

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ  
имени В.А. ЭНГЕЛЬГАРДА**

**На правах рукописи**

**Зошук Наталья Викторовна**

**ХРОМОСОМНЫЙ АНАЛИЗ:  
ИСТОРИЯ, СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ. МЕТОДЫ,  
РАЗВИТИЕ И ПЕРИОДИЗАЦИЯ**

**03.00.03 - Молекулярная биология**

**07.00.10 - История науки и техники**

**Автореферат**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва 2004**

Работа выполнена в Лаборатории функциональной морфологии хромосом Института молекулярной биологии имени В.А.Энгельгардта Российской академии наук.

**Научные руководители:**

Доктор биологических наук, профессор А.В. Зеленин.

Доктор биологических наук Е.Д. Бадаева.

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук Е.А. Ляпунова

Доктор биологических наук В.И. Попенко

**Ведущая организация:**

Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В.

Ломоносова

Защита диссертации состоится 27 мая 2004 г. в 12<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета 002.235.01 в Институте молекулярной биологии имени В.А.

Энгельгардта РАН по адресу:

119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии им.

В.А. Энгельгардта РАН.

Автореферат разослан 23 апр 2004г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат химических наук



А.М. Крицын

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Хромосомный анализ - мощный инструмент молекулярной биологии и генетики, направленный на изучение генома. Его история насчитывает свыше ста лет - с тех пор, как В. Флемминг в 1879 году впервые наблюдал продольное растепление хромосом при делении клетки аксолотля. В последующие годы хромосомы были обнаружены и описаны у множества самых разнообразных объектов как животного, так и растительного происхождения. Достиженные успехи определялись в первую очередь совершенствованием оборудования и методик приготовления хромосомных препаратов. Первостепенное значение имело развитие техники микроскопирования и усовершенствование самих микроскопов. Естественно, что в течение всего этого времени неоднократно предпринимались попытки рассмотрения истории хромосомного анализа и определения его места в биологии и медицине (С.Г.Навашин, 1916. 1921; Левицкий, 1931; White, 1978; Дарлингтон, Ла Кур, 1980; Восток. Самнер, 1981; Прокофьева-Бельговская, 1986; Hsu 1992, 1995). В то же время, последнее десятилетие ознаменовалось стремительным прорывом в развитии науки, связанным с расшифровкой генома человека и ряда других видов животных, растений и микроорганизмов. Таким образом, созданные ранее классификации хромосомного анализа по ряду объективных причин не могли охватить достижений молекулярной биологии последних лет. С другой стороны, прогресс в определении первичной структуры генома лег в основу создания принципиально новых методов и подходов к изучению хромосом. В связи с перечисленными фактами, назрела насущная необходимость пересмотра истории хромосомного анализа в свете современных представлений и определения его места в биологической науке сегодняшнего дня. Это и послужило целью диссертационной работы.

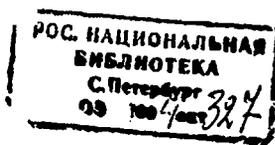
Цель работы.

Цель работы состояла в рассмотрении истории хромосомного анализа с учетом достигнутого прогресса в исследованиях геномов, выделении отдельных периодов его развития и определении наиболее перспективных направлений. Для этого были решены следующие задачи:

- описаны ключевые этапы развития хромосомного анализа за весь период его существования;
- рассмотрены основные методы исследования хромосом, охарактеризованы наиболее широко используемые их модификации, описаны история создания и области применения;
- определено место и роль хромосомного анализа в геномную эру;
- выделены основные этапы развития хромосомного анализа.

Научная новизна и практическая значимость.

В работе сформулировано положение о современном хромосомном анализе, его месте в геномных исследованиях ближайшего будущего и влиянии на его техническое обеспечение современных геномных исследований и новых технологий



Рассмотрены ключевые события в истории хромосомного анализа. Обоснована невозможность выделения четких временных границ в его развитии, поскольку появление новых и усовершенствование существовавших технологий зачастую идет одновременно. Показано, что его успехи в последние годы определялись преимущественно достижениями молекулярной биологии и генетики.

Показано, что успех хромосомного анализа в первую очередь определяется выбором методов и объектов, наиболее соответствующих поставленным целям. В связи с этим, проведена систематизация современных методов хромосомного анализа и составлен справочный материал, облегчающий выбор адекватных подходов для решения конкретных задач.

Развитие и современное состояние хромосомного анализа подробно рассмотрены на примере исследований, проводимых в Лаборатории функциональной морфологии хромосом Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Материалы диссертации могут быть использованы при подготовке лекционного материала и практических занятий на кафедрах генетики и молекулярной биологии различных учебных заведений. Они представляют интерес также для экспериментальных лабораторий, поскольку знание истории хромосомного анализа позволит более осмысленно подойти к выбору наиболее адекватных подходов для решения конкретных задач.

#### **Апробация работы.**

Материалы работы были представлены на IV Совещании по кариологии и кариосистематике растений, С-Петербург, Россия (1999) и на Всероссийской конференции «От двойной спирали до генома человека». Москва, Россия (2004).

#### **Структура и объем диссертационной работы.**

Диссертация состоит из введения, общего очерка истории хромосомного анализа, заключения, выводов и списка литературы. В обзорной части перечислены ключевые события в развитии хромосомного анализа дана сравнительная оценка методов дифференциального окрашивания хромосом, включая обсуждение его молекулярных механизмов. Далее охарактеризованы другие методы исследования хромосом, включая гибридизацию *in situ* и микродиссекцию. В отдельной главе рассмотрены особенности хромосомного анализа растений на примере работ, проводимых в Лаборатории функциональной морфологии хромосом Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Диссертация изложена на страницах машинописного текста и иллюстрирована рисунками и таблицами. Библиография включает цитированных работ, из них зарубежных источников. По теме диссертации опубликовано 6 статей в отечественных научных журналах.

### **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.**

#### **Развитие хромосомного анализа, возможность периодизации.**

История хромосомного анализа насчитывается свыше 120 лет. Первым исследованием в этой области явилась работа В. Флемминга (1879), который впервые наблюдал продольное

расщепление хромосом при делении ооцитов аксолотля. Два года позже он предложил термин «митоз» для обозначения процесса деления клетки. С конца 70-х гг. XIX века поведение хромосом изучалось многими исследователями, но наиболее значимый вклад в эту область внесли Э. Страсбургер и В. Флемминг. Первый период развития хромосомного анализа в целом ознаменовался установлением самого факта существования хромосом и их описанием.

