МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Т. Г. Алєксєєва, С. В. Білоконь

Політенні хромосоми *Drosophila melanogaster*

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до великого спеціального практикуму для студентів спеціальності «Біологія» спеціалізації «Генетика і молекулярна біологія» всіх форм навчання

ОДЕСА
ОНУ
2019

УДК 595.773.4:575.222.2.034 (075.8)
Х266

Рекомендовано до друку Вченою радою
біологічного факультету ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 2 від 10 жовтня 2018 р.

Рецензенти:

Страшнюк В. Ю., доктор біологічних наук, професор кафедри генетики і цитології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна;

Андрієвський О. М., кандидат біологічних наук, професор кафедри біохімії Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

Алєксєєва Т. Г.

Х266 Політенні хромосоми *Drosophila melanogaster* : метод. вказівки до великого спец. практикуму / Т. Г. Алєксєєва, С. В. Білоконь / Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2018. – 58 с.

Методичні вказівки включають основні теоретичні відомості та практичні інструкції щодо проведення лабораторного практикуму, присвяченого дослідженню політенних хромосом клітин слинних залоз личинок *Drosophila melanogaster*.

Методичні вказівки рекомендовано студентам біологічного факультету, що спеціалізуються по кафедрі генетики і молекулярної біології при виконанні лабораторних робіт з «Великого спеціального практикуму» і спеціального курсу «Основи генетичного аналізу».

© Алєксєєва Т. Г., Білоконь С. В., 2019
© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2019

ЗМІСТ

1. ВСТУП 4

Правила безпеки при проведенні ВСП 8

Тема 1. Політенні хромосоми *Drosophila melanogaster*. Загальні положення 10

Тема 2. Будова личинки дрозофіли. Відбір личинок 19

Тема 3. Препарування личинок *Drosophila melanogaster* і виготовлення тимчасових препаратів клітин слинних залоз 22

Тема 4. Визначення ступеня політенізації хромосом клітин слинних залоз *Drosophila melanogaster* 27

Список рекомендованої літератури 37

Додаток 1 41

Додаток 2 50

Додаток 3 56

ВСТУП

Одним із важливих завдань генетики є всебічний аналіз будови, структури та функцій хромосом живих об'єктів. Відомо, що дискретні хромосоми можливо виявити тільки в процесі клітинного поділу, під час якого матеріал, з якого складаються хромосоми, є конденсованим, тобто специфічним чином укладеним. Завдяки цій компактизації хромосомний матеріал набуває максимально зручного стану для транспортування в знов утворені дочірні клітини. У ході кожного клітинного поділу молекули ДНК компактизуються приблизно в 10 000 разів, тому природно, що в такому щільно упакованому стані ДНК генетично неактивна.

Таким чином, завдання аналізу будови та функціонування хромосом живих об'єктів дуже ускладнюється тим, що хромосоми рослин і тварин, які можливо виявити на стадії метафази, є малими за розміром і не завжди підлягають тонкому аналізу. Дослідження структури таких хромосом досить часто є надто складною задачею для великої кількості об'єктів.

У багатьох організмів у ряді нормальних (слинні залози комах, антиподальні клітини зародкового мішку рослин) та патологічних (клітини деяких злоякісних пухлин ссавців) тканин процес реплікації ДНК не супроводжується поділом самої клітини, відбувається зміна нормального проходження клітинного циклу. Такий видозмінений клітинний цикл називають ендоциклом. Внаслідок цієї зміни в ядрі накопичуються тисячі однойменних хромосом (чи хроматид). Хромосоми зазначених клітин можуть бути до 200 разів більшими за звичайні хромосоми соматичних клітин, що робить їх надзвичайно зручним об'єктом для дослідження функціонування хромосом.

Політенія виникає і досягає високих ступенів у тих органах і на тих етапах розвитку, коли є необхідність швидкого росту органа при незмінно високому рівні функціонування. Органи, що містять клітини з політенними хромосомами, зазвичай беруть участь у процесах інтенсивної секреції, причому, як правило, ця секреція здійснюється

протягом короткого часу на фоні швидкого росту. З огляду на те, що в клітинному циклі повністю блокований весь механізм поділу ядра і клітини, процес реплікації хромосом максимально спрощено і прискорено. Зрозуміло також, що ендоцикл сприяє збереженню високої функціональної активності органа, так як немає перерви, пов'язаної з проходженням мітозу.

Протягом такої інтерфази хромосоми активно функціонують: відбувається синтез РНК у процесах транскрипції, а в синтетичному періоді інтерфази – реплікація ДНК. Величезна лінійна молекула дезоксирибонуклеопротеїну, яка складає кожну хромосому (хроматиду) в інтерфазі є нерівно конденсованою; компактизовані ділянки, які носять назву хромомери, межують з декомпактизованими ділянками (міжхромомерами). Гомологічні хромомери усіх наявних у клітини хроматид зазвичай об'єднуються в один загальний хромомер. Відрізняючись між собою за величиною, формою, вмістом ДНК і розташуванням у хромосомі, хромомери мають чітку впорядкованість і надають хромосомним ниткам та їх окремим ділянкам індивідуальний характер. У той же час структура хромомер рухлива, і загальний малюнок певною мірою може змінюватися при зміні внутрішньоклітинних і зовнішніх умов.

Розташування великої кількості хромосом у поліплоїдних клітинах може здійснюватися одним із двох способів – у першому випадку усі хромосоми щільно кон'югують одна з одною гомологічними ділянками, утворюючи структуру, яка нагадує канат або мотузку (так звані політенні хромосоми «класичного» типу). У другому випадку кон'югація хроматид в ядрі є неповною, і хромосоми об'єднуються в пучки по декілька штук, а не по сотні чи тисячі, як у випадку класичних політенних хромосом; такі хромосоми розташовуються майже повністю незалежно одна від одної, і кон'югують лише в деяких ділянках. При значних порушеннях кон'югації такі хромосоми виглядають як скупчення заплутаних ниток, які важко розрізнити в об'ємі ядра. Цей тип політенізації хромосом не має чіткої поперечної смугастості, як за класичної політенізації і носить назву «прихованої політенії». Обидва види

політенії можуть переходити один від одного при змінах зовнішніх та внутрішніх умов існування клітини. Відомо, що ступінь щільності кон'югації гомологічних хроматид в ядрі клітин слинних залоз дрозофіли змінюється під впливом мутацій, у рослин – під впливом температури тощо. Зміни активності хромосом в інтерфазний період є основою змін функціонування геному в цілому і може призводити до ряду патологічних станів клітин, наприклад, до малігнізації соматичних клітин ссавців.

Зміни функціональної активності хромосом належать до неспадкової, зворотньої або епігенетичної мінливості, яка виникає внаслідок зміни експресії гена або групи генів. Політенні хромосоми дозволяють спостерігати зміни функціональної активності генів у реальному часі.

Дослідження політенних хромосом не обмежується питаннями організації структури інтерфазного ядра та особливостями взаємодії хромосом у ньому. Їх використовують для локалізації певних послідовностей в геномі, дослідження організації хроматину, у популяційних дослідженнях. Саме з дослідження функціонування політенних хромосом розпочався аналіз механізмів точної просторово-часової регуляції, необхідної для підтримання стабільного епігенетичного стану хроматинових доменів, а також цілісності геному в клітинних поколіннях. Створені карти політенних хромосом надають чудову можливість для визначення генетичної різноманітності між популяціями, для дослідження філогенетичних відносин споріднених видів.

З огляду на те, що основні механізми реалізації генетичної інформації в переважній більшості живих організмів є типовими і відбуваються за спільними алгоритмами, надзвичайно важливу роль у пізнанні фундаментальних основ процесів життя відіграють модельні об'єкти, серед яких чільне місце займає плодова мушка *Drosophila melanogaster*. Можливість використання дрозофіли як тест-об'єкта пов'язана з тим, що до 39% її генів гомологічні генам людини, а клітинний метаболізм здійснюється за спільними механізмами, що дозволяє екстраполювати отримані у експериментах на дрозофілі дані

на інші біологічні об’єкти. Так, наприклад, стрес-реакція, яка розвивається в комах у відповідь на дію несприятливих факторів зовнішнього середовища, є аналогічною стрес-реакції ссавців і має високий ступінь еволюційного консерватизму.

У даних методичних вказівках викладено основні теоретичні відомості та практичні інструкції щодо проведення лабораторного практикуму, присвяченого дослідженню політенних хромосом клітин слинних залоз личинок *Drosophila melanogaster*.

ПРАВИЛА БЕЗПЕКИ ПРИ ПРОВЕДЕННІ ВСП

Забезпечення безпечних і сприятливих умов під час навчання і праці людини є надзвичайно важливим моментом при плануванні і організації навчального процесу. При виконанні експериментальної роботи необхідно дотримуватись санітарно-гігієнічних вимог та вимог з приводу пожежної безпеки. Під час експерименту потрібно працювати з реактивами обережно, з обов'язковим виконанням застережливих заходів. При використанні електроприладів важливо дотримуватись усіх інструкцій по їх використанню.

У першому блоці лабораторних занять студентам необхідно навчитися виготовляти тимчасові давлені мікропрепарати слинних залоз личинок плодової мухи. Протягом цих занять студенти будуть працювати з наступним обладнанням: бінокулярні лупи з чорною та білою підложками, пінцети, препарувальні голки, предметні та покривні скельця, маркери по склу. При використанні скляного обладнання слід приділяти увагу техніці безпеки для запобігання поранень від розбитого скла і уколів та подряпин від пінцетів та препарувальних голок. Необхідно дотримуватися загальноприйнятих правил проводження робіт з оптичними приладами: бінокулярними лупами та дослідницькими мікроскопами. Усі реактиви в лабораторії повинні зберігатися в тарі з надписом, що вказує її вміст, концентрацію. Забороняється зберігання реактивів без найменування (етикеток). Реактиви, необхідні для виготовлення постійних препаратів клітин з політенними хромосомами дрозофіли, не є небезпечними для здоров'я дослідників, проте слід дотримуватися загальних правил їх використання і працювати у одноразових гумових рукавичках та робочих халатах. Робоче місце студента повинно бути обладнане згідно з всіма належними інструкціями. На робочому місці розміщують лише необхідні для конкретної роботи реактиви, прилади і обладнання. Воно повинно утримуватися студентом у чистоті та порядку. Перед початком роботи необхідно перевіряти наявність протипожежних засобів, справність

вентиляційної системи, справність ізоляції приладів; по закінченню – необхідно прибрати робоче місце та вимкнути воду та прилади.

Мухи *Drosophila melanogaster* відносяться до тваринних об'єктів типу Arthropoda. Робота з цими комахами не має суттєвих біотичних обмежень і не є травмонебезпечною.

У другому блоці студентам пропонується засвоїти принципи роботи з сучасними системами цифрової візуалізації, навчитися визначати реальне збільшення мікроскопу, проводити точні виміри мікроскопічних об'єктів. Окрім того, студенти повинні оволодіти базовими принципами роботи з програмою ImageJ (Fiji), яка є одним із найпотужніших інструментів аналізу і обробки зображень. Аналіз електронних мікрофотографій, отримання точних вимірів, проведення розрахунків проводиться в спеціально обладнаному класі біологічного факультету, в якому необхідно дотримуватися наступних правил: не можна торкатися монітора руками, проводити вологе прибирання, хапати дроти живлення, пристрої заземлення, з'єднувальні кабелі, коли комп'ютер ввімкнений. З клавіатурою треба поводитися обережно, м'яко натискаючи на її клавіші, також забороняється некоректне вимкнення та ввімкнення комп'ютеру. При несправності монітору, системного блоку або принтерів тощо студентам не дозволяється усувати їх самостійно, без спеціаліста.

В усіх задіяних приміщеннях біологічного факультету забезпечення санітарно-гігієнічних умов в лабораторії досягається дотриманням чистоти та відповідності освітлення, вентиляції робочих приміщень, а також засобів медичної і пожежної безпеки встановленим нормам. Також під час роботи категорично забороняється приносити на робоче місце їжу та напої.

ТЕМА 1

ПОЛІТЕННІ ХРОМОСОМИ *DROSOPHILA MELANOGASTER*. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Мета роботи: ознайомитися із загальнобіологічними, генетичними і молекулярно-біологічними аспектами будови і функціонування політенних хромосом *Drosophila melanogaster*.

У 1881 році французький ембріолог Е. Бальбіані (E. Balbiani) у клітинах слинних залоз, мальпігієвих судин, кишківника, мязів та гіподерми личинок *Chironomus plumosis* описав «перманентну спірему» – структуру, яка нагадувала довгий циліндричний шнур, що заповнював весь об'єм ядра. Подекуди на спіремі були наявні величезні муфтоподібні здуття, які отримали назву кілець Бальбіані. «Перманентну спірему» різних організмів – комах та інфузорій вивчав цілий ряд дослідників, які прийшли до висновку, що вона складається не з одного шнура, а з окремих елементів, кількість яких близька до кількості гаплоїдного числа мітотичних хромосом. У 1912 році чех Ф. Рамбоусек (F. Rambousek) вперше висунув припущення, що спірема має відношення до хромосом; у середині 30-х років минулого століття Т. Пайтнер (T. Painter) отримав незаперечні докази на користь хромосомної природи спіреми. Власне термін «політенні хромосоми» був запропонований П. Коллером (P. Koller) у 1935 році і був прийнятий за рекомендацією С. Дарлінгтона (C. Darlington) у 1937 році.

Як вже зазначалося, політенні хромосоми можуть мати різну морфологію. Незаперечними властивостями політенних хромосом класичного типу вважають наступні:

1. Це інтерфазні хромосоми, які максимально декомпактизовані і знаходяться у стані максимальної можливості для експресії, тобто це активно функціонуючі хромосоми.
2. Для них властиві гігантські розміри, оскільки вони складаються із сотень-тисяч гомологічних ниток-хроматид.

3. Ці хромосоми мають характерний рисунок поперечної смугастості – рисунок хромомерів.
4. Кількість хромосом у ядрах клітин з політенними хромосомами найчастіше дорівнює гаплоїдному стану – гомологічні хромосоми кожної пари щільно кон’ югують одна з одною.

Відомо два типи розташування політенних хромосом класичного типу в ядрі: окремі хромосоми можуть розташовуватися в ядрі незалежно одна від іншої, або можуть мати так званий хромоцентр. Хромоцентр об’єднує прицентромерні райони всіх хромосом в одну структуру. Між наявністю або відсутністю хромоцентру в політенних хромосомах різних організмів не виявлено ніякого еволюційного зв’язку. Для політенних хромосом клітин слинних залоз *Drosophila melanogaster* властива наявність хромоцентру.

