

УДК 576.316.3: 547.963.32

И.Э.Ушал (5 курс СПбГТУ, каф. ФХОМ), Б.Н.Кудрявцев д.б.н. (ИнЦ РАН)

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК В ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ХРОМОСОМАХ ЧЕЛОВЕКА

Известно, что ДНК играет определяющую роль в явлениях наследственности.

В настоящее время получено огромное количество данных, характеризующих размер генома у различных видов животных и растений. В то же время сведения о содержании ДНК и ее вариабельности в норме и при патологии в индивидуальных хромосомах, составляющих кариотип какого-либо вида, крайне ограничены и относятся главным образом к хромосомам человека. Данных же о содержании ДНК и ее вариабельности в отдельных участках хромосом еще меньше (в основном они относятся к ЯОР и гетерохроматиновым).

Существующие методы определения содержания ДНК в индивидуальных хромосомах кариотипа обладают целым рядом недостатков. Методы проточной цитометрии, наиболее часто используемые для измерения содержания ДНК в хромосомах, несмотря на их высокую производительность и точность, не позволяют измерять содержание ДНК в отдельных участках хромосом. Кроме того, для получения надежных результатов с помощью этих методов требуется наличие большого количества хромосом, что достижимо далеко не всегда. Недостатки методов абсорбционной и флуоресцентной цитофотометрии при измерении содержания ДНК в хромосомах связаны, прежде всего, с их низкой производительностью и большой трудоемкостью. В связи с этим разработка новых методов, позволяющих достаточно быстро измерять содержание ДНК в индивидуальных хромосомах или их отдельных участках, остается весьма актуальной задачей.

В настоящей работе предложен новый метод определения содержания ДНК в индивидуальных хромосомах человека. Метод включает три последовательных этапа: 1) идентификацию хромосом на предметных стеклах, используя их дифференциальное окрашивание Хехст 33258 с контрастированием актиномицином Д, 2) обработку хромосом по Фельгену с помощью реактива типа Шиффа аурамина-SO₂, 3) микрофлуориметрию содержания ДНК в хромосомах.

Препараты метафазных хромосом получали из лимфоцитов периферической крови человека по общепринятой методике. С помощью анализатора изображений «Видеотест», состоящего из микроскопа ЕС ЛЮАМ РПО11, цифровой ПЗС-видеокамеры СРТ 8360 и компьютера Р166, изображения метафазных пластинок записывали в базу данных компьютера. После идентификации хромосом Хехст 33258 удаляли смесью метанола ледяной уксусной кислоты и воды (1:1:1) и окрашивали препараты по Фельгену используя реактив типа Шиффа – аурамин SO₂. Измерение содержания ДНК в идентифицированных хромосомах проводили также с помощью анализатора изображений «Видеотест», используя программу «ВидеоТест-Морфо 3.2». Статистическую обработку данных проводили в программе «Excel». Содержание ДНК в индивидуальных хромосомах кариотипа человека представляли в виде отношения к содержанию ДНК в хромосоме 2.

Сравнение результатов определения содержания ДНК в хромосомах человека, полученных с помощью метода телевизионной флуориметрии свидетельствует о том, что они хорошо совпадают с данными, полученными другими методами.

Таким образом, разработан микрофлуориметрический метод определения содержания ДНК в хромосомах человека по точности не уступающий ранее известным методам, но являющийся менее трудоемким. Исследование кариотипа одного человека данным методом может быть осуществлено за 5 дней (включая культивирование лимфоцитов в течение 72 часов, оба варианта окраски и непосредственно измерения). Кроме того, использование ком-

пьютера позволяет вернуться к препаратам и уточнить возникшие вопросы, что иногда бывает необходимо.