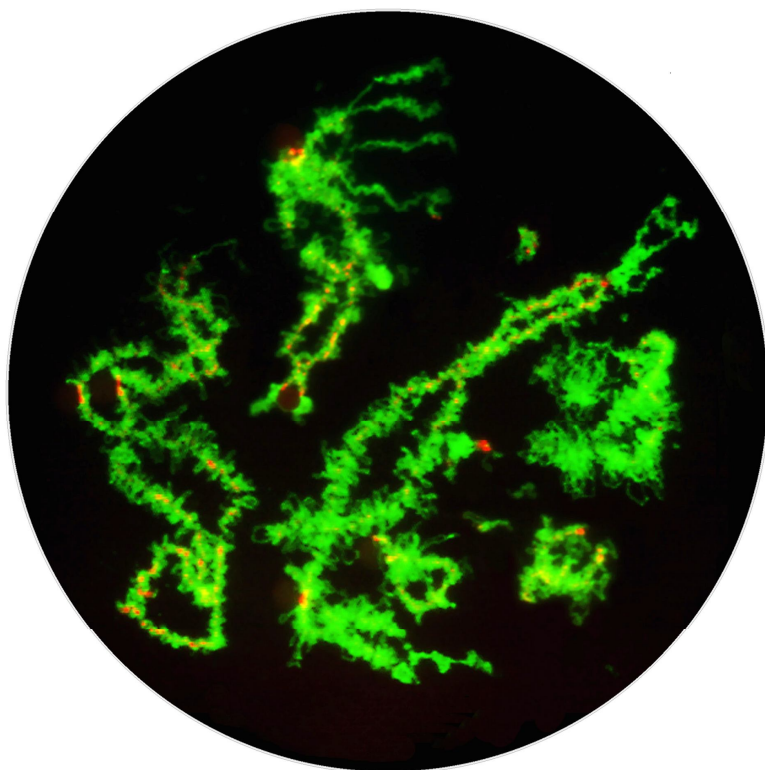


**А.Ф.Сайфитдинова**

**ДВУМЕРНАЯ  
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ  
ДЛЯ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ**



Учебно-методическое пособие

А.Ф.Сайфитдинова

Двумерная флуоресцентная микроскопия  
для анализа биологических образцов

Учебно-методическое пособие

Санкт-Петербург

2011 г

УДК 57.086.2  
ББК Е041.12

**Рекомендована к печати**

Редакционно-издательским советом Биолого-почвенного факультета Санкт-Петербургского государственного университета

**Рецензенты:**

Зав.лабораторией Структуры и функции хромосом Биолого-почвенного факультета СПбГУ д.б.н., проф. Е.Р.Гагинская.

Зав.лабораторией Морфологии и функции клеточных структур Института цитологии и генетики СО РАН д.б.н. Н.Б.Рубцов.

*Издается с 2008 года*

**Сайфитдинова А.Ф.**

Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов. Учебно-методическое пособие. – 2-е изд., испр. и доп. – СПб.:

Учебно-методическое пособие содержит подробное описание современных методов двумерной флуоресцентной микроскопии, используемых для исследования широкого круга объектов. Подробные протоколы сопровождаются комментариями, содержащими методические тонкости. Описаны принципы флуоресцентной микроскопии для анализа двумерных биологических образцов и особенности использования различных подходов для решения конкретных задач. Особое внимание уделено возможности одновременного использования различных методов флуоресцентной микроскопии в одном исследовании. Рассмотрены вопросы регистрации и анализа флуоресцентных изображений классическими методами, а также с использованием современных цифровых технологий.

Пособие предназначено для студентов биологических факультетов, а также специалистов, использующих методы флуоресцентной микроскопии в исследованиях и диагностике.

УДК 57.086.2  
ББК Е041.12

© Сайфитдинова А.Ф., 2011

## Предисловие к первому изданию

Идея создания методического пособия, объединяющего в себе самые разные методы исследования, связанные с использованием флуоресцентного микроскопа пришла в голову достаточно давно. Консультируя самых разных людей – от студентов до опытных ученых, часто приходилось сталкиваться с одними и теми же вопросами. Именно поэтому, в этом методическом пособии столько внимания уделено не только тому, **как** надо делать, но и **почему** нужно делать именно так.

Значительную часть методических тонкостей, изложенных в этом пособии, в разное время мне помогли освоить Тамара Викторовна Васильева (кафедра цитологии и гистологии Биологического факультета МГУ), Татьяна Федоровна Андреева (лаборатория экспериментальной цитологии Биологического НИИ СПбГУ), Елена Романовна Гагинская (лаборатория структуры и функции хромосом Биологического НИИ СПбГУ), Евгения Владимировна Журова (лаборатория структуры и функции хромосом Биологического НИИ СПбГУ), Людмила Петровна Тимофеева (Институт экспериментальной биологии, Харку, Эстония), Александр Викентьевич Родионов (Биологический НИИ СПбГУ, Ботанический институт РАН), Татьяна Ревовна Сухих (Институт цитологии РАН), Гарри Морган (Garry T. Morgan) (Институт генетики Ноттингемского университета, Великобритания), Ирина Валерьевна Соловей (Мюнхенский университет, Германия), которые всегда были готовы не скупясь поделиться своими знаниями и умениями.

Большинство методов ждали своей очереди быть донесёнными до широкой общественности, накапливаясь в большой черной тетради. Возможно, идея создания пособия никогда не была бы реализована без помощи и поддержки коллег и друзей. Я очень благодарна всем, кто взял на себя труд прочитать и оценить текст на стадии его подготовки.

18 апреля 2008

А.Ф.Сайфитдинова

## **Предисловие ко второму изданию**

Стремительное развитие современного индустриально-технологического общества привело к тому, что методы флуоресцентной микроскопии все шире входят в практику. Они перестали быть прерогативой исследовательских лабораторий и активно внедряются в рутину диагностических методов и подходов. Появились модели флуоресцентных микроскопов, специализированные для решения отдельных задач. Многие лаборатории становятся обладателями целого парка таких приборов. Все это определило высокую востребованность практического руководства по методам флуоресцентной микроскопии и показало необходимость переиздания обновленной версии вышедшей в 2008 году книги.

При переработке материала я постаралась учесть многочисленные мнения читателей, которым я очень благодарна за высказанные предложения. Вместе с тем, я постаралась сохранить концепцию учебно-методического пособия, которое не уходит на полку после того как его прочитали, а остается на рабочем столе исследователя в качестве постоянного спутника в его практической работе.

*26 февраля 2011*

*А.Ф.Сайфитдинова*

## Глава 1. Введение во флуоресцентную микроскопию

### 1.1. Флуорохромы

Флуоресцентная микроскопия представляет собой разновидность световой микроскопии, в которой увеличение контрастности достигается путем использования особых веществ – флуорохромов (или флуорофоров). Такие вещества способны расходовать часть энергии поглощенного света на флуоресценцию (или излучение света определенной длины волны при возвращении из возбужденного состояния в стабильное). При этом испускаемый свет отличается от поглощенного длиной волны и интенсивностью. В соответствии с правилом Стокса, длина волны испускаемого света больше, чем длина поглощаемого, поскольку при поглощении часть энергии рассеивается в виде тепла, а излучение света большей длины волны требует меньше энергии. Каждый флуорохром характеризуется определенным спектром поглощения и испускания, который определяется путем измерения относительной интенсивности флуоресценции при определенной длине волны (Рисунок 1.1).

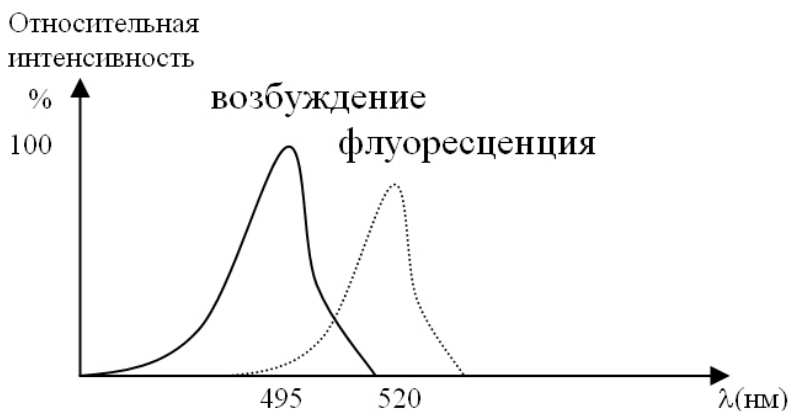


Рисунок 1.1. Кривые возбуждения и испускания для флуорохрома FITC.

Наиболее интенсивная флуоресценция наблюдается тогда, когда происходит облучение светом с длиной волны, близкой к максимуму на кривой возбуждения. Тем не менее, перевести флуорохром в возбужденное состояние можно облучением светом, длина волны которого не соответствует его максимуму возбуждения. Для этого за короткий промежуток времени флуорохром должен получить несколько импульсов облучения, только тогда суммарная энергия поглощенного света позволит ему достичь возбужденного состояния. Такой подход в настоящее время реализован в лазерном мультифотонном микроскопе.

Испускаемый свет также имеет максимальную интенсивность в определенной специфичной для данного флуорохрома области спектра (Приложение 1).

В отличие от фосфоресценции, которая может происходить и спустя некоторое время после окончания облучения, флуорохром излучает свет без задержки во времени, что позволяет испускать свет максимальной интенсивности. Тем не менее, разные флуорохромы даже при поглощении света одинаковой интенсивности будут излучать свет разной интенсивности. В таком случае говорят о силе флуорохрома, которая определяется квантовой эффективностью – отношением между интенсивностью поглощаемого и испускаемого света. Слабые флуорохромы с низкой квантовой эффективностью испускают мало света по сравнению с уровнем поглощения. Современные химически модифицированные флуорохромы нового поколения, как правило, обладают высокой квантовой эффективностью.

В процессе освещения происходит постепенное уменьшение интенсивности флуоресценции. Это явление носит название «выцветание» флуорохрома. Степень выцветания зависит от интенсивности возбуждающего света и времени экспозиции. На скорость и степень выцветания могут оказывать влияние физические и химические изменения самого флуорохрома, наличие в растворе других флуорохромоов, а также окислителей или солей тяжелых металлов. Современные флуорохромы выцветают значительно медленнее, чем те, которые использовались 10-15 лет назад. Тем не менее,

проблема замедления снижения уровня флуоресценции все еще актуальна, поскольку она напрямую связана с возможностью получения качественного изображения исследуемого объекта.

Для защиты флуорохромов от выцветания готовые препараты необходимо хранить в темноте при низких температурах (4°C для водных заключающих сред и кратковременного хранения, -20°C для длительного хранения препаратов в средах на основе незастывающих компонентов). Водные заключающие среды обычно представляют собой буферные растворы, использованные при окраске и отмывке препаратов (Приложение 2). В качестве незастывающих заключающих сред для флуоресцентной микроскопии могут быть использованы нефлуоресцирующее иммерсионное масло, жидкий парафин, глицерин разной концентрации, а также синтетические заключающие среды на основе полимеров (изобутилметакрилат, полистирол).

Использование в заключающих средах фотозащитных добавок, таких как DABCO (дiazобисциклооктан), N-пропилгаллат, пара-фенилендиамин, продлевает время флуоресценции в 15-30 раз – и это существенно для фиксации изображения. В настоящее время многие фирмы, производящие различные реактивы, конъюгированные с флуорохромами, а также флуоресцентные красители, предлагают готовые заключающие среды с фотозащитными добавками. Приготовить такие среды можно самостоятельно по прописям (Протоколы 1.1.1-1.1.4), затем расфасовать их в пробирки по 1 мл и хранить при -20°C.

Необходимо также помнить, что на интенсивность флуоресценции могут оказывать влияние небольшие изменения pH, присутствие даже в незначительных количествах сильных окислителей и солей тяжелых металлов, таких как ртуть или осмий.



**Протокол 1.1.1. Фотозащитная среда 1**

1. К 1мл 0,2 М Tris-HCl (pH 7,5) или 1x PBS добавить 233мг DABCO.
2. Перемешать пипетированием.
3. Добавить 9 мл нефлуоресцирующего глицерина.
4. Оставить на ночь в термостате при 65°C.
5. Профильтровать теплый раствор через фильтр с размером пор 45 мкм.
6. Расфасовать и хранить при -20°C до использования.

**Протокол 1.1.2. Фотозащитная среда 2**

1-1,2% DABCO  
2x SSC  
50% нефлуоресцирующего глицерина

Коэффициент преломления такой среды позволяет совмещать флуоресцентную и фазово-контрастную микроскопию, так как в ней снижено содержание глицерина.

**Протокол 1.1.3. Фотозащитная среда 3**

1 мл пара-фенилендиамина  
1 мл 1М TrisHCl (pH 9,5)  
4 мл нефлуоресцирующего глицерина

Готовый раствор имеет pH 8,5.

**Протокол 1.1.4. Фотозащитная среда 4**

5% N-пропилгаллат  
95% нефлуоресцирующего глицерина

## 1.2. Флуоресцентный микроскоп

Качество изображения во флуоресцентной микроскопии обеспечивается контрастом и яркостью изображения. В первую очередь это достигается за счет подбора флуорохромов и использования узкополосных светофильтров. Значительную роль играет также качество оптики и сведение к минимуму рассеивания как возбуждающего, так и излучаемого света. Основным прибором для исследования флуоресценции двумерных биологических образцов является флуоресцентный микроскоп с освещением падающим светом. В основе его устройства лежит правило Стокса, благодаря которому удается эффективно разделять световые потоки (Рисунок 1.2).

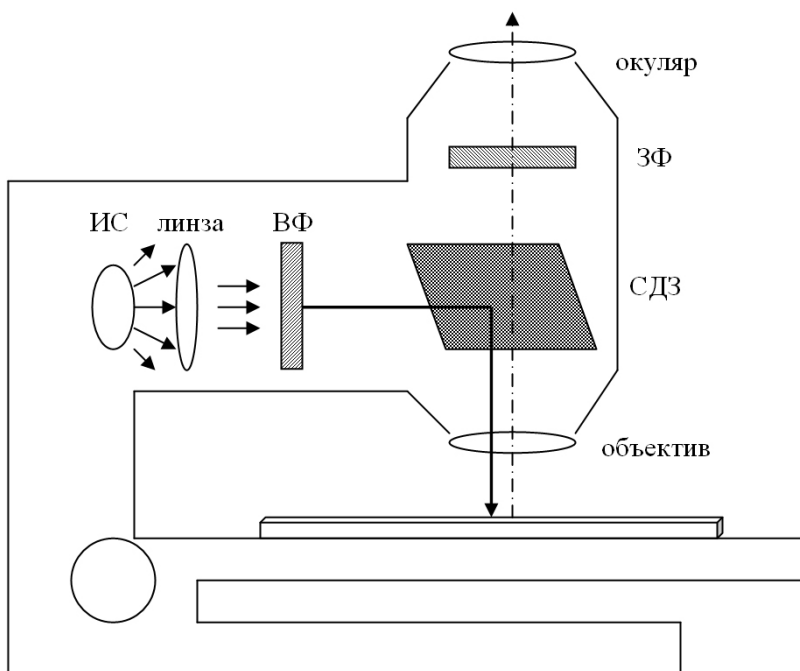


Рисунок 1.2. Устройство флуоресцентного микроскопа с освещением падающим светом. ИС – источник света; ВФ – возбуждающий фильтр; СДЗ – светоделительное зеркало; ЗФ – запирающий фильтр.

Основным инструментом, разделяющим световые потоки является светоделительное (или дихроматическое) зеркало. Оно имеет специальное интерференционное покрытие, позволяющее отражать свет, длина волны которого меньше определенного значения, и пропускать излучение с большей длиной волны. Узкополосный возбуждающий фильтр подбирают таким образом, чтобы он выделял из всего спектра лампы свет той длины волны, которая максимально эффективно поглощается флуорохромом на препарате. Использование узкополосного запирающего фильтра позволяет убрать фоновое свечение, отраженное от деталей микроскопа и препарата, что значительно увеличивает контрастность изображения и четкость получаемых результатов.

Сближение в пространстве всех светофильтров позволило объединить их в единые модули – комбинированные фильтры (в англоязычной и переводной литературе такие блоки фильтров часто называют кубиками). Их использование позволяет производить замену сразу всех фильтров без смещения изображения или потери резкости. Это дало возможность использовать одновременно несколько флуорохромов, а затем с высокой точностью совмещать полученные изображения. Таким образом, исследователю остается только позаботиться о соответствии спектров используемых в работе флуорохромов характеристикам комбинированных фильтров, которыми укомплектован микроскоп.

Благодаря тому, что в качестве конденсора выступает линза объектива в флуоресцентном микроскопе с падающим светом световой пучок фокусируется с максимальной точностью. Правда, это накладывает определенные требования на качество объектива. Поскольку интенсивность светового потока, проходящего через линзу в каждом направлении, пропорциональна квадрату апертуры, то суммарная интенсивность регистрируемого света зависит от величины апертуры объектива в четвертой степени. Поэтому для флуоресцентной микроскопии необходимо использовать специальные объективы, пропускающие свет любой длины волны, а также имеющие большие числовые значения апертуры.

Еще одним преимуществом освещения падающим светом является то, что не происходит рассеивание света при прохождении через более толстое предметное стекло. Покровное стекло обязательно надо протереть спиртом перед использованием, чтобы удалить грязь и пыль, которые могут отражать свет и люминесцировать в ультрафиолетовом излучении. При выборе покровных стекол предпочтение нужно отдавать тонким стеклам толщиной 100-170 мкм (№1-№1,5). Использование тонких стекол сокращает потери флуоресцентного сигнала. Кроме того, иммерсионные объективы больших увеличений сконструированы таким образом, чтобы корректировать aberrации, вносимые стеклами толщиной до 170 мкм.

В качестве источника света обычно используются ртутные лампы различной мощности, спектр которых имеет равномерно распределенные пики высокой интенсивности в области от 300 до 700 нм, а также имеют сильное свечение между пиками. Такая лампа охватывает область спектра от УФ до ИК и может быть использована для возбуждения большинства флуорохромов. Если для активизации флуорохрома требуется длинноволновый свет ИК области спектра, микроскоп дополнительно комплектуют ксеноновой лампой.

Флуоресцентные микроскопы могут быть укомплектованы ртутными лампами 50W, 100W, 200W. Использование более мощной лампы позволяет возбудить с достаточной для детекции интенсивностью даже слабый флуорохром, но она значительно увеличивает скорость выгорания как сильных, так и слабых флуорохромов. Снизить интенсивность поступающего от лампы светового потока можно с помощью диафрагмы, но это приводит к неравномерному освещению поля зрения. Современные микроскопы позволяют регулировать интенсивность света с помощью системы понижающих светофильтров, но при этом свет разных областей спектра регулируется по-разному. Именно поэтому при работе с сильными флуорохромами, не требующими интенсивного облучения, целесообразнее работать на микроскопе, укомплектованном менее мощной лампой.

## Глава 2. Методы исследования с использованием двумерной флуоресцентной микроскопии

### 2.1. Автофлуоресценция

Явление автофлуоресценции широко распространено в природе. Многие структурные компоненты клеток, а также некоторые продукты метаболизма способны флуоресцировать в ответ на облучение светом определенной длины волны.

Способностью флуоресцировать обладают каротиноиды, такие как витамин А, которые излучают зеленый свет в ответ на облучение ультрафиолетом. Используя автофлуоресценцию можно изучать распределение рибофлавина, тиамина, цероида, липофусцина, порфиринов, а также флуоресцирующих веществ, накапливаемых энтерохромаффинными клетками. Флуоресценцию многих аминов можно индуцировать фиксацией формалином благодаря формированию кольцевых структур. Таким образом удастся локализовать нейромедиаторы, такие как катехоламины и 5-гидрокситриптамин. Способностью флуоресцировать обладают волокна коллагена и эластина, окружающие клетки соединительной ткани, а также белки клеточной стенки растений и грибов.

К сожалению, исследование автофлуоресценции редко позволяет получить однозначный результат. Обычно автофлуоресценция характеризуется низкой квантовой эффективностью, однако, в природе встречаются и такие сильные флуорохромы, как зеленый флуоресцирующий белок медузы *Aequorea victoria* (GFP) и флуорохромы некоторых глубоководных беспозвоночных.

В исследовательской практике важно учитывать возможность автофлуоресценции объекта для правильного подбора красителей, а также для планирования эксперимента и выбора соответствующего фиксатора.

## **2.2. Методы окраски препаратов флуоресцирующими красителями**

Окраска флуоресцирующими красителями широко используется в патанатомии, гистологии, цитологии, молекулярной биологии и цитогенетике. Большинство рутинных методов основано на химических свойствах красителей.

Многие флуорохромы обладают способностью растворяться в липидах тканей. Их использование позволяет локализовать мембранные структуры, кислые и нейтральные липиды и жировые капли в клетках. Для этих целей используются целый ряд красителей, таких как судан черный, фосфин 3R, тиофлавин S, родамин B, 3,4-бензопирен, а также современные липофильные красители на основе аминостирилов, такие как FM1-43 (SynaptoGreen C3), FM4-64 (SynaptoRed C2), MDY-64, DiI, DiO, DiD, DiA, DiR. Благодаря своим химическим свойствам, они позволяют водными растворами окрашивать на препаратах даже небольшие жировые включения, не нарушая их морфологию (Протокол 2.2.1).

Для окраски целлюлозы применяются ароматические амины, анилиновый синий, а также красители, которые при щелочных значениях pH вступают в реакцию с гидроксильными группами волокон целлюлозы с образованием ковалентных связей, такие как корифосфин O, окрашивающий стенки растительных клеток. Амилоидные структуры флуоресцируют в ультрафиолете при взаимодействии с тиофлавином S, а также могут быть выявлены окраской конго красным. Введение тетрациклина позволяет локализовать места отложения солей кальция в костях, а нервные клетки могут быть окрашены желтым проционом M4RS.

Красители, модифицирующиеся под действием тех или иных ферментов с приобретением свойств флуорохромов, позволяют идентифицировать определенные клеточные структуры. Так, MitoTracker Green FM позволяет локализовать митохондрии в живых клетках дрожжей, а LisoTracker Red FM начинает флуоресцировать в кислой среде после взаимодействия с ферментами лизосом. Такие красители не надо тщательно отмывать, поскольку в водной среде они не способны излучать свет.

Наибольшее применение для исследования тканей и клеток самого разного происхождения находят флуоресцентные красители, специфически окрашивающие нуклеиновые кислоты. Независимо от состава оснований, нуклеиновые кислоты окрашивает бромистый этидий, дающий красную флуоресценцию при возбуждении синим светом, и йодистый пропидий (PI), одинаково эффективно окрашивающий как РНК, так и ДНК и испускающий красный свет в ответ на облучение зеленым светом. Молекулы акридинового оранжевого поразному взаимодействуют с одонитевыми и двунитевыми молекулами РНК и ДНК. В результате окрашивания двунитевые молекулы нуклеиновых кислот флуоресцируют зеленым светом, а одонитевые – красным (Протокол 2.2.2).

