

Шадрина Мария Михайловна,
Томский государственный университет, г. Томск
Shadrina Maria Michailovna, Tomsk State University, Tomsk

Немирович-Данченко Николай Михайлович, младший научный
сотрудник, Томский государственный университет, г. Томск
Nemirovich-Danchenko Nikolai Michailovich, Tomsk State University, Tomsk

Ходанович Марина Юрьевна, д.б.н., заведующий лабораторией,
Томский государственный университет, г. Томск
Khodanovich Marina Yurievna, Tomsk State University, Tomsk

**МЕТОДИКА ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО
И ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО *IN SITU* ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА
METHOD OF IMMUNOHISTOCHEMICAL AND FLUORESCENT
IN SITU HYBRIDIZATION ANALYSIS**

Аннотация: нами разработан протокол совмещения иммуногистохимического окрашивания маркера молодых нейронов даблкортина и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) теломерной ДНК на криосрезах мозга толщиной 10 нм. Показано успешное применение, приводится подробный протокол окрашивания.

Abstract: we have developed a technique for joint staining of brain 10 nm criosections for doublecortin immunohistochemistry and telomere DNA fluorescent *in situ* hybridization. The successful application of the technique is shown, a timetable procedure is developed and all the reagents necessary for its implementation are written out, as well as the necessary temperature conditions are indicated.

Ключевые слова: иммуногистохимия, флуорисцентная *in situ* гибридизация, методология FISH.

Keywords: immunohistochemistry, fluorescent *in situ* hybridization, methodology.

Окрашивание теломер методом FISH [1,2,3,4] является одним из стандартных методов определения длины теломер. Кроме того, есть удачные примеры совмещения FISH с иммуногистохимическими окрашиваниями [5,6,7]. Совмещение иммуногистохимии с FISH-мечением теломерной ДНК может позволять оценивать длину теломер в конкретных типах клеток. Мы разработали протокол совмещения окрашивания Теломер методом FISH с иммуногистохимическим мечением даблкортина, маркера молодых нейронов в мозге. Этот белок отличается относительно более низкой стойкостью, поэтому важно подобрать параметры протокола, сохраняющие его иммуногенность.

Животных перфузировали 4% параформальдегидом под эфирным наркозом. Мозг извлекали, фиксировали в течение ночи 4% раствором парафор-мальдегида, подвергали криопротекции в сахарозно-фосфатном буфере (24 часа в 10% и 24 часа в 20% растворах соответственно) при 4°C, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C для дальнейших иммуногистохимических исследований.

Коронарные срезы мозга толщиной 10 мкм готовили с использованием криостата HM525 (Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Германия). Уровень срезов для иммуногистохимического и флуоресцентного анализа гибридизации *in situ* определялось от -2,64 мм до -3,60 мм от брегма в соответствии с атласом мозга крысы [8].

Перед окрашиванием стекло с препаратом помещали в термостат на 50°C для лучшей адгезии образцов к стеклу. Далее стекла помещали в раствор PBS (1 таблетка PBS на 100 мл дистиллированной воды) 3 раза на 5 минут для смачивания образцов и наносили на стекла блок-буферный раствор (раствор PBS 10 мл, Triton X100 50мкл, азид натрия 2-3 мкг, donkey serum 15 мг, бычий сывороточный альбумин 50 мг) на час. На следующем этапе наносили РНКазу (100 мкг / мл) на срезы на 20 минут при 37 ° С, после чего его промывали в PBS 2 раза по 2 минуты.

Следующим шагом было помещение образцов в раствор пепсина (0,005% пепсина 10мМ HCl) на 5 минут при 37° С. Затем стекла промывали PBS 3 раза по 5 минут и наносили гибридизационный буфер (250мкл раствора: 20 Мм Трис, 60% формаид, 0,0007 г альбумина) на препараты на 1 час, после чего гибридизационный буфер с ДНК-зондом и стекла с образцами нагревали в течение 5 минут при 85°C, гибридизационный буфер с ДНК-зондом наносили на предметные стекла, накрывали покровными стёклами и помещали в ThermoBrite при температуре 85°C в течение 5 минут.

После этого препараты выдерживали 2 часа в тёмном месте при комнатной температуре, затем покровные стекла снимали, промывали в промывочном растворе (2X SSC, 0,1% Tween-20) 2 раза по 10 минут при 60°C. Затем препараты промывали в промывочном растворе при комнатной температуре 2 раза по 10 минут и промывали в PBS 3 раза по 5 минут. После этого на стекло наносили первичные антитела (Doublecortin (C-18): sc-8066, Santa Cruz) 1:100мкл блокирующего буфера. На следующий день отмывку проводили 3 раза в PBS по 5 минут, вторичные антитела (Donkey anti goat AlexaFlour 488 (705-545-147), Jackson ImmunoResearch) в концентрации 1:500 мкл наносили на 3 часа, после этого препараты снова промывали PBS 3 раза в течение 15 минут, и наносили среду с DAPI (4 ', 6-диамидино-2-фенилиндол), накладывали покровное стекло.

