ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДИМИНУЦИИ ХРОМАТИНА У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ПОДОТРЯДА Cyclopoida

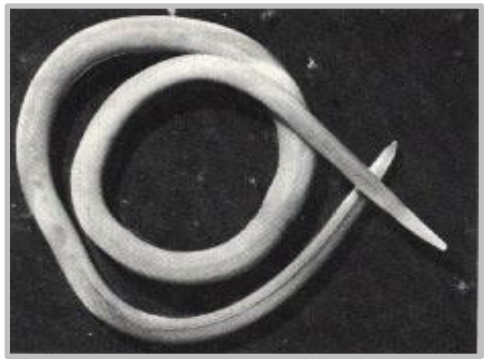
Алексеева Анастасия Леонидовна

Научный руководитель:

академик РАН, д.б.н. И.Ф. Жимулев

Лаборатория молекулярной цитогенетики ОМКБ ИХБФМ СО РАН

Распространенность диминуции хроматина



Ascaris suum

Stylonychia mytilus

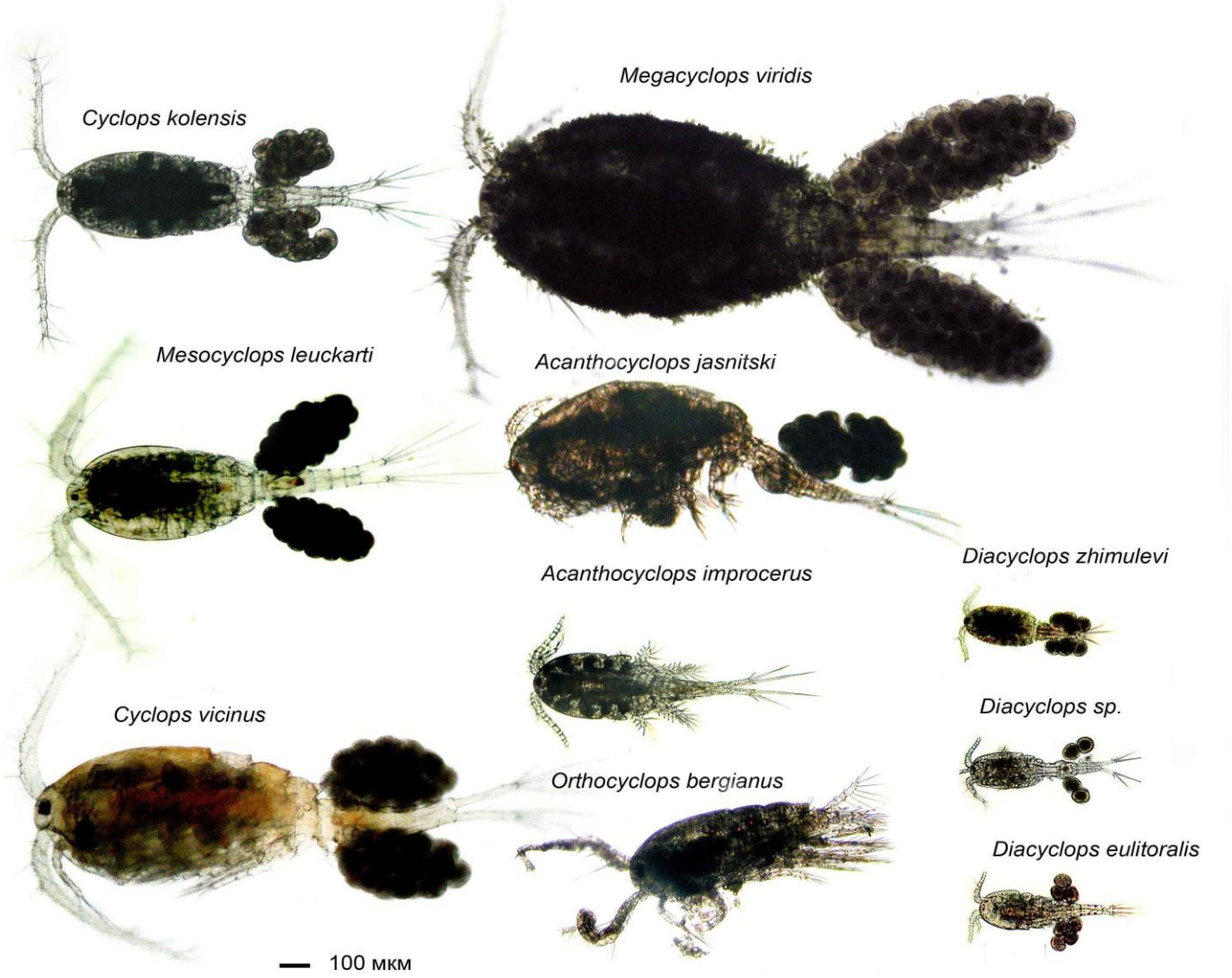
Cyclops kolensis

Miastor metraloas

Eptatretus okinoseanus

Dicyrtomina ornata

Диминуция хроматина у циклопов



Кирильчик С.В., 2008

Цель и задачи работы

Целью дипломной работы являлось определение наличия или отсутствия диминуции хроматина у некоторых видов подотряда Cyclopoida, а также определение содержания ДНК в гаплоидном геноме этих видов до и после диминуции хроматина.