Еще один ДНК-связывающий флуорохром, положивший начало использованию флуоресцентной микроскопии для идентификации хромосом методом Q-бэндинга – это акрихин. Он обладает небольшой специфичностью к GC-парам и поэтому позволяет получать дифференциально окрашенные хромосомы (Протоколы 2.2.3-2.2.4). Некоторые антибиотики также обладают способностью нуклеотид-специфично связываться с ДНК. При этом хромомицин А3 и оливомицин в ответ на облучение синим светом излучают желто-зеленый свет. Эти свойства используются в получении дифференциальной окраски митотических хромосом в том случае, когда необходимо выявить R-бэнды (эти вещества окрашивают GC-обогащенную ДНК) (Протокол 2.2.5). Иногда для получения более четкого результата используется контрастирование другим антибиотиком – дистамицином А, который специфически связывается с AT-парами, поглощает свет, но не обладает способностью флуоресцировать (Протокол 2.2.6).

При необходимости получения окраски, похожей на G-бэндинг, используются AT-специфичные флуоресцентные красители DAPI (Sigma) и Hoechst 33258 (Hoechst), дающие голубое свечение при облучении ультрафиолетом. При необходимости контрастирования, можно сочетать окрашивание с обработкой актиномицином D, специфически связывающим GC-пары и поглощающим излучение без флуоресценции (Протокол 2.2.7).

Часто окраску нуклеиновых кислот флуорохромами сочетают с другими методами. Эту процедуру проводят после завершения всех манипуляций непосредственно перед заключением препарата (Протокол 2.2.8). Иногда удобно добавить краситель непосредственно в заключающую среду (Протокол 2.2.9). Для этой цели подходят красители, слабо флуоресцирующие в водных растворах, такие как DAPI или PI, или димерные красители, такие как TOTO-1, дающие яркий флуоресцентный сигнал только в том случае, если произошло взаимодействие молекулы красителя с нуклеиновой кислотой.

Использование парарозанилина, акрифлавина или аурамина О в качестве цветного реактива в реакции Фельгена позволяет производить количественную оценку ДНК на препарате. Красители OliGreen, PicoGreen и RiboGreen дают возможность проводить количественную оценки ДНК (одно и двунитевой) и РНК в водных растворах, а система SYTO RNASelect Green Fluorescent Cell Stain (Molecular Probes) селективно окрашивает РНК на препаратах.

Для прижизненного окрашивания организмов используют водные растворы акридинового оранжевого, дигидроэдиума, SITS, диацетата флуоресцина, SYNTOX и DAPI, поскольку для получения детектируемого свечения достаточно использовать эти флуорохромы в очень низких концентрациях (Протоколы 2.2.10-1.1.11). Использование флуоресцирующих конъюгатов липополисахаридов и декстрансульфата позволяет проводить прижизненное исследование эндцитоза. Хотя в данном случае никакого окрашивания не происходит, наблюдение за флуоресцирующими частицами различных размеров позволяет следить за динамикой внутриклеточных процессов.

### ***Протокол 2.2.1. Окраска липидов фосфином 3R***

1. Обработать препараты 0,1% водным раствором фосфина 3R в течение 3 минут.
2. Быстро сполоснуть срезы водой.
3. ЗаклЮчить в 90% водный раствор глицерина.

Серебристо-белая флуоресценция липидов в УФ свете.



**Протокол 2.2.2. Окраска нуклеиновых кислот акридиновым оранжевым**

1. Приготовить концентрированный раствор акридинового оранжевого: 100 мг на 100 мл дистиллированной воды (может храниться в темноте при 4°C).
2. Провести зафиксированные препараты по серии спиртов понижающейся концентрации – 96%; 70%; 50% этанол.
3. Поместить на 5 мин в PBS (pH 6,0).
4. Окрашивать 15 мин свежеприготовленным рабочим раствором акридинового оранжевого (1 часть концентрированного раствора на 9 частей PBS (pH 6,0)).
5. Стряхнуть краску и промыть в 2 сменах PBS по 2 мин.
6. ЗаклЮчить препарат.

Формалиновая фиксация может нарушить окрашивание, лучше использовать спиртовые фиксаторы или метанол-ЛУК (3:1). Использование ацетатного буфера pH 4,2 вместо PBS позволяет получить более резкие цветовые различия между ДНК и РНК.

**Протокол 2.2.3. Q-бэндинг митотических хромосом с акрихином**

**Подкисленная вода:** Кислотность бидистиллированной воды довести 0,1N HCl до pH 4,5;

**Раствор красителя:** 0,25 мг акрихина (Quinacrine dihydrochloride, Sigma) растворить в 50 мл бидистиллированной воды, довести кислотность 0,1N HCl до pH 4,5.

1. Размочить препараты хромосом в дистиллированной воде.
2. Окрашивать раствором акрихина 15 минут.
3. Промыть 3 раза по 3 мин в подкисленной воде.
4. Высушить препараты на воздухе (сухие препараты можно хранить замороженными в темной коробочке).
5. ЗаклЮчить препарат в подкисленную воду и исследовать под микроскопом.

***Протокол 2.2.4. Q-бэндинг митотических хромосом с акрихин ипритом*****Приготовить краситель:**

1. 2 г NaCl растворить в 100 мл буфера Макильвейна (pH 6,8-7,0).
2. 5 мл акрихин иприта (Quinacrine mustard, Sigma) растереть в 1 мл дистиллированной воды до полного исчезновения комочков.
3. Влить воду с красителем в буфер и ополоснуть ступку буфером, важно убедиться в полном растворении красителя.
4. Хранить при 8°C в темноте.

**Окраска:**

1. Сухие препараты сполоснуть буфером Макильвейна, pH 6,8-7,0.
2. Поместить стекла в краску и оставить на 20-60 мин при 8°C в темноте.
3. Промыть в буфере Макильвейна pH 6,8-7,0 в течение 2-8 мин.
4. Заключить в фотозащитную среду и исследовать под микроскопом.

**Отмыть краситель:**

1. Удалить покровное стекло.
2. Промыть препарат в воде 1-2- мин.
3. Поместить в смесь: 96% этанол-ЛУК-вода (1:1:1) на 10-15 мин.

### ***Протокол 2.2.5. Дифференциальная окраска хромосом хромомицином АЗ***

**Концентрированный раствор:** 0,5 мг/мл водный раствор хромомицина АЗ оставить на 1 неделю при 4°C в темноте для созревания.

**Рабочий раствор:** к концентрированному раствору красителя добавить равный объем буфера Макильвейна рН 7,0 и добавить MgCl<sub>2</sub> до 5 мМ.

1. Нанести рабочий раствор красителя на препарат и окрашивать 30-45 мин при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C
2. Сполоснуть буфером Макильвейна рН 7,0
3. Заключить препарат в фотозащитную среду и оставить в темной коробочке при 4°C.
4. Исследовать препарат под микроскопом не раньше следующего дня.

### ***Протокол 2.2.6. Окраска хромосом хромомицином АЗ/дистамицином А***

**Раствор красителя:** 0,5 мг/мл раствор хромомицина АЗ в дистиллированной воде оставить на 1 неделю при 4°C в темноте для созревания.

**Контрастирующий раствор:** 0,2 мг/мл дистамицина А в буфере Зёренсена (рН 6,8). Дистамицин А в водном растворе нестойк, хранить при -20°C в аликвотах, не размораживая.

1. Смешать красящие растворы 1:1 и нанести на препарат.
2. Окрашивать в темноте в течение 20-30 мин при комнатной температуре.
3. Сполоснуть препарат в буфере Зёренсена (рН 6,8).
4. Заключить препарат в фотозащитную среду и исследовать под микроскопом.

***Протокол 2.2.7. Окраска АТ-обогащенной ДНК на препаратах хромосом***

**Контрастирующий раствор:** 0,1 мМ свежеприготовленный раствор актиномицина D (Mg. 1255,5) в буфере Макильвейна (pH 6,8).

**Раствор красителя:** 1 мкг/мл DAPI в буфере Макильвейна (pH 6,8) или 100 мкг/мл Hoechst 33258 в буфере Макильвейна (pH 6,8) или любом другом буфере с низким содержанием NaCl.

1. Гидратировать препараты в серии спиртов понижающей концентрации.
2. Поместить в буфер Макильвейна (pH 6,8) на 2 мин.
3. Обработать контрастирующим раствором в течение 20 мин.
4. Промыть 2 мин в буфере Макильвейна (pH 6,8).
5. Окрасить препараты раствором одного из красителей в течение 15 мин.
6. Промыть препараты буфером Макильвейна (pH 6,8).
7. ЗаклЮчить в фотозащитный раствор и исследовать под микроскопом.

***Протокол 2.2.8. Окраска нуклеиновых кислот различными флуорохромами***

**Рабочий раствор DAPI:** 0,02 мкг/мл в 2x SSC.

**Рабочий раствор PI:** 1-10 мкг/мл в 2x SSC.

**Концентрированный раствор YOYO-1:** 2,5 мкМ в DMSO, хранить при 4°C.

**Рабочий раствор YOYO-1:** свежеприготовленный 2,5 нМ раствор в 2x SSC

**Концентрированный раствор SYTO-1:** 1 мМ в DMSO, хранить при 4°C.

**Рабочий раствор SYTO-1:** свежеприготовленный 10 мкМ раствор в 2x SSC.

**Концентрированный раствор TO-PRO-3:** 1мМ в DMSO, хранить при 4°C.

**Рабочий раствор TO-PRO-3:** свежеприготовленный 1 мкМ раствор в 2x SSC.

1. Препараты сполоснуть 2x SSC.
2. Провести окрашивание рабочим раствором красителя:  
DAPI – 1-3 мин  
PI – 1-5 мин для нативного хроматина,  
– 15-30 мин – после денатурации.  
TO-PRO-3 – 5 мин.  
YOYO-1 – 30-40 мин.  
SYTO 16 – 10 мин.
3. Сполоснуть 2x SSC.
4. Заключить в фотозащитный раствор и исследовать под микроскопом.

### ***Протокол 2.2.9. Совмещенная с заключением окраска нуклеиновых кислот***

**Концентрированный раствор DAPI:** 0,5 мг/мл водный раствор, хранить в темноте при -20°C.

**Концентрированный раствор PI:** 1 мг/мл водный раствор, хранить в темноте при -20°C.

**Концентрированный раствор хромомицина А3:** 0,5 мг/мл водный раствор, оставить на 1 неделю при 4°C в темноте для созревания.

1. Добавить краситель непосредственно в фотозащитную заключающую среду: DAPI – 50 нг/мл; PI – 1 мкг/мл; хромомицин А3 – 20 мкг/мл.
2. Заключить препараты в подготовленную среду с красителем и оставить в темной коробочке при 4°C на несколько часов (для DAPI и PI) или на несколько дней, вплоть до 2 недель (для хромомицина А3).
3. Исследовать препараты под микроскопом.

***Протокол 2.2.10. Прижизненная окраска клеток в культуре***

1. Вырастить монослой клеток на покровном стекле.
2. Растворить 25 мг SITC в 10 мл культуральной среды (до конечной концентрации 2,5 мг/мл).
3. Инкубировать клеточную культуру в среде с краской 48 часов.
4. ЗаклЮчить монослой клеток в том же растворе SITC в среде для культивирования и исследовать под микроскопом.

В живых клетках окрашиваются цитоплазматические везикулы вокруг ядра, а у мертвых клеток флуоресцирует только мембрана. Если такой препарат зафиксировать в растворе, содержащем спирт, то краситель вымывается из цитоплазмы и интенсивно окрашивает ядро.

***Протокол 2.2.11. Окраска лизосом в живых клетках***

**Концентрированный раствор** акридинового оранжевого – 1 мг краски в 2 мл буфера Макильвейна, довести pH до 7,3 минимальным количеством HCl или NaOH.

**Рабочий раствор:** 1 мл концентрированного раствора развести в 99 мл буфера Макильвейна, при необходимости довести pH до 7,3.

1. Вырастить монослой клеток на покровном стекле.
2. Отмыть клетки от культуральной среды буфером Макильвейна.
3. Инкубировать 5 мин в свежеприготовленном рабочем растворе красителя.
4. Сполоснуть несколько секунд в буфере Макильвейна, заклЮчить препарат в том же буфере и исследовать под микроскопом.

Лизосомы живых клеток флуоресцируют оранжевым цветом. Мертвые клетки имеют ярко-красную флуоресценцию цитоплазмы и ярко-зеленую ядер.

### 2.3. Иммуноцитохимия

В основе метода лежит способность антител специфически связываться с определенными веществами в клетках и тканях на препаратах. В отличие от гистохимических методов, использование антител позволяет достичь значительно более высокой точности распознавания для тех или иных веществ. Однако внедрение иммуноцитохимических методов в практику стало возможно только после того, как удалось разработать способы конъюгации молекул красителя с антителами без нарушения их иммунных свойств.

С 30-х годов прошлого столетия метод претерпел несколько этапов развития и стал значительно точнее и эффективнее. В настоящее время исследователь может использовать не только высоко-специфичные афинно-очищенные моноклональные антитела вместо поликлональных антисывороток, но и  $F(ab')_2$  фрагменты иммуноглобулинов, состоящие из вариабельных частей легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов. Такие укороченные молекулы более специфично связываются с мишенью на препарате и меньше подвержены деградации.

При осуществлении непрямого метода иммуноцитохимического окрашивания используют антитела против исследуемого белка, полученные в результате иммунизации того или иного животного. А они уже специфически распознаются мечеными флуорохромами антителами против иммуноглобулинов того животного, в котором были выработаны первые антитела (Рисунок 2.1). В случае прямого метода используют антитела против исследуемого вещества непосредственно конъюгированные с репортерными молекулами (Рисунок 2.1, А). Подходы, аналогичные иммуноцитохимическим, могут применяться и с другими реактивами, обладающими высокой специфичностью распознавания. Например, авидин из яичного белка и стрептавидин, выделенный из *Streptomyces avidinii*, обладают высоким сродством к биотину, а яд бледной поганки фаллоидин очень специфично распознает фибриллярный актин.

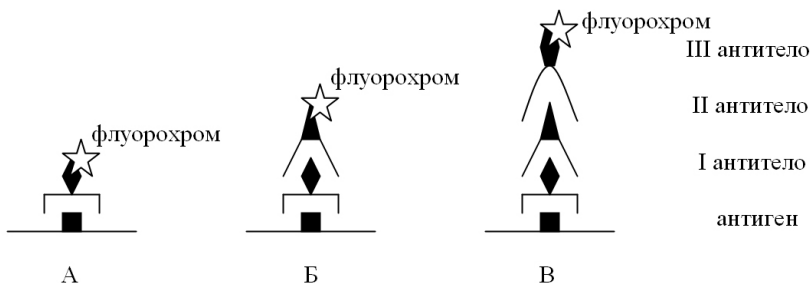


Рисунок 2.1. Схемы экспериментов прямого (А) и непрямого (Б и В) методов.

При проведении иммуноцитохимического окрашивания часто возникает риск неспецифических реакций. Это может происходить потому, что разные белки могут иметь одинаковые или сходные эпитопы, распознающиеся антителами. Кроме того, при нарушении условий хранения (многократных размораживаниях и замораживаниях, бактериальном заражении) антитела разрушаются и начинают неспецифически оседать на препарате. Неспецифическая адсорбция антител может происходить также при использовании слишком высоких концентраций. Чтобы этого не происходило, необходимо провести серию пробных реакций на препаратах, содержащих исследуемый антиген, используя последовательные разведения антител. Разведение подбирают таким образом, чтобы неспецифическое окрашивание было минимально, в то время как специфическое было достаточно интенсивно.

Коммерческие антитела необходимо хранить согласно инструкции производителя. В случае использования антисывороток в них добавляют азид натрия или тимерозол до 0,02% и хранят при 4°C, можно также добавить в них равный объем глицерина – тогда сыворотку можно будет хранить при -20°C, но только до первого размораживания. Как коммерческие, так и некоммерческие антитела можно размораживать только один раз, а после этого их можно хранить непродолжительное время при 4°C. Поэтому удобнее сразу расфасовать все имеющиеся антитела на отдельные порции, достаточные для использования один или несколько раз.



Неспецифическая реакция может быть связана также с неправильной фиксацией и хранением препарата. Независимо от метода приготовления препаратов и используемых фиксаторов, препараты во время проведения иммуноцитохимических реакций нельзя высушивать, особенно до осуществления соответствующих отмывок. К сожалению, невозможно порекомендовать один фиксатор для всех возможных иммуноцитохимических реакций. Выбор фиксатора главным образом зависит от влияния того или иного реактива на антигенные свойства исследуемого белка. Иными словами при использовании разных антител, возможно, придется следовать разным стратегиям фиксации препарата.

Традиционно используются фиксаторы на основе формалина, хлороформа, ацетона, спиртов, уксусной кислоты (Таблица 2.1), при этом для сохранности антигена лучше готовить мазки, давленные препараты, разного рода срезды и замороженные срезы, чем проводить реакцию на регидратированных парафиновых срезах. Кроме того, кратковременная фиксация всегда предпочтительнее, особенно это касается формалиновых фиксаций, поскольку при длительном хранении из-за возникновения в белковых молекулах поперечных сшивок появляется сильная автофлуоресценция тканей (Раздел 2.1), затрудняющая интерпретацию результатов. При исследовании эпитопов, изменяющих антигенные свойства при высыхании, нельзя использовать фиксаторы на основе ацетона, в таком случае лучше использовать этанол различных концентраций. Иногда предпочтительнее использование метанола, однако в каждом случае фиксатор придется подбирать экспериментально. Приготовленные препараты лучше использовать как можно быстрее, однако иногда их можно хранить некоторое время в буферном растворе с 0,01% азидом натрия или же в 70% этаноле или метаноле. А в том случае, когда возможно использование высушенных препаратов, их можно хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ , не допуская обводнения.

**Таблица 2.1. Фиксаторы, используемые для иммуоцитохимии**

<b>Название</b>	<b>Состав</b>	<b>Применение</b>	<b>Метод</b>
10% формалин	100мл 40% формалина, 9г NaCl, 900мл воды	Фиксация тканей и органов	Фиксировать до 4 часов, в зависимости от объема образца, при 4°C, провести по спиртам восходящей концентрации от 30% до 70% и оставить на ночь для удаления формалина.
4% PFA	4% PFA из 10% 1x PBS pH 7,0	Фиксация монослы клеток, спрэдов	Фиксировать 2 – 30 мин при 4°C, отмыть 30 мин – ночь в 1x PBS при 4°C.
2% PFA – метанол	2% PFA из 10% 70 % метанол 1x PBS pH 7,0	Фиксация монослы клеток, замороженных срезов	Фиксировать до 1,5 часов при 4°C, оставить на ночь в 70% метаноле.
4% PFA – этанол	4% PFA из 10% 50% этанол 1x PBS pH 7,0	Фиксация монослы клеток, замороженных срезов	Фиксировать до 1,5 часов при 4°C, оставить на ночь в 70% этаноле.
Этанол	Этанол различных концентраций	Фиксация замороженных срезов, спрэдов	Фиксировать при 4°C или при комнатной температуре разное время.

<b>Название</b>	<b>Состав</b>	<b>Применение</b>	<b>Метод</b>
Метанол – ЛУК	3 части метанола 1 часть ЛУК	Фиксация суспензии клеток, замороженных срезов	Фиксировать в 3 сменах ледяного фиксатора, оставить на ночь при -20°C
Этанол – ЛУК	95% этанола 5% ЛУК	Фиксация замороженных срезов, давленных препаратов	Фиксировать 1 – 5 мин при 4°C
Фиксатор Карнуа	60% этанол, 30% хлороформ, 10% ЛУК	Фиксация тканей и органов	Фиксировать при комнатной температуре в течение ночи, отмыть в 70% этаноле.
Метакарн	60% метанол, 30% хлороформ, 10% ЛУК	Фиксация тканей и органов	Фиксировать при комнатной температуре в течение ночи, отмыть в 70% этаноле.
Хлороформ–ацетон	50% хлороформ 50% ацетон	Фиксация замороженных срезов	Фиксировать 5 мин при 4°C, высушить на воздухе
Ацетон	100% ацетон	Фиксация замороженных срезов	Фиксировать 10 мин при 4°C, высушить на воздухе
Ацетон–метанол	50% ацетон 50% метанол	Фиксация мазков и спрэдов	Фиксировать 2 мин при комнатной температуре, отмыть в 1xPBS 5 мин

Еще одним важным фактором, влияющим на получение положительных результатов, является хорошая адгезия препарата к стеклу, поскольку из-за многократных отмывок с детергентами плохо приклеенный препарат можно потерять. Классический способ наклейки на белок в данном случае не подходит, поскольку это увеличит фоновое неспецифическое связывание антител. Монослой клеток помещают в фиксатор вместе со стеклом, на котором они выросли. Для давленных препаратов, мазков и срезов используют чистые обезжиренные стекла, отмытые в растворах детергентов и этаноле, но не в кислоте, изменяющей заряд поверхности стекла. Для наклеивания срезов можно покрывать стекла желатином и даже использовать более сильные адгезивы, такие как поли-L-лизин и аминопропилтриэтоксисилан. В настоящее время чистые, обработанные адгезивами предметные стекла можно купить, но надо помнить, что они сохраняют свои свойства только при первом использовании, в дальнейшем с ними надо обращаться как с обычными стеклами.

Для предотвращения поверхностной адсорбции и уменьшения неспецифического связывания антител рекомендуется предварительно обработать препараты блокирующим раствором. Принцип его действия основан на оккупации участков, способных к связыванию небольших белковых молекул, поэтому в качестве блокирующих растворов часто используют 10% нормальную сыворотку или 3% раствор БСА. При выборе блокирующего реагента важно убедиться, что используемые антитела не имеют кросс-реакции с выбранной сывороткой. Более качественная забивка получается при использовании 4–6% обезжиренного сухого молока, однако даже незначительные примеси жира могут вызвать появление грязных разводов на препарате. Во избежание этого готовый раствор несколько раз центрифугируют, каждый раз отбирая раствор со дна и не забывая верхнюю фракцию. В настоящее время выпускаются готовые к употреблению порошкообразные блокирующие реагенты на основе измельченных ультразвуком казеинов молока, дающие прекрасный эффект и удобные в использовании. Вне зависимости от выбранного реагента, его разводят в 1x PBS или другом физиологичном буфере с pH 6,8–

7,2 с добавлением детергента: 0,05% Triton X-100, 0,02% Saponin или 0,02% Tween 20. Тот же раствор рекомендуется для разведения антител и проведения отмывок, хотя в некоторых случаях долю блокирующего реагента в растворе можно сократить в несколько раз.