Новый этап начался в 1903 - 1904 гг., когда В. Стэттон и Т. Бовери показали, что именно хромосомы могут являться материальными носителями менделевских факторов наследственности. В 20-30-е гг. XX в. прогресс хромосомного анализа определялся в основном изучением растительных объектов: сравнительная кариология растений резко опережала сравнительную кариологию животных. Этим она обязана трудам С. Г. Навашина, Т. Сакамуры и Г. А. Левицкого. Именно С. Г. Навашин впервые показал возможность различать хромосомы по особенностям их строения. Большое значение в кариосистематике растений сыграли также труды Г. А. Левицкого. В 1931 году вышла в свет его работа «Морфология хромосом», в которой он предложил новую методику фиксации и окраски для изучения хромосом культурных (ржи, ячменя, гороха, пшеницы, сахарной свеклы) и некоторых классических в цитологическом отношении растений (*Najas*, *Muscari*). В круг интересов ученого входили вопросы систематики и эволюции. Г. А. Левицкий - один из основателей радиационной генетики растений. Он ввел термин и развил учение о кариотипе.

Отдельное место в этот период занимало изучение нетипичных хромосом. В 1881 году Бальбиани описал гигантские политенные хромосомы слюнных желез личинок двукрылых (*Chironomus*), а Флемминг, исследуя ооциты аксолотля, обнаружил хромосомы типа ламповых щеток. На протяжении последующих лет в основном совершенствовались лишь методики выделения таких хромосом из ядер.

Успехи хромосомного анализа конца XIX - начала XX века определялись в первую очередь совершенствованием оборудования. Именно к этому моменту был создан микроскоп позволяющий достигнуть разрешения порядка 0,2 мкм. Последующие сто лет стали веком его дальнейшего усовершенствования, а также разработки и внедрения новых вариантов микроскопической техники. Параллельно этому совершенствовались методики приготовления препаратов. В 60 - 80-е гг. XIX в. были подобраны и внедрены в практику консервирующие жидкости (фиксаторы) и клеточные красители, создание которых продолжается до сих пор.

Следует отметить, что именно разработка новых способов приготовления препаратов имела ключевое значение для развития хромосомного анализа. Долгое время хромосомы как животных, так и растений изучали на тканевых срезах. Такие препараты содержали в основном разрушенные митозы, хромосомы накладывались одна на другую, образуя клубки, плохо поддающиеся анализу. Технологии, основанные на использовании суспензий клеток (человек и животные) или приготовлении давленных препаратов (растения) позволили преодолеть эти трудности.

В 30-40-х гг. XX века появились первые сведения о возможности идентификации хромосом, основанной на неоднородности их окрашивания, хотя тогда эти методы не нашли практического применения в цитогенетике. В это время был впервые описан так называемый холодовой гетерохроматин (H-сегменты), под которым подразумевали участки метафазных хромосом в соматических клетках некоторых видов растений и амфибий, которые слабо прокрашиваются основными красителями после охлаждения клеток до температуры 0—3°C в течение 3 - 5 суток (Darlington, La Cour, 1940; Callan, 1942). Несколько позже было показано, что рентгеновское облучение в комбинации с холодной обработкой приводит к необычной степени дифференциации - гетерохроматических участков хромосом *Trillium*, *Tradescantia*, *Vicia*, особенно вблизи центромеры (Darlington, La Cour, 1945; Kurabayashi, 1953). Неоднородное окрашивание хромосом растений получали и при обработке корешков солями тяжелых металлов (Элленгорн, 1940).

С конца 50-х - начала 60-х годов XX века фронт исследования хромосом и соответственно развитие хромосомного анализа переместились от растений к человеку и животным. Пора бурного развития цитогенетики человека, а затем и других млекопитающих приходится на 60-е годы. Благодаря ряду усовершенствований методик (использование в качестве материала культуры клеток, применению гипотонического раствора и колхицина [Hsu, 1952], фитагемагглютинина [Moorhead et al., 1960], приготовление тотальных препаратов, высушенных на воздухе - [Rothfels, Siminovich, 1958]) были выявлены структурные особенности аутосом и половых хромосом человека, определяемые их размерами, положением центромеры, наличием вторичных перетяжек и спутников. Как следствие, в 1956 году появилась работа Дж. Тио и А. Левана, в которой в культуре фибробластов легкого было впервые правильно определено число хромосом (46) человека. С этого момента изучением хромосом человека занимались многочисленные исследовательские группы в разных странах мира. Полученные данные были обобщены на конференции по стандартизации хромосом человека, состоявшейся в Дэнвере (США) в 1960 г. В соответствии с рекомендациями этой конференции все хромосомы человека были разделены на 7 групп и обозначены буквами: A(1-3), B(4-5), C(6-12) + X, D(13-15), E(16-18), F(19-20) и G(21-22) +Y. Номенклатура оказалась почти универсальной и не изменялась (не считая минимальных модификаций) в течение 10 лет.

Новый этап развития хромосомного анализа начался в 1968 году с появлением методов дифференциального окрашивания хромосом. По времени это совпало с другим важным методическим открытием - получением гибридов соматических клеток человека и грызуна, в которых избирательно элиминируются хромосомы человека. Возможность простой и надежной идентификации хромосом позволила использовать такие гибриды для локализации на хромосомах человека различных биохимических маркеров и соответственно кодирующих эти белки генов. Работы по картированию хромосом человека получили стремительное развитие. Уже к 1975 году на индивидуальных хромосомах человека было локализовано более 70 генов. Полученные с помощью этого подхода монохромосомные и радиационные гибриды широко используются для генетического и физического картирования геномов

человека и других организмов. К настоящему моменту на хромосомах человека локализовано около 10 тыс. генов.

Дифференциальное окрашивание хромосом.

#### 1. Q-дифференциальное окрашивание (Q-бэндинг).

Решающий вклад в развитие этой области науки внесли работы, выполненные в конце шестидесятых годов прошедшего столетия профессором Торбьёрном Касперсоном и его сотрудниками в Нобелевском институте медицинских исследований и генетики (The Nobel Institute for Medical Cell Research and Genetics), входившем в состав знаменитого Каролинского медицинского университета Стокгольма (Karolinska Institutet). В начале 1968г. в журнале «Experimental Cell Research» появилась их статья "Химическая дифференциация по длине метафазных хромосом (Chemical differentiation along metaphase chromosomes)". По праву ее можно считать основополагающей, поскольку она стала мощным стимулом для развития хромосомных исследований и технологий.

Очень скоро оказалось, что Q - метод (от англ. "quinacrine", в русском переводе акрихин), позволивший проводить полную идентификацию хромосом человека, значительно расширил возможности хромосомного анализа, в частности для диагностики некоторых наследственных заболеваний. Он мог быть использован для локализации хромосомных разрывов и границ обменов при абберациях. Рисунок флуоресценции хромосом был видоспецифичен, воспроизводим, а в дальнейшем выяснилось, что и идентичен в разных тканях организма. Заключением этой блистательной серии исследований стала итоговая статья о полной идентификации всех 24 хромосом человека (Caspersson et al., 1970). Очень скоро метод Q -бэндинга нашел широкое применение в цитодиагностике генетических заболеваний человека.