Політенні хромосоми формуються в первинно диплоїдних ядрах за рахунок послідовних дуплікацій кожного хромосомного елементу без наступного розходження синтезованих гомологів. Для таких клітин властивий цілий ряд особливостей. Перш за все, формування політенних хромосом пов’язано зі змінами проходження етапів клітинного циклу. Клітинний цикл у цьому випадку носить назву ендоцикл і складається лише з двох етапів – S-фази (синтетичний період, під час якого відбувається синтез ДНК), і G – міжсинтетичної фази. За своїми характеристиками фаза G у клітинах у стані ендоциклу має значну подібність до фази G_1 – пресинтетичного періоду, який в інтерфазі звичайного клітинного цику передує синтетичному періоду. Період G_2 – постсинтетичний період, після якого клітина входить у мітотичний поділ і власне сам мітотичний поділ у ендоциклічних клітинах відсутні; таким чином, сформовані політенні хромосоми не можуть вступати у мітотичний поділ. Ядерна оболонка і ядерце залишаються інтактними впродовж усього процесу множинної реплікації ДНК. Для *D. melanogaster* властивий наступний ряд збільшення ступеня політенізації, залежного від кількості циклів редуплікацій хромосом:

2C→4C→8C→16C→32C→64C→128C→256C→512C→1024C→2048C

Таким чином, хромосоми в ядрі слинних залоз плодової мушки проходять від семи до десяти циклів реплікації. Наприкінці кожного періоду реплікації дочірні хроматиди не розходяться, залишаючись спареними.

Молекулярні механізми диференціювання клітин за політенним типом інтенсивно досліджуються. Відомо, що ключову роль у проходженні клітинного циклу відіграють циклін-залежні протеїнкінази (CDKs), які модифікують інші білки шляхом фосфорилювання, і, у свою чергу, можуть бути активовані іншими білками – циклінами (cyc). Показано, що начальні етапи клітинного циклу, зокрема перехід від G_0 до G, керуються цикліном D-типу в комплексі з циклін-залежними кіназами Cdk4 та Cdk6. Ініціацію та розвиток S-фази контролюють протеїнові комплекси Cyc E/Cdk2 та Cyc A/ Cdk2. Перехід до мітозу залежить від циклінів типу А та В у складі комплексу з Cdk1. Для активації циклін-залежної кінази Cdk1 також необхідна наявність фосфатаз Cdc25-типу. У політенних клітинах виключається експресія компонентів, які виявилися зайвими для ендоциклу. Так, зменшення експресії циклін-залежної протеїнкінази Cdk1 та/або лише її активаторів (цикліну В, цикліну А та Cdc25/*string*) вилучає фазу мітозу в клітинах з таким типом реплікації. Дія ще однієї сигнальної системи – Notch – призводить до інгібування активності М-фазної циклін-залежної кінази і одночасно до активації S-фазної циклін-залежної кінази у фолікулярних клітинах дрозофіли. До виходу з мітотичного циклу також призводять мутації в гені *fizzy* (*fz*), який пов'язаний з мітотичною деградацією циклінів А й В. Ще один ген дрозофіли – *escargot* (*esg*), який не функціонує у личинкових тканинах з політенними хромосомами, в разі надекспресії інгібує нормальну ендореплікацію в клітинах слинних залоз. Продукт гену *Dm myb* відіграє важливу роль у регуляції G_2/M-переходу; порушення його експресії призводить до зупинки типового

клітинного циклу в G_2-періоді та переході клітини на шлях ендореплікації.

З іншого боку відомо, що **ендоредуплікація хромосом знаходиться під онтогенетичним контролем**, зокрема, регулюється гормонами. З огляду на те, що гормони визначають диференційну активність генів в онтогенезі, активуючи і репресуючи певні локуси, вважають, що саме їм належить визначальна роль у детермінації процесів, які призводять до порушення нормального ходу мітозу та утворення політенних клітин.

У комах в регуляції онтогенезу приймають участь два базових гормони – екдистерон і ювенільний гормон. Показано, що ключову роль у генетичній програмі, що відповідає за помноження геному, відіграє ювенільний гормон. Його кількість підвищується наприкінці ембріональної стадії розитку – саме тоді починаються перші цикли ендореплікації. Наприкінці личинкової стадії розвитку в гемолімфі комах спостерігається зменшення рівня ювенільного гормону і пік вмісту екдизону, що супроводжується зупинкою процесу політенізації. Якщо ювенільний гормон сприяє політенізації хромосом клітин, то стосовно впливу, який чинить на цей процес екдистерон, одностайної думки немає. Вважають, що дія екдистерону на ендореплікацію залежить від концентрації гормону, причому важливу роль у реакції клітин відіграють генотип та стать личинок.

Морфологія політенних хромосом самиць (XX) і самців (XY) у комах загалом однакова. Логічно припустити, що на цитологічних препаратах політенних хросомом самців дрозофіли Х-хромосома повинна бути вдвічі тоншою, ніж дві спарені Х-хромосоми самиці; проте вона є тоншою лише на 25%, окрім того Х-хромосома самців виглядає значно більш розпушеною, ніж інші аутосоми та відповідні Х-хромосоми самиць. З огляду на те, що розпушеність структури хромосом пов’язана з активною транскрипцією в хромосомах, такий стан Х-хромосоми самців пояснюється механізмом дозової компенсації. Розпушеність хромосоми і той факт, що кількість негістонових білків у Х-хромосомі самців майже удвічі більша, ніж в

одній хромосомі самиці, і є структурною основою для явища дозової компенсації.

Існує механізм, який контролює формування розрихленої структури единої Х-хромосоми у самців. Виділені продукти п'яти генів: *msl-1, msl-2, msl-3, mle* (MSL-білки) й *mof*, а також щонайменше два види РНК, які приймають участь у цьому процесі. Ці білки утворюють комплекс й поєднуються з сотнями ділянок Х-хромосоми самця й забезпечують дифузність її структури. Для нормального функціонування всього комплексу необхідна наявність кожного з п'яти MSL-білків. Комплекс дозової компенсації локалізується лише в Х-хромосомах самця.

Будова політенних хромосом. Для організації політенних хромосом у личинки *Drosophila melanogaster* третього віку є характерним досить високий рівень соматичного синапсису – об'єднання гомологічних хромосом кожної пари в одну структуру. Синапсис політенних хромосом у дрозофіли може бути порушеним на тому чи іншому проміжку, зазвичай у районах центромерного, теломерного або інтеркалярного хроматину. Частота синапсису може змінюватися під дією різноманітних факторів фізичної і організменної природи.

Специфічна особливість, яка властива політенним хромосомам класичного типу – це поперечна смугастість. Вздовж кожної окремо взятої хроматиди почергово розташовані ділянки більш щільно (хромомери) і менш щільно (міжхромомери) конденсованого ДНП. Коли численні сестринські хроматиди під час синапсису зближуються, гомологічні хромомери утворюють поперечну смугу – диск. Деконденсовані ділянки хроматид між хромомерами у політенній хромосомі утворюють міждиски.

Ще одна характерна властивість політенних хромосом – це унікальність рисунку дисків. Патерн рисунку – розміри і морфологія дисків, відстань між сусідніми дисками суворо індивідуальні для кожної ділянки хромосоми. Завдяки цьому окремі групи дисків можуть слугувати маркерами не лише районів, але й цілих хромосом.

Саме ця властивість надала можливість побудови детальних і точних цитологічних карт політенних хромосом.

Перші і єдині загально визнані карти політенних хромосом *Drosophila melanogaster* були складені К. Бріджесом (C. Bridges) ще у 1935 році, який запропонував досить простий і зручний спосіб їх побудови. На препараті політенних хромосом можна визначити п’ять довгих плечей хромосом: хромосоми 2 і 3 мають по два плеча, Х-хромосома – одне, IV хромосома – дуже коротка, у порівнянні з рештою, Y-хромосому на препараті розрізнити не можна, тому що вона гетерохроматизована і входить до складу хромоцентру. За рекомендацією Бріджеса, кожне з п’яти довгих плеч хромосом дрозофіли поділено на 20 приблизно рівних по довжині сегментів, кожний з яких починається з великого, добре помітного диску. Четверта – мікрохромосома, також поділена на два таких сегменти. У кінцевому рахунку виходить 102 райони, які позначають арабськими цифрами. Кожний сегмент поділяють на шість ділянок, позначених латинськими літерами (від А до F). В межах кожної ділянки кожен диск знову позначають цифрами. Все це дає змогу дуже точно ідентифікувати кожен індивідуальний диск. Копії карт Бріджеса для усіх хромосом наведено у Додатку 2 даних методичних вказівок.

Важливо підкреслити, що великий вплив на морфологію політенних хромосом мають фіксатори і барвники, які використовуються для виготовлення препарату. Для використовування карт Бріджеса потрібно дотримуватися стандартної методики виготовлення препаратів політенних хромосом (наведена в темі 3). Всього на картах Бріджеса зображено трохи більше 5 000 дисків, але якщо вважати, що близько півтори тисячі з них зображено дублетами (зараз вважають, що так звані «диски-дублети» представляють собою артефакт, подвоєння одного диска у процесі виготовлення препарату), то загальну кількість дисків потрібно зменшити приблизно до 3,5 тисяч.

Генетична структура політенних хромосом. Як вже зазначалося, політенні хромосоми класичного типу характеризуються

чередуванням дисків та міждисків, головною цитологічною відмінністю яких є ступінь компактизації ДНК. Транскрипційно активними в політенних хромосомах є всі структури, для яких властивий той чи інший ступінь декомпактизації: пуфи, розрихлені диски, кільця Бальбіані, ядерця і, скоріше за все, міждиски.

Згідно з сучасними уявленнями, середня кількість генів, які розташовуються у межах одного диску, складає 3-5, хоча існують диски з дуже великою кількістю генів, наприклад, блоки з 160-200 ідентичних послідовностей 5S рРНК займають групу з чотирьох дисків, а сотні копій 18S й 28S рРНК локалізовані у ядерцевому організаторі, який у багатьох видів двокрилих виглядає як одиночний диск. Генетична функція міждисків інтенсивно досліджується. Було показано наявність унікальних послідовностей ДНК, а також великої кількості мотивів різних регуляторних елементів у міждисковому матеріалі. З огляду на те, що міждиски завжди знаходяться у декомпактизованому стані, вони постійно активні в більшості тканин і на всіх стадіях розвитку.

Яскравим морфологічним проявом активування та роботи генів є розпушення матеріала диска і формування на ньому структур, які отримали назву пуфів (РНК-пуфів). Розпушення диску пов’язане з тим, що активізація гена починається з накопичення різноманітних білків, які входять у транскрипційні комплекси, і супроводжується появою синтезованих РНК і білків, які цю РНК запаковують у спеціальні гранули для транспортування із ядра до цитоплазми. Пуфи, які мають особливу морфологію, отримали назву кілець Бальбіані: при їх активуванні хроматиди утворюють петлі, а численні петлі утворюють муфтоподібну структуру. Для кілець Бальбіані властивий надзвичайно високий рівень транскрипції.

Окрім звичайних РНК-пуфів, для утворення яких характерна декомпактизація ДНК і зменшення її питомої ваги в обсязі великого пуфа і які виглядають на препаратах світлими або прозорими, у клітинах слинних залоз на пізніх стадіях розвитку виникають ДНК-пуфи. На препаратах вони виглядають як темні здуття на хромосомах і зазвичай кодують білки секреції слинних залоз. Одночасно з

ампліфікацією ДНК (до двадцяти разів збільшується кількість матриць генів) у таких пуфах відбувається і активна транскрипція.

Ядерця як окремі органели ядра в клітинах з політенними хромосомами були описані одночасно з відкриттям самих політенних хромосом. Ядерце можна трактувати як високоспеціалізований пуф, який виникає виключно на ділянці хромосоми, що має назву ядерцевий організатор і містить гени рибосомних 18S і 28S рРНК. Кожен ген, що входить до ядерцевого організатора, функціонує незалежно один від одного; окрім того, ядерцеві гени схильні до ампліфікації.

Гетерохроматин у політенних хромосомах, як і в мітотичних, розташований у прицентромерних районах. У дрозофіли він об'єднаний у хромоцентр, який утворюється за рахунок негомологічної (ектопічної) кон'югації прицентромерних районів усіх хросомом. У складі хромоцентру гетерохроматин може бути у двох станах – α-гетерохроматин (щільні компактизовані гранули) і β-гетерохроматин (пухке сітчасте утворення). Вважають, що до складу α-гетерохроматину входять головним чином сателітні ДНК, а до β-гетерохроматину – різні мобільні елементи. Для ДНК хромоцентру властива неповна політенізація або недореплікація, причому β-гетерохроматин політенізується більшою мірою, ніж α-гетерохроматин. Ще одна структура, яка виглядає як диски із щільно компактизованого матеріалу, має назву інтеркалярний гетерохроматин: це ділянки хромосом, в яких міститься ДНК, що реплікується в пізній стадії S-періоду. Ці ділянки часто залишаються недорепліkованими і можуть вступати в ектопічні контакти між собою та прицентромерним хроматином. Вони є «гарячими точками» утворення хромосомних перебудов.

Матеріали та обладнання

Тексти лекцій спецкурсу

Методичні вказівки

Інформаційні джерела, наведені у переліку літератури

Інтернет-ресурси

FlyBase Wiki https://wiki.flybase.org/wiki/Main_Page
FlyBase http://flybase.org/

Завдання

Відповісти на тестові питання (Додаток 1)

Розглянути та навчитися читати карти політенних хромосом, складені К. Бріджесом (C. Bridges) й Б. Слизински (B. Slizynski) (Додаток 2).

ТЕМА 2

БУДОВА ЛИЧИНКИ ДРОЗОФІЛИ. ВІДБІР ЛИЧИНОК

Мета роботи: ознайомитися з життєвим циклом і зовнішньою і внутрішньою будовою личинок плодової мушки, навчитися розрізняти стадії розвитку, визначати стать личинок та виділяти слинні залози.

Матеріали та обладнання

Мухи лінії *Canton-S Drosophila melanogaster* на усіх етапах онтогенезу

Бінокулярні лупи

Чорна підложка

Препарувальні голки

Пінцети

Хід роботи

1. Роздивитись, замалювати і сфотографувати усі стадії онтогенезу *Drosophila melanogaster.*

Життєвий цикл плодової мушки *Drosophila melanogaster* триває приблизно 10 днів за температури +25 °С. Розвиток ембріона триває близько 24 годин. Дрозофіла має три личинкові стадії (рис. 1): перша (L1), друга (L2) (кожна триває приблизно одну добу) і третя стадія (L3), яка завершується за три доби. Стадія лялечки триває чотири доби. Із лялечки звільняється імаго. Дорослі мухи досягають статевої зрілості після 2-4 діб і запліднені самки починають відкладати яйця. Ця хронологія етапів розвитку може досить значно варіювати (до декількох днів) в залежності від умов середовища (температура, перенаселеність, якість їжі) та генотипу мух.