- **Отработка модифицированного метода оценки количества ДНК в ядрах, окрашенных по Фёльгену, с применением цифровой фотокамеры, на клетках (мазках) крови стандартных объектов, для которых содержание ДНК в гаплоидном геноме хорошо известно.**

- **Определение количества ДНК в геномах двух наиболее изученных видов циклопов: *Cyclops kolensis* и *Cyclops insignis*, с использованием окрашивания по Фёльгену ядер ранних эмбриональных клеток (на стадии от 1 до 16 клеток), поздних эмбриональных клеток (от 128 клеток) и ядер клеток соматических тканей (постдиминуционные ядра) исследуемых видов циклопов с применением разработанного метода.**

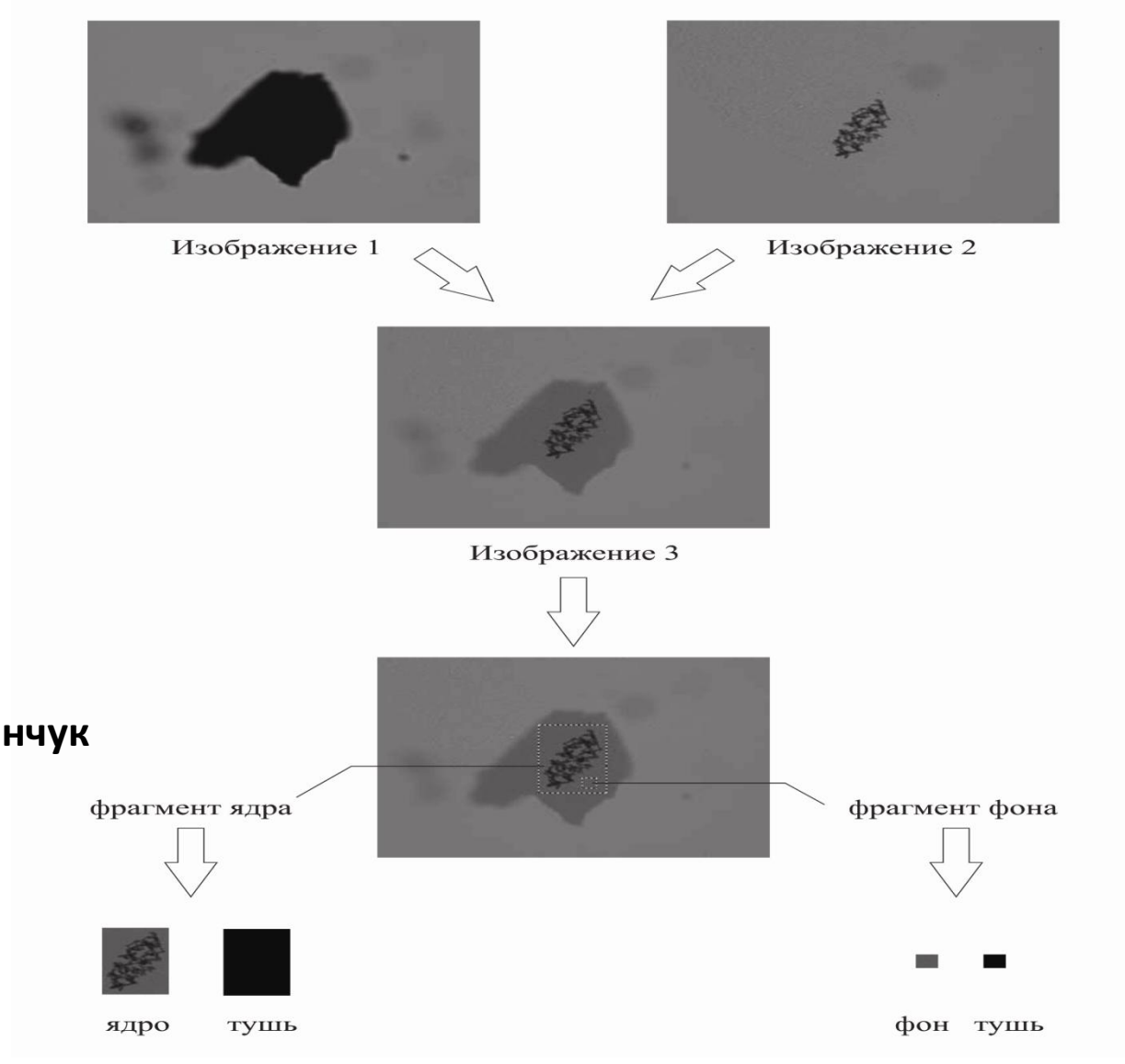
- **Выяснение наличия или отсутствия диминуции хроматина у ранее неизученных видов подотряда Cyclopoida и оценка абсолютных значений размеров их геномов до и после диминуции хроматина на основании полученных данных.**

Сбор биологического материала

Апрель 2009-2010 гг.	Марьинский пруд на Воробьевых горах, г. Москва
Август 2009-2010 гг.	озеро Байкал (вблизи стационара
Март 2010 г.	Лимнологического института СО РАН, п. Большие Коты)
Декабрь 2009 г.	искусственный водоем ИЦГ СО РАН, г. Новосибирск

Определение видов циклопов – с.н.с. ЛИН СО РАН Шевелёва Н.Г.