Инкубирование препарата с антителами можно проводить от 30 минут до нескольких часов, варьируя температуру от 4° до 37°C, подбирая оптимальные условия. Чем выше температура, тем быстрее работают антитела, но и больше неспецифическое связывание. При 4°C целесообразно проводить инкубацию в течение ночи, но в этом случае обязательно добавление в раствор 0,02% азиды натрия или тимерозола для предотвращения размножения бактерий.

Отмывку препарата проводят после каждого раунда инкубации с антителами 3-4 раза в 1x PBS с детергентом по 5 минут при постоянном покачивании. При использовании непрямого метода каждый этап окрашивания будет сопровождаться последующей отмывкой.

Иногда для усиления сигнала проводят трехэтапное окрашивание с использованием как вторых, так и третьих антител, конъюгированных с флуорохромами (как правило, одними и теми же или с перекрывающимися спектрами возбуждения и излучения), однако в этом случае возрастает риск амплификации неспецифического сигнала.

В некоторых случаях возникает необходимость одновременного выявления нескольких антигенов. В этом случае можно следовать двум разным стратегиям. Первая основана на последовательном выявлении антигенов и применяется тогда, когда возможны перекрестные реакции или используются первичные антитела на основе одних и тех же иммуноглобулинов. В этом случае приходится полностью проводить окрашивание, получать изображения, затем тщательно отмывать препарат и проводить реакцию с другими антителами. Этот путь наименее результативен и неудачи возможны не только из-за недостаточной отмывки, но и вследствие слишком тщательной отмывки, вплоть до полной потери препаратов. В случае возможных кросс-реакций первичных антител, полученных в разных организмах, проводят

последовательные окраски. Коммерческие вторичные антитела редко имеют сродство друг к другу (это можно уточнить в описании производителя) и поэтому окраску ими можно проводить одновременно.

Во втором случае, когда все используемые антитела имеют высокую специфичность и не связываются друг с другом, возможно проведение одновременного окрашивания первичными, а затем одновременное окрашивание вторичными антителами. Следует напомнить, что используемые иммуноглобулины должны не только быть разного происхождения, но и нести флуорохромы с не перекрывающимися спектрами излучения.

Кроме потребности в совмещении нескольких иммуноцитохимических реакций, довольно часто возникает необходимость одновременного использования других методов исследования. Здесь решающим фактором является сохранность антигенных свойств. Поэтому окраску антителами проводят непосредственно после фиксации. То есть до нее могут быть проведены только прижизненные манипуляции, а все остальные методы исследования можно применять после иммунохимической окраски. Если необходимо дополнительно окрасить препарат флуоресцентными красителями, окрашивание проводят перед заключением препарата. При использовании длительных методик, связанных с многократным высушиванием препарата, целесообразно сначала исследовать его под микроскопом, сохранить полученные изображения, а уже потом проводить последующие обработки. Независимо от того, будете ли вы смотреть препарат в один прием или в несколько, все используемые флуорохромы по возможности не должны иметь перекрывающиеся спектры излучения.

Готовые препараты лучше исследовать сразу, однако их можно хранить некоторое время в горизонтальном состоянии в темных коробочках при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Протокол 2.3.1. Непрямое иммуоцитохимическое окрашивание****Блокирующий раствор:** 3% БСА в 1х PBS; 0,02% Tween 20**Раствор для разведения антител:** 1% БСА в 1х PBS; 0,02% Tween 20**Развести антитела** в соответствии с результатами пробных экспериментов или рекомендациями производителей.

1. Сухие и частично дегидратированные препараты насытить водой в серии спиртов понижающихся концентраций.
2. Поместить стекла на 1–3 мин в 1х PBS.
3. Нанести на препарат 500 мкл блокирующего раствора, накрыть кусочком парафильма 24х50мм<sup>2</sup>, поставить во влажную камеру и инкубировать 30–60 мин при 37°C.
4. Стряхнуть блокирующий раствор вместе с парафильмом и нанести 200 мкл раствора I антител. Накрыть новым кусочком парафильма и инкубировать во влажной камере 40–60 мин при 37°C.
5. Отмывать в 3 сменах 1х PBS; 0,02% Tween 20 по 5 мин при 24 °–37°C, непрерывно качая.
6. Нанести на препарат 200 мкл раствора II антител, накрыть кусочком парафильма, поставить во влажную камеру и инкубировать 40–60 мин при 37°C.
7. Отмывать в 4 сменах 1х PBS; 0,02% Tween 20 по 5 мин при 24 °–37°C, непрерывно качая.
8. Заключить препарат в фотозащитную среду и исследовать под микроскопом.

При использовании трех и более антител, пункты 5 и 6 повторяют необходимое количество раз. Более 5 циклов окрашивания проводить не рекомендуется, поскольку из-за многократно увеличенного неспецифического связывания полученные результаты будет трудно интерпретировать. Этапы с 6 по 8 необходимо проводить в темноте.

#### **2.4. Включение меченых предшественников в реплицирующуюся ДНК**

Включение галогенизированных предшественников в реплицирующуюся ДНК позволяет получать препараты метафазных хромосом с высоким разрешением (Протокол 2.4.1), исследовать репликационный бэндинг хромосом, а также проводить исследования временных особенностей репликации различных хроматиновых фокусов. В основе этих методов лежит способность клеток усваивать галогенизированные нуклеотидтрифосфаты из питательной среды и включать их в состав синтезирующейся ДНК. В зависимости от срока и длительности инкубации, а также от способов визуализации меченой ДНК, можно получать различные результаты.

Препараты метафазных хромосом с включенным бромдезоксисуридином можно окрашивать флуоресцентными красителями или выявлять участки включения меченого предшественника иммунохимическими методами.

Антитела против галогенизированных предшественников узнают модифицированный нуклеотид только в одонитевой последовательности, поскольку комплементарно связанная вторая цепь маскирует эпитоп. Поэтому окраска антителами включенных галогенизированных предшественников требует обязательной предварительной денатурации (Протокол 2.4.2). Для этого препарат обрабатывают 0,1N раствором соляной кислоты. Возможно также использование метода денатурации ДНК на препарате путем инкубирования в 70% формамиде при 70°C (Протокол 2.5.2).

При исследовании репликации в культуральную среду вводят галогенизированные предшественники до конечной концентрации 10мкМ. Время инкубации может колебаться от 15 до 60 мин, в зависимости от целей эксперимента. При необходимости проведения одновременного мечения ДНК, реплицирующейся в разное время, используют комбинацию йоддезоксисуридина и хлордезоксисуридина. Антитела к этим предшественникам были первоначально выделены как побочный продукт при получении антител к бромдезоксисуридину, поэтому, имея низкую кросс-реакцию между собой, все они, как правило, достаточно интенсивно



окрашивают BrdU. Сроки и продолжительность инкубации с предшественниками зависит от продолжительности клеточного цикла культивируемых клеток и целей исследования, при этом время инкубации с CldUTP не должно превышать 45 мин. Иммунохимическую детекцию включенных предшественников проводят также как описано в протоколе 2.4.3, последовательно выявляя антителами сначала включенный CldU, а затем IdU.

Включение предшественников, непосредственно меченных флуорохромами, позволяет избежать этапа детекции, а также наблюдать за живыми клетками. Однако флуоресцентные конъюгаты, в отличие от галогенизированных, не могут преодолеть плазматическую мембрану и попасть в клетку. Для решения этой проблемы используют два метода: микроинъекция предшественника в клетку и метод скрэтчинга (нанесение царапин на монослой клеток стерильной иглой) с последующей инкубацией в среде с меченым предшественником.

#### ***Протокол 2.4.1. Получение метафазных хромосом высокого разрешения***

**Питательная среда для клеток:** 385 мл RPMI 1640, 5 мл 200мМ L-глутамин, 10 мл антибиотиков (5000 ед/мл пенициллина и 5000 мкг/мл стрептомицина), 100 мл фетальной сыворотки, инактивированной нагреванием.

**Гипотонический раствор:** 0,075М KCl в дистиллированной воде

**Фиксатор:** метанол-ЛУК (3:1), охлажденный до  $-20^{\circ}\text{C}$

**Концентрированный раствор метотрексата:** 0,01мМ в дистиллированной воде

**Концентрированный раствор BrdUTP:** 1 мг/мл в дистиллированной воде.

1. Культуру лимфоцитов, стимулированную фитогемагглютинином, инкубировать при  $37^{\circ}\text{C}$ .
2. Через 72 часа добавить метотрексат до 0,1мкМ и инкубировать еще 17 часов.

3. Собрать клетки центрифугированием и отмыть осадок дважды питательной средой.
4. Ресуспензировать клетки в RPMI 1640 с добавлением 20% БСА и перенести во флакон.
5. Добавить BrdUTP до конечной концентрации 50 мкг/мл и инкубировать 7 часов.
6. За 10 мин до окончания культивирования ввести в среду колцемид (10 мкг/мл) до конечной концентрации 0,06 мкг/мл.
7. Собрать клетки центрифугированием при 1000g в течение 10 мин и ресуспензировать в гипотоническом растворе, согретом до 37°C.
8. Инкубировать 10 мин в гипотоническом растворе при 37°C.
9. Добавить 100 мкл фиксатора в пробирку с гипотоническим раствором и собрать клетки центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин.
10. Ресуспензировать клетки в ледяном фиксирующем растворе и оставить на 30 мин при -20°C.
11. Собрать клетки центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин, ресуспензировать в новой порции фиксатора и оставить на 10 мин при -20°C.
12. Собрать клетки центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин, ресуспензировать в новой порции фиксатора и хранить при -20°C до приготовления препаратов.
13. Чистые сухие предметные стекла поместить в 96% этанол и охладить до 4°C.
14. Собрать клетки центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин, ресуспензировать в свежем фиксирующем растворе.
15. Промыть предметное стекло в ледяной дистиллированной воде и раскапать на него суспензию фиксированных клеток.
16. Внести препарат на несколько секунд в пламя горелки и высушить на воздухе.

**Протокол 2.4.2. Иммунохимическое выявление включенного BrdU****Блокирующий раствор:** 4% БСА в 1х PBS, 0,05% Tween 20**Раствор для разведения антител:** 1% БСА в 1х PBS, 0,05% Tween 20**Антитела против BrdU:** развести в соответствии с рекомендациями производителей.**Вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом:** развести в соответствии с рекомендациями производителей.

1. Опустить препараты на 5-10 мин в 1х PBS.
2. Денатурировать ДНК инкубацией в 0,1N HCl в течение 5-10 мин при комнатной температуре.
3. Отмыть в 2 сменах 1х PBS по 5 мин.
4. Инкубировать в блокирующем растворе 10 мин при 37°C.
5. Нанести 100 мкл раствора антител против BrdU под кусочек парафильма 24х50мм<sup>2</sup> и инкубировать 30 мин при 37°C во влажной камере.
6. Отмыть препараты в 3 сменах 1хPBS; 0,05% Tween 20 при комнатной температуре, непрерывно качая.
7. Нанести 100 мкл раствора вторичных антител под кусочек парафильма 24х50мм<sup>2</sup> и инкубировать 30 мин при 37°C во влажной камере.
8. Отмыть препараты в 3 сменах 1х PBS; 0,05% Tween 20 при комнатной температуре, непрерывно качая.
9. Провести по серии спиртов повышающейся концентрации и высушить на воздухе.
10. Заключение в фотозащитную среду и исследовать под микроскопом.

Этапы с 7 по 10 по возможности проводить в темноте.

### 2.5. Мечение нуклеиновых кислот *in situ*

Иногда возникает необходимость выявления ДНК на уже фиксированных препаратах. Кроме проведения иммуноцитохимической окраски (раздел 2.3) антителами к двунитовой ДНК, хорошие результаты дает мечение нуклеиновых кислот *in situ*. Во-первых, специфичность работы используемых полимераз значительно выше специфичности реакции антител на регидратированных препаратах. Во-вторых, такие методы позволяют решать особые задачи. Например, если необходимо выявить районы хромосом, обогащенные однонитевыми разрывами, с успехом применяется метод ник-трансляции *in situ* (Протокол 2.5.1). Сам по себе метод несложен, но важно использовать высококачественную ДНК-полимеразу I. Также важно использовать препараты, не подвергавшиеся очень длительным фиксациям в метанол-ЛУК (3:1), поскольку в уксусной кислоте ДНК подвергается гидролизу и, хотя этот процесс не идет так быстро, как в соляной кислоте, он может привести к получению неадекватных результатов. Кроме того, нельзя использовать фиксаторы на основе формалина, так как даже после длительных отмывок препарата в нем могут оставаться следовые количества фиксатора, ингибирующие полимеразу. Для данного метода не рекомендуется использование предшественников ДНК, непосредственно меченных флуорохромами, так как это снижает чувствительность метода. Лучше всего использовать дезоксирибонуклеотиды, конъюгированные с гаптенами, с последующей иммунохимической детекцией, что позволяет также амплифицировать сигнал.

Для осуществления мечения ДНК на препарате используют метод ник-трансляции с применением ДНКазы I в концентрации, достаточной для нанесения одного разрыва на каждые 100 п.н. (Раздел 2.6), а также олигомечение со случайными праймерами по протоколу олигомечения ДНК в растворе, но без добавления матрицы (Раздел 2.6). Денатурацию препарата для последующего олигомечения проводят в 70% формамиде (Протокол 2.5.2). Успех реакции зависит от качества проведения денатурации, поэтому необходимо строго соблюдать временной и температурный режимы.

Мечение ДНК на препаратах позволяет выявить тонкие петли и нити, чего нельзя сделать окрашиванием ДНК-специфичными красителями и прижизненным включением меченых предшественников, поскольку в этих случаях флуоресценция пропорциональна количеству ДНК, а при получении изображения участки со слабой флуоресценцией просто не детектируются. Если же использовать выдержки, достаточные для фиксации слабого сигнала, то участки с высокой концентрацией ДНК превратятся в огромные засвеченные пятна. В том случае, когда ДНК метят на фиксированном препарате, реакция проходит только на его поверхности, что выравнивает интенсивность сигнала в районах с разной концентрацией ДНК.

Для осуществления мечения определенной последовательности на препарате, используют метод полимеразной реакции *in situ* со специфичными праймерами (PRINS) (Протокол 2.5.6). В отличие от ПЦР *in situ*, когда многократно амплифицированный продукт ПЦР затем смывается с препарата и анализируется молекулярными методами, в результате реакции PRINS амплифицированный продукт с включенными мечеными предшественниками остается на препарате, маркируя место локализации искомой последовательности. Оба метода объединяет применение термостабильной ДНК полимеразы, поскольку это дает возможность использовать достаточно длинные праймеры с высокой температурой отжига. Однако выбор полимеразы для каждого из методов будет свой. Так, если для ПЦР *in situ* важно использование точных полимераз, то для мечения полимеразной реакцией *in situ* наоборот, предпочтение будет отдаваться менее точным полимеразам, поскольку высокая точность не имеет большого значения для локализации сигнала, зато такие полимеразы работают быстрее и менее чувствительны к состоянию ДНК матрицы, что важно при работе с фиксированными препаратами. Здесь следует снова отметить, что как и для других методов мечения ДНК *in situ* для полимеразной реакции нельзя использовать препараты, фиксированные формалином.

Сложность в осуществление этого метода на практике состоит в том, что полимеразы могут использовать в качестве затравки концы нитей ДНК в местах разрывов и частичной деградации, произошедшей в процессе фиксации. Решать эту проблему можно несколькими способами. Если возможно использование щадящей фиксации (например, охлажденными спиртовыми растворами) избавляться приходится только от существующих в хромосомной ДНК разрывов. Для этого используют лигазную реакцию (Протокол 2.5.3). Если же нельзя избежать использования фиксирующего раствора, содержащего уксусную или пикриновую кислоту, для уменьшения неспецифического мечения проводят предварительную застройку образовавшихся брешей с последующей лигазной реакцией. Для этого можно использовать фрагмент Кленова и инкубировать препарат при 37°C, как в случае олигомечения, только без добавления праймеров, или использовать термостабильную полимеразу и провести реакцию при 72°C (протокол 2.5.4).

Еще один способ борьбы с неспецифическим мечением основан на «затуплении» 3'-концов ДНК в местах разрывов, в результате чего ДНК-полимераза не может использовать их в качестве затравки для последующего синтеза. Для этого также можно использовать фрагмент Кленова и провести реакцию при 37°C или обработать препарат при 72°C с термостабильной полимеразой (Протокол 2.5.5).

Денатурировать ДНК препарата, чтобы обеспечить ее комплементарное связывание с праймерами к исследуемой последовательности удобнее всего методом инкубации в 70% формамиде (Протокол 2.5.2). Поскольку для реакции PRINS используют термостабильную полимеразу, ДНК препарата можно также денатурировать уже в реакционной смеси прямо на стекле, но в этом случае возможно испарение части воды из-за нарушения целостности герметизирующего контура из резинового клея. Если это происходит, то в оставшемся буфере изменяется состав и фермент теряет работоспособность, а в тех участках, где препарат подсох, происходит неспецифическая адсорбция меченых нуклеотидов. Чтобы исключить испарение, некоторые производители выпускают специальные полипропиленовые

наклеивающиеся на предметные стекла камеры с крышечками. Они позволяют проводить денатурацию прямо на стеклах, однако увеличивают стоимость эксперимента не только за счет собственной цены, но и за счет увеличения объема реакционной смеси в десятки раз. Поэтому, в том случае, если полимерная реакция *in situ* ставится под покровным стеклом, целесообразно проводить предварительную денатурацию.

Увеличения чувствительности метода при локализации уникальных последовательностей можно достичь использованием нескольких однонаправленных праймеров, комплементарных участкам исследуемой последовательности на расстоянии 200-500 п.н.

Если необходимо локализовать несколько последовательностей на одном препарате, возможно проведение многоцветной PRINS. В этом случае, после каждой проведенной реакции включения меченного предшественника и последующей отмывки (Протокол 2.5.6, пункты 1-5) проводят реакцию затупления 3'-концов (Протокол 2.5.5), при этом в каждом следующем раунде дополнительную денатурацию. Реакционные смеси будут различаться меткой, конъюгированной с предшественником. Использование различных гаптенот требует отдельной иммунохимической детекции для каждого антителами, конъюгированными с флуорохромами с неперекрывающимися спектрами флуоресценции. Когда для реакции используют предшественники, непосредственно связанные с флуорохромами, детекция не нужна, но чувствительность метода снижается.

Для выявления определенных последовательностей РНК на препарате можно использовать метод обратной транскрипции *in situ* (RT-PRINS) (Протокол 2.5.7). В этом случае практически нет проблемы неспецифического мечения, зато возможны неудачи из-за быстрой деградации РНК. Поэтому все инструменты и посуда должны быть проавтоклавированы, а растворы приготовлены с использованием воды без нуклеазной активности. Для исследования лучше всего подходят свежезафиксированные препараты замороженных срезов на покровных стеклах.

**Протокол 2.5.1. Выявление однонитевых разрывов ДНК методом ник-трансляции *in situ***

**Реакционная смесь:** 10мкМ бета-меркаптоэтанол; 50мМ Tris-HCl (рН 7,5); 5мМ MgCl<sub>2</sub>; 50 мкг/мл БСА; 50мкМ каждого из дезоксирибонуклеотидов; 20мкМ биотинилированного dUTP и 10 единиц ДНК полимеразы I.

**Останавливающий реакцию раствор:** 500мМ NaCl; 50мМ ЭДТА.

**Блокирующий раствор:** 3% БСА в 2х SSC; 0,02% Tween 20.

**Детектирующий раствор:** авидин, стрептавидин или антитела против биотина, конъюгированные с флуорохромом, разведенные в соответствии с рекомендациями производителя.

1. На сухой препарат нанести 20 мкл смеси под покровное стекло 24x50мм<sup>2</sup> или 8 мкл под стекло 18x18мм<sup>2</sup>.
2. Инкубировать 1 час при 16°C, затем 30 мин при 18°C и 30 мин при 20°C.
3. Смыть покровное стекло останавливающим реакцию раствором.
4. Отмыть препарат в 2 сменах 2х SSC по 5 мин при комнатной температуре.
5. Нанести 200 мкл блокирующего раствора под кусочек парафильма и инкубировать 30-40 мин при 37°C во влажной камере.
6. Стряхнуть блокирующий раствор, нанести 100-200 мкл детектирующего раствора под кусочек парафильма и инкубировать 1 час при 37°C во влажной камере.
7. Отмывать в 4 сменах 2х SSC; 0,02% Tween 20 по 5 мин при 24 °–37°C и постоянном покачивании.
8. Провести по серии спиртов повышающейся концентрации и высушить на воздухе.
9. Заключить в фотозащитную среду и исследовать под микроскопом.

Этапы с 6 по 9 по возможности проводить в темноте.



***Протокол 2.5.2. Денатурация ДНК на препарате***

1. Сухие препараты подогреть до 60-70°C.
2. 70% формамид в 2х SSC налить в высокий стаканчик и нагреть до 70°C.
3. Опустить теплые стекла в раствор формамида на 2 мин.
4. Быстро перенести препарат в 70% этанол, охлажденный до -20°C, оставить на 3 мин.
5. Поместить стекло в 80% этанол, охлажденный до -20°C на 3 мин.
6. Поместить стекло в 96% этанол, охлажденный до -20°C на 3 мин.
7. Высушить препарат на воздухе.

Если подготовленный препарат не был использован в течение нескольких часов, процедуру придется повторить, но это отрицательно скажется на качестве зафиксированного материала.

***Протокол 2.5.3. Лигирование разрывов хромосомной ДНК***

**Лигазный буфер:** 0,66М Tris-HCl (pH 7,5); 50мМ MgCl<sub>2</sub>; 10мМ DTT; 10мМ dATP.

1. На сухие или размоченные в 2х SSC препараты нанести 10 мкл лигазного буфера, содержащего 0,5 единиц Т4 ДНК лигазы, накрыть покровным стеклом 24x24мм<sup>2</sup> и инкубировать 1 час при комнатной температуре.
2. Смыть покровное стекло буфером 2хSSC.
3. Провести препарат по серии спиртов повышающейся концентрации.
4. Высушить на воздухе.

***Протокол 2.5.4. Застройка брешей ДНК термостабильной полимеразой***

**Реакционная смесь:** буфер для Taq ДНК-полимеразы, содержащей 1,5-2,5мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,2мМ каждого из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов.

1. На сухой препарат нанести 10 мкл реакционной смеси, содержащей 1 единицу Taq-полимеразы, накрыть покровным стеклом 24х24мм<sup>2</sup> и заклеить по контуру резиновым клеем на основе каучука.
2. Инкубировать 15 мин при 72°С.
3. Смыть покровное стекло буфером 2хSSC.
4. Провести лигазную реакцию по протоколу 2.5.3.

***Протокол 2.5.5. Затупление 3'-концов дидезоксирибонуклеотидами***

**Реакционная смесь:** буфер для Taq ДНК-полимеразы, содержащей 2,5мМ MgCl<sub>2</sub>; 10мкМ каждого из дидезоксирибонуклеотидов.

