

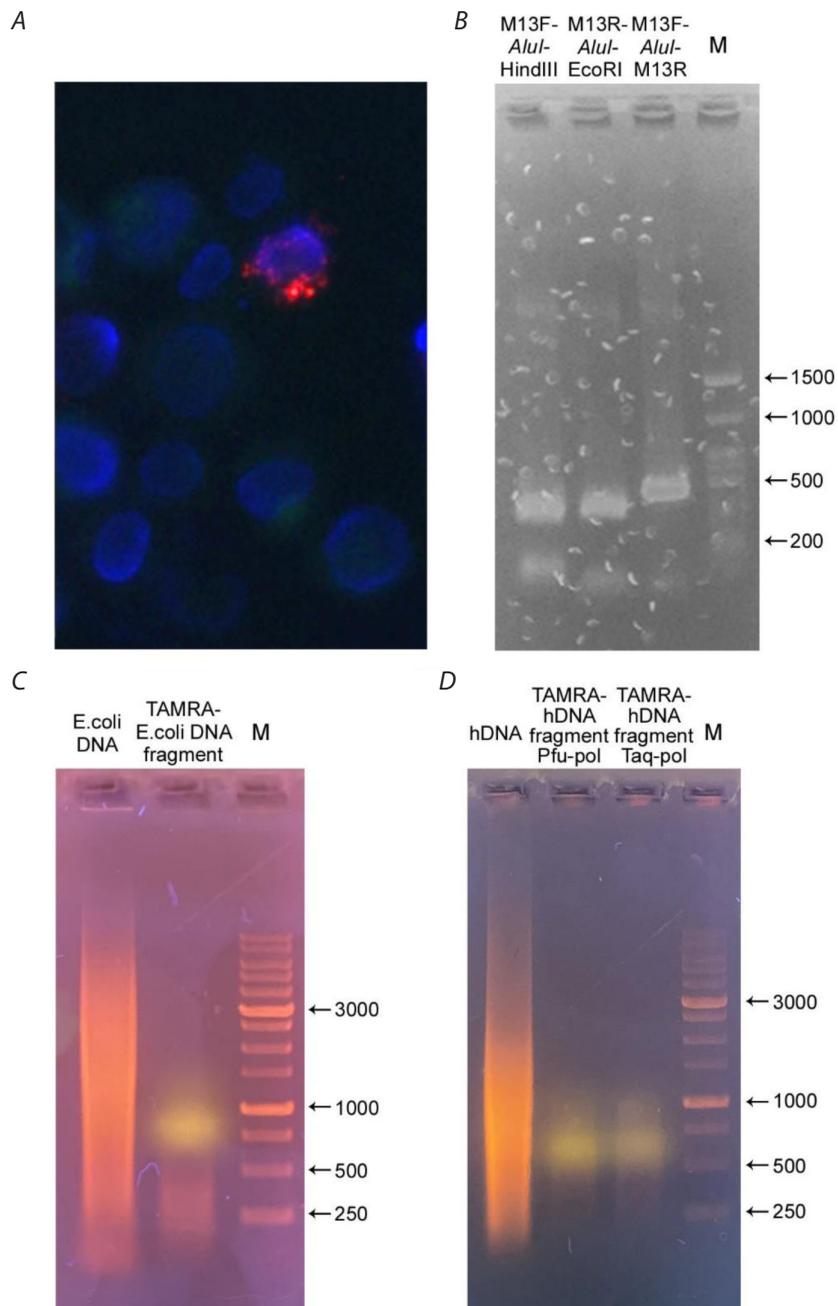
ПРИЛОЖЕНИЯ

к статье «Концепция природной реконструкции генома.

Часть 4. Интеграция фрагментов экстраклеточной двуцепочечной ДНК в геном гемопоэтических стволовых клеток и формирование экстрахромосомальных интермедиатов»

С.Г. Ошихмина, В.С. Рузанова, Г.С. Риттер, Е.В. Долгова, С.С. Кирикович, Е.В. Левитес, Я.Р. Ефремов, Т.В. Карамышева, А.С. Молодцева, Я.В. Райцина, О.С. Таранов, С.В. Сидоров, С.Д. Никонов, О.Ю. Леплина, А.А. Останин, Е.Р. Черных, Н.А. Колчанов, А.С. Проскурина, С.С. Богачев

Приложение 1. Конструирование специфических зондов и методика FISH



Молекулярная характеристика зондов, созданных для проверки гипотезы интеграции экстраклеточного материала в геном гемопоэтических стволовых клеток.