Схема получения изображений в экспериментах по оценке количества ДНК в ядрах, окрашенных по Фёльгену, с применением метода цифровой микрофотографии



д.б.н. Л.В. Омельянчук

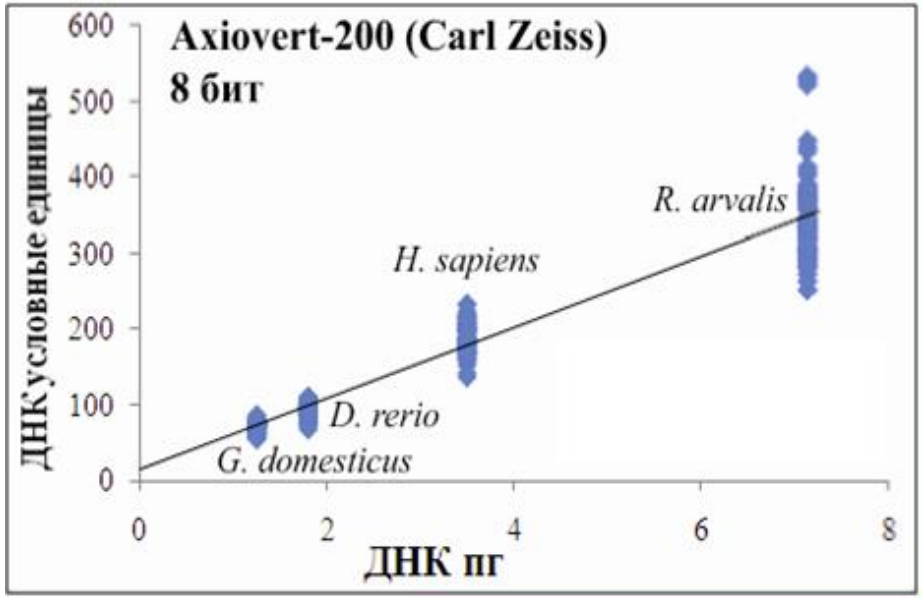
Mathcad, version 14.0.0.163 (Parametric Technology Corporation, США)