Таблица 1

Список процедур для совместного иммуногистохимического окрашивания срезов мозга и флуоресцентной FISH гибридизации *in situ*

Минуты	Шаг
5	Выдерживание препаратов в термостате, 50°C
15	Промывка в PBS 3 раза по 5 минут
60	Инкубация в блок-буфере
20	Обработка раствором РНКазы, 37°C

Минуты	Шаг
4	Промывка в PBS 2 раза по 2 минуты
5	Раствор пепсина, 37°C
15	Промывка в PBS 3 раза по 5 минут
60	Гиридизационный буфер
5	Предварительная инкубация ДНК-пробы и препаратов на 85°C
15	Гибридизация при 85°C
120	Гибридизация при комнатной температуре в тёмном месте.
20	Промывка в промывочном растворе 2 раза по 10 минут, 60°C
20	Промывка в промывочном растворе 2 раза по 10 минут, ком. темп.
45	Промывка в PBS 3 раза по 5 минут
Ночь	Инкубация с первичными антителами
15	Промывка в PBS 3 раза по 5 минут
180	Инкубация со вторичными антителами
15	Промывка в PBS 3 раза по 5 минут
	Добавление монтирующей среды с DAPI, наложение покровных стёкол

Исследование поддержано Российским научным фондом (проект No. 18-15-00229).

Работа Н.М.Немировича-Данченко оплачивалась из научного проекта, выполненного при поддержке Программы повышения конкурентоспособности ТГУ 8.1.24.2020.

Список литературы:

1. Bär, C., de Jesus, B. B., Serrano, R., Tejera, A., Ayuso, E., Jimenez, V., ... Blasco, M. A. (2014). Telomerase expression confers cardioprotection in the adult mouse heart after acute myocardial infarction. *Nature Communications*, 5(1).doi:10.1038/ncomms6863
2. Zijlmans, J. M. J. M., Martens, U. M., Poon, S. S. S., Raap, A. K., Tanke, H. J., Ward, R. K., & Lansdorp, P. M. (1997). Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(14), 7423-7428.doi:10.1073/pnas.94.14.7423
3. De Pauw, E. S. D., Verwoerd, N. P., Duinkerken, N., Willemze, R., Raap, A. K., Fibbe, W. E., & Tanke, H. J. (1998). Assessment of telomere length in hematopoietic interphase cells using in situ hybridization and digital fluorescence microscopy. *Cytometry*, 32(3), 163-169.doi:10.1002/(sici)1097-0320(19980701)32:3<163::aid-cyto1>3.0.co;2-1
4. Herrera, E. (1999). Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *The EMBO Journal*, 18(11), 2950-2960.doi:10.1093/emboj/18.11.2950
5. Nehmé, B., Henry, M., & Mougnot, D. (2011). Combined fluorescent in situ hybridization and immunofluorescence: Limiting factors and a substitution strategy for slide-mounted tissue sections. *Journal of Neuroscience Methods*, 196(2), 281-288. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.01.018

6. Heng, H. H. Q., Spyropoulos, B., & Moens, P. B. (n.d.). DNA-Protein In Situ Covisualization for Chromosome Analysis. In Situ Hybridization Protocols, 15-28. doi:10.1385/1-59259-677-0:15

7. Duval, C., de Tayrac, M., Sanschagrín, F., Michaud, K., Gould, P. V., & Saikali, S. (2014). ImmunoFISH Is a Reliable Technique for the Assessment of 1p and 19q Status in Oligodendrogliomas. PLoS ONE, 9(6), e100342. doi:10.1371/journal.pone.0100342

8. Wood, T. C., et al. Whole-brain ex-vivo quantitative MRI of the cuprizone mouse. PeerJ Preprints 4, e2323v1; 10.7287/peerj.preprints.2323v1 (2016).

УДК 616.8-005

DOI 10.37539/VT187.2020.52.45.003

Шварц Владислав Александрович, магистрант,
Томский государственный университет, г. Томск
Schwartz Vladislav Alexandrovich, Tomsk State University, Tomsk

Кудабаева Марина Станиславовна, аспирант,
Томский государственный университет, г. Томск
Kudabaeva Marina Stanislavovna, Tomsk State University, Tomsk

Губский Илья Леонидович, к.б.н., РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва
Gubsky Ilya Leonidovich, Pirogov Medical University, Moscow

Наместникова Дарья Дмитриевна, к.б.н., РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва
Gubsky Ilya Leonidovich, Pirogov Medical University, Moscow

Ходанович Марина Юрьевна, д.б.н., доцент,
Томский государственный университет, г. Томск
Khodanovich Marina Yurievna, Tomsk State University, Tomsk

**ДОЛГОВРЕМЕННАЯ ДИНАМИКА ОБЪЕМА ИШЕМИЧЕСКОГО
ОЧАГА И ОБЪЕМА ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА
НА МОДЕЛИ ЛОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ У КРЫС
LONG-TERM DYNAMIC OF ISCHEMIC LESION VOLUME
AND THE BRAIN HEMISPHERES' VOLUME IN THE MODEL
OF FOCAL ISCHEMIA MODEL IN RAT**

Аннотация: в исследовании изучалась динамика объема ишемического очага и объемов полушарий мозга у животных с локальной ишемией в течении 2 месяцев после ишемии при помощи ручной сегментации. Были выявлены значимые различия между объемами полушарий на 1, 3, 14, 21, 30, 42 день исследования ($p < 0,01-0,05$), а также резкий рост объема ишемического поражения в течение 1-3 суток, после чего его объем монотонно уменьшался.