Работы Касперсона и его группы легли в основу новой номенклатуры хромосом человека, принятой на знаменитой Парижской конференции в 1971 г., которой с тех пор руководствуются генетики и цитогенетики всего мира. На ее основании были выбраны и наши "русские хромосомы" в период организации отечественной программы "Геном человека". Позже разработка и внедрение технологий высокоразрешающего бэндинга повлекли за собой необходимость уточнения номенклатуры, что и было отражено в ISCN - International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 1995. В настоящее время флуоресцентный бэндинг превратился в рутинную технику идентификации хромосом человека, животных и растений.

#### 2. C-лифференциальное окрашивание (C-бэндинг).

Разработка и внедрение Q - бэндинга стали мощным стимулом к поиску, созданию и использованию новых методов дифференциальной окраски хромосом. Неоднородность окрашивания хромосом по длине наблюдали и ранее, однако после публикации статей по Q-бэндингу на него стали обращать более пристальное внимание. Так 1970 году при проведении экспериментов по гибридизации *in situ* меченной тритием сателлитной ДНК на хромосомах мыши был случайно открыт новый метод дифференциальной окраски (Pardue,

Gall, 1970). Авторы заметили, что после денатурации и последующей ренатурации хромосомных препаратов центромерные (гетерохроматические) участки хромосом окрашивались красителем Гимза более интенсивно, чем другие. Позже процедура обработки была модифицирована (Agrighi, Hsu, 1971; 1974) и получила название С- окраски (С- от «centromeric heterochromatin», позже это стали трактовать как "constitutive" heterochromatin).

Метод С - бэндинга быстро стал ценным инструментом в руках цитогенетиков для исследования хромосом животных и человека. Работы по хромосомам растений в то время были единичными, поэтому дальнейшие усилия ученых сконцентрировались на совершенствовании процедуры С -окрашивания для анализа этих объектов. На середину 70-х - конец 80-х гг. приходится основная масса работ в этом направлении. В этот период были отработаны основные модификации метода, которые применяются до настоящего времени практически без изменений, и детально исследованы несколько объектов, в основном злаки и лилейные. Эти работы доказали видоспецифичность рисунков дифференциального окрашивания и постоянство расположения бэндов на хромосомах. В то же время, общее число изученных видов было ограниченным.

### 3. С-дифференциальное окрашивание хромосом (G-бэндинг).

Параллельно с С-дифференциальной окраской появился еще один метод, также основанный на использовании красителя Гимза и названный G-бэндингом (G - от красителя "Giemsa"). В 1971 году Э. Самнер и его коллеги с помощью предобработки препаратов в щелочах, и горячих солевых растворах получили картину чередующихся темно- и светлоокрашенных сегментов на хромосомах человека (Sumner et al., 1971). Было показано, что за исключением Y-хромосомы, G - положительные бэнды совпадают с ярко флуоресцирующими Q - бэндами. Авторы показали, что новый метод способен заменить Q-окрашивание при идентификации индивидуальных хромосом. Помимо этого. G-бэндинг обладал рядом несомненных преимуществ:

- для анализа не нужна флуоресцентная микроскопическая установка: препараты не выцветают, т.е. их можно неограниченно долго хранить;
- бэнды получаются более четкими и детальными.

Практически одновременно был предложен другой вариант метода G-бэндинга, основанный на обработке препаратов хромосом человека трипсином (Seabright, 1971). Рисунки дифференциального окрашивания, полученные с использованием этих двух модификаций, оказались практически идентичными. Вплоть до настоящего времени оба варианта G-бэндинга используются без существенных изменений.

Очень быстро G-бэндинг стал основным методом изучения хромосом человека и животных. Исследование различных видов млекопитающих, в том числе и человека, выявило видоспецифичность, воспроизводимость и индивидуальность рисунков G-окрашивания каждой хромосомы. В то же время возможность получения G - бэндов на хромосомах растений долгое время служила предметом дискуссий. Начиная с 80-х гг. появляется все больше сообщений по G- или по крайней мере G-подобной окраске хромосом растений.

причем наиболее четкие результаты были получены с помощью красителя ацетоорсеина (OR-бэндинг).

Период с конца 60-х гг. до середины 80-х характеризовался появлением новых методов дифференциального окрашивания и совершенствованием существующих. Например, возможности Q-бэндинга значительно расширились с внедрением флуорохромов, специфичных для AT (DAPI, дистамицин А, Hoechst 33258) или ГЦ пар оснований (хромомидин Аз. актиномицин D). Для выявления кинетохоров на митотических хромосомах был разработан метод, получивший название Cd-окрашивания. Среди созданных в это время методов можно перечислить и так называемую «арлекинскую окраску», позволяющую выявлять сестринские хроматидные обмены; избирательную окраску азотнокислым серебром ядрышкообразующих районов (Ag - окраска), репликативный бэндинг и ряд других. Все они нашли широкое применение в различных областях знаний, в том числе в пренатальной диагностике, судебной и спортивной медицине, мониторинге окружающей среды.

Другие методы исследования хромосом.

Наряду с дифференциальной окраской, развивались и другие способы исследования хромосом - гибридизация *in situ*, микродиссекция, причем при изучении хромосом человека и животных они успешно объединились в одну процедуру.

Гибридизация *in situ* в настоящее время является наиболее распространенным методом хромосомного анализа - за последние 10 лет с его помощью выполнено свыше половины всех работ в области молекулярной цитогенетики. Его используют для решения разнообразных задач: от прямого физического картирования последовательностей ДНК на хромосомах, идентификации хромосом и хромосомных аномалий, до анализа геномного родства и изучения процессов макроэволюции хромосом. Для анализа мелких объектов, а также исследования тонкой структуры хромосом с помощью гибридизации *in situ* используют не оптический, а электронный микроскоп (в качестве метки берут комплексы коллоидного золота с макромолекулами, специфически связывающимися с репортерными группами в ДНК-зонде).

Первой была разработана радиоактивная гибридизация *in situ* (1969-1970 гг.). В 1982 г. был предложен новый вариант гибридизации, основанный на мечении проб биотином и выявлении сигналов с помощью ферментативных систем (пероксидазы хрена или щелочной фосфотазы). Несколько позже (в 1985 г.) он был адаптирован для исследования хромосом растений. В то же время, возможности гибридизации *in situ* значительно расширились с появлением ее флуоресцентного варианта - FISH - благодаря высокому разрешению, безопасности и возможности локализации нескольких проб в одном эксперименте. Созданный изначально для картирования хромосом человека, метод флуоресцентной гибридизации *in situ* быстро нашел широкое применение в цитогенетике растений и животных.

Появление новых флуорохромов повлекло за собой необходимость совершенствования как самой микроскопической техники, так и разработки программного обеспечения для анализа таких препаратов. С другой стороны, это позволило значительно увеличить число

проб в эксперименте. Одним из наиболее ярких примеров достижений в этой области стал метод хромосомного пэйтинга. Он основан на мечении всех индивидуальных хромосом различными флуорохромами (или их сочетаниями). Картину флуоресценции регистрируют с помощью системы анализа изображения с использованием комбинации соответствующих фильтров. Компьютер считывает спектр и интенсивность флуоресценции каждой хромосомы, и в соответствие с полученными данными, присваивает ей определенный псевдоцвет.

