

Метод приготовления препаратов пахитенных хромосом *A. fistulosum* для последующей иммунодетекции мейотических белков

Научный руководитель – Хрусталева Людмила Ивановна

Кудрявцева Н.А.¹, Ермолаев А.С.²

1 - Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия, *E-mail: natalia.kudryavtseva92@gmail.com*; 2 - Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия, *E-mail: ermol-2012@yandex.ru*

Современные методы молекулярной цитогенетики, такие как гибридизация *in situ* (ISH) или иммунолокализация, требуют получения высококачественных препаратов хромосом. На высококачественных препаратах хромосомы должны быть расположены на достаточном расстоянии друг от друга для облегчения анализа результатов ISH или иммунолокализации.

Пахитенные хромосомы в 7–40 раз длиннее метафазных хромосом, что затрудняет получение хороших препаратов хромосом. В последние годы были разработаны различные протоколы приготовления препаратов мейотических хромосом для последующей иммунодетекции белков. Однако эти протоколы оптимизированы для видов с небольшим геномом или короткими хромосомами, как например, *Arabidopsis arenosa* ($2n = 2x = 16$; 150 Mb) [1], *Brassica napus* ($2n = 4x = 38$; 921 Mb) [2] или томат ($2n = 2x = 10$; 900 Mb) [3].

Виды рода *Allium* известны своими большими геномами ($2n = 2x = 16$; 16 000 Mb) и хромосомами, которые являются одними из самых больших среди овощных культур [4]. Существующие методы приготовления препаратов пахитенных хромосом для последующей иммунодетекции имеют ограничения для видов с большими хромосомами, из-за образования спутанных «клубков» хромосом, что усложняет анализ индивидуальных хромосом.

Мы разработали протокол, который позволяет получить высококачественные препараты пахитенных хромосом лука, пригодные для иммунодетекции мейотических белков. Хороший разброс хромосом был достигнут за счет использования фиксатора Кларка и 45% уксусной кислоты при раздавливании материнских клеток пыльцы (РМС). Мы успешно протестировали протокол на РМС *A. fistulosum* для визуализации белка ZYP1 (поперечные филаменты синаптонемного комплекса). На полученных препаратах мы смогли проследить каждую отдельную хромосому *A. fistulosum* от теломеры к теломере. Анализ результатов показал отсутствие значительного растяжения хромосом.

Разработанный протокол может иметь широкое применение в исследованиях по локализации мейотических белков для видов с крупными геномами и хромосомами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ проекта № 24-76-10037.

Источники и литература

- 1) Higgins J. Cytological techniques to analyze meiosis in *Arabidopsis arenosa* for investigating adaptation to polyploidy / J.D. Higgins, K.M. Wright, K. Bomblies, F.C. Franklin // *Frontiers in plant science*. – 2014. – Т. 4. – С. 546.
- 2) Chelysheva L. A. Immunolocalization of meiotic proteins in Brassicaceae: method 1 / L. A. Chelysheva, L. Grandont, M. Grelon // *Plant meiosis: methods and protocols*. – 2013. – С. 93-101.

- 3) Anderson L. K. Combined fluorescent and electron microscopic imaging unveils the specific properties of two classes of meiotic crossovers / L. K. Anderson, L. D. Lohmiller, X. Tang, M. Falque // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – Т. 111. – №. 37. – С. 13415-13420.
- 4) Shukla S. The onion genomic resource: A genomics and bioinformatics driven resource for onion breeding / S. Shukla, M.A. Iquebal, S. Jaiswal, U.B. Angadi, S. Fatma, N. Kumar, R. S. Jasrotia, Y. Fatima, A. Rai, D. Kumar // Plant Gene. – 2016. – Т. 8. – С. 9-15.