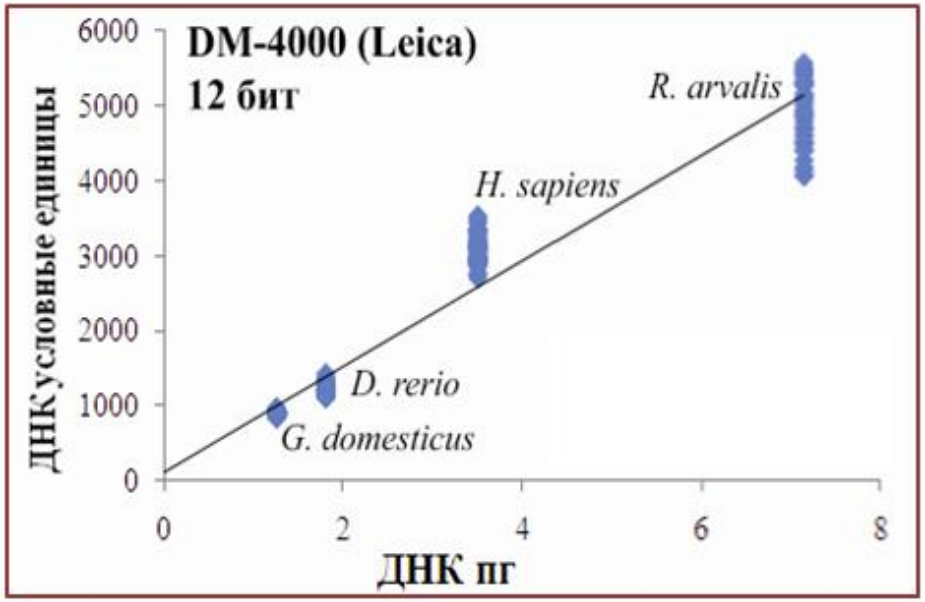
Контрольные объекты

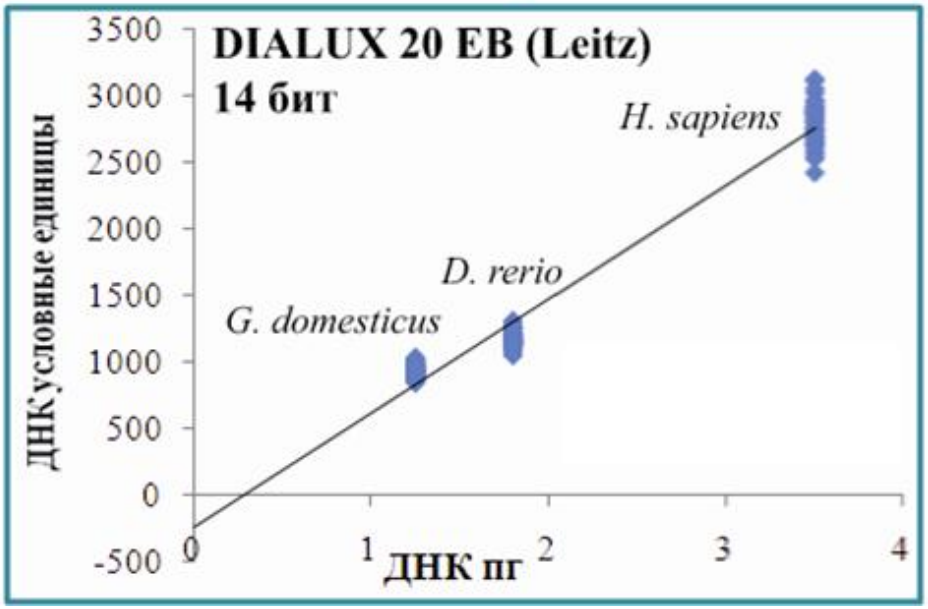
Вид	ДНК, пг	Тип клеток
Danio rerio	1.68-1.80	Эритроциты
Homo sapiens	3.50	Лейкоциты
Rana arvalis	4.65-7.17	Эритроциты
Gallus domesticus	1.25	Эритроциты

Содержание ДНК в гаплоидном геноме (1C) согласно базе данных Animal Genome Size Database (http://www.genomesize.com).

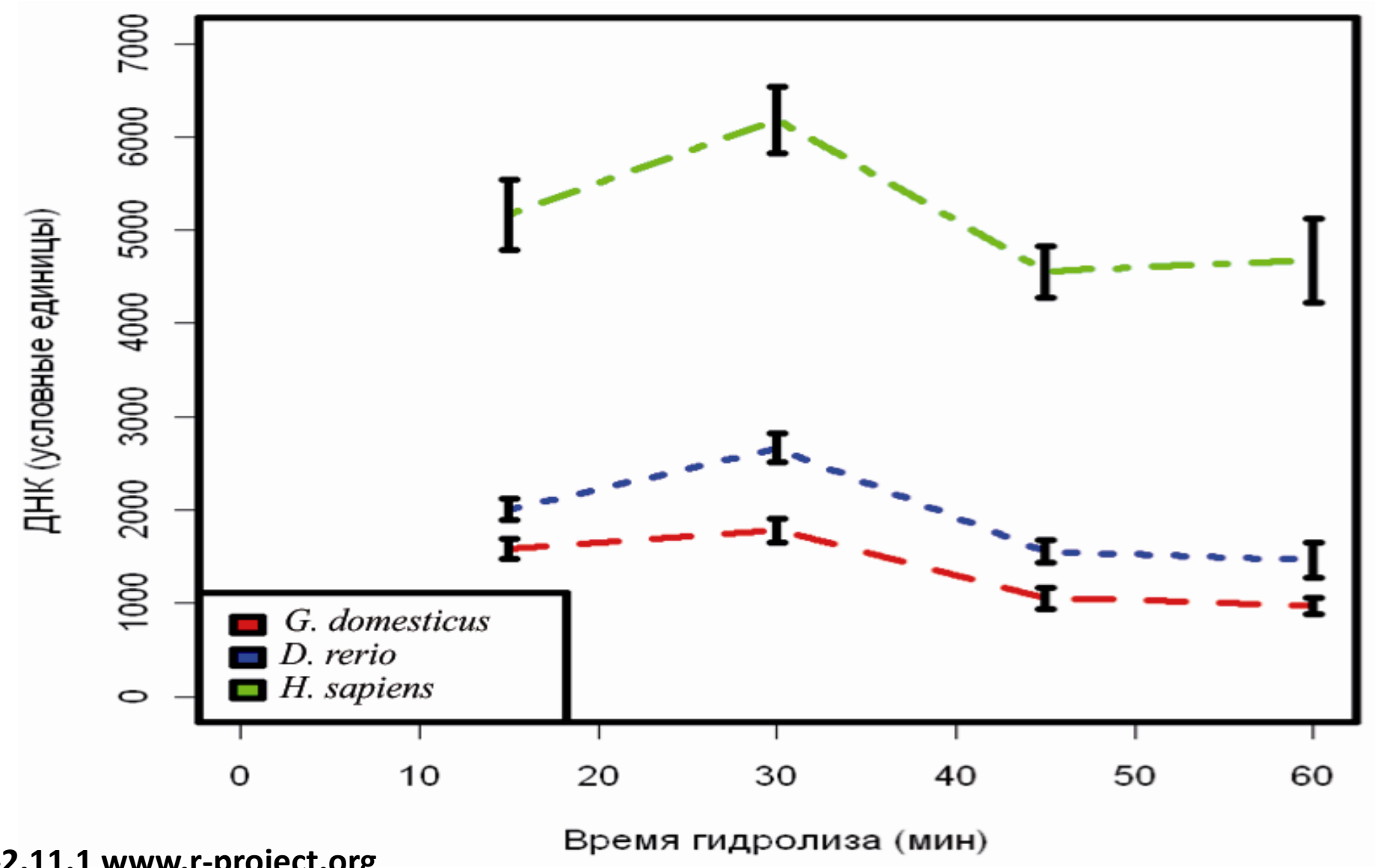
Калибровочные графики для контрольных объектов