Для проведения FISH на хромосомах необходимы зонды, специфичные для конкретных хромосом или их участков. Основным методом их получения стала микродиссекция. Сочетание технологий микродиссекции и FISH использовались при изучении политенных хромосом двукрылых и хромосом типа «ламповых теток» амфибий, митотических и мейотических хромосом млекопитающих и растений. Микродиссекция внесла существенный вклад в расшифровку генома человека, в частности позволила провести тонкое картирование отдельных хромосомных локусов. Важное место она занимала в осуществлении программы «геном риса» - хромосомно-специфичные библиотеки, которые использовались при секвенировании его генома, были получены с помощью лазерной микродиссекции. Этот метод используется при анализе геномов ячменя, ржи, сахарной свеклы, сои, сосны, табака и других видов растений.

К числу современных подходов хромосомного анализа относится проточная цитометрия - сортировка в потоке, которая позволяет с высокой частотой (до 98-99%) получать фракции индивидуальных хромосом человека и животных. С его помощью были получены многие геномные библиотеки, специфичные для индивидуальных хромосом, ставшие основным источником материала для секвенирования генома человека.

Метод пульс-электрофореза применяют в основном для анализа мелких хромосом, чьи линейные размеры лежат на грани разрешения светового микроскопа (0.1-0.18 мкм), например дрожжей. С. *elegans* и других. С его помощью были определены размеры наименьшей хромосомы кариотипа домашней курицы *Callus gallus domesticus* (-3.4 млн.пн.).

Основные методы хромосомного анализа, наиболее широко использующиеся в современной практике, приведены в таблице 1.

Таблица 1. Основные методы исследования хромосом.

Методы анализа	Области применения	Недостатки метода
Монохромное окрашивание (конец 19в. – н.в.)	Быстрый, дешевый и эффективный способ для подсчета числа и определения морфологии хромосом.	Не все хромосомы можно идентифицировать; субъективная интерпретация, основанная на точности глазомера
<b>Дифференциальное окрашивание хромосом</b>		
Q- бэндинг [Caspersson et al, 1968г.,]	Идентификация хромосом человека, животных и некоторых видов растений. Выявление хромосомных	Необходима специальная аппаратура. препараты долго не хранятся. применим для ограниченного числа объектов

	перестроек. Хорошо совместим с технологией гибридизации <i>in situ</i> .	
C- бэндинг [Arrighi, Hsu, 1971]	Выявление полиморфизма хромосом человека и животных. Основной метод при исследованиях хромосом растений.	Можно использовать не для всех видов животных и растений. Плохо совместим с технологией гибридизации <i>in situ</i> .
G- бэндинг [Sumner et al., 1971] [Seabright, 1971]	Простой, эффективный и доступный метод изучения и идентификации хромосом и выявления хромосомных перестроек у человека и животных.	Плохо воспроизводим и мало используется для изучения хромосом растений. Ограниченно пригоден для анализа сложных хромосомных перестроек.
N- бэндинг [Matsui, Sasaki, 1973]	Окрашивание участков ЯОР и некоторых типов гетерохроматина у растений	Непригоден для изучения некоторых видов растений, т.к. выявляет не все типы гетерохроматина.
Гибридизация <i>in situ</i>		
Радиоактивная [Gall, Pardue, 1969; John et al., 1969]	Прямая локализация на хромосомах последовательностей ДНК	Необходимость подсчета зерен серебра в большом числе метафазных пластинок для статистической достоверности результатов, время проявления автографов варьирует от нескольких недель до месяцев, опасность для здоровья и окружающей среды, проблемы хранения и утилизации отходов.
Ферментативная [Langer-Safer et al., 1982]	Простой и быстрый способ выявления гибридизационных сигналов.	Работа с высокотоксичными реактивами. Нельзя выявлять одновременно более 2-х зондов.
Флуоресцентная FISH [Pinkel, Straume, Gray, 1986]	Возможность локализации на хромосомах нескольких проб, высокое разрешение. Возможность усиления сигнала с помощью амплификации	Необходима соответствующая микроскопическая техника (флуоресцентный микроскоп), препараты быстро выцветают
Геномная GISH [Le et al., 1989;	Эффективный метод для изучения происхождения и	Невозможно различать очень близкие или слишком отдаленные

Anamthawat-Jonsson et al., 1990]	эволюции аллополиплоидных видов растений. Используется для локализации точек разрывов при межгеномных транслокациях.	геномы.
Спектральное карнитипирование (SKY) [Schrock et al., 1996]	Исследования макроэволюционных преобразований хромосом млекопитающих. Идентификация и анализ хромосомных перестроек разной степени сложности.	Очень дорогостоящий метод, требующий специального оборудования и программного обеспечения. Не применим для исследования растений.
Микродиссекция [Scalenghe et al., 1981]	Получение зондов, специфичных для отдельных хромосом, хромосомных плеч или их участков.	Необходимы четкие маркеры для идентификации хромосом.
Система компьютерного анализа изображения	Применим ко всем типам хромосом. Повышает надежность и объективность данных. Нет необходимости работы с фотографией.	Высокая стоимость программного обеспечения и оборудования.

Молекулярные механизмы дифференциального окрашивания.

Специального рассмотрения заслуживает обсуждение молекулярной природы различных видов дифференциального окрашивания. Создатели Q - бэндинга ошибочно предположили, что ярко флуоресцирующие полосы, появляющиеся при обработке препаратов акрихин-ипритом, представляют собой участки ДНК, обогащенные ГЦ последовательностями. Несколькими годами позже было показано, что яркая флуоресценция Q - бэндс связана с наличием в этих участках хромосом последовательностей, обогащенных АТ - повторами, причем кластерно в виде 3-4 и более АТ-пар подряд (Weisblum, De Haseth, 1972; Comings, 1978). Этот вывод был подтвержден в дальнейших исследованиях с использованием АТ- и ГЦ- специфических красителей. Оказалось, что АТ-специфические флуорохромы (Hoeschst 33258 и DAPI) дают картину, идентичную той, которая возникает при окраске хромосом акрихином. В то же время флуорохромы, специфичные для ГЦ- богатых районов, дают противоположную картину. Сказанное демонстрирует прямую зависимость Q-бэндинга от нуклеотидного состава ДНК.

Намного сложнее обстоит дело с установлением природы G-бэндинга и близких к нему методов дифференциального окрашивания. Появление G-бэндс в результате обработки препаратов трипсином дает основание предполагать, что в основе дифференцировки хромосом на участки лежат различия в их белковом составе или конфигурации белков. С

другой стороны, совпадение Q-и G-бэндов. возможно, указывает, что эти особенности белков каким-то образом связаны с нуклеотидным составом участков хромосом, в которых они располагаются. Существует точка зрения, что в основе G-бэндинга лежат различия в уровне компактизации отдельных участков хромосом, связанные с их генной активностью.

