

ДНК-интеркалирующие флуоресцентные красители и их применение в современной проточной цитометрии.

Научный руководитель – Поташникова Дарья Марковна

Поташникова Дарья Марковна

Кандидат наук

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра клеточной биологии и гистологии, Москва, Россия

E-mail: dariapotashnikova@yandex.ru

Измерение внутриклеточного содержания ДНК методом проточной цитометрии с флуоресцентными ДНК-интеркаляторами - надёжный способ анализа ploидности и распределения клеток по клеточному циклу. В докладе рассмотрены самые распространенные схемы применения количественного окрашивания ДНК, основные возможности данного подхода и методические тонкости, связанные с его реализацией. 1) Количественное окрашивание ДНК в генетике растений и популяционных исследованиях: на примере различных видов бобовых. Актуальность задачи обусловлена тем, что размер генома широко варьирует у близкородственных видов растений и значительно влияет на ряд их морфологических и физиологических параметров [1]. Оценка размера генома растений предполагает выделение ядер с дальнейшим окрашиванием йодидом пропидия. В качестве внутреннего контроля количества ДНК был использован горох сорта Frisson с содержанием ДНК 4,88 пкг/ядро. Коэффициент ($k=1,9$) отношения пиков G2/M и G0/G1 характеризует точность проводимой оценки. Были установлены размеры геномов ряда бобовых и проанализирована ploидность вида *Lathyrus pratensis*. Подтверждено отсутствие полиплоидов в составе популяций данного вида в 12 географических локациях на территории РФ. 2) Количественное окрашивание ДНК при анализе клеточного цикла в несинхронизированной популяции клеток человека: на примере суспензионной культуры клеток K562. Дополнительные параметры помимо окрашивания ДНК, позволяют выяснить активационный статус, историю делений и стадию клеточного цикла любой клетки; комбинирование техник визуализации позволяет дополнительно разделять стадии митоза или S-фазы в популяции [2;3]. Протокол позволяет сравнить окрашивание ДНК живых и фиксированных клеток, а также проводить сортировку по фазам клеточного цикла [3]. 3) Количественное окрашивание ДНК при одновременном анализе клеточного цикла и клеточной гибели при моделировании действия противоопухолевых препаратов: на примере суспензионной культуры клеток RPMI8866. В работе было описано нелинейное влияние распространенных ингибиторов микротрубочек на накопление клеток в фазе G2/M: «триггерные» концентрации ингибиторов находятся в диапазоне 10-30 нМ паклитаксела, 30-100 нМ нокодазола и 10-30 нМ винорельбина. Комбинированное окрашивание позволяет выделить апоптотическую и жизнеспособную суб-диплоидную популяции, с разным ответом на ингибиторы. Работа поддержана грантами РФФИ 18-34-00511 мол_а; РФФИ 18-75-00033.

Источники и литература

- 1) Bennett M.D. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. // Proc. R. Soc. Lond. B. 1972. 181: 109.
- 2) Filby A., et al. The Analysis of Cell Cycle, Proliferation, and Asymmetric Cell Division by Imaging Flow Cytometry. // Methods in molecular biology (Clifton). 2016. 1389:71-95.

- 3) Potashnikova D. et al. FACS isolation of viable cells in different cell cycle stages from asynchronous culture for RNA sequencing // *Methods in molecular biology* (Clifton). 2018. 1745:315–335.