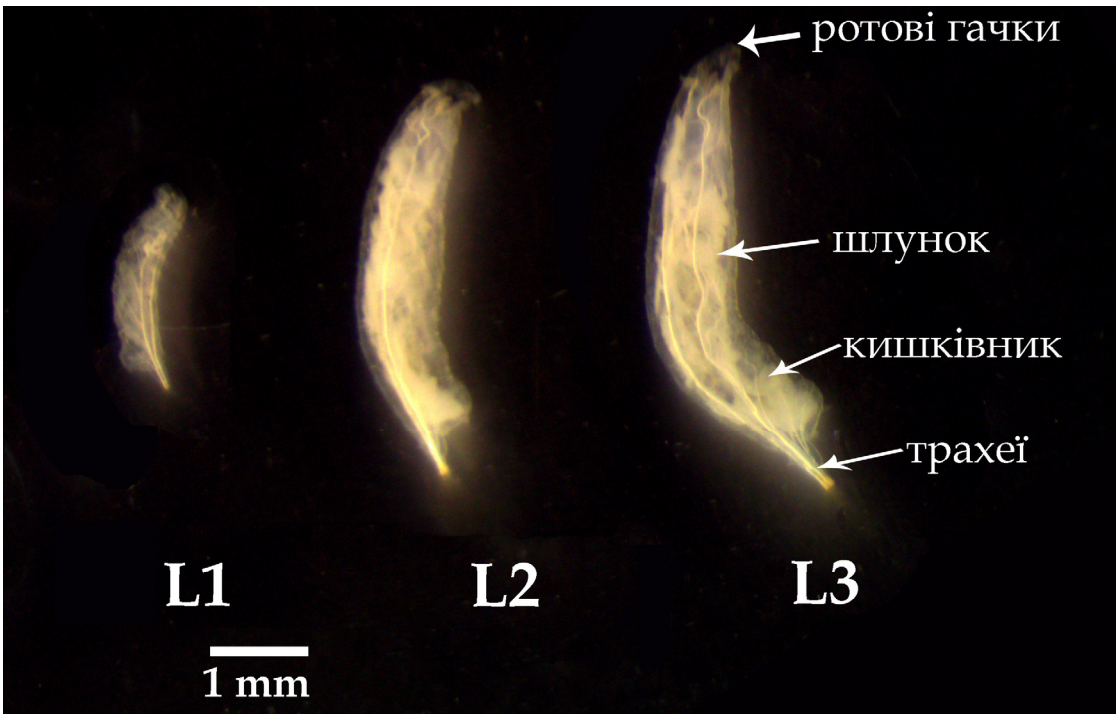


Рис. 1. Будова личинок *Drosophila melanogaster*

Для виділення слинних залоз використовують личинок третьої вікової стадії, вирощених при температурі +24 °С. На цьому етапі розвитку личинки покидають поживне середовище і виповзають на стінки культуральних ємностей, проте ще зберігають рухливість і покриви личинок залишаються світлими.

Личинки третьої вікової стадії вже можуть бути розділені за статевим принципом: гонади можна розгледіти крізь напівпрозорий шкірний покрив личинки. Гонади можна побачити за умови розташування личинки на боці, навпроти чорного фону, ідеально при освітленні зверху. Вони локалізовані з кожного боку в останній третині тіла личинки, трохи нижче дорсальної трахеї. Чоловічі гонади приблизно в п’ять разів більші за жіночі (рис. 2).

В залежності від поставленого завдання для дослідження можуть бути використані слинні залози лише личинок жіночої статі (наприклад, при дослідженні пуфової активності, якщо залучаються пуфи Х-хромосоми) За інших завдань може бути корисним порівняння результатів, отриманих для обох статей.

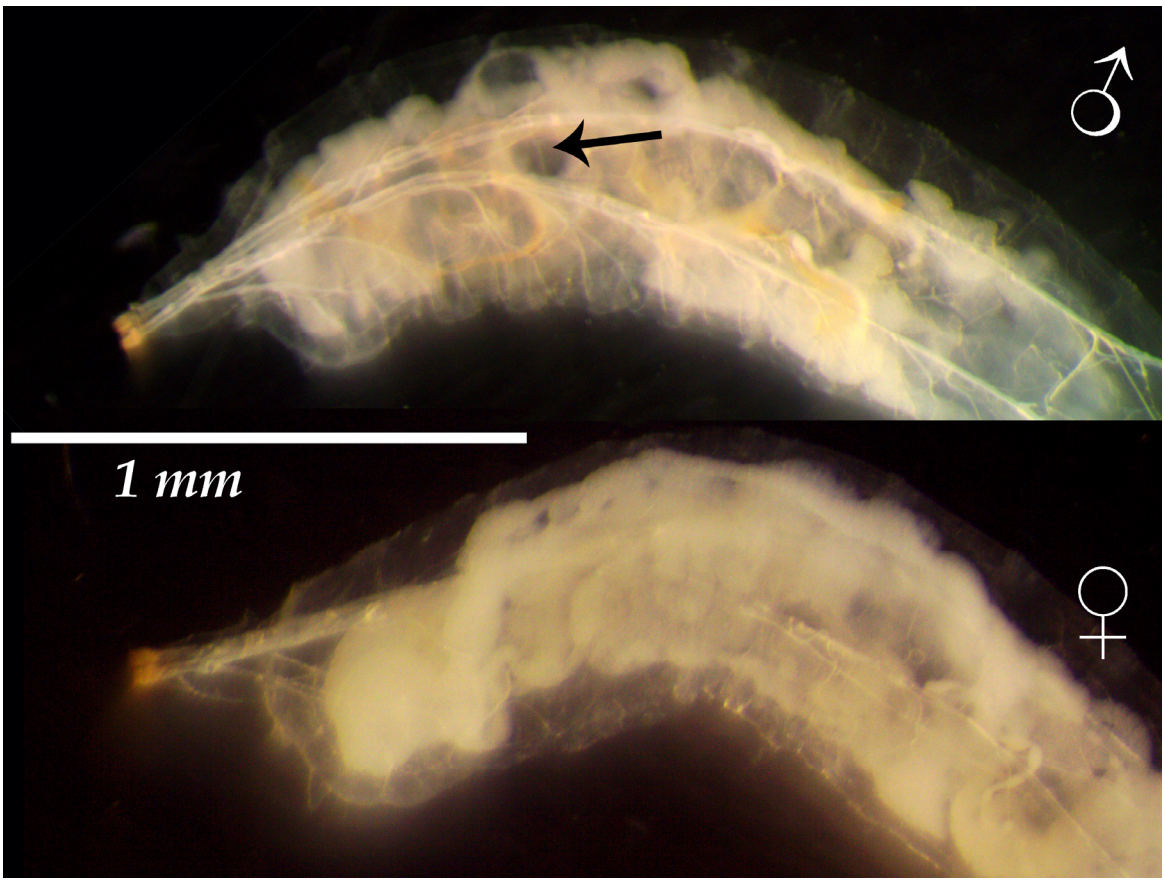


Рис. 2. Личинки *Drosophila melanogaster* жіночої і чоловічої статі
(Чоловічі гонади вказано чорною стрілкою)

2. Серед запропонованих личинок дрозофіли лінії *C-S* обрати таких, що вже досягли третьої вікової стадії. Уважно розгледіти личинок під бінокулярною лупою, розподілити на самців і самок. Замалювати та сфотографувати відмінності. Відібраних личинок жіночої статі залишити для препарування та виготовлення постійних препаратів політенних хромосом клітин слинних залоз.

ТЕМА 3

ПРЕПАРУВАННЯ ЛИЧИНОК DROSOPHILA MELANOGASTER І ВИГОТОВЛЕННЯ ТИМЧАСОВИХ ПРЕПАРАТІВ КЛІТИН СЛИННИХ ЗАЛОЗ

Мета роботи: засвоїти методики виділення слинних залоз личинок дрозофіли і виготовлення тимчасових ацеторсеїнових препаратів клітин з політенними хромосомами.

Матеріали та обладнання

Личинки третього віку *Drosophila melanogaster*, лінія *Canton-S*

Бінокулярні лупи

Мікроскопи

Чорна підложка

Предметні та покривні скельця

Препарувальні голки

Пінцети

Фізіологічний розчин (прописи всіх розчинів наведені у ДОДАТКУ 3)

2% розчин ацетоорсеїну

45% оцтова кислота

40% молочна кислота

Фільтрувальний папір

Хід роботи

1. Відібрати личинку *Drosophila melanogaster* необхідного віку і розмістити її на предметному склі ближче до лівого краю.
2. Нанести краплю фізіологічного розчину на середину того ж предметного скла, пінцетом перенести личинку в краплину.
3. Однією парою пінцетів необхідно тримати личинку за верхню частину тулуба в районі мозкових гангліїв; одночасно другою парою пінцетів перехопити личинку за верхній шар кутикули приблизно між першою та другою третиною тіла і акуратно, але сильно потягнути (рис. 3а). Ті ж самі маніпуляції можна виконати, використовуючи

пару препарувальних голок замість пінцетів. При успішному виділенні зазвичай слинні залози і вентральний ганглій залишаються прикріпленими до головної частини (рис. 3б).

4. Препарувальною голкою чи пінцетом видалити усі рештки личинки, залишивши на предметному склі лише чисті слинні залози (рис. 4а, 4б). На латеральній поверхні слинних залоз знаходиться жирова тканина. Її також необхідно обережно видалити. Слинна залоза має зернисту будову, в ній можна розгледіти величезні клітини з ядрами, навіть без попереднього фарбування.

5. Після видалення необхідно обережно прибрати фільтрувальним папером використану краплину фізіологічного розчину і додати свіжу. У такій краплині нетривалий час можна зберігати декілька пар виділених залоз; потрібно не допускати висихання розчину.

6. Наступний етап – приготування давленого тимчасового мікропрепарату політенних хромосом. Для цього на чисте предметне скло наносять краплину робочого розчину ацетоорсеїну, занурюють у ньому виділені залози і залишають на термін від півгодини до однієї години для фіксування та забарвлення матеріалу.

7. Забарвлені залози переносять у краплину 45% оцтової кислоти на предметному склі для відмивання надлишку барвника і закріплення фіксації, витримують протягом 5 хвилин.

8. За допомогою фільтрувального паперу відтягують залишки оцтової кислоти і додають по краплі оцтову (45%-ий розчин) і молочну (40%-ий розчин) кислоти. Забарвлені залози обережно накривають покривним скельцем.

9. За допомогою фільтрувального паперу відтягують залишки оцтової кислоти і додають по краплі оцтову (45%-ий розчин) і молочну (40%-ий розчин) кислоти. Забарвлені залози обережно накривають покривним скельцем.

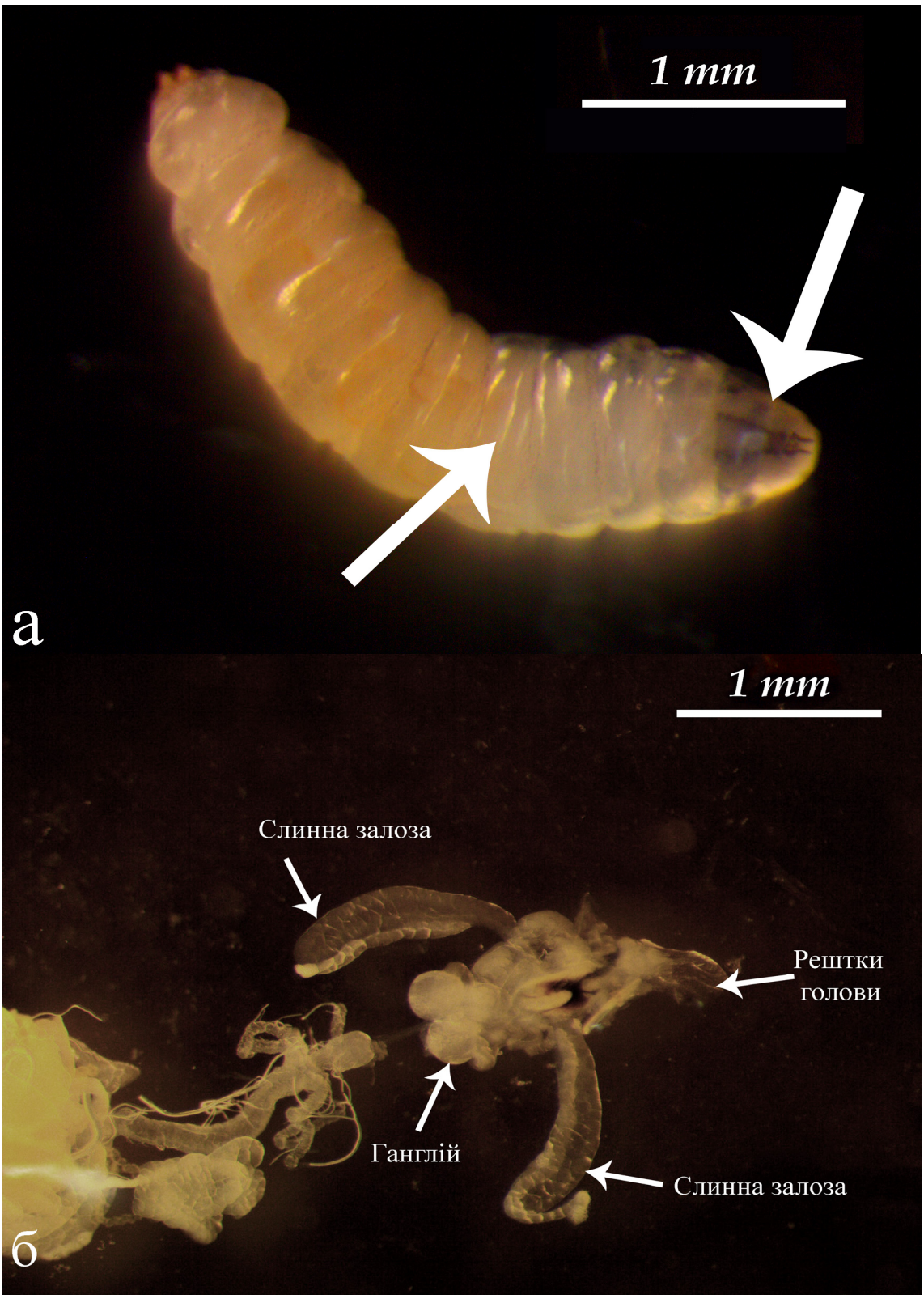


Рис. 3. Виділення слинних залоз дрозофіли: а – стрілками показані місце, за яке потрібно утримувати личинку (товста стрілка), і місце, в якому потрібно тягнути личинку за кутикулу (тонка стрілка); б – результат акуратного виділення слинних залоз: самі залози (з двох боків), вентральний ганглій і трубка кишківника залишаються приєднаними до ротової частини личинки *Drosophila melanogaster* лінії *Canton-S*