#### Периодизация хромосомного анализа.

Ранее упоминалось, что попытки рассмотрения истории хромосомного анализа предпринимались неоднократно. Наиболее интересной нам представляется классификация, предложенная в 1978 г. известным австралийским эволюционистом и цитогенетиком М. Дж. Уайтом (White, 1978). Он выделил шесть этапов развития кариологии:

- альфа-кариология - определение числа и размеров хромосом;
- бэта-кариология - детализация признаков кариотипа: определение относительной длины плеч хромосом, положения центромеры, выявление половых хромосом и пр.;
- гамма-кариология - идентификация специфических районов хромосом с использованием методов дифференциальной окраски;
- дельта-кариология - определение локализации сателлитной ДНК, ядрышкообразующих районов (рДНК). локусов, содержащих гены 55-рибосомной РНК;
- эпсилон- и зета-кариологии - выявление активно работающих участков на хромосомах типа «ламповых щеток» и политенных хромосомах, что позволяет получить детальные карты строения и функционирования хромосом.

В нашей стране классификацию Уайта поддерживал известный российский ученый Н.Н. Воронцов. В то же время следует отметить, что эта классификация достаточно условна, поскольку ряд направлений хромосомного анализа, выделенных им в качестве самостоятельных, развивался параллельно. Так исторически эпсилон- и зета-кариологии появились раньше дельта-кариологии, возникающей и активно развивающейся на наших глазах. Если быть точными, то Уайт описывает не этапы развития кариологии, а разделы хромосомного анализа. В нее по объективным причинам не вошли новейшие методы. Так. новейшая, молекулярная кариология зарождается лишь сейчас; ее задачи - изучение молекулярной организации и функционирования хромосом. Тем не менее, классификация Уайта позволяет судить, по крайней мере, о некоторых важных этапах развития учения о хромосомах.

Современный хромосомный анализ - понятие достаточно условное. Так в отношении хромосом человека получена обширная информация, начиная с содержания в них ДНК и рисунках окрашивания, и до выявления генных кластеров и индивидуальных генов. В то же время для многих организмов, в том числе для водорослей, мхов, грибов, лишайников большой проблемой является само определение числа хромосом. На самом примитивном уровне остается пока и изучение хромосом многих простейших, грибов, некоторых групп беспозвоночных и многих групп высших растений. Между тем, по классификации Уайта, этот этап можно отнести к альфа - кариологии, которая зародилась еще в конце 19 века.

Области применения хромосомного анализа.

Успех хромосомного анализа во многом обеспечивается выбором методов, наиболее адекватных целям и объектам исследования (таблица 2).

Таблица 2. Основные задачи хромосомного анализа и адекватные методы их решения.

№	Задачи	Типы хромосом	Методы хромосомного анализа
1.	Определение хромосомных чисел.	митотические	Монохромное окрашивание; гибридизация <i>in situ</i> с пробамии центромерной ДНК; пульс-электрофорез
2.	Идентификация хромосом.	митотические	Дифференциальное окрашивание; гибридизация <i>in situ</i> ; многоцветный флуоресцентный бэндинг.
3.	Локализация и ко-локализация на хромосомах клонированных ДНК-последовательностей или индивидуальных генов.	Политенные, митотические хромосомы, хромосомные фибриллы	Гибридизация <i>in situ</i> C-, G-, Q- и другие типы окрашивания; Fiber-FISH; Электронная микроскопия.
4.	Изучение хромосомных перестроек (повторов, транслокаций, делеций и др.).	Митотические, мейотические	G-, Q-, C-окрашивание; Хромосомный пэинтинг; Многоцветный флуоресцентный бэндинг; Анализ конъюгации хромосом в мейозе.
5.	Установление сходства и различия геномов и определение гомеологии хромосом.	Митотические, мейотические	Анализ конъюгации хромосом в мейозе гибридов; GISH, ZOO-FISH; гибридизация <i>in situ</i> с пробамии ДНК, имеющими определенную локализацию (рибосомные, некоторые другие гены).
7.	Получение фракций индивидуальных хромосом и их участков.	митотические, мейотические, политенные.	Проточная флуориметрия (сортировка). Микродиссекция.
8.	Оценка функциональной активности геномов.	Митотические.	ЯОР (NOR-)-бэндинг, «Арлекинная окраска»; репликативный бэндинг.
9.	Мониторинг окружающей среды.	Митотические, мейотические	СХО, дифференциальное и монохромное окрашивание. Аномалии митоза и мейоза.

10.	Медицинская цитодиагностика.	Интерфазные ядра, митотические хромосомы.	Монохромное окрашивание, все типы бэндинга. FISH, микродиссекция, аномалии митоза.
11.	Селекция новых сортов растений и пород животных	Митотические	G-дифференциальная окраска у животных, C-бэндинг у растений.
12.	Исследование генетически модифицированных организмов.	Интерфазные ядра, митотические хромосомы.	FISH
13.	Структурная геномика.	Митотические хромосомы и суспензии.	Проточная флуориметрия и микродиссекция.

### **Исследование хромосом растений.**

Геном растений изучается более ста лет (а если учитывать работы Грегора Менделя, то и все 150 лет). К настоящему моменту хромосомные числа определены для - 25% видов растений, но эти значения во многих случаях неполны или неверны, т.к. подсчеты производились лишь у одного индивида или популяции. В целом хромосомы растений изучены намного хуже, чем хромосомы животных.

К концу 90-х годов XX века сформировался комплекс методов, которые с успехом используются для анализа хромосом растений. Эти методы можно условно разделить на несколько групп:

1. Собственно методы дифференциального окрашивания, включающие кроме C- бэндинга, также и G- или точнее G- подобный бэндинг, N-, R-, T-, рестрикционный бэндинг.
2. Методы гибридизации *in situ*, направленные на локализацию на хромосомах генов, в основном кластеров генов рибосомных РНК. или клонированных последовательностей ДНК различной природы.
3. Функциональные методы, позволяющие судить о функции участков хромосом, отдельных генов или их семейств, расположенных в определенных участках хромосом. К функциональным методам относятся репликативный бэндинг, выявление сестринских хроматидных обменов (СХО или окраска "арлекина") и метод определения активности рибосомных генов на хромосомах. Особенности цитогенетических исследований растений подробно рассмотрены на примере работ, проводимых в Лаборатории функциональной морфологии хромосом Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарта.

Исследования хромосом растений, проводимые в Лаборатории функциональной морфологии хромосом Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарда РАН.