1. На сухой препарат нанести 10 мкл реакционной смеси, содержащей 1 единицу Taq-полимеразы, накрыть покровным стеклом 24х24мм<sup>2</sup> и заклеить по контуру резиновым клеем на основе каучука.
2. Инкубировать 15 мин при 72°С.
3. Смыть покровное стекло 0,1М Tris-HCl (pH 9,5).
4. Промыть 2 раза по 10 мин в 0,1М Tris-HCl (pH 9,5).

**Протокол 2.5.6. Полимеразная реакция *in situ* (PRINS)**

**Реакционная смесь:** буфер для Taq ДНК-полимеразы, содержащей 2,5мМ MgCl<sub>2</sub>; по 0,2 мМ dATP, dCTP, dGTP, 0,13мМ dTTP и 0,07мМ биотинилированного dUTP.

**Блокирующий раствор:** 3% БСА в 2х SSC; 0,02% Tween 20.

**Детектирующий раствор:** авидин, стрептавидин или антитела против биотина, конъюгированные с флуорохромом, разведенные в соответствии с рекомендациями производителя.

1. На сухой препарат нанести 10 мкл реакционной смеси, содержащей по 40 пикомоль праймеров и 1 единицу Taq-полимеразы, накрыть покровным стеклом 24x24мм<sup>2</sup> и заклеить по контуру резиновым клеем на основе каучука.
2. Инкубировать 1 мин при температуре отжига праймеров.
3. Поднимать температуру по 1 градусу в мин до 72°C.
4. Инкубировать 30 мин при 72°C.
5. Отмыть в 4х SSC; 0,1% Tween 20 дважды по 10 мин при комнатной температуре.
6. Нанести 200 мкл блокирующего раствора под кусочек парафильма и инкубировать 30-40 мин при 37°C во влажной камере.
7. Стряхнуть блокирующий раствор, нанести 100-200 мкл детектирующего раствора под кусочек парафильма и инкубировать 1 час при 37°C во влажной камере.
8. Отмывать в 4 сменах 2х SSC; 0,02% Tween 20 по 5 мин при 24 °–37°C и постоянном покачивании
9. Провести по серии спиртов повышающейся концентрации и высушить на воздухе.
10. Заключить в фотозащитную среду и исследовать под микроскопом.

Этапы с 7 по 10 по возможности проводить в темноте.

**Протокол 2.5.7. Мечение РНК транскриптов *in situ* (RT-PRINS)**

**Буфер RT:** 100мМ Tris-HCl (pH 8,3); 140мМ KCl; 10мМ MgCl<sub>2</sub>; 25мМ бета-меркаптэтанол.

**Реакционная смесь:** 0,5мМ dATP, dCTP, dGTP; 0,07мМ dTTP и 0,08мМ биотинилированного dUTP в буфере RT.

**Блокирующий раствор:** 3% БСА в 2х SSC; 0,02% Tween 20.

**Детектирующий раствор:** авидин, стрептавидин или антитела против биотина, конъюгированные с флуорохромом, разведенные в соответствии с рекомендациями производителя.

1. Инкубировать препарат в 0,2М Tris-HCl (pH 7,4) с 0,1М глицина 10 мин при комнатной температуре.
2. Перенести в 2хSSC, 50% формамид и инкубировать 10 мин при комнатной температуре.
3. Повысить температуру до 65°C и инкубировать еще 10 мин при 65°C.
4. Отмыть в 2 сменах холодного буфера RT по 15 мин при 0°C.
5. Нанести 10 мкл буфера RT с 2 мкг праймеров и 0,25 единиц РНКазина, перевернуть на предметное стекло и инкубировать 90 мин при температуре отжига праймеров.
6. Аккуратно смыть стекло буфером RT и отмывать в 2 сменах того же буфера по 5 мин при температуре инкубации.
7. Нанести 10 мкл реакционной смеси, содержащей 0,25 единиц РНКазина (ингибитора РНКаз) и 0,5 единиц ревертазы (обратной транскриптазы). Перевернуть препарат на предметное стекло и инкубировать 90 мин при 42°C.
8. Аккуратно смыть стекло буфером RT.
9. Отмыть препарат в 2 сменах 0,5х SSC по 30 мин при 42°C.

10. Отмыть препарат в 2 сменах 0,1х SSC по 30 мин при 42°C.
11. Нанести 100мкл блокирующего раствора и инкубировать 30-40 мин при 37°C во влажной камере.
12. Стряхнуть блокирующий раствор, нанести 100 мкл детектирующего раствора и инкубировать 1 час при 37°C во влажной камере.
13. Отмывать в 4 сменах 2х SSC; 0,02% Tween 20 по 5 мин при 24°–37°C и постоянном покачивании
14. Провести по серии спиртов повышающейся концентрации и высушить на воздухе.
15. Заключить в фотозащитную среду и исследовать под микроскопом.

Этапы с 12 по 15 проводить в темноте.

## 2.6. Флуоресцентная гибридизация *in situ*

Разработанный Дж. Голлом и М.-Л. Пардью в 1969 г. на основе свойства нуклеиновых кислот комплементарно спариваться, метод гибридизации *in situ* позволяет точно определить локализацию практически любой последовательности ДНК или РНК непосредственно в клетке или клеточном ядре, на метафазных хромосомах, растянутых хроматиновых фибриллах и микрочипах. Последние 20 лет технология гибридизации *in situ* интенсивно развивалась и преобразовалась в целый комплекс методов, включающих: супрессорную FISH (CISS), одновременную многоцветную FISH, FISH на растянутых фибриллах, сравнительную геномную гибридизацию (CGH), хромосомный пэйнтинг (Zoo-FISH), M-FISH (многоцветная FISH с зондами к отдельным хромосомам), межвидовое цветное сегментирование хромосом (R<sub>x</sub>-FISH), спектральное кариотипирование (SKY), многоцветный бэндинг хромосом (MCB-FISH), 3D-FISH, а также FISH и CGH на микрочипах. Несмотря на различия отдельных методов, все они включают этапы денатурации меченого зонда и нуклеиновых кислот на препарате с последующей их одновременной ренатурацией.

Получение положительного результата зависит от сохранности нуклеиновых кислот на препарате. В первую очередь сохранность материала обеспечивает правильная обработка предметных стекол. Для давленных препаратов, мазков и срезов используют чистые обезжиренные стекла, отмытые в растворах детергентов и этаноле. Срезы наклеивают на стекла, обработанные поли-L-лизинном или аминопропилтриэтоксисиланом (Протокол 2.6.1). Использование желатина, так же как и альбумина, в данном случае невозможно, так как препараты будут перевариваться протеазами во время ферментативной предобработки, что приведет к неминуемой потере значительной части материала.

Фиксацию материала рекомендуется проводить в растворах на основе формалина и спиртов (Раздел 2.3). При этом длительная фиксация в формалине затрудняет ферментативное удаление белков, маскирующих нуклеиновые кислоты из-за образования сшивок, что приводит к снижению эффективности

гибридизации с зондом. Кроме того, при фиксации свыше 24 часов даже при 0°C, РНК в тканях практически полностью деградирует. Для сокращения времени фиксации крупных образцов тканей или органов в 4% PFA на буферном растворе добавляют 0,1-1% Triton X-100 или сапонин. Более целесообразно использовать мелкие образцы тканей, что также сократит время пропиток при заключении в парафин. Для гибридизации *in situ* пригодны парафиновые срезы толщиной 4-14 мкм. Лучшей сохранности РНК удается достичь при использовании замороженных срезов с последующей фиксацией в 4% PFA или в спиртовых растворах. Монослой клеток фиксируют в 4% PFA на 1x PBS или 2% PFA-метаноле (Таблица 2.1) с последующей пермеабиллизацией в 0,5% Triton X-100, пропиткой 20% глицерином и многократной заморозкой в жидком азоте и разморозкой. Для приготовления препаратов метафазных хромосом клеточную суспензию фиксируют в метанол-ЛУК (3:1), раскапывают на чистые охлажденные предметные стекла, но без последующего обжига в пламени горелки (как для дифференциального окрашивания флуоресцентными красителями, протокол 2.4.1). Если инкубация в гипотоническом растворе не позволила полностью избавиться от клеточного детрита – возможна кратковременная (1 – 3 сек) отмывка свежераскапанного препарата в 70% ЛУК с последующим высушиванием на воздухе.

Локализацию транскриптов лучше проводить сразу после приготовления препаратов во избежание деградации РНК. Препараты для исследования ДНК можно хранить в высушенном виде при 4°C или при -20°C несколько месяцев. Свежеприготовленные препараты хромосом, раскапанные на чистые стекла без адгезивов, могут отмываться в процессе предобработки или при детекции, тогда как старые препараты практически не теряются. При необходимости проведения срочной гибридизации препараты искусственно «состаривают» инкубированием в сухом виде от 2 час до 1 суток при 65°C.

В том случае, когда нужно избавиться от сигнала, возникшего при взаимодействии зонда с транскриптами, проводят обработку РНКазой А (Протокол 2.6.4). Если необходимо также исключить взаимодействие с РНК,

находящейся в составе дуплексов, проводят предобработку препаратов РНКазой Н.

Удаление белков, маскирующих нуклеиновые кислоты, существенно улучшает качество гибридизации на срезах тканей, монослое клеток, препаратах митотических хромосом и интерфазных ядер. Для этой цели используют пепсин (Протокол 2.6.5), протеиназу К (Протокол 2.6.6), а также некоторые специфические ферменты, необходимые, например, для переваривания хитина или целлюлозы.

После проведения любых ферментативных предобработок препарат необходимо дополнительно зафиксировать (Протокол 2.6.7). Это позволит не только сохранить морфологию и целостность материала, но и ингибирует работу ферментов.

Для удаления гистонов используют обработку 1М тиоцианатом натрия при 80°C в течение 10 мин. В некоторых случаях для удаления заряда и снижения неспецифического фонового связывания применяют ацелирование 0,25% уксусным ангидридом на 0,1М триэтаноламине рН 8,0 в течение 10-20 мин при комнатной температуре. Полностью подготовленный препарат сразу используют для гибридизации, но при необходимости его можно хранить в сухом виде при 4°C несколько суток.

В качестве зонда в любой разновидности гибридизации *in situ* используются фрагменты нуклеиновых кислот, в состав которых включены репортерные молекулы. Прямое мечение осуществляется включением предшественников нуклеиновых кислот, непосредственно конъюгированных с флуорохромами. Обычно для этого используют DEAC, FITC, Cy3, техасский красный и Cy5, спектры которых не перекрываются и позволяют применять их для одновременной многоцветной FISH. Для непрямого мечения используются предшественники, конъюгированные с гаптенами: биотин, дигоксигенин, динитрофенол, эстрадиол. При этом репортерная молекула связывается с dUTP линкером, имеющим разную длину. Очень короткий линкер ( $n < 5$ ) может затруднить связывание с антителами, тогда как слишком длинный линкер ( $n > 16$ ) может оказаться ломким, что отрицательно скажется на эффективности мечения.



Состав и размеры зондов варьируют в зависимости от целей эксперимента и особенностей метода. Последовательность, комплементарная исследуемой может быть представлена РНК, одно- и двунитовой ДНК, а также искусственным аналогом PNA, в котором молекула рибозы заменена коротким пептидом сходной пространственной организации. Длина зонда может колебаться от 20-40 п.н. вплоть до 1000 п.н. Каждый вариант имеет свои преимущества и недостатки. Рассмотрим их более подробно. Чаще всего используются двунитовые ДНК зонды, устойчивые к внешним воздействиям, которые можно успешно метить различными способами. Они требуют обязательной денатурации перед использованием. Однонитовые ДНК зонды не требуют денатурации, но их получение возможно только методом ПЦР с праймером к антисмысловой цепи. Эффективность такой реакции значительно ниже, поскольку количество продукта увеличивается в арифметической прогрессии, тогда как при использовании двух праймеров нарастание происходит в геометрической прогрессии. Недостатком ДНК-зондов является то, что они с трудом проникают внутрь толстых объектов. В этом случае предпочтительнее использование РНК зондов, которые получают методом транскрипции *in vitro* в присутствии меченых предшественников. Такие зонды имеют высокое удельное включение модифицированных предшественников, а, кроме того, позволяют легко удалять с препарата несвязавшиеся однонитовые молекулы РНК простым перевариванием РНКазой А. Однако они чувствительны к действию РНКаз на всех этапах гибридизации, что накладывает дополнительные требования при работе с ними.

Легко проникают внутрь любых образцов и устойчивы к действию РНКаз синтетические олигонуклеотидные пробы, но работать с ними приходится при низких температурах, иначе есть риск полностью отмыть весь зонд с препарата. Практически не имеют недостатков PNA зонды, они устойчивы к любым ферментам, не требуют денатурации, легко проникают в ткани, а также обладают способностью взаимодействовать с двунитовой ДНК на препарате, комплементарно связываясь с одной нитью ДНК и вытесняя другую, что делает ненужным

предварительную денатурацию ДНК образца. Однако такие зонды нельзя получать и метить в лабораторных условиях, а заказ и приобретение их у фирм-изготовителей требует существенных материальных затрат.

Определившись с типом зонда и выбрав подходящую метку, необходимо произвести включение меченого предшественника в состав зонда. Самым дешевым методом, позволяющим пометить любую двунитевую ДНК, является метод ник-трансляции (Протокол 2.6.8). Поскольку процесс мечения определяется одновременной работой двух ферментов – ДНКазы I, наносящей одонитевые разрывы, и ДНК полимеразы I, обладающей 5'-3' экзонуклеазной и полимеразной активностями, успех мечения в значительной степени зависит от качества очистки исходной ДНК.

Для ускорения мечения и уверенного получения фрагментов необходимого размера концентрацию ДНКазы I в рабочем растворе необходимо подобрать заранее, руководствуясь следующим протоколом (2.6.9).

Концевое мечение с использованием дезоксирибонуклеотидил трансферазы применяется главным образом для включения радиоактивного предшественника или мечения олигонуклеотидных зондов.

Метод олигомечения со случайными праймерами (Протокол 2.6.10) основан на использовании коротких олигонуклеотидных (6 – 9 п.н.) затравок, с равной вероятностью отжигающихся вдоль всей денатурированной молекулы ДНК и способности фрагмента Кленова ДНК полимеразы I к 5'-3' полимеразной активности. Он позволяет получать зонды с большей долей включения меченого предшественника, чем концевое мечение и ник-трансляция, но длина меченых фрагментов может быть ограничена только длиной матрицы, что не всегда удобно, а, кроме того, себестоимость зонда, полученного таким образом, выше. Тем не менее, этот метод достаточно прост и пользуется популярностью.

Наиболее дешевым и вместе с тем самым эффективным методом получения меченых ДНК зондов является метод ПЦР (Протокол 2.6.11). Кроме высокой эффективности включения меченых нуклеотидов, этот метод позволяет увеличить

количество исходной матрицы в среднем в  $10^4$  раз. При необходимости получить зонд для локализации известной последовательности используются праймеры, находящиеся на расстоянии 100 п.н. – 1000 п.н., не образующие шпилек и не комплементарные друг другу. При использовании в качестве матрицы геномной ДНК рекомендуется до реакции мечения получить первичный амплификат и убедиться, что его длина соответствует предполагаемой. В том случае, если необходимо получить зонд для клонированного фрагмента неизвестной нуклеотидной последовательности, можно воспользоваться стандартными праймерами, фланкирующими полилинкерный участок вектора. Однако необходимо помнить, что наилучший результат получается при использовании зондов длиной 200-700 п.н., при этом допустимо использование последовательностей до 1000 п.н., но если клонированный фрагмент длиннее, его придется разрезать ДНКазой I. Для этого готовят раствор 1,5 мкг/мл ДНКазы; 0,1М  $MgCl_2$  и добавляют прямо в реакционную смесь в таком количестве, чтобы после 10-15 мин инкубации в растворе были фрагменты длиной 200-500 п.н. Ингибируют ДНКазу прогреванием в течение 2-3 мин при  $94^{\circ}C$ .

Очистить полученный зонд от минерального масла, а также избавиться от невключившихся нуклеотидов можно переосаждением амплификата изопропанолом (Протокол 2.6.12).

Использование ПЦР с вырожденными праймерами (DOP-ПЦР) позволяет метить любые последовательности ДНК достаточно эффективно (Протокол 2.6.13), причем, имея даже незначительное число копий исходной ДНК-матрицы, мы можем получить неограниченное количество меченого зонда. Метод основан на использовании праймеров, внутренняя последовательность которых состоит из 6 случайных нуклеотидов: 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3'. Сначала проводят несколько низкотемпературных циклов, позволяющих праймерам фланкировать участки ДНК матрицы, причем, варьируя условия первых циклов можно задавать специфичность отжига и длину полученных фрагментов. В следующих высокотемпературных циклах полученные

фланкированные последовательности амплифицируются по стандартному протоколу ПЦР.

В том случае, когда реакцию проводят с использованием других типов термостабильных полимераз, не выдерживающих длительного нагревания до 94°C, полимеразу в реакционную смесь добавляют после этапа первой длительной денатурации. Меченый предшественник вводится в реакцию только после проверки длины первичного амплификата. 1-10 мкл исходного ПЦР продукта берут в реакцию мечения и проводят ее только с использованием высокотемпературных циклов. Доля модифицированного предшественника в составе реакционной смеси зависит от типа конъюгата (Протокол 2.6.11).

Однонитевые РНК зонды получают методом транскрипции *in vitro* (Протокол 2.6.14). Для этого используются векторы с промоторами для различных фаговых РНК-полимераз, причем наличие разных промоторов по обеим сторонам клонированного фрагмента позволяет получать однонитевые зонды, комплементарные как смысловой, так и несмысловой последовательности. Это дает возможность осуществления контрольного эксперимента. Чтобы исключить получение длинных последовательностей, содержащих не только клонированный фрагмент, вектор разрезают рестриктазой по сайту, находящемуся сразу за вставкой, после чего линейную последовательность проверяют методом электрофореза и дважды очищают фенол-хлороформом. Очищенный линейный вектор переосаждают спиртом и растворяют в 10мМ Tris-HCl (pH 8,0); 1мМ ЭДТА. Метить РНК можно непосредственно предшественником, несущим репортерную молекулу, но эффективность включения выше при использовании смеси УТР и аминоксил-УТР (1:1), с последующим присоединением биотина к уже синтезированной молекуле РНК.

Эффективность включения меченного гаптенами предшественника можно оценить иммунохимической реакцией с антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой (Протокол 2.6.15).

Количество меченого зонда, необходимое для проведения одной гибридизации, зависит не только от удельного включения модифицированного предшественника, но и от состава

исследуемой последовательности. При этом одновременно надо учитывать, что для создания условий благоприятствующих выходу денатурированного зонда из раствора и образованию гибридных двунитевых структур с нуклеиновыми кислотами на препарате необходимо повысить тотальную концентрацию ДНК в растворе. Для этого используют ДНК или РНК носитель. В некоторых случаях вместо носителя используют конкурентную ДНК, которая комплементарно связывает часть меченого зонда, выводя его таким образом из реакции гибридизации с нуклеиновыми кислотами на препарате. От того, выполняет ли носитель роль конкурентной ДНК помимо повышения концентрации ДНК в реакционной смеси, также зависит сколько меченого зонда необходимо использовать в одной гибридизации.

Для локализации уникальных последовательностей на один препарат необходимо взять 50 – 100 нг зонда в 10 мкг ДНК носителя, представляющую из себя чужеродную ДНК, не имеющую комплементарных участков к исследуемой последовательности. Чаще всего для этой цели используют фрагментированную ДНК спермы лосося (размер фрагментов от 400 до 1000 п.н.). В том случае, если вы собираетесь исследовать последовательности в геноме лосося, придется выбрать другой тип носителя, которым может быть ДНК любого эволюционно удаленного вида.

Для локализации повторяющихся последовательностей, в частности сателлитной ДНК или рибосомных генов на один препарат берут 20 – 50 нг зонда в 10 мкг носителя, которым может быть любая ДНК, не имеющая комплементарных участков с исследуемой. Для рибосомных генов и теломерных последовательностей лучше использовать в качестве носителя тРНК, но не для генов 5S рРНК, так как они имеют участок значительной гомологии с последовательностью тРНК. В этом случае в качестве носителя можно взять линейаризованную плазмидную ДНК.

При гибридизации проб к отдельным хромосомным сегментам, исходно полученных методом микродиссекции (МСВ-FISH), и длинных последовательностей, клонированных в YAC (дрожжевых искусственных хромосомах), PAC (P1

искусственных хромосомах) и ВАС (бактериальных искусственных хромосомах) на реакцию берут 100 – 200 нг зонда. Если пометили тотальную дрожжевую ДНК, содержащую YAC, то на одну гибридизацию используют 1 мкг зонда. В качестве носителя в таких экспериментах используют фракцию высокоповторяющихся последовательностей Cot-1 того же вида, что и исследуемая ДНК, в количестве 5-10 мкг на один препарат. Носитель одновременно берет на себя функцию конкурентной ДНК, гибридизуясь с сателлитными последовательностями и, таким образом, выводя их из реакции.

В том случае, когда для гибридизации используются пробы к целым хромосомам, так называемые хромосомные пэйнты (M-FISH, Zoo-FISH), или проводят гибридизацию с меченой тотальной ДНК, например, в случае сравнительной геномной гибридизации (CGH), на один препарат берут 150-500 нг меченого зонда. В качестве носителя используют 10-50 мкг Cot-1 ДНК или тотальную ДНК, с которой производят сравнение.

Для приготовления гибридизационной смеси осажденный меченый зонд вместе с носителем растворяют в гибридизационном буфере (Протокол 2.6.16). В состав буфера входит формамид – вещество, снижающее температуру денатурации нуклеиновых кислот. Для фрагментов длиной 200-700 н.п. используют буфер с 50% формамида, при работе с олигонуклеотидами концентрацию формамида снижают до 25% и ниже. От концентрации формамида зависит температура денатурации и гибридизации, поэтому доля формамида в гибридизационном буфере должна строго соответствовать протоколу. ДНК лучше растворяется в формамиде, чем в водных растворах, поэтому начинать приготовление пробы целесообразно с добавления формамида к сухому осадку.

Кроме температуры, на процесс ренатурации оказывают влияние кислотность раствора и концентрация одновалентных катионов. Повышение pH до 10 и выше приводит к нарушению стабилизации дуплексов, что увеличивает жесткость условий гибридизации. Поэтому в основе гибридизационной смеси обычно лежит буферный раствор с pH 6,5 – 7,5. Концентрация одновалентных катионов, таких как ионы натрия, оказывает еще более существенное влияние на стабилизацию гибридов.

Положительно заряженные катионы взаимодействуют с фосфатными группами нуклеиновых кислот, снижая электростатическое отталкивание двух комплементарных нитей. Поэтому увеличение концентрации солей одновалентных металлов снижает жесткость гибридизации. Эти факторы надо учитывать при выборе гибридизационного буфера для постановки конкретного эксперимента. Стандартная гибридизационная смесь для фрагментов длиной 200-700 н.п. содержит 2x SSC pH 7,0, тогда как для межвидовой гибридизации и олигонуклеотидных зондов используют буфер на основе 4x SSC.