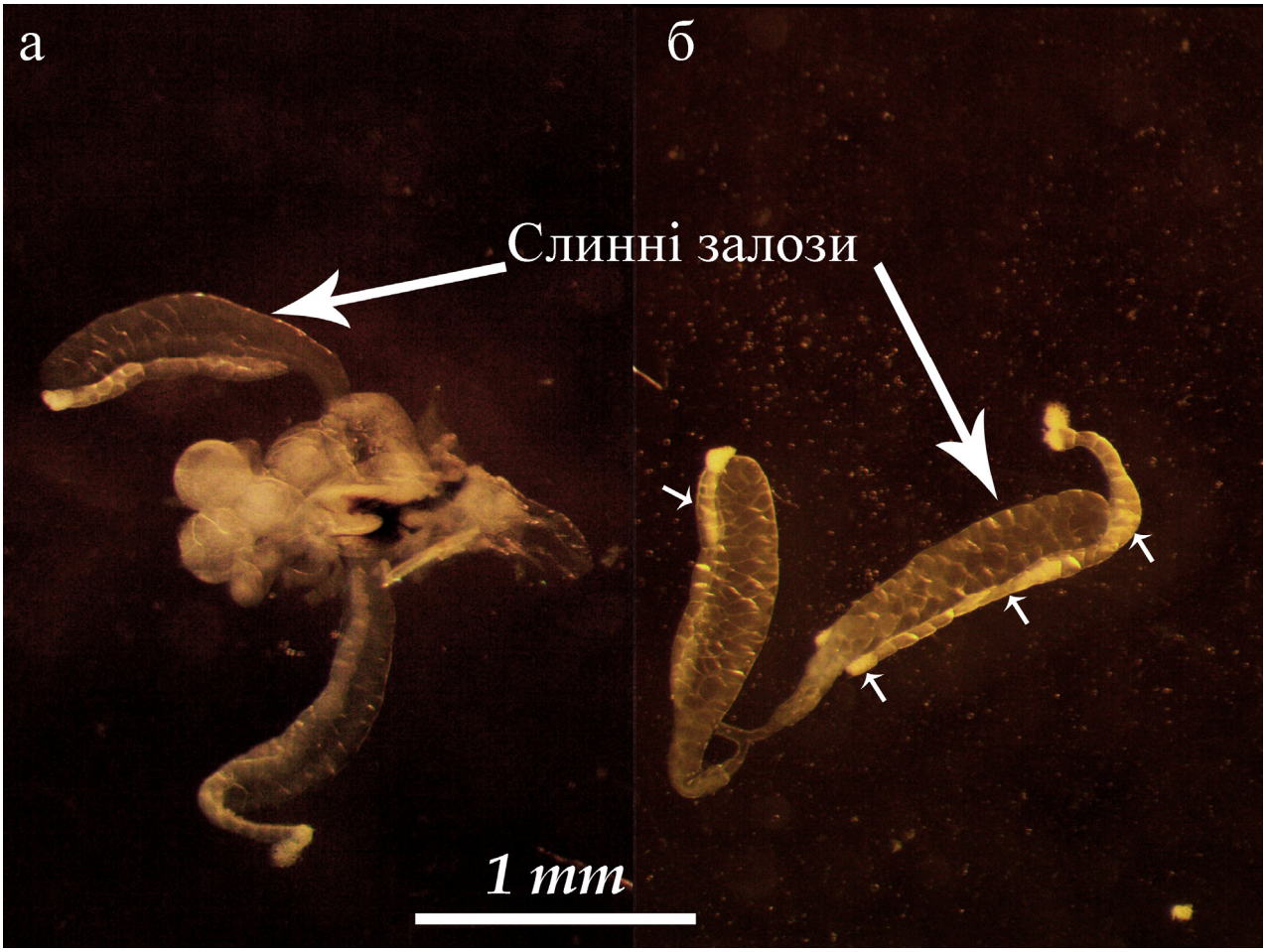


Рис. 4. Виділення слинних залоз дрозофіли: а – видалена кишка і решта личинки, залишилися нервовий ганглій і рештки голови; б – видалено усе, окрім слинних залоз. На поверхні залоз є рештки жирової тканини (вказані маленькими стрілками).

10. За допомогою фільтрувального паперу відтягують залишки оцтової кислоти і додають по краплі оцтову (45%-ий розчин) і молочну (40%-ий розчин) кислоти. Забарвлені залози обережно накривають покривним скельцем.

11. Препарат накривають зверху смужкою фільтрувального паперу і обережно видаляють надлишок кислоти; дуже обережно, круговими рухами, тримаючи дерев'яну паличку суворо перпендикулярно до скла, натискають на місце, де знаходиться слинна залоза. Обережний тиск повинен розправити хромосоми між покривним і предметним скельцями, зберігаючи їх структуру і цілісність.

12. Виготовлений тимчасовий препарат розглядають під мікроскопом. Використовуючи об’єктив із найменшим збільшенням локалізують місце знаходження слинних залоз на склі і перевіряють якість виготовлення препарату. Якщо хромосоми недостатньо добре розправлені, допускається обережне додавання краплини 45% оцтової кислоти і повторення процедури пункту 10.

13. Готові препарати роздивляються під біологічним дослідницьким мікроскопом. Якісно виконані тимчасові препарати політенних хромосом клітин слинних залоз можливо зберігати досить довго – декілька місяців у парах оцтової кислоти у герметично закритому посуді.

ТЕМА 4

ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ ПОЛІТЕНІЇ ХРОМОСОМ В КЛІТИНАХ СЛИННИХ ЗАЛОЗ ЛИЧИНОК *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Мета роботи: проаналізувати виготовлені препарати політенних хромосом слинних залоз *Drosophila melanogaster.*

Одним із зручних показників, за яким можна судити про реплікативну активність хромосом клітин слинної залози є ступінь політенії, або політенізації. Ступінь політенії є показником кількості елементарних ниток ДНК і відображає реплікативну активність хромосом. Окрім того, ступінь політенії є одним з показників рівня метаболізму. Ступінь політенізації також можна визначити як відношення вмісту ДНК у політенних хромосомах до вмісту ДНК у звичайному гаплоїдному чи диплоїдному ядрі. Цей показник може суттєво відрізнятися як у різних клітинах одного органа, так і в клітинах різних органів. Так, було показано, що ступінь політенії клітин слинної залози *Drosophila melanogaster* залежить від розташування клітини в тілі залози: клітини, які знаходяться в дистальній частині залози, мають вищі ступені політенізації, ніж клітини проксимальної частини.

Визначення ступеня політенізації можливо за вимірювання кількості ДНК в ядрах з політенними хромосомами. Для цього використовують методики цитофотометрії чи спектрофотометрії, які базуються на вимірі поглинання світла певної довжини хвилі при проходженні через забарвлений чи незабарвлений препарат. Метод був розроблений Т. Касперсоном у 1951 р. Т. Родман (1967) методом цитофотометрії дослідив ступінь політенії хромосом у слинних залозах личинок дрозофіли. Згідно з отриманими результатами, ініціювання нових циклів ендоредуплікації політенних хромосом припиняється за декілька годин до формування пупарія (личинково-передлялечкова линька). На цей момент у клітинах слинних залоз *Drosophila melanogaster* дикого типу знайдено 4 дискретних класи

ядер зі ступенями політенії 256С, 512С, 1024С і 2048С. У нормі найбільший відсоток ядер мають ступінь політенії 1024С – близько 70%. Приблизно 20% – це ядра 512С. Решту 10% становлять ядра з рівнями політенії 256С і 2048С.

І. І. Кікнадзе та О. Д. Груздєв (1970) показали зв'язок між ступенем політенії та морфометричними показниками хромосом, такими як довжина та поперечні розміри у *Chironomus dorsalis* Meig. Українські вчені В. Ю. Страшнюк з колегами (1995) запропонували цитоморфометричний метод для дослідження відмінностей за ступенем політенії хромосом у слинних залозах личинок дрозофіл. Подальші дослідження, виконані В. Ю. Страшнюком у співавторстві з Непийводою С. М., Журавльовою Л. О. (Шакіною), Рарог М. А., Бєлоусовою І. Б., Лєоновою І. С. та ін., підтвердили точність, ефективність та зручність такого методу (рис. 5).

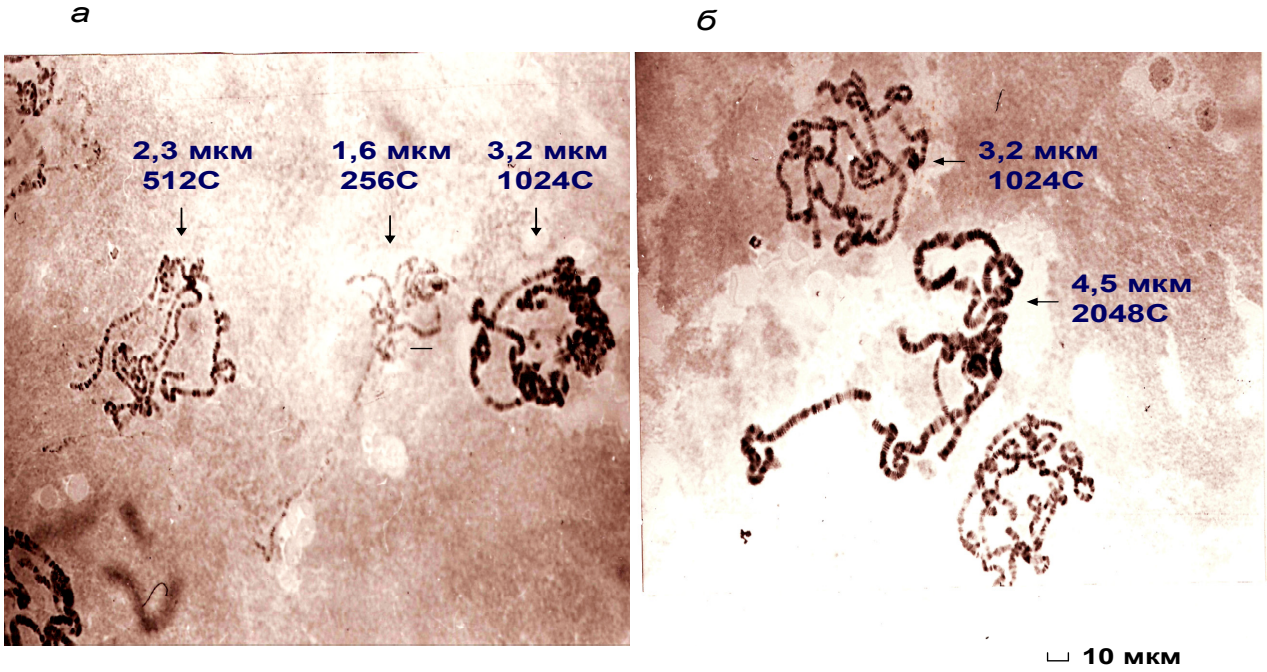


Рис. 5. Гігантські хромосоми *D. melanogaster* з різним ступенем політенії: *а* – проксимальна частина слинної залози, *б* – дистальна частина залози [Страшнюк и др., 1995].

Згідно з зазначеними авторами, виходять з наступних положень: кожен цикл ендоредуплікації збільшує ступінь політенії удвічі, отже, відмінності між політенними хромосомами мають дискретний

характер. Ступеню політенії 256С відповідає ширина хромосом 1,6 мкм; 512С – 2,3 мкм; 1024С – 3,2 мкм і 2048С – 4,5 мкм відповідно. Чим вищий ступінь політенії хромосом, тим інтенсивніше вони забарвлюються оцтоорсеїном. Контрольні вимірювання ширини хромосом проводять у районі диска 22А хромосоми 2L, який приблизно відповідає середній ширині хромосом.

Найбільш зручною і надійною комп'ютерною програмою, яка дозволяє аналіз та обробку зображень, загально визнана ImageJ. Це програма з відкритим вихідним кодом, яка поширюється без ліцензійних обмежень як суспільне надбання. ImageJ широко використовують у біологічних та медичних дослідженнях, а також в інших дисциплінах, які пов'язані з аналізом зображень.

Серед дистрибутивів ImageJ є версія, яка орієнтована на роботу з медико-біологічними зображеннями і носить назву Fiji (Fiji is just ImageJ) (рис. 6).

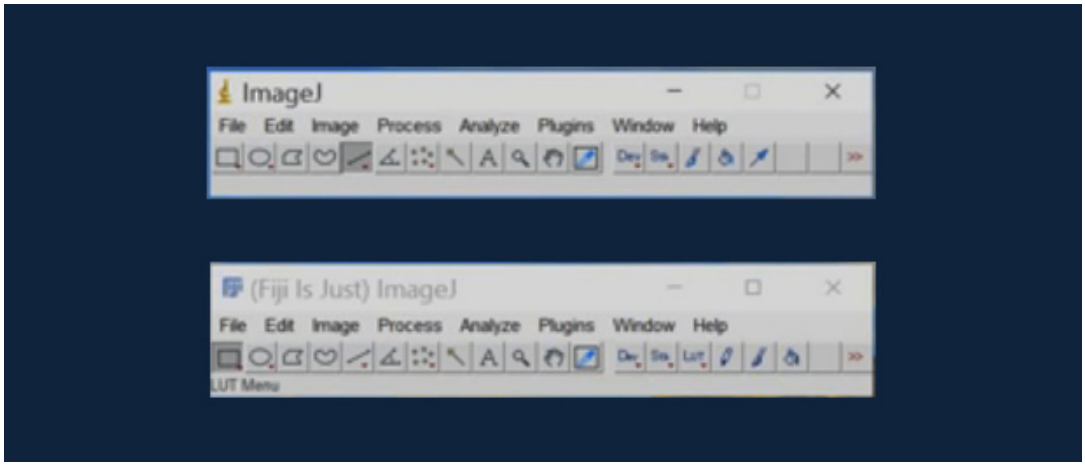


Рис. 6. Скріншот екрану комп'ютера з активованими вікнами програм Fiji й ImageJ

Матеріали та обладнання

Тимчасові давлені мікропрепарати політенних хромосом

Мікроскоп з системою цифрової візуалізації

Об'єкт-мікрометр ОМП 0,01 мм

Персональні комп'ютери з наперед встановленою програмою ImageJ у версії Fiji

Хід роботи

1. Виготовлені за проходження попередньої лабораторної роботи якісні препарати політенних хромосом розглядають під мікроскопом із встановленою цифровою камерою, зображення з якої виводиться на монітор комп'ютера.

2. Відібрані політенні пластинки (не менше 6 з одного скла, не менш ніж два препарати) фотографують при збільшенні об'єктиву 40×. Важливо зберігати фотографії у форматах «bmp», «png» або «tiff», які забезпечують належну якість фотографії для її подальшого аналізу засобами комп'ютерного забезпечення.

3. При тому ж збільшенні фотографують шкалу об'єкт-мікрометра ОМП 0,01 мм. Об'єкт-мікрометр – це предметне скло з мікрометричною сіткою (калібрувальною лінійкою). Воно призначено для калібрування мікроскопа або цифрової камери для мікроскопа при вирахуванні лінійних розмірів об'єкта, який досліджують під мікроскопом. Ціна поділку калібрувальної лінійки складає 10 мкм. Потрібно пам'ятати, що при роботі з об'єктивами 40× і вище необхідно враховувати товщину рисок поділків, тому при визначенні еталонної відстані потрібно використовувати відстань між лівою стороною лівої риски і лівою стороною правої риски. Окрім того, при визначенні еталонної відстані бажано використовувати максимальну кількість поділків у полі зору – це зменшить похибку калібрування і, відповідно, похибку усіх наступних вимірів.