A – интернализация в клетки карциномы Эрлиха TAMRA-меченого pBSM13 ПЦР фрагмента; B – субстрат, состоящий из части полилинкера pBS и прилегающего к нему *AluI* повтора; C – электрофорез ДНК *E. coli* и ПЦР продукт, меченный TAMRA, с вырожденным праймером и матрицей ДНК *E. coli*, амплифицированный с помощью Pfu-полимеразы; D – электрофорез hDNA^{gr} и ПЦР продукты, меченные TAMRA, с вырожденным праймером и матрицей hDNA^{gr}, амплифицированные с помощью Taq- и Pfu-полимераз. M – маркер 1 т.п. н.

Получение суспензий фиксированных клеток из первичной культуры клеток костного мозга мышей или сепарата костного мозга человека

Суспензию фиксированных клеток, обогащенных метафазными пластинками, получали из следующих вариантов обработок: Control (в качестве контрольных образцов использовали метафазные пластинки, полученные из необработанных препаратов клеток костного мозга) – 1.15 млн клеток; специфический зонд (описан в разделе «Материалы и методы», Конструирование зонда для обработки клеток костного мозга) – 0.85 млн клеток. После культивирования с колхицином (0.5 мкг/мл) 1 мл суспензионной культуры переносили в 1.5 мл центрифужные пробирки (Eppendorf), центрифугировали 10 мин при 400g. Осторожно сливали надосадочную жидкость и к осажденным клеткам добавляли 0.5 мл гипотонического раствора, клетки аккуратно перемешивали с помощью пипетки и гипотонировали в течение 7 мин при 3 °С. В качестве гипотонического раствора использовали стандартный 0.075 М раствор KCl (Sigma-Aldrich, США). По истечении времени гипотонии проводили предфиксацию: в суспензию добавляли несколько капель фиксатора Карнуа (метанол–ледяная уксусная кислота 3:1), фиксатор добавляли к осажденным клеткам очень аккуратно по стеночке пробирки, суспендирование не проводили. Пробирки выдерживали на льду 10–15 мин. Аккуратно перемешивали и центрифугировали, сливали жидкость, осадок клеток заливали небольшим количеством (1 мл) свежеприготовленного охлажденного до –20 °С метанол-уксусного фиксатора и центрифугировали. Снова осадок тщательно суспендировали в 1 мл свежеприготовленного охлажденного до –20 °С метанол-уксусного фиксатора, оставляли в холодильнике при –20 °С на 30 мин. Центрифугировали, меняли фиксатор. Смену фиксатора проводили трижды. На всех этапах фиксации центрифугирование проводили при 400g в течение 10 мин.

Приготовление цитологических препаратов метафазных хромосом для FISH

Перед приготовлением препаратов хромосом фиксатор, в котором хранились клетки, меняли на холодный свежеприготовленный фиксатор Карнуа. Для приготовления препаратов использовали обезжиренные чистые предметные (76×26×1 мм) стекла фирмы SuperFrost®, Menzel Gläser (Thermo Scientific, США). Перед приготовлением препаратов стекла выдерживали в спирте не менее часа, затем высушивали и помещали в стакан с дистиллированной водой и охлаждали на льду. 25 мкл суспензии фиксированных клеток раскапывали из автоматического дозатора 100 мкл (Gilson Inc, США) с высоты 40 см на поверхность чистых холодных и влажных предметных стекол и высушивали на воздухе. Для лучшего распластывания хромосом и их освобождения от цитоплазмы на препараты капали 15 мкл фиксатора, стекло выдерживали на термостойке (Prazitherm, Harry Gestigkeit GmbH, Германия) при 56 °С до полного высыхания фиксатора. Качество готовых препаратов контролировали под фазово-контрастным микроскопом Axio Imager M1 (Zeiss), объектив Plan NEOFLUAR 20x/0.5 Ph 2. Для последующей работы отбирали стекла с достаточным количеством качественных метафаз (оптимальной плотностью клеток и полными метафазами, с хорошим качеством распластывания хромосом). Гибридизацию *in situ* ставили на следующий день, поэтому для того, чтобы «состарить» препараты, их прогревали в термостате при 60 °С не менее часа (термостат суховоздушный TC-1/20 СПУ, Россия) (Lichter et al., 1988; Pinkel et al., 1988; Henegariu et al., 2001).