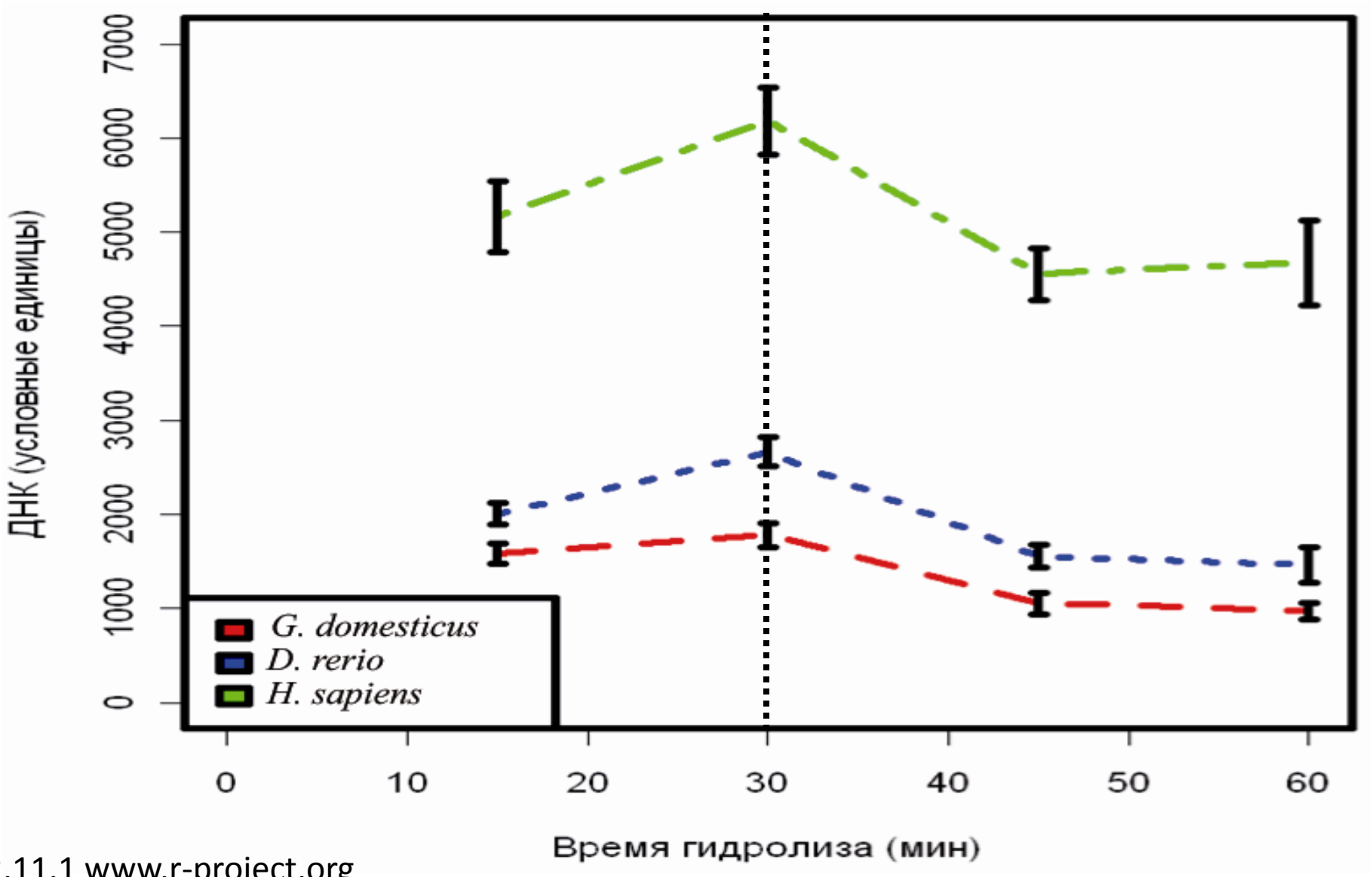


Кривые зависимости содержания связанного с клеточным ядром красителя Фельгена от времени гидролиза ДНК (контрольные объекты)