4. Здійснити калібрування для перерахунку кількості одиниць-пікселів у мікрометри. Калібрування проводиться наступним чином:

4.1. На персональному комп'ютері відкрити комп'ютерну програму Fiji і загрузити в неї мікрофотографію шкали об'єкт-мікрометру (рис. 7).

4.2. Перш за все необхідно відкрити меню «Image», вибрати пункт меню «Type» і встановити режим «8-bit». Програма автоматично переведе кольорову фотографію у режим «Greyscale», необхідний для здійснення коректного аналізу.

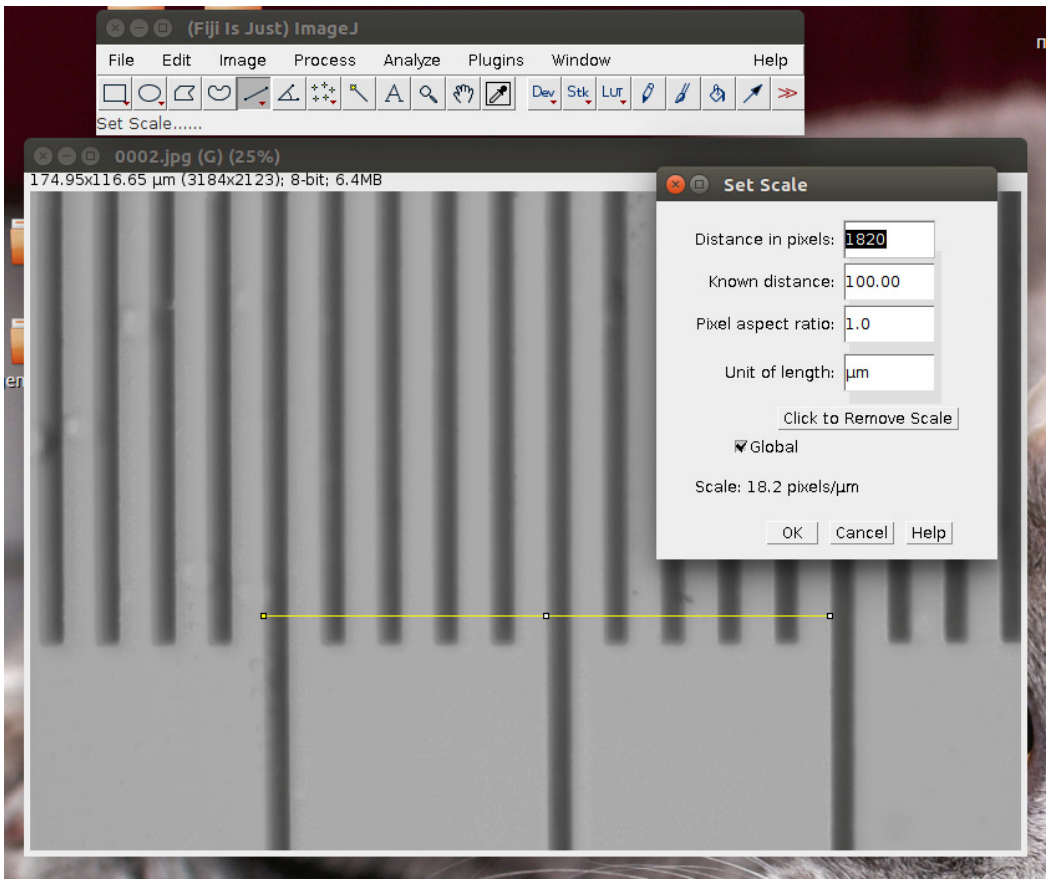


Рис. 7. Скріншот програми ImageJ: калібрування об'єктиву мікроскопа (пояснення в тексті)

4.3. Потім, використовуючи інструмент «Stright», провести пряму лінію (для того, щоб лінія була дійсно прямою, потрібно утримувати клавішу «Shift») від першої обраної риски до другої обраної риски (рис. 5), що складає у даному випадку 100 мкм. Після цього необхідно відкрити вкладку «Analyze» і вибрати в меню строку «Set scale» (рис. 7).

4.4. У першому пункті меню «Set scale» «Distance in pixels» вказана автоматично визначена довжина лінії у пікселях (у даному випадку – 1820 пікселей). У наступному пункті меню – «Known distance» – необхідно вказати довжину лінії в мікрометрах. Її визначають, пам'ятаючи, що ціна поділку калібрувальної лінійки об'єкт-мікрометру дорівнює 10 мкм. Третій пункт «Pixel aspect ratio» визначає співвідношення довжини і висоти зображення в пікселях, яке повинно дорівнювати 1,0 і встановлюється автоматично. Останній

пункт меню «Unit of length» визначає одиниці виміру. Для вибору мкм необхідно ввести символи «um».

4.5. Для подальшого використання даного калібрування в аналізі серії зображень необхідно в меню «Set scale» встановити галочку в пункті «Global». Це збереже настройки і дозволить використовувати їх у подальшій роботі.

5. Провести вимірювання ширини політенних хромосом сфотографованих клітин за допомогою комп'ютерної програми ImageJ. Важливо, щоб мікрофотографії хромосом бути зроблені з використанням того самого мікроскопу, окуляру та об'єктиву, які попередньо були прокалібровані за допомогою об'єкт-мікрометру. Зрозуміло, що при використанні декількох обєктивів кожен з них повинен бути прокалібрований окремо.

5.1. Вимірювання товщини політенних хромосом відбувається наступним чином: у програмі ImageJ відкривають мікрофотографію препарату політенних хромосом (рис. 8) і переводять її у 8-бітне зображення (пункт 4.2).

Рис. 8. Скріншот програми ImageJ: вимірювання товщини політенних хромосом *Drosophila melanogaster* (пояснення в тексті)

5.2. Виміри проводять за допомогою інструменту «Stright». З огляду на те, що не на всіх виготовлених студентами препаратах можна чітко розрізнити ділянку 22А на хромосомі 2L, методика цитофотометричних досліджень може бути адаптована наступним чином: на мікрофотографії політенних хромосом роблять мінімум п’ять вимірів товщини політенних хромосом у довільних ділянках (не потовщених і не потоншених, таких, що візуально мають середню товщину), і розраховують середню товщину політенних хромосом для кожного випадку (рис. 8, 9).

5.3. Активувавши інструмент «Stright», обирають довільну ділянку з чітко окресленим плечем хромосоми і вимірюють її ширину (рис. 8). Після цього необхідно увійти у меню «Analyze» і вибрати пункт «Measure» (рис. 9) На екрані з’явиться окремий файл «Results», у якому є інформація стосовно першого виміру: у таблиці послідовно показано ряд значень, з яких нас цікавить останнє – «Length» (на рис. 9 обведене червоним прямокутником). У цій колонці вказана довжина проведеної лінії в мікрометрах, яка характеризує ширину хромосоми в довільно взятій ділянці.

5.4. Для продовження роботи необхідно провести ще одну лінію в іншій ділянці хромосоми і внести цей вимір у файл «Results». Алгоритм дій залишається тим же: після проведення виміру необхідно увійти у меню «Analyze» і вибрати пункт «Measure», але для економії часу рекомендують використовувати гарячі клавіші «Ctrl+M». У програмі ImageJ передбачена можливість помітити місце, де вже було проведено вимір (для того, щоб випадково не повторити процедуру вимірювання). Для того щоб зберегти лінію, необхідно зайти у меню «Edit» на головній панелі програми ImageJ і вибрати пункт «Fill». У цьому випадку активна жовта лінія виміру стане чорною рискою на фотографії (на рис. 8 обведені червоними колами). Того ж ефекту можна досягти використанням гарячих клавіш «Ctrl+F».

5.5. Після проведення процедури вимірів – не менш ніж п’ять разів для п’яти різних ділянок політенних хромосом одного ядра – потрібно зняти показники. У відкритому вікні «Results», в якому

збережено показники, необхідно вибрати меню «Results» і в ньому вибрати пункт «Summarize». За цією командою для кожного з розрахованих показників програма визначить середнє значення, стандартне відхилення і вкаже максимальний і мінімальний варіанти (рис. 9).

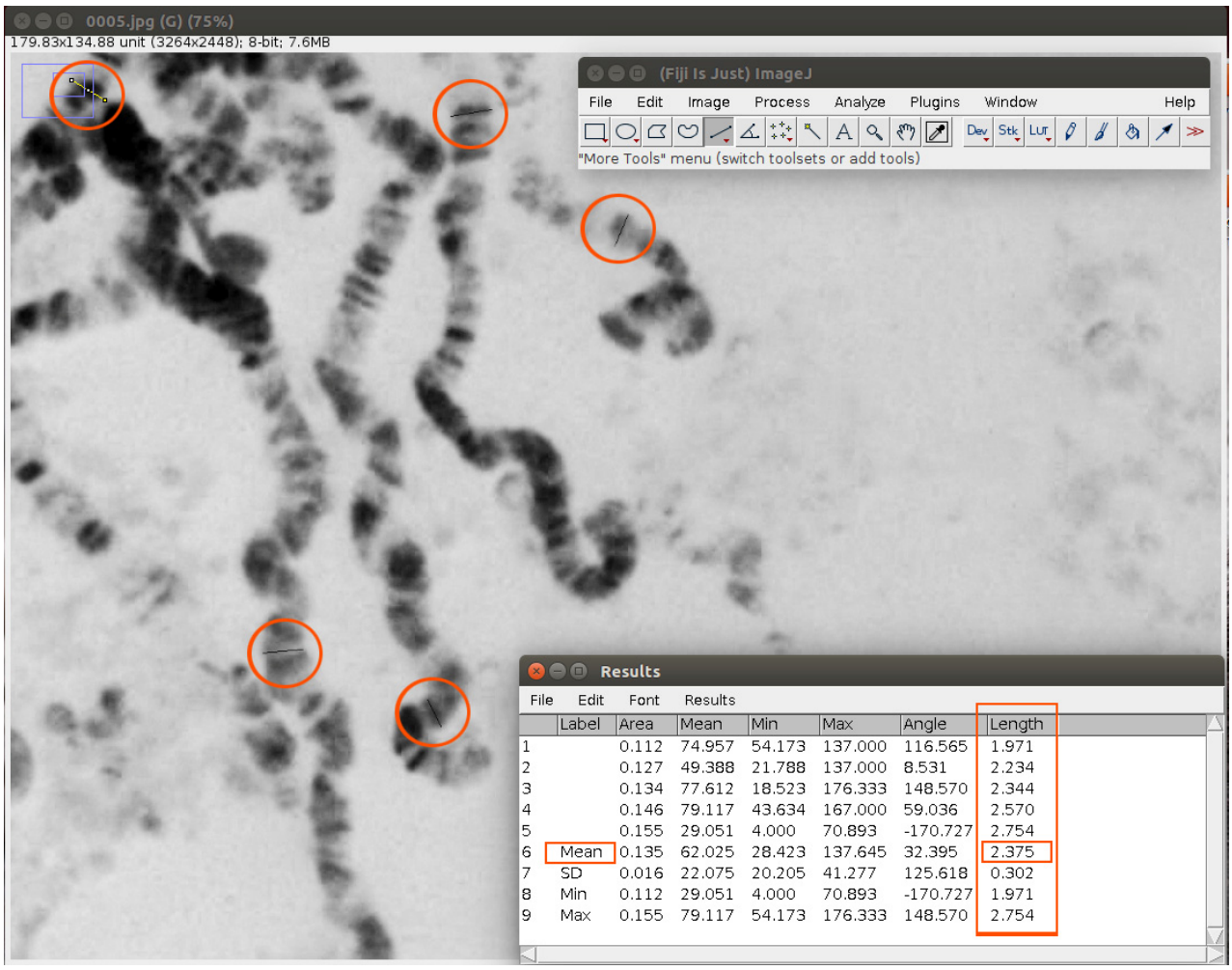


Рис. 9. Скріншот програми ImageJ: зняття показників при проведенні цитометричних досліджень (пояснення в тексті)

5.6. Для того, щоб зберігти результати вимірів у файл Excel, необхідно у відкритому файлі «Results» вибрати пункт «Save as» і задати шлях збереження файлу.

6. Необхідно оцінити ступінь політенізації хромосом і розподілити її за чотирма класами політенії за запропонованою схемою: до класу 256С можна віднести хромосоми з середньою товщиною від 1,0–1,9 мкм, до класу 512С – 2,0–2,9 мкм, до класу

1024С – 3,0–3,9 мкм і до класу 2048С – 4,0–4,9 мкм. Показники ширини політенних хромосом з кожного препарату та їх розподіл за класами внести у таблицю 1, яка заповнюється кожним студентом окремо за результатами власної роботи. Кожен студент повинен виміряти не менш ніж шість наборів політенних хромосом з кожного мікропрепарату і не менш ніж два препарати, заповнивши таким чином дві таблиці (табл. 1 і 2).

Таблиця 1

Товщина політенних хромосом препарату № 1 клітин слинної залози личинки *Drosophila melanogaster* лінії *Canton-S*

№ ядра	Товщина політенних хромосом у довільних точках, мкм					Середне значення, мкм	СПХ
	1	2	3	4	5		
1	1,97	2,23	2,34	2,57	2,75	2,37	512 С
2							
***							
6							

7. Для отримання більш чіткої картини функціонування політенних хромосом у личинок дрозофіли обраної лінії необхідно об’єднати результати, отримані кожним студентом групи.

8. Серед усіх клітин на кожному препараті окремо визначають кількість (частку) клітин у класах з певним ступенем політенії хромосом (256С, 512С, 1024С і 2048С). (Загальну кількість досліджених ядер з політенними хромосомами приймають за 100%, відповідно визначається відсоток ядер для кожного класу). Результати, отримані студентами всієї академічної групи, зводять у таблицю (табл. 2), відмічаючи кількість наборів політенних хромосом з певним ступенем політенізації:

Таблиця 2

Ступінь політенізації хромосом у ядрах клітин слинної залози личинок *Drosophila melanogaster* лінії *Canton-S*, %

Ступінь політенії хромосом	Студенти										Всього
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
256С	2										
512С	5										
1024С	4										
2048С	1										
Усього	12										

9. За даними заповненої таблиці вираховують, який відсоток від загальної кількості проаналізованих наборів політенних хромосом складає кожен клас і визначають загальний ступінь політенії, властивий клітинам мух лінії *C-S* у даних умовах утримання.

10. Кожен студент подає оформлений звіт «Визначення ступеня політенії в клітинах слинних залоз личинок *D. melanogaster* лінії *Canton-S*».