Цитогенетические исследования злаков, а впоследствии и других растений с большей или меньшей интенсивностью проводились в Лаборатории в течение 30 лет и активно продолжаются в настоящее время. Первые работы в этом направлении, начатые в конце 60-х гг. под руководством доктора биологических наук А.Б. Иорданского, завершились публикацией серии статей (Иорданский и др., 1971; Зурабишвили и др., 1974; Iordansky et al., 1978). Одновременно с ними вышли работы Б. Гилла и Г. Кимбера (Gill, Kimber, 1974a,b) и Шаповой (Шапова, 1974). Таким образом, 1974 г. можно считать годом рождения современной цитогенетики растений. После этого анализ хромосом растений в лаборатории проводился в нескольких направлениях. Основными из них являются следующие:

1. C-бэндинг крупнохромосомных объектов.

Для исследования крупнохромосомных объектов в Лаборатории была разработана оригинальная модификация метода C - дифференциальной окраски хромосом, с помощью которой были детально изучены и охарактеризованы кариотипы и проведена идентификация всех индивидуальных хромосом основных видов хлебных злаков (пшеница, рожь, ячмень, тритикале) и ряда других растений - кукурузы, гороха, овса, дикорастущих пшениц и видов родственного рода *Aegilops* (Савченко и др., 1986; Муравенко, дисс., 1988; Бадаева, 2000; Саматадзе, 2003; рис.1).

Работы по исследованию дикорастущих и возделываемых тетраплоидных и гексаплоидных видов пшеницы в лаборатории были начаты в середине 80-х гг. В результате



Рис. 1. Метафазная пластинка гибрида *T.aestivum* x *T. kiharue* с транслокацией по 6В хромосоме, C-окрашивание.

этих исследований была разработана обобщенная идиограмма хромосом A-, B- и D- геномов и предложены принципы паспортизации и каталогизации сортов и коллекционных образцов пшеницы, которые могут быть использованы в исследованиях других видов и родов растений. Работы продолжаются до настоящего времени.

Изучение гибридов пшениц и видов родственных родов *Secale*, *Hordeum*, *Agropyron*, *Aegilops* позволило определить генетические взаимосвязи (гомеологию) между индивидуальными хромосомами этих видов и послужил базой для создания единой генетической номенклатуры хромосом злаков (Бадаев и др., 1983; Муравенко и др., 1986; Бадаева, 2000:

Badaeva et al., 1991; Badaeva et al., 1996).

Из других работ по крупноросомным растениям следует упомянуть недавно выполненные исследования хромосом гороха (Саматадзе и др., 2002; рис.2).



Рис.2  
Метафазные пластинки гороха *Pisum sativum*, окрашенные методом С-бэндинга. а - нормальный кариотип; б,с - транслокационные линии.

## 2. С-бэндянг мелкохромосомных объектов. Недоконденсация хромосом. С-подобный бэндянг мелкохромосомных объектов.

Особое внимание в работе коллектива лаборатории уделяется изучению так называемых мелкохромосомных растений, что потребовало адаптации существующих методов приготовления препаратов и их окрашивания, а также активного внедрения систем компьютерного анализа хромосом. В результате были впервые описаны кариотипы хлопка, ромашки и льна (рис.3). Размеры хромосом этих объектов (1-5мкм) слишком малы для изучения их на препаратах, приготовленных "обычными" методами и окрашенными с помощью стандартного С-бэндинга.



Рис. 3. Метафазные хромосомы разных сортов *Matricaria chamomilla*, окрашенные методом С-бэндинга - сверху; OR-бэндянг - снизу.

С-окрашивание дает хорошие результаты лишь на ограниченном числе объектов, и у многих видов с помощью этого метода выявляются лишь центромерные блоки. В связи с этим возникла необходимость создания методов дифференциального окрашивания, которые позволяли бы получить более информативные картины. Их разработка является одним из основных направлений работ лаборатории. В числе наиболее перспективных методов можно назвать OR- или G-подобный бэндянг. В то же время, появление новых технологий окрашивания диктует необходимость

их сопоставления со стандартными. Такие исследования были выполнены на хромосомах нескольких видов растений, имеющих как крупные (ячмень, зингерия). так и мелкие (ромашка, лен) хромосомы.

Впервые G-подобное окрашивание у растений было получено в конце 90-х гг. на хромосомах двух видов хлопчатника: диплоидного (*Gossypium herbaceum* L. var. *Africanum* (Watt) Mauer) и тетраплоидного (*G. barbadense* L.) (Muravenko et al., 1998). Окраску проводили в соответствии с модифицированным BrdU-Hoechst-Giemsa - бэндингом. разработанным изначально для исследования хромосом млекопитающих (Zakharov, Egolina, 1976). Для количественного анализа хромосом хлопка в Лаборатории впервые был использована система компьютерного анализа изображения. В результате впервые удалось не только идентифицировать все индивидуальные хромосомы хлопчатника, но и сравнить их с исходными предковыми формами.

На основании подхода, использующего предобработку материала интеркалятором ДНК (9-аминоакридином) и последующее окрашивание ацетоорсеином (OR-бэндинг) была разработана модификация метода, позволившая впервые описать и изучить сверхмелкие хромосомы одноклеточных красных водорослей, относящихся к примитивным низшим растениям. С помощью системы компьютерного хромосомного анализа впервые были четко выявлены, подсчитаны и морфологически охарактеризованы хромосомы *Galdieria maxima*, *G. partita*, *G. sulfuraria* и *Cyanidium caldarium*.

### 3. Другие методы хромосомного анализа растений.

Л) Ag-NOR- бэндинг (серебрение).

Рис. 4. Метафазные хромосомы *Pisum sativum*. окрашенные серебром (черные точки - активные районы ядрышкового организатора).



В Лаборатории Ag-NOR-бэндинг успешно используется для анализа ядрышковой активности и процессов взаимодействия геномов в составе полиплоидных видов растений - рода *Aegilops*, *Allium*, *Hordeum* (Амосова и др., 1989). а также межвидовых гибридов и дополненных хромосомных линий. С помощью Ag-NOR-бэндинга проведен анализ ядрышковой активности хромосом льна, ромашки, гороха (Саматадзе и др., 2003). При исследовании гороха [рис. 4] применение Ag-NOR-бэндинга помогло уточнить идентификацию хромосом и сопоставить генетические и цитологические карты хромосом. В частности, сравнение размеров окрашенных участков дало возможность дифференцировать хромосомы, участвующие в двух разных транслокациях. С помощью метода «серебрения» были разделены близкородственные виды льна, ранее относимые к одному виду.

С) Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH).