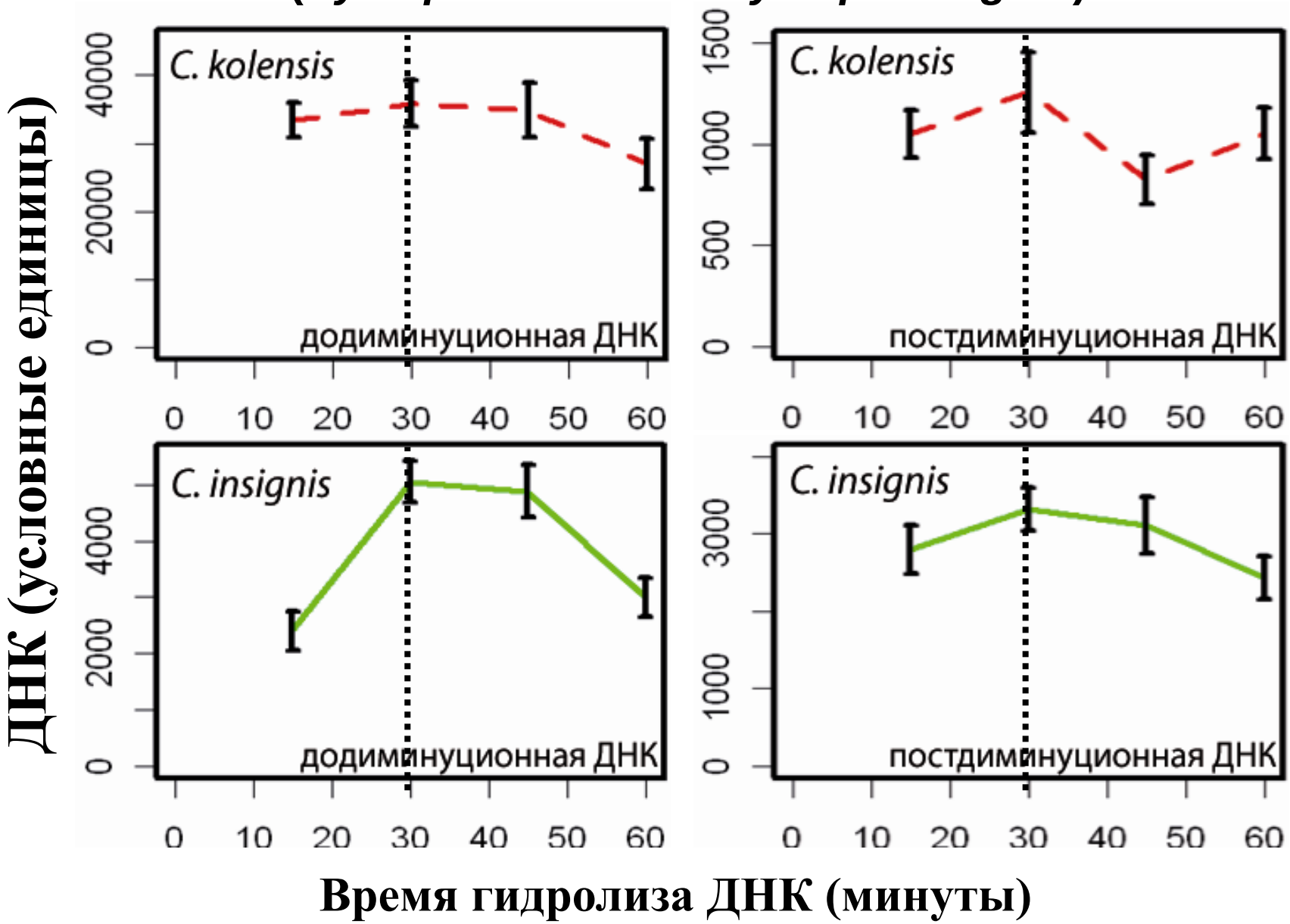
R-2.11.1 www.r-project.org

Кривые зависимости содержания связанного с клеточным ядром красителя Фельгена от времени гидролиза ДНК (контрольные объекты)



R-2.11.1 www.r-project.org

Кривые зависимости содержания связанного с клеточным ядром красителя Фельгена от времени гидролиза ДНК (*Cyclops kolensis* и *Cyclops insignis*)



Количество ДНК в клетках *Cyclops kolensis* и *Cyclops insignis* до и после диминуции хроматина (пг)

Вид циклопа (популяция)	Додиминуционное развитие			Постдиминуционное развитие		Элиминируемая ДНК, %
	Анафаза, 2С	Метафаза, 4С	Направительные тельца, 1С	Поздние эмбрионы, 2С	Ноги, имаго, 2С	
C. kolensis (московская поп.)	**39,9** σ=3,5 n=28	**80.8** n=1	**21,2** σ=1,27 n=23	д.о.	**1,82** σ=0,24 n=18	**95,4-95,7**
C. kolensis (московская поп.)	**41,5** σ=3,6 n=69	**84,8** σ=8,3 n=44	д.о.	д.о.	**1,98** σ=0,18 n=14	**95,2-95,3**
C. kolensis (московская поп.)	**40,6** σ=3,6 n=38	**80,9** σ=6,9 n=177	**20,6** σ=2,8 n=28	**1,6** σ=0,12 n=13	**1,77** σ=0,17 n=38	**95,6-96,1**
C. kolensis (байкальская поп.)	**40,7** σ=3,4 n=3	**85,6** σ=10,8 n=49	д.о.	**1,66** σ=0,36 n=24	**1,52** σ=0,28 n=50	**96,1-96,4**
C. kolensis (байкальская поп.)	д.о.	**106,5** σ=15,1 n=8	**18,9** σ=4,0 n=7	**2,02** σ=0,45 n=43	**2,08** σ=0,43 n=50	**96,2**
C. insignis (московская поп.)	**7,5** σ=0,46 n=51	**14,9** σ=1,04 n=120	**3,7** σ=0,44 n=19	Анафаза **7,4** σ=0,34 n=30 Метафаза **14,2** σ=1,0 n=50	**6,81** σ=0,36 n=74	**0,9-8,0**