TAMRA-меченый зонд

Зонд pBSM13-TAMRA+ представлял собой амплифицированный полилинкер плазмиды pBlueScript+, меченый TAMRA флуорохромом в ПЦР. Для амплификации использовали праймеры M13 (M13 for: 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3', M13 rev: 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3').

Флуоресцентная гибридизация *in situ* с TAMRA-меченым зондом

Флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) проводили по стандартному протоколу, описанному в работе (Arnoult et al., 2008), с небольшими модификациями. Цитологические препараты метафазных хромосом обрабатывали РНКазой А (100 мкг/мл, (Sigma, США) в 2×SSC в течение часа при 37 °С в термостате (Incucell 55, ВМТ, Чехия). Затем препараты проводили по серии спиртов возрастающей концентрации (70, 80, 96 %) и высушивали при комнатной температуре. Для удаления остатков цитоплазмы препараты обрабатывали раствором 0.02 % пепсина (Cole-Parmer, США) в 10 мМ HCl в течение 20 мин при 37 °С. Далее препараты отмывали 5 мин в фосфатном буфере (0.13 М NaCl, 0.27 мМ KCl, 7 мМ Na₂HPO₄, 3 мМ NaH₂PO₄, pH 7.4, PanReac AppliChem, Германия). Фиксацию цитологического материала проводили в фосфатном буфере и 1 % формаль-

дегиде (Sigma, США) в течение 10 мин при комнатной температуре. После фиксации препараты отмывали в фосфатном буфере и обезживали стандартным способом в серии спиртов возрастающей концентрации. Денатурацию зонда и метафазных хромосом проводили одновременно. Для этого на цитологический препарат с метафазными хромосомами, предварительно обработанный для FISH, под покровное стекло (24 мм×50 мм) наносили 12 мкл рBSM13-TAMRA+ ДНК-зонда (200 нг/мкл), растворенного в гибридизационном буфере, и заклеивали резиновым клеем. Денатурацию препарата проводили на нагревательном столике (Thermomixer comfort, Eppendorf, Германия) при 75 °С в течение 5 мин. После денатурации препараты быстро переносили во влажную камеру и оставляли на ночь в суховоздушном термостате (Incucell 55, ВМТ, Чехия) при 42 °С. Количество TAMRA-меченого зонда, наносимое на препарат, было одинаковым во всех трех вариантах.

Детекция на цитологических препаратах TAMRA-меченого зонда

По окончании гибридизации покровные стекла аккуратно смывали в 2×SSC, а препараты последовательно отмывали в свежеприготовленном растворе 1×SSC при 60 °С в течение 5 мин. Затем препараты переносили в 4×SSC/0.1 % NP-40 и инкубировали при 42 °С в течение 10 мин при покачивании. После этого препараты инкубировали 5 мин при комнатной температуре в фосфатном буфере (PBS). По окончании инкубации в PBS препараты переносили в стакан с дистиллированной водой, быстро окунали и переносили в стакан с 70 % этанолом. Дегидратацию препаратов проводили в серии спиртов возрастающей концентрации (70, 80, 96 %) по 3 мин при комнатной температуре. Высушивали и проводили общее окрашивание метафазных хромосом DAPI (4,6-diamidino-2-phenyl-indole). Для этого под покровное стекло наносили 10 мкл раствора антифэйда с DAPI (Prolong Gold antifade reagent with DAPI, Molecular Probes).