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Базова

1. Атраментова Л. О., Утєвська О. М. Статистичні методи в біології. Х : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2007. – 288 с.
2. Бродский В. Я., Урываева И. В. Клеточная полиплоидия: пролиферация и дифференцировка. – М. : Наука, 1981. – 259 с.
3. Жимулев И. Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск : ВО “Наука”, Сиб. издат. фирма, 1994. – 565 с.
4. Жимулёв И. Ф. Общая и молекулярная генетика. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2007. – 479 с.
5. Страшнюк В. Ю., Непейвода С. Н., Шахбазов В. Т. Цитоморфологическое исследование политенных хромосом *Drosophila melanogaster* Meig в связи с эффектом гетерозиса, отбором по адаптивно важным признакам и полом // Генетика. – 1995а. – Т. 31, № 1. – С. 24 – 29.
6. Тоцький В. М. Генетика. – Одеса : Астропринт, 2008. – 712 с.
7. Шакина Л. А., Страшнюк В. Ю. Генетические, молекулярные и гуморальные механизмы, регулирующие эндоцикл // Генетика. – 2011. – Т. 47, № 10. – С.13 – 22.
8. Козерецька І. А., Проценко О. В., Жук О. В., Серга С. В., Демидов С. В. Генетика дрозофіли. Практикум : навч. посібник. – К. : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2013. – 95 с.
9. Патент на корисну модель № 52573 Україна, МПК 2006 G01N33/554. Спосіб визначення активності біологічно активної речовини / В. Ю. Страшнюк, А. В. Усачов; заявник та правовласник Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна. – № u 2010 04098; заявл. 08.04.2010; опубл. 25.08.2010, Бюл. 16. – 4 с.

Додаткова

10. Гвоздев В. А. Пространственное расположение хромосом в клеточном ядре определяет активность генов // Сорос. обр. журн. – 2000. – Т. 7, № 2. – С. 4-10.
11. Жимулёв И. Ф. Современные представления об организации и функционировании политенных хромосом // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 11. – С. 2-7.

12. Журавлева Л. А., Страшнюк В. Ю., Шахбазов В. Г. Влияние плотности культуры на степень политении гигантских хромосом инбредных линий и гибридов *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика. – 2004. – Т. 38, № 3. – С. 46–51.
13. Кикнадзе И. И., Груздев А. Д. Изменение длины хромосом слюнных желез хирономид в связи с политенией // Цитология. – 1970. – Т. 12, № 8. – С. 953–961.
14. Мыцик А. В. Использование программы ImageJ для автоматической морфометрии в гистологических исследованиях // Омский научн. вестн. – 2011. – № 2 (100). – С. 187 – 189.
15. Страшнюк В. Ю., Аль-Хамед С., Шаламов Ю. А., Шахбазов В. Г. Изменение структуры и функции политенных хромосом как механизм температурной адаптации и эффекта гетерозиса у дрозофилы // Доповіді НАН України. – 1995б. – № 5. – С. 139–142.
16. Страшнюк В. Ю., Аль-Хамед С., Непейвода С. Н.,Шахбазов В. Г. Цитогенетическое и цитобиофизическое исследование механизмов температурных адаптаций и эффекта гетерозиса у *Drosophila melanogaster* Meig. // Генетика. 1997. – Т. 33, № 6. – С. 793–799.
17.Страшнюк В. Ю., Белоусова И. Б., Леонова И. С. Влияние генотипа на степень политении гигантских хромосом *Drosophila melanogaster* Meig в связи с различиями по приспособленности // Изв. Харьков. энтомол. об-ва, 2000. – Т. 8, вып. 1. – С. 179-182.
18. Страшнюк В. Ю., Таглина О. В., Горенская О. В., Шакина Л. А. Структурно-функциональные особенности политенных хромосом *Drosophila melanogaster* при гетерозисе // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2009. – Т. 6. – С. 236-240.
19. Страшнюк В. Ю., Шаламов Ю. А. Пуфовая активность политенных хромосом у *Drosophila melanogaster* в связи с различиями по степени политении и условиями температуры // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2013. – Т. 12. – С. 84-88.
20. Рарог М. А. Страшнюк В. Ю., Воробьева Л. И. Влияние генотипа на функцию эндоредупликации гигантских хромосом и

экспрессивность признака *eyeless* у *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 2003. – Т. 39, № 8. – С. 1053–1058.
21. Bridges C. B. Revision of the salivary gland map of the X chromosome of *Drosophila melanogaster* // Genetics. – 1938. – Vol. 23. – P. 142-143.
22. Bridges C. B., Bridges P. N. Reference map of the salivary gland 2R-chromosome of *Drosophila melanogaster* // J. Hered. – 1939. – Vol. 30, № 11. – P. 475-476.
23. Bridges P. N. A revised map of the left limb of the third chromosome of *Drosophila melanogaster* // J. Hered. – 1941. – Vol. 32. – P. 64-65.
24. Bridges P. N. A revision of the salivary gland 3R-chromosome map of *Drosophila melanogaster* // J. Hered. – 1941. – Vol. 32, № 11. – P. 299-300.
25. Bridges P. N. A new map of the salivary gland 2L-chromosome of *Drosophila melanogaster* // J. Hered. – 1942. – Vol. 33. – P. 403-408.
26. Caspersson T. Cell growth and cell function. – N.Y.; L. : Acad. Press, 1951. – 185 p.
27. Collins T. J. ImageJ for microscopy // BioTechniques. – Vol. 43 (1Suppl). – P. 25-30.
28. Loza-Coll M. A., Southall T. D., Sandall S. L., Brand A. H., Jones D. L. Regulation of *Drosophila* intestinal stem cell maintenance and differentiation by the transcription factor Escargot // EMBO J. – 2014. – V. 33, № 24. – P. 2983-2996.
29. Chyb S., Gompel N. Atlas of *Drosophila* morphology: wild-type and classical mutants. – Academic press. Amsterdam and Boston : Elsevier, 2013. – 224 p.
30. Dougherty G. Digital image processing for medical applications. – Cambridge University Press. – 2009. – 485 p.
31. Duronio R. J. Developing S-phase control // Gen. & Dev. – 2012. – V. 26. – P. 746-750.
32. Dyka L. D., Shakina L. A., Strashnyuk V. Yu., Shckorbatov Yu. G. Effects of 36.6 GHz and static magnetic field on degree of endoreduplication in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes // Inter. jour. of radiation biology. – 2016. – V. 92, № 4. – P. 222-227.

33. Edgar B. A., Orr Weaver T. L. Endoreduplication cell cycles: more for less // Cell. – 2001. – V. 105. – P. 297–306.
34. Hartenstein V. Atlas of *Drosophila* Development. - [Електронний ресурс] / Hartenstein. - Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. – Режим доступу до атласу: http://www.sdbonline.org/sites/fly/atlas/00atlas.htm
35. Larkins B. A., Dilkes B. P., Dante R. A. Investigating how and why of DNA endoreduplication // J. Exp. Bot. – 2001. – Vol.52, №355. – P. 183–194.
36. Rodman T. C. DNA replication in salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster* at successive larval and prepupal stages // Genetics. – 1967. – V. 55. – P. 375-386.
37. Sauer K., Knoblich J. A., H. Richardson, Lehner C. F. Distinct modes of cycling E/cdc2c kinase regulation and S-phase control in mitotic and endoreduplication cycles of Drosophila embryogenesis// Genet. Dev. – 1995. – V.9. – P. 1327–1339.
38. Slizynski B. M. A revised map of salivary gland chromosome 4 of *Drosophila melanogaster* // J. Hered. – 1944. – Vol. 35. – P. 322-324.

Офіційний сайт програми ImageJ: https://imagej.nih.gov/ij/

Офіційний сайт дистриб'ютиву Fiji: http://fiji.sc/

ДОДАТОК 1

Тестові завдання

Назвіть прізвище дослідника, який у 1881 році відкрив політенні хромосоми:

А. Е. Бальбіані
Б. Т. Пайтнер
В. Ф. Рамбоусек
Г. П. Коллер

Термін «політенні хромосоми» був запропонований:

А. П. Коллером
Б. М. Кольцовим
В. С. Дарлінгтоном
Г. Т. Пайтером

У клітинах слинних залоз та мальпігієвих судин *Chironomus plumosis* Е. Бальбіані відкрив структуру, яку назвав:

А. «Перманентна спірема»
Б. «Політенна хромосома»
В. «Кільце Бальбіані»
Г. «Ретикулярна структура»

Виберіть вірні твердження щодо загальних властивостей політенних хромосом класичного типу:

А. Це активні інтерфазні хромосоми
Б. Ці хромосоми є функціонально неактивними
В. Ці хромосоми можна побачити неозброєним оком
Г. Ці хромосоми мають характерний поперечно-смугастий малюнок
Д. Кількість хромосомних елементів в ядрі дорівнює гаплоїдному числу хромосом даного об’єкту
Е. Кількість хромосомних елементів в ядрі дорівнює диплоїдному числу хромосом даного об’єкту

Ж. Кількість хроматид політенних хромосом може досягати декількох тисяч
З. Рутинні барвники при дії на політенні хромосоми призводять до цитологічної картини однорідного і інтенсивного забарвлення хромосом

Виберіть вірні твердження щодо опису морфології хромосом при прихованій політенії:
А. Це активні інтерфазні хромосоми
Б. Кон'югація хроматид є неповною
В. Хроматиди об'єднуються в пучки по декілька штук і розташовуються повністю незалежно одна від одної
Г. Ці хромосоми мають характерний поперечно-смугастий малюнок
Д. Кон'югація хроматид є повною
Е. Кількість хроматид політенних хромосом може досягати декількох тисяч
Ж. Такі хромосоми важко розрізнити під мікроскопом

Виберіть вірні твердження про хромоцентр:
А. Це активні ділянки політенних хромосом
Б. Структура, що об'єднує прицентромерні райони усіх хромосом
В. Структура, що об'єднує теломерні райони усіх хромосом
Г. Структура, що об'єднує прицентромерні і теломерні райони всіх хромосом
Д. Хромоцентр не властивий політенним хромосомам *Drosophila melanogaster*

Виберіть усі фази клітинного циклу, які мають місце при формуванні клітин з політенними хромосомами:
А. М-фаза
Б. S-період інтерфази
В. G_1-період інтерфази
Г. G_2-період інтерфази

Після кожного періоду реплікації ДНК при формуванні політенних хромосом класичного типу дочірні хромосоми…

А. Сегрегують

Б. Не сегрегують

В. Виключаються з процесу транскрипції

Г. На дочірніх хроматидах припиняється синтез РНК

Виберіть ген, який є необхідним для підтримання циклу диплоїдних клітин:

А. *escargot*

Б. *sxl*

В. *msl*

Г. *vg*

Виберіть невірне твердження стосовно стану клітин з політенними хромосомами:

А. Сформовані політенні хромосоми не можуть вступати в мітотичний поділ

Б. Ядерна оболонка може бути лізована протягом процесу політенізації

В. Процес політенізації хромосом не впливає на стан та функціонування ядерця

Г. Хромосоми в ядрі слинних залоз плодової мушки проходять від восьми до десяти циклів реплікації

Після кожного періоду реплікації ДНК при формуванні політенних хромосом класичного типу дочірні хромосоми…

А. Сегрегують

Б. Не сегрегують

В. Виключаються з процесу транскрипції

Г. На дочірніх хроматидах припиняється синтез РНК

Специфічний клітинний цикл, який включає політенізацію хромосомного матеріалу клітини, має назву:

А. Ендоцикл
Б. Екзоцикл
В. Тип розвитку клітин слинних залоз
Г. Апоптоз

Які фази клітинного циклу мають місце за проходження процесу політенізації клітин слинної залози дрозофіли?
А. Інтерфаза, що складається з періодів G і S, які багаторазово повторюються
Б. Інтерфаза, що складається з періодів G_1, S, G_2, які багаторазово повторюються
В. Інтерфаза, що складається з періодів G_1 і S, які багаторазово повторюються, потім відбувається перехід до мітотичного поділу
Г. Інтерфаза, яка зупинилася на етапі G_0

Виберіть риси, властиві для ендоциклічної клітини слинних залоз дрозофіли:
А. Клітина проходить усі періоди інтерфази і вступає в мітоз
Б. Наприкінці ендоциклу ядерна оболонка потерпає лізис
В. Ядерце і ядерна оболонка залишаються інтактними
Г. Сформовані політенні хромосоми не можуть вступати в мітотичний поділ
Д. Високий рівень соматичного синапсису хроматид

Назвіть активатор/активатори, який потрібен для переключення клітинного циклу від періоду G_0 до G_1 або G:
А. Циклін А
Б. Циклін В
В. Циклін Е
Г. Циклін D

Назвіть активатор/активатори, який потрібен для переключення клітинного циклу від періоду G_1 або G до S-періоду:
А. Циклін А

Б. Циклін B
В. Циклін E
Г. Циклін D

Назвіть активатор/активатори, який потрібен для переключення клітинного циклу від інтерфази до мітозу:
А. Циклін A
Б. Циклін B
В. Циклін E
Г. Циклін D

Назвіть ферменти, які відіграють ключову роль при проходженні клітинних циклів:
А. Циклін-залежні протеїнкінази
Б. ДНК-залежні ДНК полімерази
В. РНК-залежні ДНК полімерази
Г. АТФ-синтази

Назвіть гормон дрозофіли, який стимулює ендореплікацію хромосом:
А. Ювенільний гормон
Б. Екдистерон
В. Активаційний гормон
Г. Антиювенільний гормон

Виберіть вірні твердження стосовно впливу статі личинок на морфологію політенних хромосом дрозофіли:
А. X-хромосоми самиць вдвічі товщі, ніж X-хромосома самця
Б. X-хромосома самця значно більш розпушена, ніж хромосоми самки
В. Y-хромосома входить до складу хромоцентру
Г. Y-хромосома деконденсована і виглядає розпушеною

Специфічна смугастість політенних хромосом класичного типу створюється за рахунок:

А. Чередування хромомерів (конденсованого) і міжхромомерів (менш конденсованого дезоксирибонуклеопротеїна)

Б. Неоднакової інтенсивності забарвлення різних пар нуклеотидів

В. Зміни паттерну конденсації ДНК

Г. Це артефакт виготовлення препаратів

Виберіть невірне твердження стосовно морфології політенних хромосом *Drosophila melanogaster*

А. Масштабні зміни патерну поперечної смугастості можуть бути викликані зовнішнім впливом

Б. Патерн поперечної смугастості є індивідуальним для кожної хромосоми

В. Поява пуфів – специфічного здуття хромосом – може бути викликана зовнішніми факторами

Г. Завдяки унікальності і сталості патерну поперечної смугастості вдалося побудувати карти політенних хромосом дрозофіли

Назвіть автора детальних карт політенних хромосом *Drosophila melanogaster:*

А. К. Бріджес

Б. Т. Морган

В. Е. Бальбіані

Г. А. Стертевант

На яку кількість сегментів було розбито хромосоми *Drosophila melanogaster* для побудови карт?

А. 102

Б. 20

В. 200

Г. 84

Яка середня кількість генів приходиться на диск політенної хромосоми *Drosophila melanogaster*?