Количество ДНК в клетках *Cyclops kolensis* московской популяции до и после диминуции хроматина

Дата (авторы) / Кол-во ДНК (1С, пг)	2011 г. (наши данные)	1996 г. (А.К. Гришанин)	2010 г. (А.К. Гришанин, М. В. Загоскин)
ДО диминуции хроматина	**20,49**±1,89	**2,3**±0,05	**15,3**±3,1
ПОСЛЕ диминуции хроматина	**0,90**±0,11	**0,14**±0,02	**0,98**±0,13

Количество ДНК в клетках *Cyclops kolensis* байкальской популяции до и после диминуции хроматина

Дата (авторы) / Кол-во ДНК (1С, пг)	2011 г. (наши данные)	2006 г. (А.К. Гришанин)
ДО диминуции хроматина	**18,93**±4,02 – **26,63**±3,77	**2,3**±0,04
ПОСЛЕ диминуции хроматина	**1,03**±0,22	**0,085**±0,002

Количество ДНК в геноме вида *Cyclops insignis*

Дата (авторы) / Кол-во ДНК (1С, пг)	2011 г. (наши данные)	2008 г. (А.К. Гришанин)
ДО и ПОСЛЕ диминуции хроматина	**3,62**±0,27	**2,10**±0,04 - **2,15**±0,05

Количество ДНК в ядрах клеток ранее неизученных видов циклопов (пг)

Вид циклопа (популяция)	Додиминуционное развитие		Постдиминуционное развитие		Элиминируемая ДНК, %
	Анафаза, 2С	Метафаза, 4С	Поздние эмбрионы, 2С	Ноги, имаго, 2С	
M. leuckarti (байкальская поп.)	**2,25** σ = 0,37 n = 20	**3,9** σ = 0,46 n = 8	**1,94** σ = 0,34 n = 21	**1,68** σ = 0,31 n = 32	**Не обнаружена**
A. vernalis (новосибирская поп.)	**д.о.**	**д.о.**	**1,92** σ = 0,44 n = 39	**д.о.**	**д.о.**
E. serrulatus baicalocorrepus (байкальская поп.)	**д.о.**	**д.о.**	**3,8** σ = 1,06 n = 8	**3,36** σ = 0,28 n = 50	**д.о.**
D. eulitoralis (байкальская поп.)	**д.о.**	**д.о.**	**1,8** σ = 0,56 n = 8	**1,47** σ = 0,57 n = 5	**д.о.**
A. konstantini (байкальская поп.)	**д.о.**	**д.о.**	**д.о.**	**1,83** σ = 0,43 n = 20	**д.о.**
A. profundus tomilovi (байкальская поп.)	**д.о.**	**д.о.**	**д.о.**	**3,18** σ = 0,28 n = 12	**д.о.**
A. elegans (байкальская поп.)	**д.о.**	**д.о.**	**д.о.**	**1,3** σ = 0,25 n = 28	**д.о.**
C. bicolor (байкальская поп.)	**д.о.**	**д.о.**	**1,68** n = 1	**1,28** σ = 0,23 n = 14	**д.о.**

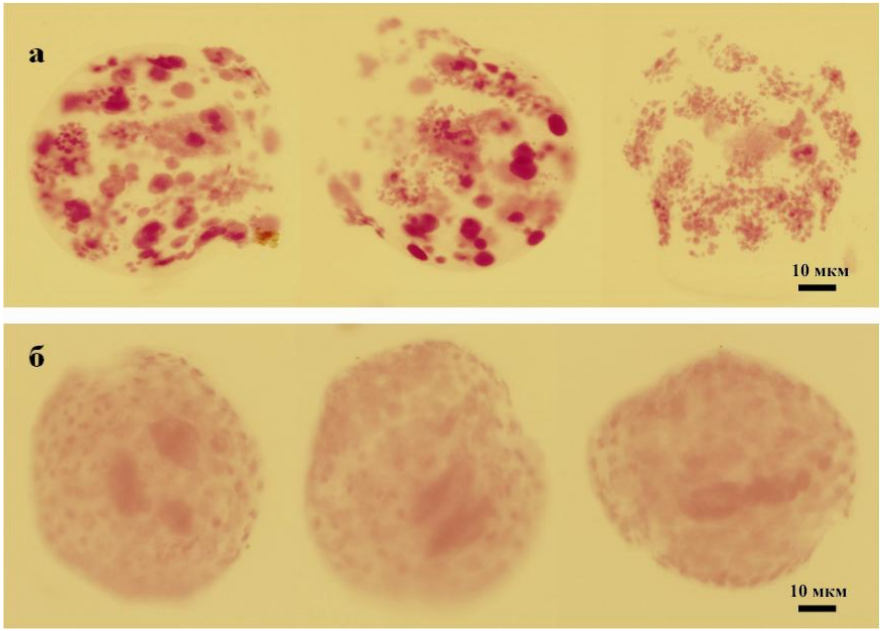
Размеры до- и пост- диминуционных геномов ранее неизученных видов циклопов (пг)