Для того, чтобы гибридизационную смесь можно было нанести на препарат и заключить под покровное стекло, ее объем должен быть не меньше 10 мкл для покровных стекол 22x22мм<sup>2</sup> и 20 мкл – для стекол 22x50мм<sup>2</sup>. В таком объеме трудно достичь концентрации зонда, эффективно образующего гибриды с молекулами на препарате. Решить эту задачу позволяют вещества, связывающие воду и увеличивающие эффективную концентрацию зонда, такие как декстран сульфат с молекулярным весом выше 8000 (лучше 200000). Конечная концентрация декстран сульфата в гибридизационном буфере составляет 5-10%.

Двунитевые зонды требуют обязательной предварительной денатурации непосредственно перед нанесением на препарат. Для этого пробирку с подготовленным зондом кипятят на водяной бане в течение 5 мин. Если зонд не требует предварительного отжига с носителем, сразу после денатурации его переносят в лед и инкубируют при 0°C в течение 5–10 мин. При работе с зондами к отдельным хромосомным сегментам, хромосомными пэйнтами, а также для проведения CGH, меченую последовательность предварительно отжигают с конкурентной ДНК. Для этого подготовленную пробу сразу после денатурации инкубируют при комнатной температуре или при 37°C в течение 5-30 мин и только после этого наносят на препарат.

В некоторых случаях, если объект исследования имеет значительный объем или трудно пропитывается растворами, целесообразно перед нанесением зонда провести

предгибридизацию с гибридационным буфером того же состава, только без меченого зонда.

Денатурацию нуклеиновых кислот на препарате можно провести предварительно, как описано в протоколе 2.5.2. Этим же способом придется воспользоваться при осуществлении гибридизации с зондом, требующим предварительного отжига с конкурентной ДНК. Если же такой необходимости нет, гораздо эффективнее провести денатурацию в гибридационном буфере. 10 мкл гибридационной смеси аккуратно заключить под покрывное стекло 22x22мм<sup>2</sup> или 20 мкл – под стекло 24x50мм<sup>2</sup>, стараясь не оставлять пузырей, заклеить по периметру резиновым клеем на основе каучука и прогреть препарат до 81,5°С в течение 2 – 3 мин.

На предварительно денатурированный препарат точно так же наносят зонд, закрывают покрывным стеклом и заклеивают резиновым клеем.

Гибридизацию проводят при температуре 37°– 42°С во влажной камере в течение 1–2 суток. При более кратковременной инкубации снижается эффективность гибридизации, тогда как длительные эксперименты протяженностью более трех суток не показывают заметного усиления сигнала по сравнению с двухдневными гибридизациями, но при этом возрастает риск заражения бактериями и грибами.

После завершения инкубации препараты необходимо отмыть от молекул зонда, не вступивших в комплементарное взаимодействие с нуклеиновыми кислотами на препарате (Протокол 2.6.17). Жесткость отмывок, также как и условий гибридизации, определяется температурой и концентрацией одновалентных катионов. Температурный режим можно также изменять добавлением формамида, поскольку его присутствие снижает температуру плавления дуплексов, причем увеличение содержания формамида на 2% приводит к уменьшению температуры денатурации на 1°. Концентрацию солей изменяют, варьируя кратность буферного раствора SSC в составе растворов для отмывки. Рекомендуется смывать покрывное стекло и проводить первую отмывку в буфере того же состава, что и гибридационный, только температуру увеличивают на



5–10°C. Следующую отмывку проводят в 2 сменах буфера без формамида, а ее жесткость регулируют температурой (42°–65°C) и кратностью буфера (0,1xSSC – 2xSSC).

При проведении прямой гибридизации с зондами, непосредственно меченными флуорохромами, после отмывки препарат проводят по серии спиртов повышающихся концентраций, высушивают на воздухе, заключают в фотозащитную среду и исследуют под микроскопом. Все работы с флуорохромами по возможности проводят в темноте.

В том случае, когда зонд требует иммунохимического выявления, ее проводят сразу после отмывок, избегая высушивания препарата, так как это может ухудшить результат детекции (Протокол 2.6.18). Будучи по существу иммуноцитохимическим окрашиванием, детекция может быть прямой, если антитела к использованным гаптенам непосредственно конъюгированы с флуорохромом, и непрямой, когда распознающие метку иммуноглобулины требуют дополнительного этапа детекции антителами, конъюгированными с флуорохромами.

После завершения детекции препарат рекомендуется провести по серии спиртов повышающихся концентраций и высушить на воздухе. Это обеспечивает дополнительную фиксацию материала, подвергшегося обработке растворами детергента, а также удаляет мыльные разводы с препарата, которые могут ухудшить качество изображений. Однако дегидратируя препарат исследователь не оставляет возможности провести дополнительный раунд амплификации сигнала в случае, если такая необходимость возникнет. Поэтому иногда этап обезвоживания и высушивания пропускают. Готовый препарат заключают в фотозащитную среду и исследуют под микроскопом.

Преимуществом непрямого метода детекции репортерных молекул в составе гибридизованного зонда является возможность усиления флуоресцентного сигнала иммунохимическими методами. В самом простом случае последовательно используются иммуноглобулины, конъюгированные с флуорохромами, причем каждое следующее антитело специфически распознает предыдущее (Рисунок 2.2).

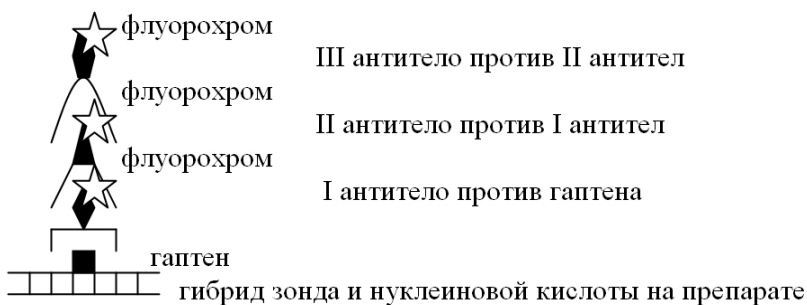


Рисунок 2.2. Схема усиления сигнала иммунохимическим методом.

Эффективность усиления сигнала в такой системе возрастает пропорционально количеству раундов амплификации, но при этом увеличивается неспецифический фон. Еще одним недостатком этого метода является его дороговизна, т.к. необходимо приобрести несколько конъюгатов, последовательно взаимодействующих друг с другом.

Система на основе авидина, конъюгированного с флуорохромом, и биотинилированных антител к авидину, позволяет проводить многократную амплификацию, используя только два вида конъюгатов (Рисунок 2.3).

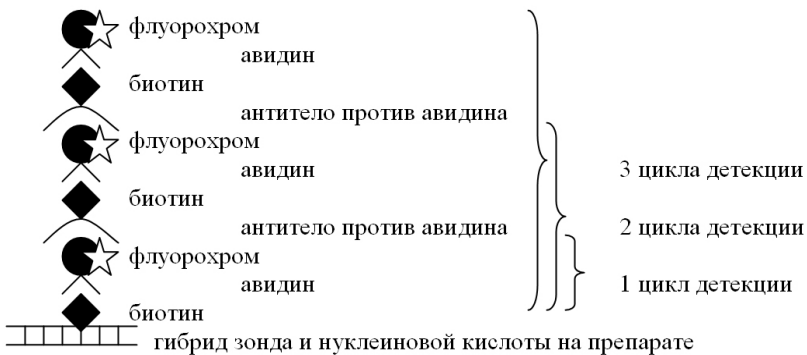


Рисунок 2.3. Схема усиления сигнала в системе биотин-авидин.

Кроме того, дополнительное усиление сигнала происходит за счет способности авидина связывать сразу 4 молекулы биотина, что приводит к образованию сложных структур, содержащих множество флуорохромов. Тем не менее, даже усиленный иммунохимическими методами сигнал позволяет локализовать последовательности не меньше 5 т.п.н., а в том случае, когда необходимо локализовать единичные копии уникальных последовательностей ДНК или РНК-транскриптов придется прибегнуть к усилению сигнала с использованием меченых тирамид. В основе метода лежит каталитическая доставка репортерных молекул (catalyzed reporter deposition, CARD), которая широко используется в иммуноблоттинге и иммуносорбентном методе со связанным ферментом (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). В такой системе визуализация сигнала происходит в результате пероксидазно-тирамидной реакции в участке связывания пероксидазы хрена, обогащенном тирозином, фенилаланином и триптофаном, приводя к накоплению активизированных тирамид в местах локализации пероксидазы на препарате (Рисунок 2.4). Причем тирамиды могут быть как гаптенизированными, то есть требовать последующего иммунохимического выявления, так и непосредственно конъюгированными с флуорохромами. При этом чувствительность метода возрастает настолько, что удается детектировать 1 – 20 копий мРНК на клетку.

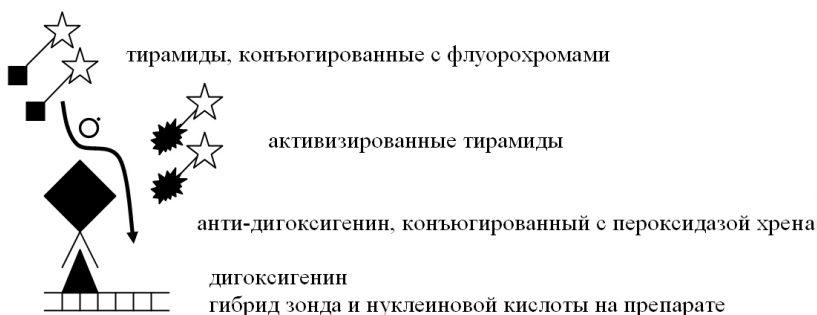


Рисунок 2.4. Схема усиления сигнала с использованием меченых тирамид.

При необходимости одновременной локализации на препарате нескольких последовательностей проводят гибридизацию с зондами, меченными разными репортерными молекулами, детектируемыми различными флуорохромами. Чаще всего для детекции многоцветной FISH используют следующие флуорохромы: AMCA; DEAC; FITC; Alexa 488; Cy3; TRITC; Cy3,5; Техасский красный; Alexa 633; Cy5; Cy5,5 - подбирая комбинации флуорохромов с неперекрывающимися спектрами излучения. В случае проведения прямой гибридизации меченные флуорохромами предшественники непосредственно включаются в состав зонда, при проведении непрямой FISH используются зонды, меченные разными гаптенами, такими как: биотин, дигоксигенин, динитрофенол, эстрадиол, которые детектируются иммунохимическими методами, причем детекцию гаптенных зондов можно проводить одновременно. Так, например, для одновременной детекции биотина и дигоксигенина препарат инкубируют в растворе, содержащем авидин-FITC и анти-дигоксигенин-Cy3, в соответствующих разведениях. При необходимости одновременной детекции третьего зонда, например меченного динитрофенолом, в тот же раствор можно ввести антитела против динитрофенола, конъюгированные с DEAC.

Планируя эксперимент необходимо учесть, что для локализации трех последовательностей достаточно использовать две различные репортерные системы. То есть первый зонд детектируется флуорохромом 1, второй зонд – флуорохромом 2, а третий зонд – одновременно флуорохромами 1 и 2. Такой подход не только снижает стоимость эксперимента, но и позволяет получать более четкие результаты, поскольку увеличение числа флуорохромов приводит к тому, что возникает проблема частичного перекрытия спектров. Число различных последовательностей, которые одновременно можно локализовать на препарате, равно  $2^n - 1$ , где  $n$  – число использованных флуорохромов. Так, имея 3 репортерных молекулы, мы можем получить 7 различных зондов.

При наличии в комплектации микроскопа узкополосных фильтров можно использовать одновременно и большее количество зондов. Так использование пяти флуорохромов (например, AMCA, FITC, Cy3, Cy5, Cy7) дает возможность создать 31 независимый зонд. Классическая схема M-FISH, позволяющая идентифицировать все хромосомы человека, основана на одновременном использовании 6 флуорохромов (Таблица 2.2).

Другой способ обойти проблему перекрывающихся спектров – проведение нескольких последовательных гибридизаций на одном препарате с промежуточными фиксациями изображений и отмывками. Такой метод получил название репробинга. Он позволяет, используя ограниченное число флуорохромов, локализовать достаточно много различных последовательностей. Ниже приведена схема эксперимента для идентификации всех хромосом человека с использованием всего трех флуорохромов (Таблица 2.3).

При необходимости, гибридизацию *in situ* можно сочетать с другими методами исследования. Иммуноцитохимическое окрашивание белков проводят либо до гибридизации, либо после нее, вместе с детекцией гаптенов, в зависимости от чувствительности эпитопов к высушиванию.

Также метод FISH можно сочетать с включением галогенизированных предшественников. Само мечение проводят инкубацией клеток культуры в среде с 10мкМ содержанием BrdUTP, IdUTP или CldUTP. Монослой клеток фиксируют на покровных стеклах или делают препараты метафазных хромосом (Протокол 2.6.2). Поскольку иммунохимическое выявление галогенизированных предшественников требует проведения предварительной денатурации ДНК, целесообразно проводить их окрашивание после проведения гибридизации. Причем при осуществлении совместной иммунохимической детекции все процедуры лучше проводить в PBS, так как антитела против галогенизированных предшественников могут плохо работать в SSC. Также, можно сначала полностью закончить все процедуры, связанные с детекцией FISH, а затем перейти к окрашиванию включенных предшественников (Раздел 2.4).

**Таблица 2.2. Схема M-FISH на хромосомах человека с 6 флуорохромами**

зонд	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
DEAC				X			X	X	X				X			X			X	X		X		
FITC							X	X		X				X			X		X		X		X	
Cy3											X				X			X		X	X			X
Cy3,5	X		X		X			X	X	X	X											X		
Cy5	X	X										X	X	X	X							X		
Cy5,5			X	X		X	X					X					X	X						

**Таблица 2.3. Схема идентификации хромосом человека методом репробинга с 3 флуорохромами**

зонд	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
<b>Первая гибридизация</b>																								
TAMRA				X			X	X	X				X			X			X	X		X		
FITC							X	X		X				X			X		X		X		X	
Cy5											X				X			X		X	X			X
<b>Вторая гибридизация</b>																								
TAMRA	X		X		X			X	X	X	X											X		
FITC	X	X					X					X	X	X	X							X		
Cy5			X	X		X						X					X	X						

Кроме того, для контрастирования и визуализации объектов проводят дополнительную окраску препаратов флуоресцентными красителями (Протоколы 2.2.8 и 2.2.9). Такие окраски проводят после завершения всех процедур и перед заключением готового препарата в фотозащитный раствор.

Готовые препараты рекомендуется хранить в темном прохладном месте до исследования под микроскопом. При необходимости длительного хранения их надо аккуратно сложить в коробочки, избегая сдвигов покровных стекол, и убрать в морозильную камеру на  $-20^{\circ}\text{C}$ . Опыт показывает, что при таком хранении флуоресцентный сигнал на препарате сохраняется в течение многих месяцев.

#### ***Протокол 2.6.1. Обработка стекол аминопропилтриэтоксисиланом***

1. Отмыть стекла детергентом, интенсивно промыть проточной водой и сполоснуть в 3 сменах дистиллированной воды.
2. Высушить стекла на воздухе.
3. Опустить каждое стекло на 3 мин в ацетон.
4. Перенести в 2% раствор 3-аминопропилтриэтоксисилана (3-aminopropyltriethoxysilane, Sigma) на ацетоне и оставить на 5 мин.
5. Сполоснуть в дистиллированной воде и сушить в течение ночи при  $65^{\circ}\text{C}$
6. Готовые стекла убрать в коробочки и хранить в защищенном от пыли месте.

***Протокол 2.6.2. Получение препаратов метафазных хромосом из культуры клеток фибробластов*****Концентрированный раствор колхицина:** 1% водный раствор**Гипотонический раствор:** 0,5% KCl или 0,9% цитрат Na  
(рекомендуется для эмбриональных фибробластов)**Фиксатор:** метанол-ЛУК (3:1), охлажденный до  $-20^{\circ}\text{C}$ 

1. За 35-120 мин до окончания культивирования ввести в среду колхицин до 0,1%. Интенсивно взболтать и слить делящиеся клетки в центрифужную пробирку.
2. Собрать клетки центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин и инкубировать в гипотоническом растворе, согретом до  $37^{\circ}\text{C}$  20-30 мин.
3. Добавить 100 мкл фиксатора в пробирку с гипотоническим раствором и собрать клетки центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин.
4. Ресуспензировать клетки в ледяном фиксирующем растворе и оставить на 30 мин при  $-20^{\circ}\text{C}$ .
5. Собрать клетки центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин, ресуспензировать в новой порции фиксатора и оставить на 10 мин при  $-20^{\circ}\text{C}$ .
6. Собрать клетки центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин, ресуспензировать в новой порцией фиксатора и оставить на ночь при  $-20^{\circ}\text{C}$ .
7. Чистые сухие предметные стекла поместить в 96% этанол и охладить до  $4^{\circ}\text{C}$ .
8. Собрать клетки центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин, ресуспензировать в свежем фиксаторе.
9. Промыть предметное стекло в ледяной дистиллированной воде и раскатать на него суспензию фиксированных клеток.
10. Высушить препараты на воздухе
11. Опустить препарат в 96% этанол на 3 мин, быстро высушить и убрать в коробочку. Хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ , не позволяя обводняться.
12. Перед использованием замороженный препарат помещают в 96% этанол, а затем высушивают.



**Протокол 2.6.3. Фиксация тканей для приготовления парафиновых срезов**

1. Изолированные фрагменты тканей промыть в физиологическом растворе или 1х PBS.
2. Фиксировать материал в 4% PFA на 1х PBS 30 мин – 4 часа при 4°C.
3. Отмыть в 1х PBS 30 мин и провести по серии спиртов увеличивающейся концентрации по 30 мин при 4°C, в 70% этаноле оставить на ночь при 4°C.
4. Обезводить материал в изобутиловом спирте и пропитать ксилолом, а затем парафином.
5. Залить материал в блоки и нарезать толщиной 5 мкм.
6. Наклеить срезы на подготовленные стекла и сушить в течение ночи при 65°C.

**Протокол 2.6.4. Предобработка препаратов РНКазой А**

**Свободная от ДНКазы РНКаза А:** 20 мг/мл в 10мМ Tris-HCl (pH 7,5); 15мМ NaCl, инкубировать при 90°C в течение 15 мин, расфасовать и хранить при -20°C.

**Рабочий раствор РНКазы:** 100 мкг/мл в 2х SSC, готовить перед использованием.

1. Сухие препараты размочить в 2х SSC в течение 5-20 мин при комнатной температуре.
2. Нанести на стекло 200 мкл рабочего раствора РНКазы, закрыть кусочком парафильма 24х50мм<sup>2</sup> и инкубировать во влажной камере 1 час при 37°C.
3. Промыть в 3 сменах 2х SSC при комнатной температуре.

***Протокол 2.6.5. Предобработка препаратов пепсином***

**Концентрированный раствор пепсина:** 10% в стерильной воде, прокипятить 15 мин, охладить до комнатной температуры и расфасовать, хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Рабочий раствор пепсина:** 0,005% в 0,1М HCl.

**Раствор для отмывки:** 1xPBS; 50мМ MgCl<sub>2</sub>

1. Сухие препараты размочить в 2x SSC в течение 5-20 мин при комнатной температуре.
2. Нанести на стекло 200 мкл рабочего раствора пепсина, закрыть кусочком парафильма 24x50мм<sup>2</sup> и инкубировать во влажной камере 10 мин при 37°C.
3. Промыть в 3 сменах по 5 мин 1x PBS; 50мМ MgCl<sub>2</sub>

***Протокол 2.6.6. Предобработка препаратов протеиназой К***

**Концентрированный раствор протеиназы К:** 20 мг/мл в стерильной воде, инкубировать 2 часа при 37°C, расфасовать и хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Рабочий раствор протеиназы К:** 2 мкг/мл протеиназы К в 2 мМ CaCl<sub>2</sub>; 20мМ Tris-HCl (pH 7,5).

1. Сухие препараты размочить в 2x SSC в течение 5-20 мин при комнатной температуре.
2. Нанести на стекло 200 мкл рабочего раствора протеиназы К, закрыть кусочком парафильма 24x50мм<sup>2</sup> и инкубировать во влажной камере 10 мин при 37°C.
3. Промыть в 3 сменах 1x PBS; 50мМ MgCl<sub>2</sub> по 5 мин.

***Протокол 2.6.7. Постфиксация препаратов перед гибридизацией*****Фиксатор:** 1% PFA на 1x PBS, 50мМ MgCl<sub>2</sub>

1. Инкубировать препараты в фиксаторе 10 мин при комнатной температуре.
2. Отмыть в 2 сменах 1x PBS, 50мМ MgCl<sub>2</sub> по 5 мин.
3. Провести по серии спиртов повышающихся концентраций и высушить на воздухе.

***Протокол 2.6.8. Мечение ДНК-зондов методом ник-трансляции*****10x буфер NT:** 0,5М Tris-HCl (pH 7,5); 50мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,5 мг/мл БСА.**100мМ бета-меркаптоэтанол:** 0,1 мл бета-меркаптоэтанола растворить в 1,4 мл бидистиллированной воды.**Смесь нуклеотидов:** 0,5мМ dATP, 0,5мМ dCTP, 0,5мМ dGTP и 0,1мМ dTTP.**Концентрированный раствор ДНКазы I:** 1 мг/мл, растворить 1 мг в 0,5 мл 0,3М NaCl, добавить 0,5 мл глицерина, разделить на порции и хранить при -20°C.**Рабочий раствор ДНКазы I:** 1 мкг/мл в воде, готовят непосредственно перед использованием (концентрацию фермента в рабочем растворе лучше подобрать заранее, см протокол 2.6.9.).**Останавливающий реакцию раствор:** 0,1М NaCl; 20мМ ЭДТА; 20мМ Tris-HCl (pH 7,5).

1. В центрифужной микропробирке собрать реакционную смесь:
  - 1 мкг ДНК
  - 5 мкл 0,1М бета-меркаптоэтанола
  - 5 мкл смеси нуклеотидов
  - 5 мкл 10x буфера NT
  - 1 мкл 1М меченого dUTP
  - H<sub>2</sub>O до 48 мкл
2. Быстро перемешать на вортексе и поставить в лед.
3. Добавить 1 мкл ДНК полимеразы I (5 единиц) и 1 мкл рабочего раствора ДНКазы I, быстро перемешать и собрать смесь кратковременным центрифугированием.
4. Инкубировать 90 мин при 15°C.
5. Отобрать 10 мкл реакционной смеси для исследования методом электрофореза в 1,2% агарозном геле, остальную смесь поставить в лед.
6. Если длина фрагментов больше 1000 п.н., то продолжить инкубировать при 15°C еще 30 мин.
7. Остановить реакцию добавлением равного объема (40 мкл) останавливающего буфера.
8. Добавить в реакционную смесь ДНК носитель (количество носителя и его выбор зависит целей эксперимента и будет описан ниже) и 1/10 объёма 3М ацетата натрия, рН-5,5.
9. Добавить 2,5 объёма этанола и хранить при -20°C до использования (осаждать в этаноле как минимум в течение ночи).
10. Перед использованием осадить ДНК центрифугированием при 12000g в течение 15 мин (лучше использовать центрифугу с охлаждением, 4°C).
11. Промыть осадок 70% этанолом и подсушить.

