

Визуализация новореплицированной ДНК и изучение ее ультраструктуры.

Научный руководитель – Голышев Сергей Александрович

Волынкина Инна Александровна

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: inna-volynkina@yandex.ru

В настоящий момент механизмы и динамика процесса репликации ДНК в клетках эукариот подробно изучены в системах *in vitro* [3] и на уровне целого ядра. Однако до сих пор остается неясным поведение гетерогенно упакованного хроматина в нативных условиях. Результатом многих исследований репликации являются различные гипотезы [1, 2], которые требуют строгого экспериментального доказательства с детальным изучением ультраструктуры репликационных сайтов и отсутствием артефактов ранее примененных методов, таких как денатурация соляной кислотой и пермеабилзация, которые в значительной степени искажают препарат на электронно-микроскопическом уровне.

В данной работе с целью визуализации новосинтезированной ДНК использовался метод введения модифицированного предшественника 5'-этинилдезоксисуридина (EdU) с последующим выявлением сайтов включения посредством клик-реакции с флуоресцентным маркером Alexa⁵⁵⁵-азидом. Подобная модель позволяет вести контроль эксперимента на световом уровне, а также не требует проведения пермеабилзации и окрашивания специфическими крупными зондами (например, антителами), что снижает уровень деструктивных эффектов и пространственную погрешность в 15-30 нм, обусловленную размерами самих зондов. Однако в 1982 году был разработан метод фотоокисления [4], суть которого заключается в том, что флуоресцентные краски обладают способностью генерировать свободные радикалы кислорода при облучении светом с высокой энергией, что позволяет окислять 3,3'-диаминобензидин (DAB) и переводить его в электронно-плотный полимерный осадок в области локализации флуорохрома [5]. Данный процесс после дополнительного контрастирования позволяет наблюдать локализацию маркера с высокой точностью и сохранностью структуры на уровне стандартной электронной микроскопии.

В ходе работы были получены как световые, так и электронно-микроскопические изображения, которые на данный момент детально изучаются методами компьютерной обработки.

Источники и литература

- 1) Голышев С. А., Поляков В. Ю. (2008) Ультраструктура хроматина в сайтах репликации, Цитология, 50 (1), 29-39.
- 2) Blow, G. G. and Ge, X. Q. (2008) Replication forks, chromatin loops and dormant replication origins, Genome Biology, 9 (12), 244.
- 3) Chagin, V. O., Stear, J. H. and Cardoso, M. C. (2010) Organization of DNA Replication, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2, a000737.
- 4) Maranto, A. R. (1982) Neuronal mapping: a photooxidation reaction makes lucifer yellow useful for electron microscopy, Science, 217, 953-955.

- 5) Meisslitzer-Ruppitsch, C., Röhl, C., Ranftler, C., Stangl, H., Neumüller, J., Pavelka, M. and Ellinger, A. (2013) Photooxidation technology for correlative light and electron microscopy, Cell Imaging Techniques: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 931, 423-436.