M. leuckarti **(байкальская поп.)**	**1,09**±0,18
	0,89±0,17
E. serrulatus baicalocorrepus **(байкальская поп.)**	**-**
	1,71±0,24
D. eulitoralis **(байкальская поп.)**	**-**
	0,84±0,28
A. profundus tomilovi **(байкальская поп.)**	**-**
	1,59±0,14
A. vernalis **(новосибирская поп.)**	**-**
	0,96±0,22
A. konstantini **(байкальская поп.)**	**-**
	0,91±0,21
A. elegans **(байкальская поп.)**	**-**
	0,65±0,12
C. bicolor **(байкальская поп.)**	**-**
	0,64±0,11

Количество ДНК в ядрах клеток ранее неизученных видов циклопов (пг)

Вид циклопа (популяция)	Додиминуционное развитие			Постдиминуционное развитие		Элиминируемая ДНК, %
	Анафаза А, 2С	Метафаза М, 4С	Интерфаза	Поздние эмбрионы, 2С	Ноги, имаго 2С	
A. incolotaenia (байкальская поп.)	**45,0** δ=3,6 n=8	**98,5** δ=10,4 n=20	**д.о.**	**2,5** δ=0,30 n=60	**1,92** δ=0,29 n=27	**94,5-96,1%**
Diacyclops sp (байкальская поп.)	**д.о.**	**д.о.**	**8,77** δ=1,13 n=13	**0,91** n=2	**0,94** δ=0,15 n=24	**Не менее 57,1-58,5%**

Диминуция хроматина у байкальского вида *A. incolotaenia*



22,49±1,81 – **24,63**±2,60 пг

1,16±0,20 пг

94,5-96,1%

Диминуция хроматина у байкальского вида *Diacyclops sp.*

Интерфаза 32 клетки	Размер постдиминуционного генома	% элиминируемой ДНК
8,77±0,09	**0,47**±0,003	**Не менее 57,1%**

Стадия прохождения диминуции не установлена

Выводы

- Отработан модифицированный метод оценки количества ДНК в ядрах, окрашенных по Фёльгену с применением цифровой микрофотографии.

- Получена оценка абсолютных значений размеров геномов до и после диминуции хроматина для байкальской и московской популяций вида *Cyclops kolensis* и московской популяции вида *Cyclops insignis. У*становлено, что в ходе диминуции хроматина у вида *Cyclops kolensis* элиминируется 95-96% ДНК, и диминуция хроматина у вида *Cyclops insignis* отсутствует.

- Определены размеры постдиминуционных геномов для видов: *E. serrulatus baicalocorrepus* – 1,71±0,24 пг, *D. eulitoralis* – 0,84±0,28 пг, *A. konstantini* – 0,91±0,21 пг, *A. elegans* – 0,65±0,12 пг, *A. profundus tomilovi* – 1,59±0,14 пг, *C. bicolor* – 0,64±0,11 пг, *A. vernalis* – 0,96±0,22 пг.

Выводы

- Установлено, что у байкальского вида *M. leuckarti* диминуция хроматина отсутствует, и размер генома составляет 0,96±0,20 пг.

- Впервые установлено наличие диминуции хроматина у байкальских видов *A. incolotaenia* и *Diacyclops. sp.* Получены оценки размеров до- и пост- диминуционных геномов для вида *A. incolotaenia.* Для *Diacyclops. sp.* установлен размер постдиминуционного генома, и получена оценка уровня диминуции – не менее 57%.

Публикации

- Омельянчук Л.В., Семешин В.Ф., Алексеева А.Л., Пальчикова И.Г., Жимулев И.Ф. Интегральный метод измерения количества ДНК в клетке, с использованием цифровой микрофотографии // Цитология. 2010. Т. 54. Вып. 4. С. 349-353.

- Семешин В.Ф., Омельянчук Л.В., Алексеева А.Л., Иванкина Е.А., Шевелева Н.Г., Жимулев И.Ф. Содержание ДНК в ядрах *Cyclops kolensis* и *C. insignis* (Crustacea, Copepoda) // Цитология. 2011. Т. 53. Вып. 3. С. 77-81.

Автор выражает благодарность

- академику РАН Игорю Федоровичу Жимулеву
- д.б.н. Валерию Федоровичу Семешину
- д.б.н. Леониду Владимировичу Омельянчуку

- д.б.н. Аксенович Татьяне Иосифовне

<u>Автор также благодарит за помощь в сборе материала и обсуждение работы</u>

д.б.н. Людмилу Васильевну Высоцкую

ОМКБ ИХБФМ СО РАН	ИОГен РАН	ЛИН СО РАН	КТИ НП СО РАН	ИЦиГ СО РАН
Гончарова Ф.П.	Гришанина А.К.	Кирильчика С.В.	Пальчикову И.Г.	Васильеву Л.А.
Гусельникова С.В.	Загоскина М.А.	Купчинского А.Б.	Смирнова Е.С.	
Иванкину Е.А.	Муху Д.В.	Ханаева И.В.		
Иванкина А.В.		Шевелёву Н.Г.		