**Протокол 2.6.9. Оптимизация размеров меченых фрагментов**

**10x буфер NT:** 0,5М Tris-HCl (pH 7,5); 50мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,5 мг/мл БСА.

**100мМ бета-меркаптоэтанол:** 0,1 мл бета-меркаптоэтанола растворить в 1,4 мл бидистиллированной воды.

**Смесь нуклеотидов:** 0,5мМ dATP, 0,5мМ dCTP, 0,5мМ dGTP и 0,5мМ dTTP.

**Концентрированный раствор ДНКазы I:** 1 мг/мл, растворить 1 мг в 0,5мл 0,3М NaCl, добавить 0,5 мл глицерина, разделить на порции и хранить при -20°C.

**Рабочий раствор ДНКазыI:** приготовить серию разведений от 0,1 мкг/мл до 10 мкг/мл в воде.

**Останавливающий реакцию раствор:** 0,1М NaCl; 20мМ ЭДТА; 20мМ Tris-HCl (pH 7,5).

1. В центрифужных микропробирках собрать реакционную смесь:
  - 1 мкг ДНК
  - 5 мкл 0,1М бета-меркаптоэтанола
  - 5 мкл смеси нуклеотидов
  - 5 мкл 10x буфера NT
  - H<sub>2</sub>O до 48 мкл
2. Быстро перемешать на вортексе и поставить в лед.
3. Добавить 1 мкл ДНК полимеразы I (5 единиц) и по 1 мкл каждого рабочего раствора ДНКазы I, быстро перемешать и собрать смесь кратковременным центрифугированием.
4. Инкубировать 90 мин при 15° С.
5. Отобрать 10 мкл реакционной смеси для исследования методом электрофореза в 1,2% агарозном геле с маркерами размера ДНК от 50 до 2000 п.н.
6. Зафиксировать оптимальную концентрацию рабочего раствора, дающую фрагменты от 100 о 500 п.н., и использовать ее в дальнейшем.

**Протокол 2.6.10. Олигометрирование ДНК со случайными праймерами**

**10x буфер для фрагмента Кленова:** 0,5M Tris-HCl (pH 7,5); 100mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM DTT; 0,5 мг/мл БСА; 0,5M ЭДТА (pH 8,0).

**10x смесь праймеров:** 1mM раствор олигонуклеотидов (статистических затравок).

**10x смесь нуклеотидов:** 1mM dATP; 1mM dCTP; 1mM dGTP; 0,65mM dTTP и 0,35mM меченого dUTP.

1. Матричную ДНК, растворенную в воде, прокипятить на водяной бане в течение 5 мин и быстро перенести на лед.
2. Собрать реакционную смесь:
  - 0,5-1 мкг денатурированной ДНК
  - 2 мкл 10x буфера
  - 2 мкл смеси нуклеотидов
  - 2 мкл смеси праймеров
  - H<sub>2</sub>O до 19 мкл
3. Добавить 2 мкл фрагмента Кленова (2 единицы), перемешать на вортексе и собрать смесь кратковременным центрифугированием.
4. Инкубировать при 37°C от 2 до 8 часов.
5. Остановить реакцию добавлением 1 мкл 0,5M ЭДТА.
6. Отобрать 5-10 мкл реакционной смеси для исследования методом электрофореза в 1,2% агарозном геле.
7. Добавить в реакционную смесь ДНК носитель (количество носителя и его выбор зависит от целей эксперимента и будет описан ниже) и 1/10 объема 3 M ацетата натрия, pH 5,5
8. Добавить 2,5 объема этанола и хранить при -20°C до использования (осаждать в этаноле как минимум в течение ночи).
9. Перед использованием осадить ДНК центрифугированием при 12000g в течение 15 мин (лучше использовать центрифугу с охлаждением, 4°C).
10. Промыть осадок 70% этанолом и подсушить.

**Протокол 2.6.11. Мечение зондов методом ПЦР**

**10x буфер для Taq полимеразы:** 0,1M Tris-HCl (pH 8,4); 0,5M KCl; 25mM MgCl<sub>2</sub> (лучше использовать буфер, рекомендованный производителем полимеразы, концентрация MgCl<sub>2</sub> может быть от 15mM до 25mM)

**10x раствор прямого праймера:** 10 мкМ.

**10x раствор обратного праймера:** 10 мкМ.

**10x смесь нуклеотидов:** 2mM dATP; 2mM dCTP; 2mM dGTP; 1,3mM dTTP.

**Меченый предшественник:** 1mM меченый dUTP.

- Собрать реакцию смесь в тонкостенной микропробирке для ПЦР:
  - 2 мкл 10x буфера
  - 2 мкл 10x смеси нуклеотидов
  - 1,4 мкл 1mM меченого dUTP
  - 2 мкл раствора прямого праймера
  - 2 мкл раствора обратного праймера
  - 1 единицу Taq ДНК полимеразы
  - 0,1 мкг ДНК матрицы
  - H<sub>2</sub>O до 20 мкл
- Быстро перемешать на вортексе и собрать смесь кратковременным центрифугированием.
- При необходимости наслоить минеральное масло (если термоциклер оборудован нагревающейся крышкой – эта процедура не нужна).
- Инкубировать в термоциклере по следующей программе:

	денатурация	94°C	1 – 5 мин	
	денатурация	94°C	30 – 60 сек	} 30
	отжиг	50-65°C	30 – 90 сек	
циклов	синтез	68-72°C	1 – 3-мин	
	синтез	68-72°C	4 – 7 мин	

Температура отжига зависит от длины и состава праймеров.

Температура синтеза зависит от используемой полимеразы.

5. Отобрать 0,5 – 1 мкл реакционной смеси для исследования методом электрофореза в 1% агарозном геле.

Включение dUTP, меченных некоторыми флуорохромами, требует уменьшения доли модифицированного нуклеотида и соответственно увеличения доли dTTP в реакционной смеси.

Конечная концентрация некоторых конъюгатов:

DEAC – dUTP	20мкМ
Родамин 6G – dUTP	30мкМ
TAMRA – dUTP	30мкМ
Техасский красный – dUTP	30мкМ
Cy3 – dUTP	50мкМ
Cy5 – dUTP	50мкМ
AMCA – dUTP	60мкМ
FITC – dUTP	60мкМ

При подборе оптимального соотношения модифицированного предшественника с немодифицированным в реакционной смеси рекомендуется отталкиваться от рекомендаций производителя .



**Протокол 2.6.12. Очистка ПЦР продукта**

**Хлороформ – изоамиловый спирт:** Смешать хлороформ и изоамиловый спирт в соотношении 24:1.

1. Довести объем реакционной смеси водой до 100 мкл.
2. Добавить равный объем (100 мкл) хлороформ – изоамилового спирта, встряхнуть и отцентрифугировать 2 мин при 3000g.
3. Аккуратно собрать водную (верхнюю) фазу в новую пробирку.
4. Добавить 1/4 объема (25 мкл) 10М ацетата аммония и перемешать.
5. Добавить равный объем изопропанола (125 мкл) и инкубировать 10 мин при комнатной температуре.
6. Осадить ДНК центрифугированием при 12000g в течение 15 мин и промыть осадок охлажденным 70% этанолом.

**Протокол 2.6.13. Использование вырожденных праймеров для получения первичного амплификата (DOP-ПЦР)**

**10x буфер для Hot-Taq полимеразы:** 0,1M Tris-HCl (pH 8,4); 0,5M KCl; 25mM MgCl<sub>2</sub> (лучше использовать буфер, рекомендованный производителем полимеразы, концентрация MgCl<sub>2</sub> может быть от 15mM до 25mM)

**10x раствор универсального вырожденного праймера:** 20мкМ.

**10x смесь нуклеотидов:** 2mM dATP; 2mM dCTP; 2mM dGTP; 2mM dTTP.

1. Собрать реакционную смесь в тонкостенной микропробирке для ПЦР:
  - 2 мкл 10х буфера
  - 2 мкл 10х смеси нуклеотидов
  - 2 мкл 10х раствора праймеров
  - 1 единицу Hot-Taq ДНК полимеразы
  - 0,1-1 нг ДНК матрицы
  - H<sub>2</sub>O до 20 мкл
2. Быстро перемешать на вортексе и собрать смесь кратковременным центрифугированием, при необходимости наслоить минеральное масло.
3. Инкубировать в термоциклере по следующей программе:
 

денатурация	94°C	10 мин	
денатурация	94°C	1 мин	} 5-8
отжиг	30°C	1,5 мин	
медленный нагрев до 72°C		3 мин	
циклов			
синтез	72°C	3-мин	
денатурация	94°C	1 мин	} 30
отжиг	56°C	1 мин	
синтез	72°C	1,5-мин	
циклов			
синтеза на 1 сек			
синтез	72°C	10 мин	

в каждом цикле увеличивая время
4. Отобрать 5-10 мкл реакционной смеси для исследования методом электрофореза в 0,7–1% агарозном геле.

**Протокол 2.6.14. Получение меченых РНК зондов****РНК полимеразы:** T3, T7 или SP6.**10x T3,T7 буфер:** 200мМ Tris-HCl (pH 8,0); 40мМ MgCl<sub>2</sub>, 10мМ спермидин; 250мМ NaCl.**10x SP6 буфер:** 200мМ Tris-HCl (pH 7,5); 30мМ MgCl<sub>2</sub>; 10мМ спермидин.**Смесь нуклеотидов:** 10мМ АТР; 10мМ СТР; 10мМ GTP; 7,5мМ ТТР.**Меченый предшественник:** 1мМ меченый UTP

1. Собрать реакционную смесь:
  - 2 мкл 10x буфера
  - 1 мкл смеси нуклеотидов
  - 1 мкл меченого UTP
  - 1 единица РНКазина
  - 1 мкг линейной ДНК матрицы
  - 10 единиц РНК полимеразы
  - H<sub>2</sub>O до 20 мкл
2. Быстро перемешать на вортексе и собрать смесь кратковременным центрифугированием.
3. Инкубировать при 37°C (T3 и T7) или 40°C (SP6) в течение 2 часов.
4. Добавить 10 единиц ДНКазы, свободной от РНКазы, и инкубировать при 37°C 15 мин.
5. Остановить реакцию добавлением 2 мкл 200мМ ЭДТА
6. Добавить РНК носитель - 1 мкг дрожжевой тРНК и 5 мкл 5М ацетата аммония.
7. Осадить РНК добавлением 2,5 объемов охлажденного этанола. Инкубировать при -20°C в течение ночи.
8. Собрать осадок центрифугированием при 12000g в течение 20 мин при 4°C и промыть осадок охлажденным 70% этанолом.

**Протокол 2.6.15. Оценка эффективности мечения зонда**

**Инкубационный буфер:** 0,1М Tris-HCl (pH 7,5); 0,1М NaCl; 2мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,05% Triton X-100.

**Блокирующий реагент:** 3% БСА на инкубационном буфере.

**Разведение антител:** для биотинилированных зондов используют стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой, разведенный в инкубационном буфере 1:1000 – 1:5000; для зондов, меченных дигоксигенином, используют антитела против дигоксигенина, конъюгированные с щелочной фосфатазой, разведенные в инкубационном буфере 1:500 – 1:1000.

**Буфер для щелочной фосфатазы:** 0,1М Tris-HCl (pH 9,5); 0,1М NaCl; 50мМ MgCl<sub>2</sub>.

**Концентрированный раствор NBT (нитротетразолий синий):** 75 мг/мл в диметилформамиде.

**Концентрированный раствор BCIP (5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат):** 50 мг/мл в 50% диметилформамиде (при использовании калиевой соли BCIP) или воде (при использовании натриевой соли BCIP).

**Раствор для детекции:** непосредственно перед использованием к 10 мл буфера для щелочной фосфатазы добавить 44 мкл концентрированного раствора NBT и 33 мкл концентрированного раствора BCIP, беречь от света.

1. Приготовить в лунках иммунологического планшета серию разведений зонда от 1 нг/мкл до 0,1 пг/мкл. Для этого нанести в лунки иммунологического планшета по 9 мкл дистиллированной воды, а для первого разведения 9,5 мкл. Добавить к первой капле 0,5 мкл раствора меченого зонда, аккуратно перемешать пипетированием; затем из первой капли перенести 1 мкл во вторую каплю и так до последней лунки.
2. По 1 мкл из каждого разведения нанести на нейлоновую мембрану и высушить.
3. Облучить мембрану УФ в течение 2-3 мин.

4. Смочить мембрану в инкубационном буфере.
5. Перенести мембрану в емкость с блокирующим раствором и инкубировать 15 мин при комнатной температуре.
6. Провести иммунохимическую реакцию. Мембрану инкубируют в растворе антител в течение 30 мин при 37°C.
7. Отмыть мембрану в 3 сменах инкубационного буфера по 5 мин при комнатной температуре и постоянном покачивании.
8. Перенести мембрану на 1 мин в буфер для щелочной фосфатазы.
9. Инкубировать мембрану в растворе для детекции в течении 1-3 часов в темноте при комнатной температуре.
10. Хорошо промыть мембрану проточной водой и высушить.

Зонд можно использовать для гибридизации, если на мембране выявляется точка, содержащая 1 пг меченой ДНК, для высокоповторяющихся последовательностей ДНК выявление 5 пг зонда можно считать достаточным.

**Протокол 2.6.16. Растворение зонда в гибридационном буфере**

**Деионизированный формамид:** к 100 мл формамида добавить 10 г ионообменной смолы с размером ячейки 20-50 (AG501-X8, Bio-Rad), инкубировать 1-3 часа при комнатной температуре, перемешивая смесь на магнитной мешалке. Затем дважды профильтровать смесь через бумажный фильтр Ватман № 1, расфасовать и хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Концентрированный гибридационный буфер:** 4x SSC, 20% декстран сульфат; растворить навеску декстран сульфата в воде, прокипятить на водяной бане или проавтоклавируют, добавить 20x SSC до необходимой концентрации и профильтровать через мембрану с диаметром пор не меньше 0,45 мкм, расфасовать и хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ , перед использованием тщательно перемешивать.

1. Осажденный спиртом меченый зонд вместе с носителем промыть холодным 70% этанолом, отцентрифугировать при 12000g в течение 10 мин при  $4^{\circ}\text{C}$  и подсушить.
2. Растворить в деионизированном формамиде (в половине конечного объема пробы, так чтобы получить гибридационную смесь с 50% формамида).
3. Добавить равный объем концентрированного гибридационного буфера и тщательно перемешать на вортексе.

**Протокол 2.6.17. Отмывка препаратов после гибридизации**

1. Аккуратно снять пинцетом резиновый клей.
2. Поместить стекла в стаканчик с 50% формамидом, 2x SSC, предварительно нагретым до 42°C и подождать, пока покровные стекла съедут с препаратов.
3. Дважды отмыть препараты в 50% формамиде, 2x SSC при 42°C по 5 мин, постоянно покачивая.
4. Дважды отмыть препараты в 1x SSC при 42°C по 5 мин, постоянно покачивая.

**Протокол 2.6.18. Иммунохимическая детекция гибридизовавшегося зонда**

**Раствор для отмывок:** 4x SSC; 0,1% Tween 20

**Блокирующий раствор** 3% БСА в 4x SSC; 0,1% Tween 20

**Раствор для разведения антител:** 1% БСА на 4x SSC, 0,1% Tween 20

**Развести антитела** в соответствии с рекомендациями производителей.

1. На отмытые после гибридизации препараты нанести по 500 мкл блокирующего раствора, накрыть кусочками парафильма 24x50мм<sup>2</sup>, поставить во влажную камеру и инкубировать 30 – 60 мин при 37°C.
2. Стряхнуть блокирующий раствор вместе с парафильмом.
3. Нанести 200мкл раствора антител и накрыть новым кусочком парафильма, инкубировать во влажной камере 40 – 60 мин при 37°C.
4. Отмывать в 4 сменах 4x SSC; 0,1% Tween 20 по 5 мин при 37°C, непрерывно качая.

При использовании двух и более антител, пункты 3 и 4 повторяют необходимое количество раз. Больше 5 этапов окрашивания проводить не рекомендуется, поскольку из-за многократно увеличенного неспецифического связывания полученные результаты будет трудно интерпретировать. Все этапы по возможности проводить в темноте.

## 2.7. Флуоресцирующие белки

Клонирование в 1962 г. зеленого флуоресцирующего белка (GFP) из светоизлучающего органа медузы *Aequorea victoria* открыло новые возможности для использования флуоресцентной микроскопии. Примечателен тот факт, что для упаковки белковой молекулы, обладающей способностью флуоресцировать, не требуется никаких уникальных факторов, присущих только биолюминесцирующей медузе. Благодаря этому GFP удается успешно экспрессировать в чужеродных системах, а также создавать на его основе слитные белковые конструкции, сохраняющие свойства составляющих их элементов.

При создании успешно работающих слитных конструкций важно учитывать тот факт, что молекула GFP имеет сложную пространственную организацию, поэтому между участком аминокислотной последовательности, представляющей собой GFP (флуоресцентный домен), и исследуемым белком вставляют связующую (линкерную) последовательность. Главное требование к такому линкеру – гибкость, т.е. он должен служить шарниром между двумя функционально независимыми доменами; при этом слишком длинный линкер может нарушить функциональность белков, кроме того, он может оказаться ломким или послужить мишенью для клеточных протеаз. Наиболее часто применяются линкеры, состоящие из нескольких остатков глицина, они имеют маленькую длину и очень высокую подвижность, однако такой участок обладает ярко выраженными гидрофобными свойствами. Чтобы увеличить растворимость связующей последовательности и при этом сохранить гибкость, используют линкеры, состоящие из чередующихся остатков глицина и серина. Для стабилизации молекулы флуорохрома иногда используют линкеры, фиксирующие пространственную структуру молекулы, для этого в с обоих концов вводят остатки серина, которые связывают сближенные в пространстве С- и N-концы за счет образования мостиков.

Для экспрессии слитных белков используются трансляционные векторы, соответствующие объекту исследования. Получены линии трансгенных клеток, а также некоторые организмы, несущие гибридные гены, в которых различные белки слиты с флуоресцирующим доменом. Такие



системы не только позволяют проводить прижизненные исследования, но и успешно применяются в сочетании с другими методами флуоресцентной микроскопии. Так, линия клеток HeLa, несущая гистон H2B, слитый с GFP, позволяет проводить прижизненные наблюдения за изменением состояния хроматина в течение клеточного цикла и совмещать эти данные с результатами FISH и иммуноцитохимического окрашивания.

В настоящее время из различных, преимущественно глубоководных морских организмов клонировано множество флуоресцирующих белков, различающихся по аминокислотной последовательности, пространственной организации активного центра и спектральным характеристикам (Таблица 2.4).

**Таблица 2.4. Список клонированных флуоресцирующих белков**

Название	GenBank	Происхождение	Возб., нм	Излуч., нм
amajGFP(amFP486)	AF168421	<i>Anemonia maiano</i>	458	486
dstrGFP (dsFP483)	AF168420	<i>Discosoma striata</i>	456	484
clavGFP (cFP484)	AF168424	<i>Clavularia sp.</i>	443	483
GFP	M62653	<i>Aequorea victoria</i>	395, 471	508
cggGFP	AY037776	<i>Condylactis gigantea</i>	399, 482	496
hcriGFP	AF420592	<i>Heteractis crista</i>	405, 481	500
ptilGFP	AY015995	<i>Ptilosarcus sp.</i>	500	508
rmueGFP	AY015996	<i>Renilla muellenri</i>	498	510
zoanGFP (zFP506)	AF168422	<i>Zoanthus sp.</i>	496	506
asulGFP (asFP499)	AF322221	<i>Anemonia sulcata</i>	403, 480	499
disGFP	AF420593	<i>Discosoma sp. 3</i>	503	512
dendGFP	AF420591	<i>Dendronephthya sp</i>	494	508
mcavGFP	AY037769	<i>Montastraea cavemosa</i>	506	516
rflGFP	AY037772	<i>Ricordea florida</i>	508	518
scubGFP	AY037771	<i>Scolymia cubensis</i>	497	506
zoanYFP	AF168423	<i>Zoanthus sp.</i>	494, 528	538
DsRed (drFP583)	AF168419	<i>Discosoma sp. 1</i>	558	583
dis2RFP (dsFP593)	AF272711	<i>Discosoma sp. 2</i>	573	593
zoan2RFP	AY059642	<i>Zoanthus sp. 2</i>	552	576
cpFP611	AY130757	<i>Entacmaea quadricolor</i>	559	611
mcavRFP	AY037770	<i>Montastraea cavemosa</i>	508, 572	520, 580
rflRFP	AY037773	<i>Ricordea florida</i>	506, 566	517, 574
Kaede	AB085641	<i>Trachyphyllia geoffroyi</i>	488, 543	518, 582

К сожалению, иногда попытки создания слитных конструкций на основе флуоресцентных белков дикого типа осложняются проблемами, связанными с нарушениями процесса его правильной укладки в пространстве. Введение различных мутаций позволяет стабилизировать процесс формирования флуоресцентного домена слитного белка. В результате этих исследований были созданы целые семейства флуоресцентных белков. На основе GFP и DsRed получено множество вариантов, обладающих различными спектрами, значительно большей яркостью, различной скоростью выцветания (Таблица 2.5). Свойство флуоресцирующих белков выцветать под действием облучения светом определенной длины волны используется в исследованиях подвижности белковых молекул в составе внутриклеточных структур. В таких исследованиях используются варианты флуоресцирующих белков с низкой устойчивостью к выцветанию.