А. 3-5

Б. 20

В. 1

Г. 50

Дайте визначення поняттю «диск» політенної хромосоми:

А. Ділянка зконденсованого ДНП, що виглядає як темна смуга на препараті політенної хромосоми і може містити значущі послідовності

Б. Ділянка деконденсованого ДНП, що виглядає як світла смуга на препараті політенної хромосоми і може містити значущі послідовності

В. Муфтоподібне здуття на політенній хромосомі світлого кольору або прозоре, яке розглядають як візуалізацію активності гену/ів

Г. Муфтоподібне здуття на політенній хромосомі темного кольору, яке з'явилося внаслідок ампліфікації хромосомного матеріалу

Дайте визначення поняттю «міждиск» політенної хромосоми:

А. Ділянка сконденсованого ДНП, що виглядає як темна смуга на препараті політенної хромосоми і може містити значущі послідовності

Б. Ділянка десконденсованого ДНП, що виглядає як світла смуга на препараті політенної хромосоми і може містити значущі послідовності

В. Муфтоподібне здуття на політенній хромосомі світлого кольору або прозоре, яке розглядають як візуалізацію активності гену/ів

Г. Муфтоподібне здуття на політенній хромосомі темного кольору, яке з'явилося внаслідок ампліфікації хромосомного матеріалу

Дайте визначення поняттю «РНК-пуф» політенної хромосоми

А. Ділянка сконденсованого ДНП, що виглядає як темна смуга на препараті політенної хромосоми і може містити значущі послідовності

Б. Ділянка десконденсованого ДНП, що виглядає як світла смуга на препараті політенної хромосоми і може містити значущі послідовності

В. Муфтоподібне здуття на політенній хромосомі світлого кольору або прозоре, яке розглядають як візуалізацію активності гену/ів

Г. Муфтоподібне здуття на політенній хромосомі темного кольору, яке з'явилося внаслідок ампліфікації хромосомного матеріалу

Дайте визначення поняттю «ДНК-пуф» політенної хромосоми:

А. Ділянка сконденсованого ДНП, що виглядає як темна смуга на препараті політенної хромосоми і може містити значущі послідовності

Б. Ділянка десконденсованого ДНП, що виглядає як світла смуга на препараті політенної хромосоми і може містити значущі послідовності

В. Муфтоподібне здуття на політенній хромосомі світлого кольору або прозоре, яке розглядають як візуалізацію активності гену/ів

Г. Муфтоподібне здуття на політенній хромосомі темного кольору, яке з'явилося внаслідок ампліфікації хромосомного матеріалу

Дайте визначення поняттю «ядерце»:

А. Вискоспеціалізований пуф, який виникає виключно на ділянці хромосоми, яка містить повтори 18S й 28S рРНК

Б. Послідовності сателітних ДНК, які сконденсовані в щільні гранули

В. Послідовності різних мобільних елементів, які сконденсовані в пухке сітчасте утворення

Г. Ділянки хромосом, які можуть бути «гарячими точками» утворення хромосомних перебудов і в яких знаходиться ДНК, що реплікується в пізній стадії S-періоду

Дайте визначення поняттю «α-гетерохроматин»:

А. Вискоспеціалізований пуф, який виникає виключно на ділянці хромосоми, яка містить повтори 18S й 28S рРНК

Б. Послідовності сателітних ДНК, які сконденсовані в щільні гранули

В. Послідовності різних мобільних елементів, які сконденсовані в пухке сітчасте утворення

Г. Ділянки хромосом, в яких знаходиться ДНК, яка реплікується в пізній стадії S-періоду, і які можуть бути «гарячими точками» утворення хромосомних перебудов

Дайте визначення поняттю «β-гетерохроматин»:

А. Вискоспеціалізований пуф, який виникає виключно на ділянці хромосоми, яка містить повтори 18S й 28S рРНК

Б. Послідовності сателітних ДНК, які сконденсовані в щільні гранули

В. Послідовності різних мобільних елементів, які сконденсовані в пухке сітчасте утворення

Г. Ділянки хромосом, в яких знаходиться ДНК, яка реплікується в пізній стадії S-періоду, і які можуть бути «гарячими точками» утворення хромосомних перебудов

Дайте визначення поняттю «інтеркалярний гетерохроматин»:

А. Високоспеціалізований пуф, який виникає виключно на ділянці хромосоми, яка містить повтори 18S й 28S рРНК

Б. Послідовності сателітних ДНК, які сконденсовані в щільні гранули

В. Послідовності різних мобільних елементів, які сконденсовані в пухке сітчасте утворення

Г. Ділянки хромосом, в яких знаходиться ДНК, яка реплікується в пізній стадії S-періоду, і які можуть бути «гарячими точками» утворення хромосомних перебудов

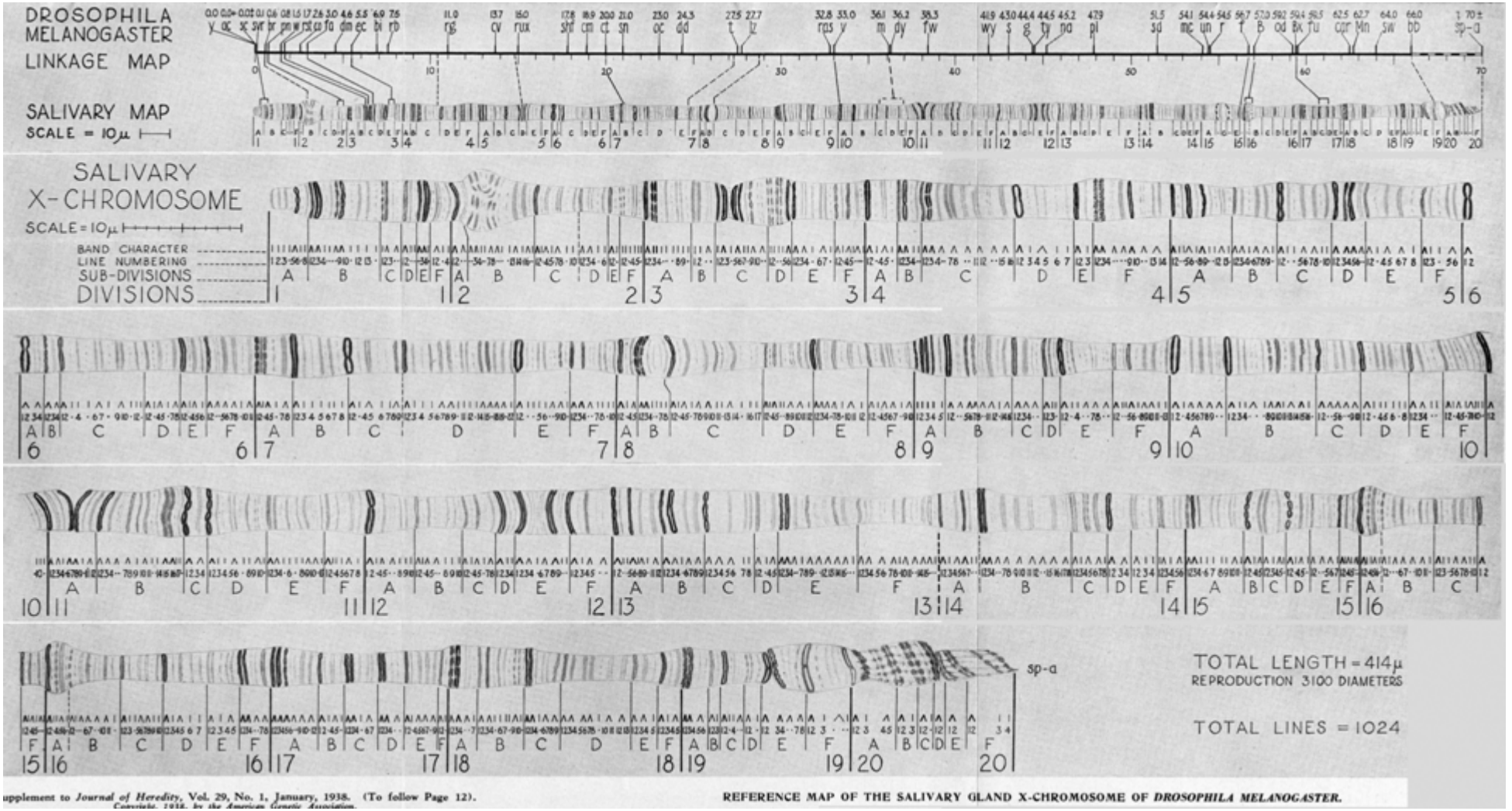


Рис. 2.1. Уточнена карта Х-хромосоми *Drosophila melanogaster*, наведена за роботою: Bridges C.B. (1938). Revision of the salivary map of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **23**: 142-143. Доступ до карти за посиланням: ftp://ftp.flybase.org/flybase/associated_files/Maps/Dmel_Bridges/Dmel_X_Bridges.png

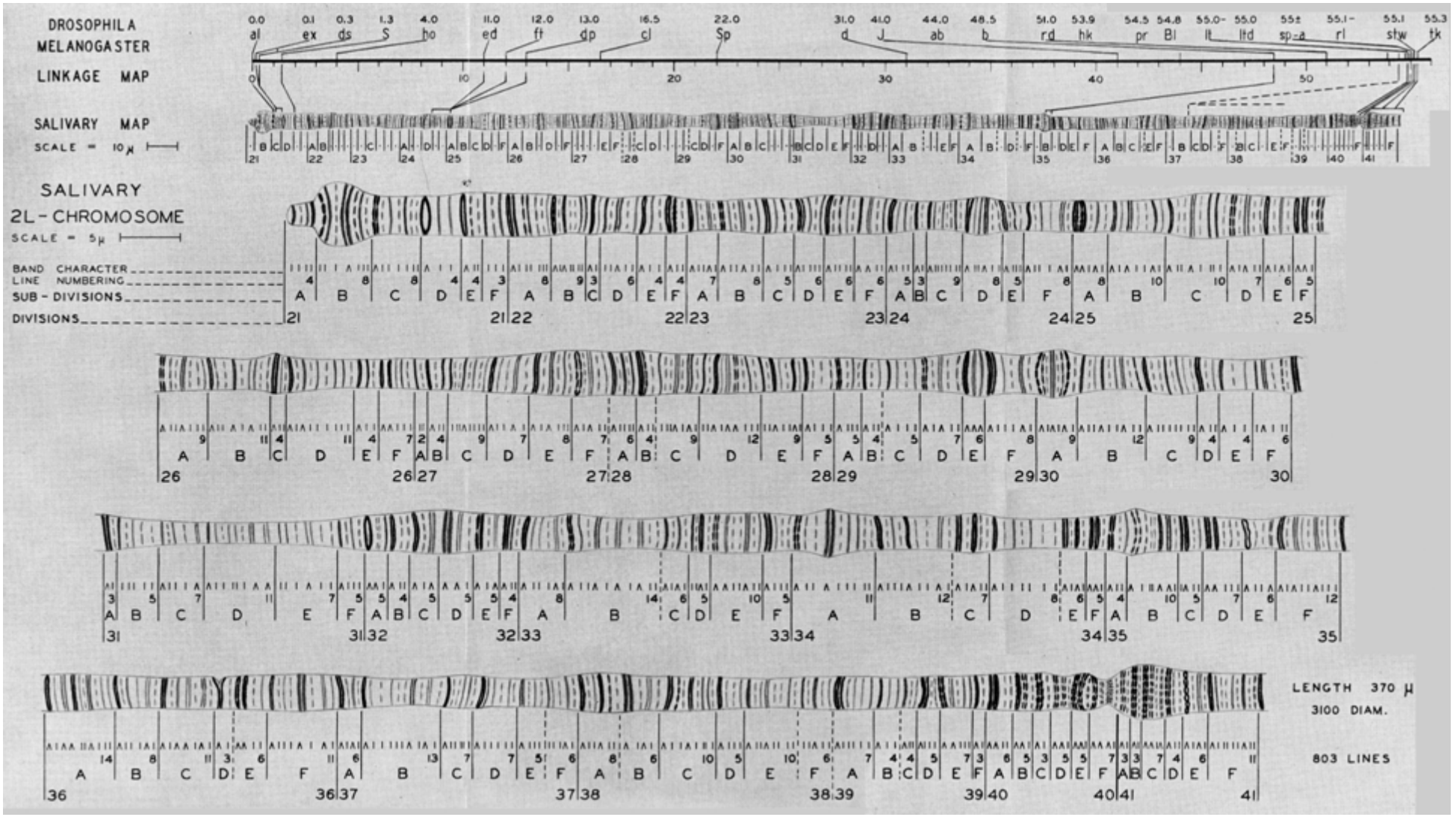


Рис. 2.2. Уточнена карта 2L плеча II хромосоми *Drosophila melanogaster*, наведена за роботою Bridges P.N. (1942). A new map of the salivary gland 2L-chromosome of *Drosophila melanogaster*. *J. Hered.* **33**: 403-408. Доступ до карти за посиланням: ftp://ftp.flybase.org/flybase/associated_files/Maps/Dmel_Bridges/Dmel_2L_Bridges.png

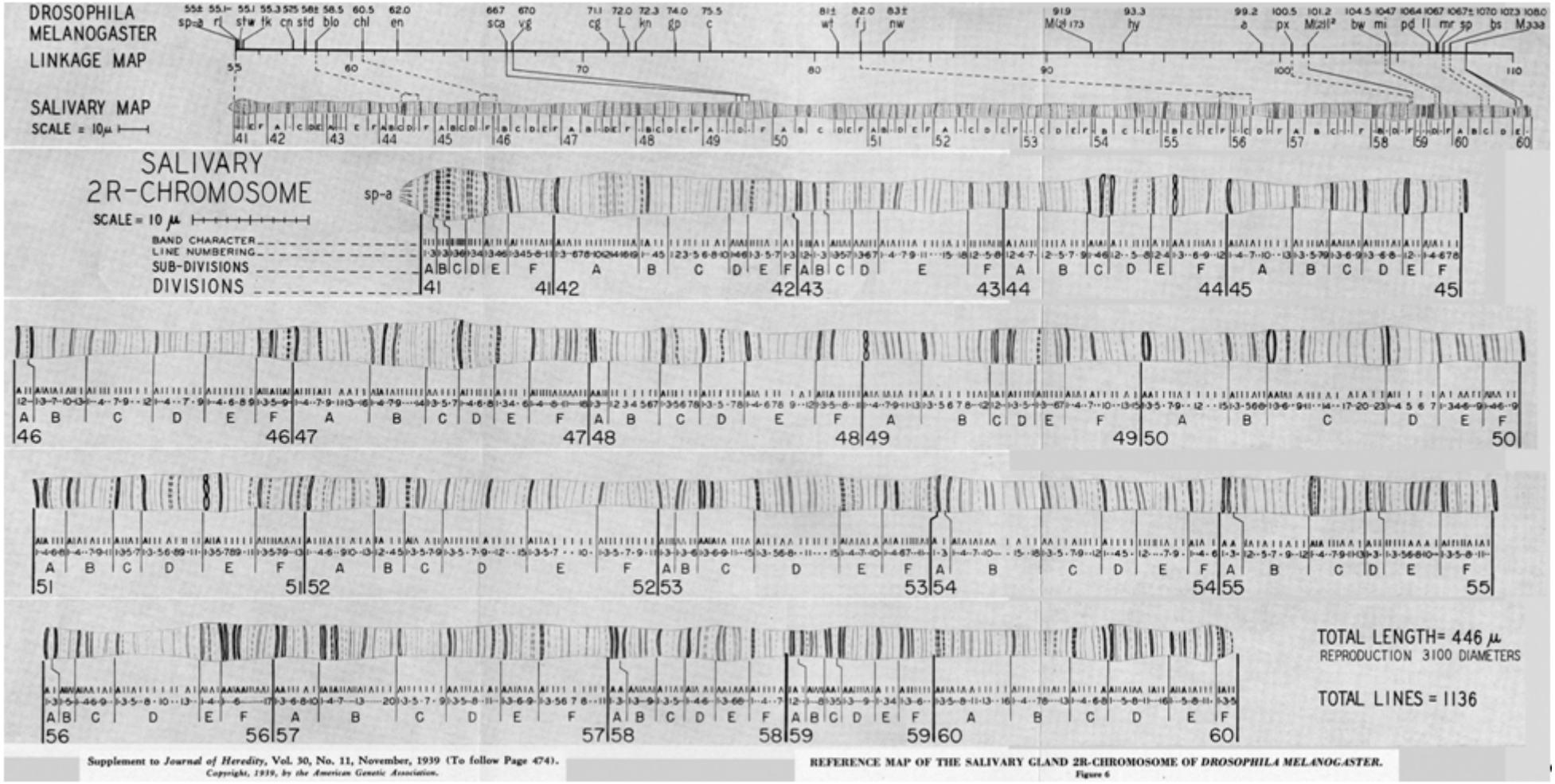


Рис. 2.3. Уточнена карта 2R плеча II хромосоми *Drosophila melanogaster*, наведена за роботою: Bridges, C.B., Bridges, P.N. (1939). Reference map of the salivary gland 2R-chromosome of *Drosophila melanogaster*. *J. Hered.* **30(11)**: 475-476. Доступ до карти за посиланням:
ftp://ftp.flybase.org/flybase/associated_files/Maps/Dmel_Bridges/Dmel_2R_Bridges.png