Флуоресцентная гибридизация *in situ* активно используется в Лаборатории функциональной морфологии хромосом для решения различных теоретических и практических задач. С помощью FISH, в комплексе с методом С-окрашивания были исследованы виды пшеницы, представляющие две эволюционные линии - эммер (*AABBDD*) и Тиморпееви (*A'AGG*), а также диплоидные виды *Triticum* и *Aegihps*, считающиеся наиболее вероятными донорами их геномов (Бадаева, 2000). Для проведения работы были выбраны клоны ДНК, представляющие высокоповторяющиеся некодирующие последовательности ДНК (pSc119, pAs1), и семейства рРНК (pTa71 - )8S-5,8S-26S rDNA; pTa794 - 5S rDNA) генов. В целом были изучены 12 диплоидных и 14 полиплоидных видов *Aegihps*. При анализе диплоидных видов было установлено, что распределение ДНК зондов, особенно проб рибосомной РНК (рис. 5),

является более консервативной характеристикой генома, чем рисунок С-окрашивания. Эти данные были использованы при анализе полиплоидных видов *Aegihps*. Полученные результаты показали, что механизмы формирования кариотипов полиплоидных видов в значительной степени определяются базовым (pivotal) геномом. Виды кластера D-геномов характеризовались высокой цитогенетической стабильностью, а модификации хромосом в процессе видообразования и внутривидовой

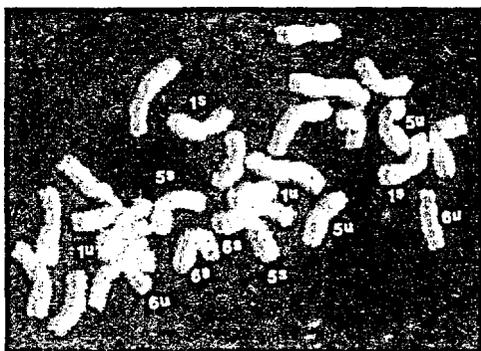


Рис.5  
Локализация кластеров 18S-26S рРНК генов на хромосомах тетраплоидного *Aegilops variabilis* методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH)

дивергенции затрагивали оба родительских генома в равной степени. Значительная хромосомная нестабильность являлась отличительной особенностью видов кластера U-геномов. Модификации хромосом у них затрагивали в основном дифференциальные геномы и происходили за счет транслокаций и интрогрессивной гибридизации. Показано, что наиболее существенные преобразования геномов происходят у тетраплоидных видов, тогда как образование гексаплоидов не приводит к значительным изменениям хромосом.

Метод гибридизации *in situ* нашел широкое применение в Лаборатории для анализа структурной организации хромосом других таксономических групп растений, в частности на льне и горохе, определения происхождения видов и их геномов и установления гомеологии хромосом. Упомянутые выше исследования злаков показали, что локализация рибосомных генов является не только высоко консервативной характеристикой генома, но и может быть использована для идентификации и определения генетического родства (гомеологии) индивидуальных хромосом. В связи с этим, данная характеристика была использована для анализа нескольких видов льна. Исследование его хромосом с помощью монохромного

окрашивания не позволяет точно определить морфологию спутничной хромосомы. Было неясно даже число хромосом у этого вида - 30 или 32. Гибридизация *in situ* показала прицентромерное расположение кластеров рибосомных генов, т.е. две мелкие хромосомы фактически представляли одну спутничную. На основании этого был сделан вывод, что диплоидное число хромосом этого вида  $2n=30$ .

В) Геномная гибридизация *in situ* (GISH).

GISH используют при анализе межвидовых гибридов или полиплоидных форм растений. С его помощью можно дифференцировать хромосомы, относящиеся к разным геномам, прямо на препаратах. Метод является уникальным подходом для изучения организации хромосом в интерфазном ядре. Он позволяет точно локализовать точки разрывов при межгеномных транслокациях.

В Лаборатории функциональной морфологии хромосом с помощью GISH были изучены линии *T. araraticum* с межгеномными транслокациями. Было показано, что точки разрывов у них локализовались или в центромерных, или проксимальных районах хромосом. Данное наблюдение свидетельствует о том, что перестройки возникали скорее под воздействием гаметоидных генов, чем из-за неправильного расхождения унivalentов и слияния телоцентрических хромосом в мейозе гибридов (рис.6).

Рис 6 Геномная гибридизация *in situ* на хромосомах *Triticum araraticum* с транслокацией 2A<sup>1</sup>4G [геномную ДНК *Triticum monocosmum* метили биотином (темная), а геномную ДНК *Ae speltoides* использовали как блокирующую] Детекцию сигнала проводили с помощью системы на основе пероксидазы хрена.



#### 4. Системы компьютерного анализа изображения.

Системы компьютерного анализа изображения используются для решения многих задач, однако они оказались особо перспективными в исследованиях растений с небольшими, сходными по морфологии хромосомами, таких как рис, сахарный тростник, сахарная свекла, хлопок, ромашка, подсолнечник, морковь и др.

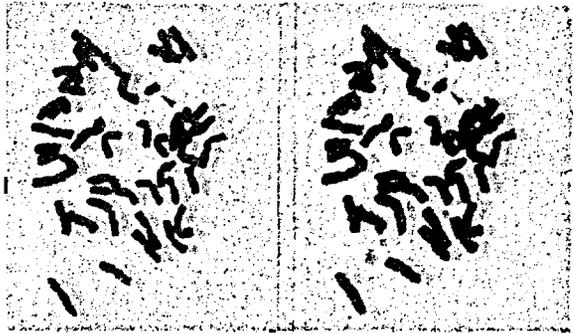
С помощью системы анализа изображения (VideoKaryoTest 2.0) в Лаборатории была исследована тонкая структура хромосом зингерии и ромашки, выявляемая с помощью разработанного ранее метода G-подобного OR-дифференциального окрашивания. В результате была показана принципиальная возможность использования морфометрического анализа хромосом для изучения геномного полиморфизма мелкохромосомных видов.

растений и сформулированы основные методические правила проведения такого анализа. В настоящее время этот метод стал рутинным в лаборатории. Он позволяет проводить в полуавтоматическом режиме анализ препаратов и кариотипирование, что резко облегчает работу и позволяет получить более объективные данные.

### 5. Микродиссекция.

В работах Лаборатории функциональной морфологии хромосом техника микродиссекции была использована для получения ДНК библиотек пшеницы. В частности, была предпринята попытка получения локус-специфической ДНК из хромосомы 5В пшеницы, содержащей *Ph1* ген, ответственный за гомеологическую конъюгацию хромосом (Родова и др., 1995, рис.6).

Рис.6. Метафазная пластинка пшеницы до (а) и после (о) микродиссекции. Стрелкой обозначена микродиссектированная хромосома *5Bdel*.



Из сказанного видно, что в Лаборатории функциональной морфологии хромосом широко используются все основные методы хромосомного анализа. Именно поэтому Лаборатория занимает одно из ведущих мест в мире в области цитогенетического анализа растений.

### Заключение.

Хромосомный анализ в геномную эру.

Конец двадцатого и начало двадцать первого столетия ознаменовались революционизирующими изменениями в биологической науке, связанными с расшифровкой полных нуклеотидных последовательностей ДНК ряда организмов. Опубликованы результаты тотального сиквенса генома человека и значительно более подробного и близкого к завершению сиквенса его пяти самых мелких (14, 22, 21, 20 и Y) хромосом, по детальности близкого к таковому для геномов *C. elegans* и *A. thaliana*.