**Таблица 2.5. Некоторые варианты флуоресцирующих белков на основе GFP**

Название	Мутации	Возб., нм	Излуч., нм
BFP	Y66H	381	445
GFP (S65T)	S65T	498	516
P4-3	Y66H/Y145F	381	445
alfaGFP	F99S/M153T/V163A	397	475
rsGFP	T2003/S65G/V68L/S72A	498	516
EBFP	F64L/S65T/Y66H/Y145F	380	440
sgBFP	F64L/S65C/I167T	387	450
EGFP	F64L/S65T	489	508
ECFP	F64L/S65T/Y66W/N146I/M153T/V163A/ N212K	434	477
EYFP	S65G/S72A/T203Y	514	527
Topaz	S65G/S72A/T203Y/K79R/T203Y/H231L	514	527
Emerald	F64L/S65T/S72A/N149K/M153T/I167T/ H231L	484	508
Sapphire	S72A/Y145F/T203I/H231L	395	510
W7	Y66W/N146I/M153T/V163A/N212K	433	475, 501

Некоторые разновидности флуоресцентных белков обладают способностью фотоактивироваться под действием света определенной длины волны. Наиболее известны среди них фотоактивируемая мутация GFP (PA-GFP) и белок Kaede. После непродолжительного облучения фиолетовым светом 405–413 нм, интенсивность флуоресценции PA-GFP при облучении синим светом возрастает в 100 раз. Фотоактивация белка Kaede имеет еще более наглядное проявление, поскольку после 1–3 секундного облучения светом с длиной волны 405 нм белок, который возбуждался синим (488 нм) и флуоресцировал зеленым светом (518 нм), начинает возбуждаться светом с длиной волны 543 нм и излучать красный свет (582 нм). Это явление получило название «фотоконверсия». Способность флуоресцентных белков к фотоактивации также используется для исследования динамики изменения молекулярного состава внутриклеточных структур.

Существование флуоресцентных белков с различными спектрами возбуждения и излучения позволяет исследовать синхронную динамику белков в клетке, а также белок-белковые взаимодействия. Получают слитные конструкции исследуемых белков с разными флуоресцентными белками, причем подбирают их таким образом, чтобы флуоресценция одного белка возбуждала флуоресценцию другого. Особенно удобны красные и инфракрасные разновидности флуоресцентных белков, поскольку их спектры возбуждения перекрываются со спектрами излучения многих флуоресцирующих белков; также используются пары BFP/GFP и CFP/YFP, причем CFP/YFP предпочтительнее, так как BFP не обладает достаточной фотостабильностью. Совмещение флуоресцентной микроскопии с методами количественной оценки излучения позволяет вычислить даже расстояние между взаимодействующими молекулами.

Использование слитных конструкций на основе флуоресцирующих белков существенно расширило возможности использования флуоресцентной микроскопии для наблюдения за изолированными клеточными структурами и живыми клетками. Тем не менее, стоит подчеркнуть, что применение флуоресцирующих белков может сочетаться с любыми методами флуоресцентной микроскопии, описанными выше.

## Глава 3. Регистрация и анализ флуоресцентных изображений

### 3.1. Фотографирование

Изображение, которое мы фиксируем с помощью флуоресцентной микроскопии, характеризуется высокой контрастностью и малой освещенностью. Поэтому время экспозиции значительно увеличивается по сравнению с обычной светлопольной микрофотографией. При этом может происходить потеря фокуса, что приводит к получению нерезких снимков. Более целесообразно использовать пленки с большей чувствительностью, хотя они и обладают меньшей контрастностью и более крупной зернистостью. Проблема контрастности изображения не так остро стоит при фиксировании флуоресценции, кроме того, повысить контрастность можно благодаря использованию специальных проявителей. Однако не стоит забывать, что такие проявители могут увеличить и без того крупное зерно. При работе с большими увеличениями зернистость пленки редко превышает оптическое разрешение микроскопа, которое обратно пропорционально числовой апертуре объектива, но это может создать проблемы с увеличением зафиксированного изображения во время печати фотографии.

Поскольку при использовании узкополосных запирающих фильтров мы, по сути, имеем дело с монохромным изображением, вполне допустимо использование технических черно-белых пленок с высокой чувствительностью (Kodak, Ilford), однако в этом случае необходимо убедиться, что выбранная пленка обладает достаточно высокой чувствительностью к свету той длины волны, которую излучает используемый флуорохром. Хорошие результаты удается получать при использовании бытовых цветных пленок для дневного света с чувствительностью не меньше 400 единиц ISO (Международная организация стандартов). Такие пленки обладают равномерной чувствительностью во всей области спектра, соответствующей видимому свету. При работе с флуорохромами, имеющими ИК излучение, необходимо использовать специальные пленки.

При отсутствии встроенного экспонометра параметры съемки приходится подбирать методом проб и ошибок, что, в конечном счете, обходится не дешево. К счастью, современные фотонасадки снабжены встроенными экспонометрами, позволяющими производить измерения, как основываясь на результатах замера во всем поле, так и производя измерения только в одной точке (в пятне), как правило, расположенной в центре поля зрения. Чтобы правильно определить время экспозиции, необходимо помнить, что для светлостойкой микроскопии с равномерной яркостью производят замер освещенности во всем поле. При работе с флуоресценцией обычно имеют место отдельные ярко светящиеся объекты на темном фоне, в таком случае наиболее яркий объект устанавливается в центральную точку и по ней производится замер освещенности для определения параметров съемки. Если экспонометр не позволяет производить измерение в пятне, необходимо уменьшить время предлагаемой экспозиции на величину, пропорциональную доле нефлуоресцирующей части поля зрения.

Некоторые микроскопы не снабжаются системой переключения световых потоков, в результате чего, при фиксации изображения из-за довольно длительной экспозиции на пленку попадает достаточно постороннего света через окуляры, чтобы вызвать появление вуали и значительную потерю контрастности. В таком случае можно доукомплектовать микроскоп специальной шторкой. Если установка шторки невозможна, производить съемку придется в темноте, прикрывая окуляры. Многие фотосистемы микроскопов, кроме шторки, содержат светоделительную призму, разделяющую поток света от объектива на две части, что дает возможность одновременно наблюдать объект глазами и производить съемку. Кроме того, дополнительная светоделительная система часто устанавливается в блоке наведения фокуса. Все это создает дополнительные удобства для исследователя, однако не стоит забывать, что при регистрации флуоресценции важно зафиксировать как можно больше излученного света, поэтому в момент съемки необходимо переключать весь световой поток на камеру.

### **3.2. Цифровая система фиксации изображения**

Несмотря на то, что использование традиционных методов фотографии позволяет получать изображения с разрешением 57000x38000 точек, с размером зерна от 0,2 до 2 мкм, исследователи все больше отдают предпочтение цифровым камерам накопления сигнала (CCD). Основное их отличие от видеокамер состоит в том, что кристалл матрицы способен накапливать сигнал в течение некоторого времени, то есть получать изображение не только в реальном времени, но и в условиях продолжительных выдержек. Именно это позволяет использовать их в работе с флуоресценцией. CCD камера, объединенная с платой-контроллером, установленной в компьютере, образует цифровую систему фиксации изображения.

В основе камеры лежит матрица, представляющая собой полупроводниковый кристалл, способный улавливать фотоны света и накапливать их энергию в течение определенного времени. Каждая сенсорная единица матрицы, получившая название «пиксель», имеет свои координаты и может с определенной периодичностью сообщать контроллеру о своем состоянии, что соответствует принятым фотонам света. Реконструируя эти данные в соответствии с координатами отдельных пикселей, компьютер выводит на экран монитора изображение. Причем передача сигнала на монитор может происходить после поступления полной информации с матрицы, и тогда задержка получения готового изображения будет значительно превосходить время экспозиции. На микроскопы обычно устанавливаются такие камеры с которых информация об изображении может передаваться по частям. Это позволяет выводить изображение значительно быстрее, что сокращает время облучения флуорохрома на препарате.

Физический размер матрицы для микроскопии большого значения не имеет, поскольку от него зависит глубина резкости, а при работе с большими увеличениями мы и так имеем дело только с тонкими оптическими срезами. Фактический размер матрицы определяется количеством ее элементарных ячеек – пикселей. При регистрации микроскопического изображения фактический размер матрицы должен соответствовать или слегка превышать разрешающую способность оптической системы,

которая обратно пропорциональна увеличению. Проведенные расчеты показали, что при использовании объективов со 100x увеличением разрешение матрицы должно быть не менее 500 тыс пикселей, а для объективов с увеличением 10x необходима матрица 5 млн пикселей. Некоторые коррективы в эти цифры может вносить использование вариоадаптера, изменяющего размер микроскопического изображения непосредственно перед камерой. Вопреки распространенному заблуждению, получение изображений с избыточным разрешением не улучшает качество изображения, а приводит к созданию гигантских файлов и хранению и обработке ненужной информации, что может, в конечном счете, привести к снижению качества изображения в результате неправильной обработки. Чтобы этого не происходило, камеры с большим разрешением (5 млн пикселей) позволяют получать изображения с разным разрешением. Так, в режиме 1x1 каждый пиксель изображения будет соответствовать 1 сенсору матрицы, в режиме 2x2 в качестве единой элементарной единицы будет выступать 4 сенсора, а в режиме 3x3 – 9 сенсоров будут образовывать один элемент изображения. В том случае, когда разрешение матрицы все-таки недостаточно, можно максимально эффективно использовать ее с помощью вариоадаптера, позволяющего вписывать объект исследования в размеры матрицы.

Увеличение фактического размера матрицы привело к тому, что избыток тепловой энергии вызывает накопление шумов (засвеченных пикселей) на сенсорах матрицы, что не позволяет увеличивать время экспозиции. А, как было сказано выше, именно это делало CCD камеры удобными для регистрации флуоресценции. Решить эту проблему помогают камеры с охлаждением матрицы. Использование для охлаждения элемента Пельтье, снижающего температуру матрицы на 30°C, уменьшает уровень шума в  $10^7$  раз.

Возможность увеличения времени экспозиции многократно повышает чувствительность использованных методов исследования. Однако, чрезмерные выдержки могут приводить к потере информации из-за того, что сенсоры будут сбрасывать данные, не дожидаясь их передачи контроллеру (затемненные пиксели).

Качество изображения определяется не только его фактическим размером, но и глубиной передачи цвета. В отличие от растрового изображения, которое формируется комбинацией черных и белых точек, 8-битная CCD камера передает  $2^8 = 256$  оттенков серого, включая черный и белый. Человеческий глаз может различить только половину этих нюансов, а это значит, что полученное такой камерой изображение будет иметь живой цвет с множеством полутонов. 12-битная камера позволяет передать  $2^{12} = 4096$  оттенков серого и, безусловно, качество такого изображения выше, однако хранение дополнительной информации многократно увеличивает размер файлов. Кроме того, может возникнуть проблема просмотра и редактирования таких изображений. Это может потребовать приобретения специального программного обеспечения, потому что стандартные редакторы изображений вместо высококачественной картинки смогут отобразить только черный прямоугольник. Еще одно замечание состоит в том, что при регистрации флуоресценции полное изображение с множеством полутонов бывает необходимо только для крупных окрашенных объектов. Это создает ощущение «живой» картинки, на которой можно разглядеть особенности морфологии объекта. В остальных случаях, когда речь идет о локализации сигнала, стараются получить максимально контрастное изображение, приближенное по своим характеристикам к растровому, то есть на максимально темном фоне максимально яркий сигнал. Но при этом нужно, чтобы изображение не было пересвечено, то есть абсолютно белому должны соответствовать только отдельные, действительно яркие точки, а лучше, чтобы их совсем не было. Оценить характеристики изображения еще до его получения бывает удобно по гистограмме, которую можно вывести на экран.

Еще одной важной характеристикой CCD камеры является ее светочувствительность в разных областях спектра. Обычно все они имеют довольно высокую чувствительность в области от 350 нм до 700 нм, но некоторые из них чувствительны также и к более коротковолновым областям спектра, в то время как другие способны регистрировать и ИК излучения до 1000 нм и больше. При подборе тех или иных флуорохромов необходимо учесть особенности имеющейся в вашем распоряжении камеры.



Поскольку запирающий фильтр флуоресцентного микроскопа пропускает свет только в узкой области спектра, при регистрации мы имеем дело с монохромным изображением. Черно-белые камеры имеют более равномерную чувствительность в разных областях спектра и позволяют в определенных технических характеристиках данной камеры пределах регистрировать свечение любого цвета практически с одинаковой эффективностью. Поэтому для флуоресцентной микроскопии более оправдано использование черно-белых камер. При этом, зная характеристики запирающего фильтра, полученному изображению всегда может быть присвоен цвет, соответствующий действительности. В случае регистрации флуоресценции нескольких флуорохромов, последовательно устанавливаются соответствующие комплекты фильтров, производится регистрация изображений и каждому из них присваивается соответствующий цвет. Такая техника получила название псевдоцветов. Несмотря на то, что в русском языке приставка «псевдо-» часто носит отрицательный характер, в данном случае при использовании узкополосных светофильтров она не только вполне оправдана, но и более адекватна, чем использование цветных камер.

Использование цветных камер предпочтительно в первую очередь для светлостойкой микроскопии с применением цветных красителей и светофильтров, а также для флуоресцентной микроскопии с использованием комплектов фильтров, позволяющих одновременно наблюдать флуоресценцию в разных спектрах. Камеры различаются по способу получения цветного изображения, но в основе всегда лежит принцип разделения видимого света на красную, зеленую и синюю составляющие. Таким образом, чувствительность цветных камер всегда лежит только в области видимого света. Наиболее соответствует действительности изображение, полученное камерой с призматическим расщеплением света и тремя охлаждаемыми матрицами, но стоимость таких систем чрезмерно высока. В тех случаях, когда используют подвижные фильтры и цветные маски, в некоторых областях спектра даже в пределах видимого света возникают зоны пониженной чувствительности, а это означает снижение чувствительности метода в целом.

### **3.3. Методы хранения и обработки цифровых изображений**

Как уже говорилось, информация с матрицы поступает в компьютер в виде описания цветовых характеристик отдельных точек, имеющих координаты по осям X и Y. На экране монитора мы видим реконструкцию изображения по такому описанию. Для того, чтобы сохранить информацию с минимальными потерями, для сохранения выбирают формат, описывающий графическую информацию по тому же принципу, что и исходное изображение. Такие форматы носят название растровых. В отличие от них, векторные форматы описывают графическую информацию функциями, определяющими кривизну линий. Обычно векторная графика создается специальными программами или приложениями, которые подбирают оптимальные способы передачи рисунка и в результате изображения больших размеров могут быть описаны в одной строке и храниться в виде очень маленького файла. Это создает ложное впечатление, что любой рисунок можно упаковать в векторный формат. Конечно, можно попытаться перевести изображения, полученные CCD камерой в растровом виде в векторный формат, но это займет немало времени, а 4 мегабайтный файл, полученный 5 мегапиксельной цветной камерой, может не поместиться в результате даже на целый компакт диск. Это произойдет потому, что программа попытается описать каждую точку отдельной функцией да еще сохранить информацию о цвете.

Из всех существующих растровых форматов для хранения изображений, полученных CCD камерами, лучше всего подходит формат TIFF, поскольку он использует те же методы описания изображения, что и контроллер цифровой камеры. Кроме того, многослойный TIFF формат позволяет сохранить в одном файле изображения, полученные с использованием разных фильтров.

Все полученные изображения, без внесения в них каких-либо изменений необходимо регулярно сохранять в виде архива. Это позволит всегда иметь возможность вернуться к исходному файлу. Хранить архивы лучше в виде непerezаписываемых компакт-дисков (CD-R и DVD-R), это исключит возможность случайного вытирания. Некоторые программы предусматривают сохранение комментариев к отдельным файлам. Кроме

информации об использованном объективе и комплекте фильтров, туда можно вписать номер препарата, объект и методы исследования, а также некоторую другую информацию. Отдельно следует позаботиться о возможности расчета увеличения и сохранения масштабной линейки. Если это не предусмотрено программным обеспечением камеры и микроскопа, необходимо получить изображение линейки объект-микрометра и измерить расстояния между рисками в пикселях.

При необходимости сжатия графической информации с сохранением разрешения, используют формат JPEG, который описывает в одну строку все точки, имеющие одинаковые цветовые характеристики, причем сохранять в формате JPEG можно с различным качеством. Степень сжатия зависит от того, насколько сильно будут аппроксимированы до единого значения близкие по цветовым характеристикам точки. Это неизбежно вызывает потерю части информации, однако, если выбрать максимальное качество, размер файла может уменьшиться очень незначительно. В данном случае выбор будет зависеть от конкретной задачи. При подготовке больших изображений для передачи по сети Интернет их можно конвертировать в формат PNG, также эффективно сжимающий графическую информацию без потери разрешения.

Обработку изображения начинают с растягивания гистограммы. В результате, всем значениям серого от 0 до 255 присваивается определенное значение. Это позволяет получить более четкое изображение на контрастном фоне. В случае необходимости можно сделать яркие или темные участки светлее или темнее. Перевод черно-белого изображения в монохромное цветное приводит к изменению яркости, причем степень изменения зависит от конкретного цвета, поэтому при совмещении изображений разных цветов яркость необходимо подкорректировать отдельно.

Совмещение монохромных изображений, полученных с разными фильтрами, можно проводить двумя способами. В случае, если исследуют колокализацию различных сигналов, суммируют цветовые характеристики в разных точках, в результате в местах одновременной локализации обоих сигналов возникает третий цвет. Если же один из цветов отражает окраску

морфологических структур, на фоне которых локализируют сигнал, то сигналы накладывают на основную окраску, в результате чего, в местах локализации сигналов остается только цвет последнего, а не результат смешения. Некоторые специализированные программы предлагают не только разные методы наложения и совмещения изображений, но и всевозможные способы математического усиления сигнала.

Серию последовательных изображений, отражающих динамические изменения, можно объединить в небольшой видеосюжет. Для этого можно воспользоваться программами для создания анимированных файлов в формате GIF. Такой файл можно будет легко включить в презентацию или разместить на странице в Интернете. Еще один распространенный способ сохранения видеороликов в виде небольшой программы осуществляется в формате FLASH.

При подготовке изображений к публикации часто возникает необходимость предоставить файл с кодировкой цвета в формате CMYK. Этот способ передачи цвета соответствует принципу создания разных цветов на бумаге, в отличие от видимого света, раскладывающегося на красный, зеленый и синий (RGB). При печати цвета создают в результате смешивания голубых, пурпурных, желтых и черных красок (CMYK). Именно поэтому, во избежание нарушения цветопередачи, корректнее переводить иллюстрации к публикациям в формат CMYK.

### Литература

1. Coignet L., Girardet A., Andreo B., Charlieu J.P., Pellestor F. Double and triple *in situ* chromosomal labelling of human spermatozoa by PRINS // *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1996. V.73 N 4. P.300-303.
2. FISH: A practical Approach (ed. By B.Beatty, S.Mai, J. Squire). Oxford university press, 2002. 255p.
3. Fluorescence microscopy. Leica Microsystems Wetzlar GmbH, 2002, 20p.
4. Hassan A.B., Cook P.R. Visualization of replication sites in unfixed human cells // *Journal of Cell Science*. 1993, V.105, P.541-550.
5. Haugland R.P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 6 ed. Molecular Probes, 1996, 679p.
6. Lichter P. Multicolor FISHing: what's the catch? // *Trends in Genetics*. 1997. V.13. P.475-478.
7. Lichter P. Non-isotopic *in situ* hybridization to metaphase chromosomes and interphase nuclei. Heidelberg: German Cancer Research Cener, 1994. 50p.
8. Light Microscopy. Carl Zeiss Jena GmbH, 2004, 17p.
9. Macgregor H.C. An introduction to animal cytogenetics. L: Chapman and Hall, 1993. 238p.
10. Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. Molecular cloning:a laboratory manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982. 545p.
11. Miyawaki A., Sawano A., Kogure T // Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores // *Nature Cell Biology*. 2003. V.5. P.S1-S7.
12. Murphy D.B. Fundamentals of light microscopy and electronic imaging. Wiley-Liss, 2001, 325p.
13. Nonradioactive *in situ* hybridization application manual. 2 ed. Boehringer Mannheim GmbH, 1996. 214p.
14. Patterson G.H., Knobel S.M., Sharif W.D., Kain S.R., Piston D.W. Use of the Green Fluorescent Protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy // *Biophysical Journal*, 1997. V.73. P.2782-2790.
15. PCR applications manual. Boehringer Mannheim GmbH, 1995. 194p.

16. Saifitdinova A.F., Derjusheva S.E., Malykh A.G., Zhurov V.G., Andreeva T.F., Gaginskaya E.R. Centromeric tandem repeat from the chaffinch genome: isolation and molecular characterization // *Genome*. 2001. V.44. P.96-103.
17. Saifitdinova A.F., Timofejeva L.P., Zhurov V.G., Gaginskaya E.R. A highly repeated FCP centromeric sequence from chaffinch (*Fringilla coelebs*) genome is revealed within interchromosomal connectives during mitosis // *Цитология*. 2000, Т.42, № 6, С.588-593.
18. Sedgewick J. Quick Photoshop for research: a guide to digital imaging for Photoshop 4x, 5x, 6x, 7x. NY:Kluwer Academic/Plenum publishers. 2002, 107p.
19. Speel E.J.M., Hopman A.H.N., Komminoth P. Signal amplification for DNA and mRNA // *Methods in Molecular Biology*. V.123: *In situ* Hybridization Protocols (ed by I.A.Darby), 1998. Totowa, NJ: Humana Press Inc. P.195-216.
20. Staining procedures. 4 ed. (ed. by G.Clark). Williams and Wilkins, 1984. 373p.
21. Telenius H., Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer // *Genomics*. 1992. V.13. P.718-725.
22. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. (под ред. С.Херрингтона и Дж.Макги). М: Мир, 1999. 560с.
23. Пирс.Э. Гистохимия. М: Издательство иностранной литературы, 1962. 962с.
24. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М: Издательство иностранной литературы, 1954. 720с.
25. Рубцов Н.Б. Хромосомы млекопитающих: методы цитогенетического анализа: Учебное пособие / Новосибирский гос. университет, 2004. Ч.1. 108с.
26. Световая микроскопия в биологии. Методы. (под ред. А. Лейси). М: Мир, 1992, 464с.