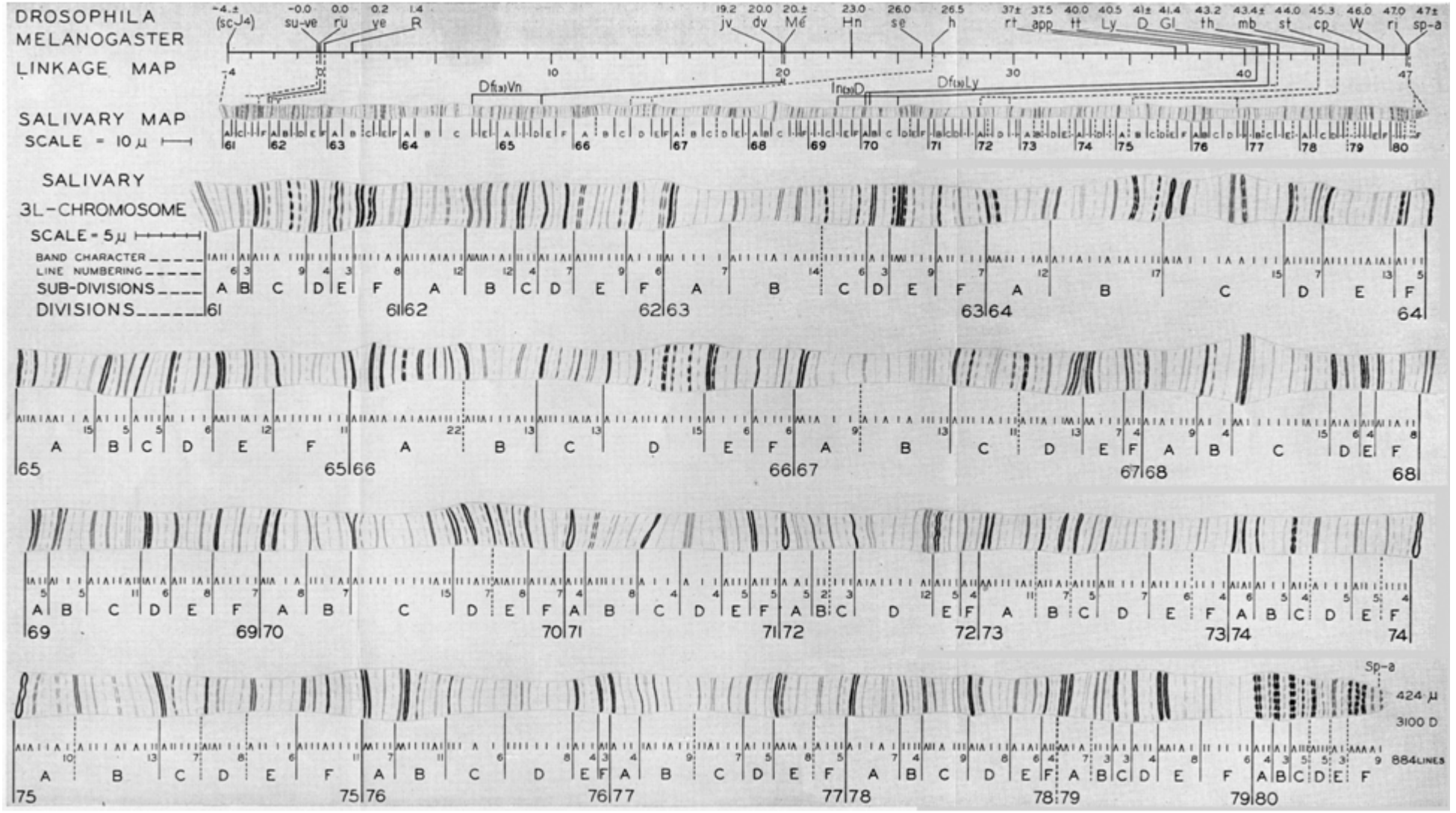


Рис. 2.4. Уточнена карта 3L плеча III хромосоми *Drosophila melanogaster*. Наведена за роботою: Bridges, P.N. (1941). A revised map of the left limb of the third chromosome of *Drosophila melanogaster*. *J. Hered.* **32(2)**: 64-65 Доступ до карт за посиланням: ftp://ftp.flybase.org/flybase/associated_files/Maps/Dmel_Bridges/Dmel_3L_Bridges.png

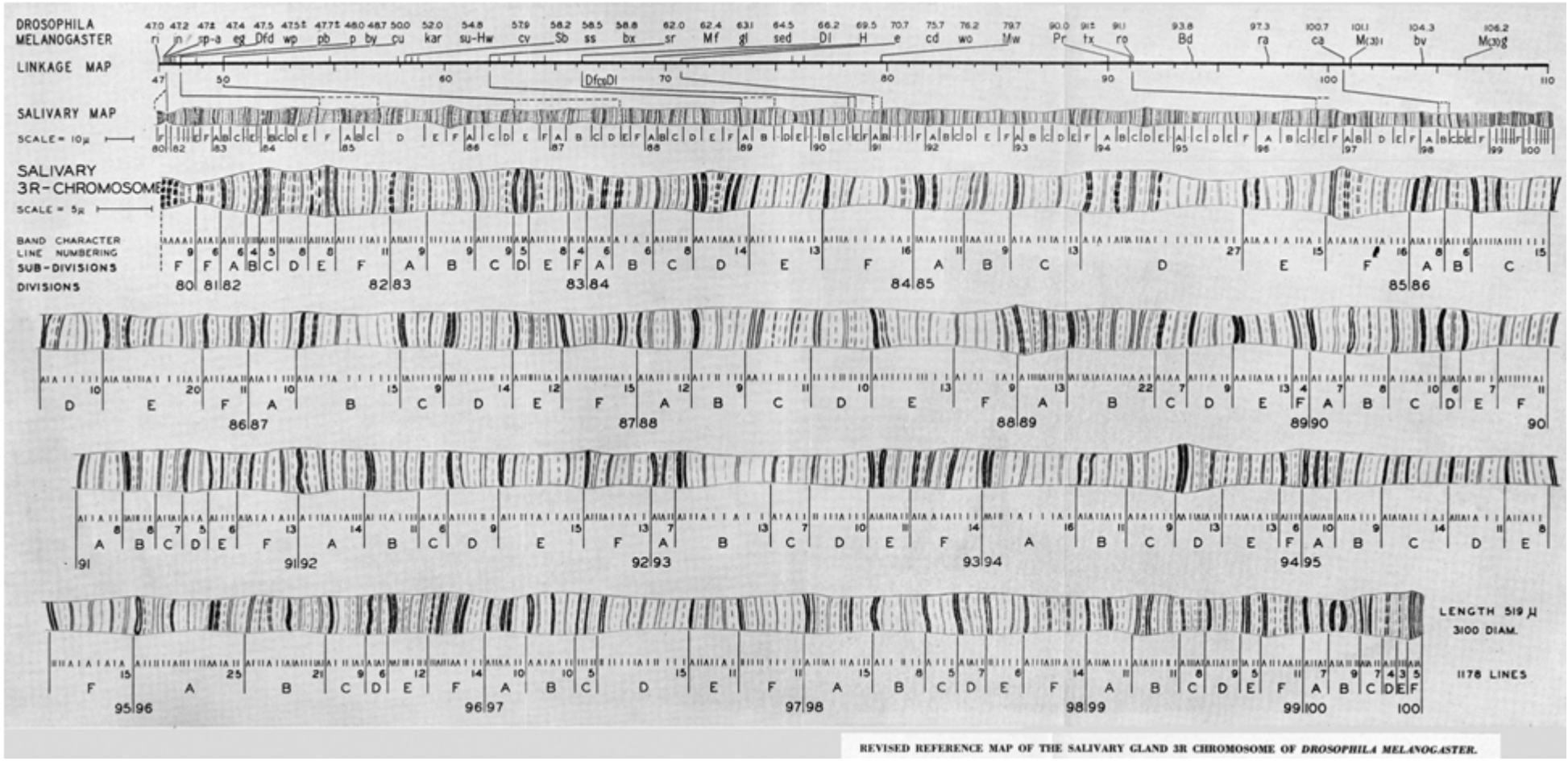
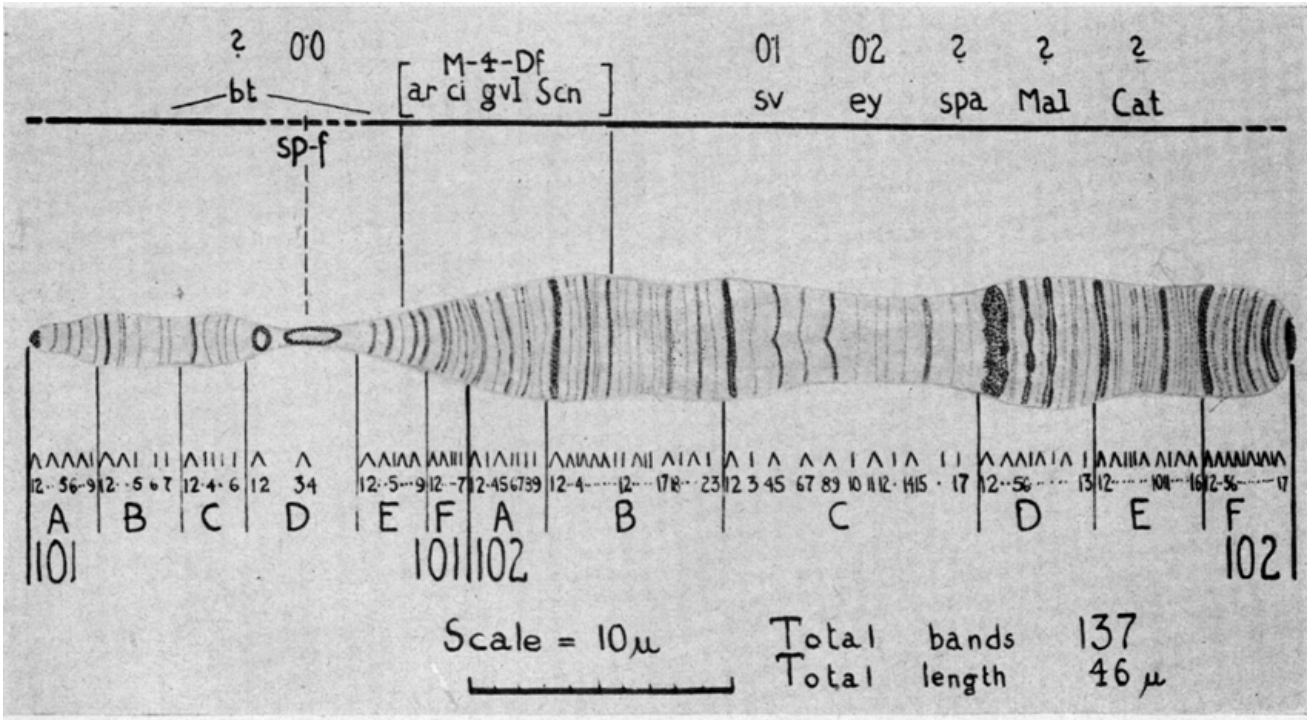


Рис. 2.5. Цитогенетична карта 3R плеча III хромосоми *Drosophila melanogaster*, наведена за роботою: Bridges, P.N. (1941). A revision of the salivary gland 3R-chromosome map of *Drosophila melanogaster*. *J. Hered.* **32**: 299-300. Доступ до карти за посиланням: ftp://ftp.flybase.org/flybase/associated_files/Maps/Dmel_Bridges/Dmel_3R_Bridges.png



MAP OF CHROMOSOME 4

Figure 1

This map is a composite drawing based on eight preparations. The dimensions here shown represent averages derived from the individual drawings and the individual bands have been fitted in by reference to all of them.

Рис. 2.6. Уточнена карта IV хромосоми *Drosophila melanogaster*.
Цитована за роботою: Slizynski, B.M. (1944). A revised map of salivary gland chromosome 4 of *Drosophila melanogaster*. *J. Hered.* **35**: 322—324. Доступ до карт за посиланням:
ftp://ftp.flybase.org/flybase/associated_files/Maps/Dmel_Bridges/Dmel_4_Slizynski.png

ДОДАТОК 3

Приготування розчину ацетоорсеїну

40 мл льодяної оцтової кислоти та 60 мл дистильованої води доводять до кипіння і поступово додають туди 2 г сухого орсеїну. Реакція розчинення орсеїну дуже бурхлива. Отриманий розчин кип'ятять 5 хвилин, потім фільтрують. Зберігають у посуді з темного скла.

Приготування розчину молочної кислоти

Використовується або 40% молочна кислота, або розведена вдвічі 80% молочна кислота промислового виробництва.

Приготування розчину оцтової кислоти

Для приготування 100 мл 45% оцтової кислоти змішують 45 мл льодяної оцтової кислоти та 65 мл дистильованої води.

Приготування фізіологічного розчину

До 25 мл готового аптечного препарату – 0,9% фізіологічного розчину додають 25 мл дистильованої води.