Развертывание работ по массовому секвенированию геномов различных организмов стало мощным стимулом для создания принципиально новых технологий. Оно оказало огромное влияние на смежные, а порой и достаточно отдаленные области биологии и медицины. В настоящей работе рассмотрено современное состояние важного раздела биологической и медицинской науки - хромосомного анализа в геномную эру. Особое внимание было уделено следующим проблемам:

- 1) Роль изучения хромосом и хромосомного анализа в развитии геномики и секвенировании геномов.
- 2) Влияние, которое оказали и окажут в обозримом, т.е. с достаточной степенью достоверности прогнозируемом будущем, геномные исследования и новые геномные технологии на хромосомный анализ и его технологическое обеспечение.
- 3) Место, которое будет занимать хромосомный анализ в геномных исследованиях ближайшего будущего.

На основании изучения истории хромосомного анализа, которая насчитывает около 150 лет. нам представляется возможным выделить следующие основные периоды его развития:

1. Конец 70-х гг. XIXв.- начало XXв.- установление факта существования хромосом и их описание. На этот момент развития хромосомного анализа приходится создание и развитие методов микрофотографирования, усовершенствования самих микроскопов. Разработаны консервирующие жидкости (фиксаторы) и ядерные красители, совершенствовались методики приготовления препаратов.
2. Начало XXв. - бурный прогресс хромосомного анализа. Увязано представление о хромосомах с генетикой во многом благодаря работам Т.Х. Моргана и его группы. Прогресс в основном связан с растительными объектами. Успехам кариосистематика растений обязана трудам С.Г. Навашина, Т. Сакамуры и Г.А. Левицкого. Принято считать, что С.Г. Навашин впервые показал возможность различать хромосомы по особенностям их строения.
3. 30-40-е гг. XXв. - первые сведения о возможности изучения хромосом, основанные на неоднородности их окрашивания.
4. Конец 50-х - начало 60-х гг. XXв. - развитие хромосомного анализа переместилось от растений к человеку и животным. Пора бурного развития цитогенетики человека а затем и других млекопитающих (работа Дж. Тью и А. Левана, 1956: 1960г.- все хромосомы человека разделены на 7 групп). Совершенствование методик приготовления препаратов (работа не на срезах, а на давленных препаратах).
5. 1968г. - создание первого метода дифференциального окрашивания хромосом (Q-бэндинг, группа Т. Касперсона): полная идентификация всех хромосом человека Как следствие, одновременное появление других методов дифференциального окрашивания (С-, G-, N-, R- и др. виды бэндинга).
6. 70-е г.г. - получение гибридов соматических клеток человека и грызунов, в которых избирательно элиминируются хромосомы человека Работы по картированию хромосом человека получили стремительное развитие. К 1975 году на индивидуальных хромосомах человека локализовано более 70 генов (к настоящему времени локализовано около 10тыс. генов).
7. Конец 60-х - 70-е и 80-е гг. XXв. Создание метода гибридизации *in situ*: 1969 - радиоактивная; 1982 - нерадиоактивная (на основе биотина); 1990 - геномная гибридизация *in situ*; 1986 - флуоресцентная гибридизация *in situ*; 1996 г. - спектральное кариотипирование.

8. 1981 г. - создание метода микродиссекции.
9. Конец XXв. - начало XXIв. - завершен основной этап расшифровки генома человека и ряда других организмов (арабидопсис. рис. рыба *Fugo*, *Drosophila melanogaster* и несколько сотен микроорганизмов). Внедрение современных технологий хромосомного анализа в медицину (генная терапия), использование трансгенных растений в сельском хозяйстве (основная масса используемой в мире сои является трансгенным продуктом).

Если XXв. можно смело назвать веком хромосомного анализа и расшифровки генома человека, то XXIв.. возможно, станет веком осмысления полученных результатов. Не вызывает сомнения, что в этом хромосомный анализ будет играть существенную роль.

#### Выводы.

1. Ключевыми этапами развития хромосомного анализа можно считать выявление и описание хромосом, разработку и совершенствование методов приготовления препаратов, консервирующих жидкостей (фиксаторов) и красителей, создание современных методов дифференциального окрашивания, гибридизации *in situ*, систем компьютерного анализа изображения и т.п. Развитие хромосомного анализа шло параллельно созданию новых технологий и развитию новых областей знаний.
2. Появление новых и развитие существовавших технологий зачастую шло одновременно, поэтому обозначить четкие временные границы отдельных периодов хромосомного анализа достаточно сложно. В то же время, при классификации хромосомного анализа следует исходить из прогресса в области изучения хромосом человека, как наиболее хорошо и всесторонне изученного объекта.
3. Показано, что в начале становления хромосомного анализа первостепенную роль играли совершенствование микрофотоирования и технологий работы с препаратами. Позже все более существенное влияние на развитие цитогенетики стали оказывать знания об объекте, т.е. создание новых методов, а также выбор наиболее адекватных поставленным задачам технологий осуществляется целенаправленно, а не подбирается эмпирически.
4. Современный хромосомный анализ - это не просто описание кариотипа. а изучение хромосом с помощью комплекса методов, позволяющих получать разностороннюю информацию об изучаемом объекте. Его определение кариотипа. составление идиограмм. идентификация хромосом с использованием дифференциального окрашивания, гибридизации *in situ*, анализа изображения, определение локализации отдельных генов и их семейств и т.п.
5. Для выбора адекватного объекта и методов для решения конкретных задач цитогенетики чрезвычайно важно знание истории хромосомного анализа. В связи с этим проведена систематизация современных методов хромосомного анализа и составлен справочный материал, облегчающий выбор адекватных методов хромосомного анализа применительно к решению поставленных задач.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации.**

1. *Зеленин А.В., Зоцук Н.В.* История современного анализа. Основополагающий вклад работ Касперсона//Онтогенез. 2000. Т. 31. № 2. С. 152-160.
2. *Зоцук Н.В., Бадаева Е.Д., Зеленин А.В.* История хромосомного анализа // Биологические мембраны. 2001. т. 18.№3.С. 164-172.
3. *Зеленин А.В., Бадаева Е.Д., Зоцук Н.В., Муравенко О.В.* Вклад хромосомных технологий в геномику растений / В кн.: Изучение генома и генетическая трансформация растений // Новосибирск: Наука. 2001. С. 13-26.
4. *Зоцук Н.В., Бадаева Е.Д., Зеленин А.В.* История современного хромосомного анализа. Дифференциальное окрашивание хромосом растений // Онтогенез. 2003. Т.34. №. 1.С. 5-18.
5. *Зеленин А.В., Зоцук Н.В.* Хромосомный анализ в геномную эру // Вестник РФФИ. 2003. В печати.

*Зоцук Н.В.* История дифференциального окрашивания хромосом растений // Цитология. IV Совещание по кариологии и кариосистематике растений. 1999. Т. 41. № 12. С. 1064.







№ - 8 1 5 1

Подписано в печать 31.03.2004  
Формат 60x88 1/16, Объем 1.5 п.л.  
Тираж 120 экз. Заказ №62  
Отпечатано в ООО «Соцветие красок»  
119992 г.Москва. Ленинские горы. д. 1  
Главное здание МГУ. к. 102