## Приложения

### Приложение 1. Спектры флуорохромов

Флуорохром	Возбуждение (нм)	Излучение (нм)
Акридин гомодимер	431	498
Акридиновый желтый	470	550
Акридиновый красный	455-600	560-680
Акридиновый оранжевый		
(ДНК)	500	526
(РНК)	460	650
Акрифлавин	436	520
Акрихин	455	495
Акрихин иприт	436	470
Актиномицин D	546	647
Аллофикоцианин	630, 645	655, 660
Аминокумарин	346	442
	350	445
Анилиновый синий	370	510
Антроцил стеарат	360-381	446
Аурамин	460	550
Аурофосфин G	450	580
Аурофосфин	450-490	515
Бенгальский розовый	525, 540	550-600
Берберин сульфат	430	550
Бета лактамас	409	447, 520
Бисбензамидин	360	461
Бриллиантовый сульфохлавинFF	430	520
Бромистый этидий	518	605
Гематопорфирин	530-560	580
Гидроксикумарин	325-360	386-455
Гидрокситриптамиин	400	530
Дофамин	340	490-520
Диалкиламинокумарин	375, 435	470, 475
Кальцеин	494	517
Кальцеин синий	373	440
Катехоламин	410	470
Кислый фуксин	540	630

<b>Флуорохром</b>	<b>Возбуждение (нм)</b>	<b>Излучение (нм)</b>
Корифосфин О		
зеленая флуоресценция	500	535
красная флуоресценция	450	650
Кумарин	387	470
Мероцианин	555	578
Метоксикумарин	358	410
Метиленовый зеленый пиронин	364	395
Митрамицин	450	470
Морской синий	365	460
Нафтофлуоресцеин	602	672
Нильский красный	515-555, 559	590, 640
Норадреналин	340	490-520
Оливомицин	440	532
Пирен	340	376
Пиронин	410	540
Пиронин В	540-490	560-650
Примулин	410	550
Прицион желтый	470	600
Резорурфин	571	585
Родамин 110	498	521
Родамин 123	505	534
Родамин 5 GLD	470	565
Родамин (дикий)	530	555
Родамин GG	525	555
Родамин В	575	595, 710 (ИК)
Родамин зеленый	502	527
Родамин красный	570	590
Родамин Х	570	590
Х-родамин	580	605
Серотонин	365	520-540
Сульфородамин В	520	595
Сульфородамин G	470	570
Тетрабромсульфонфлуоресцеин	528	544
Тетраметилродамин	555	580
Тетрациклин	390-425	525-560
Техасский красный	597	615
Тиофлавин 5	430	550
Тиофлавин S	430	550
Тиофлавин Т	380	450



<b>Флуорохром</b>	<b>Возбуждение (нм)</b>	<b>Излучение (нм)</b>
Тиофлавин TCN	350	460
Тихоокеанский синий	410	455
Фосфин 3R	465	565
Фикоэритрин В	546-565	575
Фикоэритрин R	565	578
Хлорофилл	480	650
Хромомицин А3	490	530
Эозин	524	544
Эритрозин	530	555
Эухризин	430	540
Ядерный желтый	355	495
1,5 IAEDANS	336	490
1,8-ANS	372	480
4-Methylumbelliferone	385	502
5-carboxy-2,7-dichlorofluorescein	504	529
5-Carboxyfluorescein (5-FAM)	492	518
5-Carboxynaphthofluorescein	512/598	563/668
5-HAT (Hydroxy Tryptamine)	370-415	520-540
5-ROX (carboxy-X-rhodamine)	578, 567	604, 591
5-TAMRA	548, 542	552, 568
6-Carboxyrhodamine 6G	518	543
6-CR 6G	518	543
7-Amino-4-methylcoumarin	351	430
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	546	647
7-Hydroxy-4-methylcoumarin	360	449, 455
9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridine	412, 430	471, 474
ABQ	344	445
AMC, AMCA-S	345	445
ACMA	419	483
AMCA-X	353	442
Alexa Fluor 350	346	442
Alexa Fluor 405	402	421
Alexa Fluor 430	433	539
Alexa Fluor 488	495	519
Alexa Fluor 532	531	554
Alexa Fluor 546	556	573
Alexa Fluor 568	578	603
Alexa Fluor 594	590	615

<b>Флуорохром</b>	<b>Возбуждение (нм)</b>	<b>Излучение (нм)</b>
Alexa Fluor 647	650	668
Alexa Fluor 680	679	702 (ИК)
APTRA-BTC	466/380	520/530
APTS	424	505
Astrazon Brilliant Red 4G	500	585
Astrazon Orange R	470	540
Astrazon Red 6B	520	595
Astrazon Yellow 7 GLL	450	480
Atabrine	436	490
ATTO-TAG CBQCA	465	560
ATTO-TAG FQ	486	591
BAO 9(Bisaminophenyloxadiazole)	365	395
BCECF (high pH)	492, 503	520,528
BCECF (low pH)	482	520
Bimane	380	458
BFP, blue shifted GFP (Y66H)	381, 382, 383	445, 447, 448
bis-BTC	455/405	529/505
Blancophor FFG	390	470
Blancophor SV	370	435
BOBO-1	462	481
BOBO-3	570	602
BODIPY FL	504	511
Bodipy TMR	542	574
Bodipy TR	589	617
Bodipy TR-X SE	588	616
BO-PRO-1	462	481
BO-PRO-3	575	599
BTC	464/401	533/529
BTC-5N	459/417	517/532
Calcium Crimson™	588, 589	611, 615
Calcium Green	501, 506	531
Calcium Green-1	506	531
Calcium Green-2	506/503	536
Calcium Green-5N	506	532
Calcium Green-C18	509	530
Calcium Orange	549	575, 576
Calcofluor White	385, 395, 405	437, 440, 445

<b>Флуорохром</b>	<b>Возбуждение (нм)</b>	<b>Излучение (нм)</b>
Cascade blue	377, 398, 399	420, 423
Cascade Yellow	399, 400	550, 552
CFDA	494	520
CFP, Cyan Fluorescent Protein	430, 433, 436, 453	474, 475, 476, 501
CL-NERF	504/514	540
CMFDA	494	520
Coelenterazine O	460	575
Cy2	489	506
Cy3	514,552	570
Cy3,5	581	596
Cy5	650	667
Cy5.5	488	710 (ИК)
Cy7	488	755, 767 (ИК)
CyQuant	480	520
Dansyl	355	518
Dansyl Amine	337	517
Dansyl Cadaverine	335	518
Dansyl Chloride	372	518
Dansyl DHPE	336	517
DAPI	358	461
Dapoxyl	403	580
Dapoxyl 2	374	574
Dapoxyl 3	373	574
DEAC	430	480
Di-4-ANEPPS	496	705
Di-8-ANEPPS	488, 498	605, 713
DiA	456	590
DiD	644	665
DiI	549	565
DiI C <sub>12</sub> (3)	576	599
DiO	464	501
DiO C <sub>6</sub> (3)	484	501
DiR	750 (ИК)	780 (ИК)
DRAQ5	647	670
DsRed, Red fluorescent protein	558	583
DY-630-NHS	621	660
DY-635-NHS	634	664

<b>Флуорохром</b>	<b>Возбуждение (нм)</b>	<b>Излучение (нм)</b>
EBFP, Enhanced BFP	383	447
ECFP, Enhanced CFP	436	474
EGFP, Enhanced GFP	488, 498	507, 516
ELF 97	345	530
EYFP, Enhanced YFP	513, 520	527, 532
Fast Blue	360	440
FDA	494	520
FIF (формалин-идуцированная)	405	433
FITC	495	520
Flazo Orange	375-530	612
Fluo-3	480-506, 506	520, 527
Fluo-4	494	516
Fluorescein-EX	494	518
Fluorescein Diacetate	494	520
Fluoro-Emerald	495	524
Fluoro-Gold (Hydroxystilbamidine)	361	536
Fluor-Ruby	555	582
FluorX	494	520
FM1-43 (SynaptoGreen C4)	479	598
FM4-64 (SynaptoRed C2)	515	640
Fura Red (high pH)	572	657
Fura-2, high calcium	335	505
Fura-2, low calcium	363	512
Genacryl Brilliant Red B	520	590
Genacryl Brilliant Yellow 10GF	430	485
Genacryl Pink 3G	470	583
Genacryl Yellow 5GF	430	475
GFP (S65T)	498	516
GFP red shifted (rsGFP)	498	516
GFP (дикий)	475	509
GFPuv	385	508
HEX	545	556
Hoechst 33258	352	461
Hoechst 33342	350	461
Hoechst 34580	392	498
Indo-1		
высокая концентрация кальция	330	401
низкая концентрация кальция	346	475

<b>Флуорохром</b>	<b>Возбуждение (нм)</b>	<b>Излучение (нм)</b>
Intrawhite Cf	360	430
JC-1	514	529
JOE	520	548
JOJO-1	529	545
JO-PRO-1	530	546
LaserPro	795	812
Laurodan	355	460
LDS 751		
	ДНК	543
	РНК	590
		712 (ИК)
Leucophor PAF	370	430
Leucophor SF	380	465
Leucophor WS	395	465
LOLO-1	565	579
Lucifer Yellow	425, 428	528, 536, 540
Lyso Tracker Blue	373	422
Lyso Tracker Blue-White	466	536
Lyso Tracker Green	504, 534	511, 551
Lyso Tracker Red	577	590
Lyso Tracker Yellow	551	576
LysoSensor Blue	374	424
LysoSensor Green	442	505
LysoSensor Yellow/Blue	384	540
Mag Green	507	531
Magdala Red (Phloxin B)	524	600
Mag-Fura Red	483/427	659/631
Mag-Fura-2	369/329	511/491
Mag-Fura-5	369/330	505/500
Mag-Indo-1	349/328	480/390
Magnesium Green	506, 507	531
Magnesium Orange	550	575
Maxilon Brilliant Flavin 10 GFF	450	495
Maxilon Brilliant Flavin 8 GFF	460	495
MitoTracker Green FM	490	516
MitoTracker Orange	551	576
MitoTracker Red	578	599
Monobromobimane	398	490

<b>Флуорохром</b>	<b>Возбуждение (нм)</b>	<b>Излучение (нм)</b>
Monochlorobimane	380	461
Nitrobenzoxadidole	465	510-650
Nuclear Fast Red	289-530	580
Nuclear Yellow	365	495
Nylosan Brilliant Iavin E8G	460	510
OliGreen	498	518
Oregon Green 488	496	524
Oregon Green 514	511	530
PBFI	340/380	420
PI	530	625
Phloxin B (Magdala Red)	524	600
Phorwite AR	360	430
Phorwite BKL	370	430
Phorwite Rev	380	430
Phorwite RPA	375	430
PhotoResist	365	610
PicoGreen	502	523
PKH26 (Sigma)	551	567
PKH67	496	520
Platinum <i>Bright</i> 415	415	475
Platinum <i>Bright</i> 495	495	525
Platinum <i>Bright</i> 550	546	580
PMIA	341	376
Pontochrome Blue Black	535-553	605
POPO-1	434	456
POPO-3	534	570
PO-PRO-1	435	455
PO-PRO-3	539	567
PyMPO	415	570
Pyrozal Brilliant Flavin 7GF	365	495
RiboGreen	500	520
Sapphire GFP	395	511
Sevron Brilliant Red 2B	520	595
Sevron Brilliant Red 4G	500	583
Sevron Brilliant Red B	530	590
Sevron Orange	440	530
Sevron Yellow L	430	490

<b>Флуорохром</b>	<b>Возбуждение (нм)</b>	<b>Излучение (нм)</b>
sgBFP	387	450
sgBFP (super glow BFP)	387	450
sgGFP	474	488
sgGFP (super glow GFP)	474	509
SITS	365	460
SNAFL calcein	506/535	535/620
SNAFL-1	508/540	543/623
SNAFL-2	514/543	546/630
SNARF calcein	552/574	590/629
SNARF1	576/548	635/587
Sodium Green	506, 507	532
SpectrumAqua	433	480
SpectrumBlue	400	450
SpectrumGold	530	555
SpectrumGreen	497, 509	538, 524
SpectrumOrange	559, 560	588
Spectrum Red	587	612
SPQ	344	443
Stilbene	335	440
SYBR	495	537
SYTO 18	468	533
SYTOX blue	445	470
SYTOX green	504	523
SYTOX orange	547	570
TET	521	536
Thiadicarbocyanine (DiSC3)	651, 653	674, 675
Thiazine Red R	596	615
Thiazole Orange	510	530
Thiolyte	370-385	477-488
Thiozole Orange	453	480
Tinopol CBS (Calcofluor White)	390	430
TMR	550	573
TO-PRO-1	515	531
TO-PRO-3	642	661
TO-PRO-5	747 (ИК)	770 (ИК)
TOTO-1	514	533
TOTO-3	642	660
TRITC	541	572

<b>Флуорохром</b>	<b>Возбуждение (нм)</b>	<b>Излучение (нм)</b>
True Blue	365	425
TruRed	490	695
Ultralite	656	678
Uranine B	420	520
Uvitex SFC	365	435
WW 781	605	639
XRITC	582	601
Xylene Orange	546	580
Y66F	360	508
Y66H	360	442
Y66W	436	485
YFP, Yellow Fluorescent Protein	513, 520	527, 532
YO-PRO-1	491	509
YO-PRO-3	612	631
YOYO-1	491	509
YOYO-3	612	631



**Приложение 2. Буферные растворы****1x PBS (pH 6,0)**

8000 мг/л NaCl

200 мл/л KCl

1150 мг/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>59 мг/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**1x PBS (pH 6,8-7,2)**

140мМ NaCl

2,7мМ KCl      20x можно хранить при комнатной температуре.

6,5мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>      10x хранить при 4°C.1,5мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**20x SSC (pH 7,0)**

3М NaCl

175,3 г NaCl и 88,2 г цитрата Na на 1 литр.

0,3М цитрат натрия      Хранить при комнатной температуре.

**Ацетатный буфер (pH 4,2)**

15 мл 0,2 М ЛУК

5 мл 0,2 М ацетат натрия

**Фосфатный буфер Зёренсена (pH 5,5)**47 мл 0,1 М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> или Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>3 мл 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**Фосфатный буфер Зёренсена (pH 6,8)**25 мл 0,1 М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> или Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>25 мл 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**Буфер Макильвейна pH (6,8-7,0)**

4 мл 0,1 М лимонная кислота

16 мл 0,2 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**Буфер Макильвейна (pH 7,3)**

2,5 мл 0,1 М лимонная кислота

17,3 мл 0,2 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

## Список сокращений

БСА – бычий сывороточный альбумин

ИК – инфракрасный свет

ЛУК – ледяная уксусная кислота

мРНК – матричная РНК

п.н. – пара нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомная РНК

тРНК – транспортная РНК

УФ – ультрафиолетовый свет

АТ – аденин-тимин

BFP – синий флуоресцирующий белок

BrdU – бромдезоксисуридин

CARD – каталитическая доставка репортерных молекул

CCD – цифровая камера накопления сигнала

CFP – голубой флуоресцирующий белок

CGH – сравнительная геномная гибридизация

CldU – хлордезоксисуридин

DABCO – диазобициклооктан

DAPI –диамидинофенилиндол

DMSO – диметилсульфоксид

DOP-ПЦР – полимеразная цепная реакция с вырожденными праймерами

DTT – дитиотриэтол

dUTP – дезоксирибоуринтрифосфат

ELISA – иммуносорбентный анализ со связанным ферментом

FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*

FITC – флуоресцеинизотиоцианат

GC – гуанин-цитозин

GFP – зеленый флуоресцирующий белок

GIF – графический сетевой формат

IdU – йоддезоксисуридин

JPEG – сетевой формат графики Объединенной группы фотоэкспертов

PA-GFP – фотоактивируемый зеленый флуоресцирующий белок

PBS – фосфатно-солевой буфер

PFA – параформальдегид

PI – йодистый пропидий

PNG – формат перемещаемой сетевой графики

PRINS – полимеразная реакция *in situ* со специфическими праймерами

RT-PRINS – обратная транскрипция *in situ* со специфическими праймерами

SSC – стандартный солевой раствор

TIFF – закрепленный координатный информационный формат

TRITC – тетраметилродаминизотиоцианат

UTP – рибоуринтрифосфат

YFP – желтый флуоресцирующий белок

**Оглавление**

<b>ПРЕДИСЛОВИЕ К ПЕРВОМУ ИЗДАНИЮ.....</b>	<b>3</b>
<b>ПРЕДИСЛОВИЕ КО ВТОРОМУ ИЗДАНИЮ.....</b>	<b>4</b>
<b>ГЛАВА 1. ВВЕДЕНИЕ ВО ФЛУОРЕСЦЕНТНУЮ МИКРОСКОПИЮ.....</b>	<b>5</b>
1.1. ФЛУОРОХРОМЫ.....	5
<i>Протокол 1.1.1. Фотозащитная среда 1.....</i>	<i>8</i>
<i>Протокол 1.1.2. Фотозащитная среда 2.....</i>	<i>8</i>
<i>Протокол 1.1.3. Фотозащитная среда 3.....</i>	<i>8</i>
<i>Протокол 1.1.4. Фотозащитная среда 4.....</i>	<i>8</i>
1.2. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МИКРОСКОП.....	9
<b>ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДВУМЕРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ.....</b>	<b>12</b>
2.1. АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ.....	12
2.2. МЕТОДЫ ОКРАСКИ ПРЕПАРАТОВ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИМИ КРАСИТЕЛЯМИ.....	13
<i>Протокол 2.2.1. Окраска липидов фосфином 3R.....</i>	<i>15</i>
<i>Протокол 2.2.2. Окраска нуклеиновых кислот акридиновым         оранжевым.....</i>	<i>16</i>
<i>Протокол 2.2.3. Q-бэндинг митотических хромосом с акрихином 16</i>	<i>16</i>
<i>Протокол 2.2.4. Q-бэндинг митотических хромосом с акрихин         ипритом.....</i>	<i>17</i>
<i>Протокол 2.2.5. Дифференциальная окраска хромосом         хромомицином А3.....</i>	<i>18</i>
<i>Протокол 2.2.6. Окраска хромосом хромомицином         А3/дистамицином А.....</i>	<i>18</i>
<i>Протокол 2.2.7. Окраска АТ-обогатщенной ДНК на препаратах         хромосом.....</i>	<i>19</i>
<i>Протокол 2.2.8. Окраска нуклеиновых кислот различными         флуорохромами.....</i>	<i>19</i>
<i>Протокол 2.2.9. Совмещенная с заключением окраска         нуклеиновых кислот.....</i>	<i>20</i>
<i>Протокол 2.2.10. Прижизненная окраска клеток в культуре.....</i>	<i>21</i>
<i>Протокол 2.2.11. Окраска лизосом в живых клетках.....</i>	<i>21</i>
2.3. ИММУНОЦИТОХИМИЯ.....	22
<i>Протокол 2.3.1. Непрямое иммуноцитохимическое окрашивание. 30</i>	<i>30</i>

2.4. ВКЛЮЧЕНИЕ МЕЧЕНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В РЕПЛИЦИРУЮЩУЮСЯ ДНК .....	31
<i>Протокол 2.4.1. Получение метафазных хромосом высокого разрешения.</i> .....	32
<i>Протокол 2.4.2. Иммунохимическое выявление включенного BrdU34</i>	
2.5. МЕЧЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ <i>IN SITU</i> .....	35
<i>Протокол 2.5.1. Выявление одностранных разрывов ДНК методом ник-трансляции in situ</i> .....	39
<i>Протокол 2.5.2. Денатурация ДНК на препарате</i> .....	40
<i>Протокол 2.5.3. Лигирование разрывов хромосомной ДНК</i> .....	40
<i>Протокол 2.5.4. Застройка брешей ДНК термостабильной полимеразой</i> .....	41
<i>Протокол 2.5.5. Затупление 3'-концов дидезоксирибонуклеотидами.</i> .....	41
<i>Протокол 2.5.6. Полимеразная реакция in situ (PRINS).</i> .....	42
<i>Протокол 2.5.7. Мечение РНК транскриптов in situ (RT-PRINS).</i> ..	43
2.6. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ <i>IN SITU</i> .....	45
<i>Протокол 2.6.1. Обработка стекол аминопропилтриэтоксисиланом.</i> .....	62
<i>Протокол 2.6.2. Получение препаратов метафазных хромосом из культуры клеток фибробластов</i> .....	63
<i>Протокол 2.6.3. Фиксация тканей для приготовления парафиновых срезов.</i> .....	64
<i>Протокол 2.6.4. Предобработка препаратов РНКазой А</i> .....	64
<i>Протокол 2.6.5. Предобработка препаратов пепсином</i> .....	65
<i>Протокол 2.6.6. Предобработка препаратов протеиназой К.</i> .....	65
<i>Протокол 2.6.7. Постфиксация препаратов перед гибридизацией</i> ..	66
<i>Протокол 2.6.8. Мечение ДНК-зондов методом ник-трансляции.</i> ..	66
<i>Протокол 2.6.9. Оптимизация размеров меченых фрагментов.</i> ..	68
<i>Протокол 2.6.10. Олигомечение ДНК со случайными праймерами</i> ..	69
<i>Протокол 2.6.11. Мечение зондов методом ПЦР.</i> .....	70
<i>Протокол 2.6.12. Очистка ПЦР продукта</i> .....	72
<i>Протокол 2.6.13. Использование вырожденных праймеров для получения первичного амплификата (DOP-ПЦР).</i> .....	72
<i>Протокол 2.6.14. Получение меченых РНК зондов</i> .....	74
<i>Протокол 2.6.15. Оценка эффективности мечения зонда.</i> .....	75
<i>Протокол 2.6.16. Растворение зонда в гибридизационном буфере</i> ..	77
<i>Протокол 2.6.17. Отмывка препаратов после гибридизации</i> .....	78
<i>Протокол 2.6.18. Иммунохимическая детекция гибридизовавшегося зонда.</i> .....	78
2.7. ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ БЕЛКИ .....	79

<b>ГЛАВА 3. РЕГИСТРАЦИЯ И АНАЛИЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ.....</b>	<b>83</b>
3.1. ФОТОГРАФИРОВАНИЕ .....	83
3.2. ЦИФРОВАЯ СИСТЕМА ФИКСАЦИИ ИЗОБРАЖЕНИЯ .....	85
3.3. МЕТОДЫ ХРАНЕНИЯ И ОБРАБОТКИ ЦИФРОВЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ .....	89
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ .....</b>	<b>94</b>
<i>ПРИЛОЖЕНИЕ 1. СПЕКТРЫ ФЛУОРОХРОМОВ .....</i>	<i>94</i>
<i>ПРИЛОЖЕНИЕ 2. БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ .....</i>	<i>104</i>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>105</b>
<b>ОГЛАВЛЕНИЕ.....</b>	<b>106</b>

**Алсу Фаритовна Сайфитдинова**

Учебно-методическое пособие  
ДВУМЕРНАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ  
ДЛЯ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

**Alsu Saifitdinova**

2-D FLUORESCENCE MICROSCOPY FOR ANALYSIS OF  
BIOLOGICAL SAMPLES

Обложка: *А.Ф. Сайфитдинова*  
Компьютерная верстка: *А.О. Доморацкий*

**«...Книга А.Ф.Сайфитдиновой представляет уникальное собрание разнообразных методик, которые в настоящее время являются наиболее актуальными в клеточной биологии, иммунологии и молекулярной цитогенетике...»**

*Заведующая лабораторией  
Структуры и функции хромосом  
Биологического НИИ СПбГУ,  
д.б.н., проф. Е.Р.Гагинская*

**«...Отдельного внимания заслуживает замечательная подборка молекулярных и цитологических методов, для которых в пособии приведены подробные протоколы. Эта часть превращает подготовленное пособие в полезный справочник, который, несомненно, найдет свое место на рабочем столе не только учебных, но и исследовательских лабораторий...»**

*Заведующий лабораторией  
Морфологии и функции клеточных структур  
Института цитологии и генетики СО РАН,  
д.б.н., проф. Н.Б.Рубцов*

В оформлении обложки использована микрофотография хромосом типа ламповых щеток зяблика *Fringilla coelebs*, окрашенных антителами Y12 к Sm-эпитопу мяРНП. Визуализация реакции антителами, конъюгированными с FITC – зеленая флуоресценция. Хромосомы окрашены йодистым пропидием – красная флуоресценция.