Список литературы

- Arnoult N., Shin-Ya K., Londoño-Vallejo J.A. Studying telomere replication by Q-CO-FISH: the effect of telomestatin, a potent G-quadruplex ligand. *Cytogenet Genome Res.* 2008;122(3-4):229-236. doi 10.1159/000167808
- Henegariu O., Heerema N.A., Lowe Wright L., Bray-Ward P., Ward D.C., Vance G.H. Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. *Comp Study.* 2001;43:101-109. doi 10.1002/1097-0320(20010201)43:2<101::AID-CYTO1024>3.0.CO;2-8
- Lichter P., Cremer T., Borden J., Manuelidis L., Ward D.C. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet.* 1988;80(3):224-234. doi 10.1007/BF01790090
- Pinkel D., Landegent J., Collins C., Fuscoe J., Segraves R., Lucas J., Gray J. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(23):9138-9142. doi 10.1073/pnas.85.23.9138

Приложение 2. Последовательности исходного фрагмента и фрагментов, полученных при секвенировании

В последовательностях приняты следующие обозначения:

N – праймер M13 for

N – праймер M13 rev

N – сайт рестрикции EcoRI

N – сайт рестрикции HindIII

N – сайт рестрикции EcoRV, по нему проклонирован *AluI*

N – последовательность палиндромного повтора

Исходный фрагмент

Последовательность *AluI* в pBS:

GTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGGCGAATTGGGT
ACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATGCGCGCGCCACCAC
GCCCGGCTAATTTTTGTATTTTAGTGGAGACAGGGTTTCACTGTGTTAGCCAGGAT
GGTTTCGATCTCCTGACATCGTGATCCGCCACCTCAGCCGCCAAAGTGGTGGGAT
TACAGACGTGAGCCACCAGCTTTTTTTTTTTAGACAGAGTCTCACTCTGTCACCCAG
GCTGGAGTGCAGTGGTGCAATCTTGGCTGACTGCAACCTCCGCCTCCTTCAATCTGG
GTTGAACCTCCTGGGCTCAAGTGATCCTCCCGCCTCG**ATCGAATTC**CCTGCAGCCCGGG
GGATCCATAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTT
TAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATG**GTCATAGCTGTTTCCTG**

Типы последовательностей

Тип № 1:

ATAAGCTTGAT**CCGACTCGAG**GTACACATGTGGGATCATCCTCTGGATTACCTGTGT
ACCAATAATATATCCACCACATGGGCCT**CTCGAGTCGG**ATCGAATTCCTGCAGCCCG
GGGGATC

Вместо *AluI* после сайта EcoRV содержит последовательность с инвертированными повторами.

Тип № 2:

ATAAGCTTGAT**CCGACTCGAG**CCCCGATGTGGTATAGACAGCCTCTATTACCGGCTT
GGAGAACTGTGCTGCGCCTACCTGCTCTCCCTTGCGTACAAGCATTACTATGTGCGT
ACGCTT

Содержит после сайта EcoRV последовательность повтора как в № 1.

Тип № 3:

CATGGCTCTCGTTGCTCACCTGCTCAGCGGTATCGAGGATAGAAGGCTTAGTATCTT
CGCCATCTTTGCCAATGGTAGCCACATAGTCT**CTCGAGTCGG**ATCGAATTC

Содержит после сайта EcoRV последовательность повтора как в № 1.

Тип № 4:

TCATGGTCATAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATG**GTCATAGCTGTTTCCTG**
AGCT**GTAAAACGACGGCCAGTG**AATCCGTAATCATG**GTCATAGCTGTTTCCT**AAGCT
GTAAAACGACGGCCAGTGAATCCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCT

Содержит участки полилинкера pBS и M13 праймеры.

Тип № 5:

TTACATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGC
GGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGCGTAAT
CACG **GTCATAGCTGTTTCCTG**

После EcoRV сайта идет M13 for праймер.

Тип № 6:

AGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGT
GAGTCGTATTACGCGCGCT **CACTGGCCGTCGTTTTAC**AGATCGGAAGAGCACACGTT
CTGAACTCCAGTCACCGCTCATATCTCGTATGCCGT

или

AGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGT
GAGTCGTATTACGCGCGCT **CACTGGCCGTCGTTTTAC**AGATCGGAAGAGCACACGTC
TGAACCAGTCACCGCTCATATCTCGTATGCCGTCTT

Содержит за M13 for праймером последовательность, которая частично выравнивается на человеческий геном и не является частью плазмиды или исходного субстрата.