УДК 576.316.353.7:636

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-350-6-24-26>

Оригинальное исследование/Original research

Новгородова И.П.

Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста), 142132 МО, г. Подольск, п. Дубровицы д. 60
E-mail: novg-inna2005@yandex.ru

Ключевые слова: цитогенетика, хромосома, метафазные пластинки, культура, лимфоциты, клетки, овцы, козы

Для цитирования: Новгородова И.П. Сравнительный анализ гипотонических растворов для цитогенетических исследований животных. Аграрная наука. 2021; 350 (6): 24–26.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-350-6-24-26>**Конфликт интересов отсутствует****Inna P. Novgorodova**

Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member
E-mail: novg-inna2005@yandex.ru

Key words: cytogenetics, chromosome, metaphase plates, culture, lymphocytes, cells, sheep, goats

For citation: Novgorodova I. P. Comparative analysis of hypotonic solutions for cytogenetic studies of animals. Agrarian Science. 2021; 350 (6): 24–26. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-350-6-24-26>**There is no conflict of interests**

Сравнительный анализ гипотонических растворов для цитогенетических исследований ЖИВОТНЫХ

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Цитогенетические исследования являются востребованными для выявления носителей наследственных аномалий. С целью получения метафазных пластинок хромосом различных видов животных нами был оптимизирован привычный метод с учетом внесения некоторых корректировок. Основным критерием исследований был подбор гипотонического раствора для проведения цитогенетических исследований у овец и коз.

Методы. Были рассмотрены 3 варианта использования гипотонических растворов: 0,56%-й раствор хлорида калия; дистиллированная вода (1 раствор) и 0,56%-м раствором хлорида калия (2 раствор); 2%-й раствор цитрата натрия и 0,56%-й раствор хлорида калия (1:1) (смесь). Для культивирования клеток периферической крови отбирали кровь из яремной вены животных (козы $n = 8$, овцы $n = 11$). Культивирование клеток проводили по общепринятой методике.

Результаты. Результаты проведенных исследований показали, что в зависимости от используемых компонентов качество препаратов отличалось. Оптимальные параметры для приготовления хромосом с хорошим распределением были получены при культивировании клеток лимфоцитов овец с использованием в качестве гипотонического раствора 0,56%-го хлорида калия (20 мин) и колебалось от 25,00 до 42,86%. Для проведения цитогенетических исследований у коз оптимальные результаты были выявлены при использовании 2%-го раствора цитрата натрия с 0,56%-м раствором хлорида калия (1:1) в течение 20 мин — от 26,67 до 62,50%. Каждый вариант позволил уменьшить потерю клеток в процессе приготовления препаратов хромосом для определенного вида животных. Таким образом, протокол получения метафазных пластинок с использованием 2%-го раствора цитрата натрия с 0,56%-м раствором хлорида калия (1:1) в качестве гипотонического раствора является оптимальным при использовании у коз, в то время как классический метод (0,56%-й раствор хлорида калия) был наиболее подходящим для овец.

Comparative analysis of hypotonic solutions for cytogenetic studies of animals

ABSTRACT

Relevance. Cytogenetic studies are in demand to identify carriers of hereditary anomalies. In order to obtain metaphase plates of the chromosomes of various animal species, we optimized the usual method, taking into account some adjustments.

Methods. The main research criterion was the selection of a hypotonic solution for cytogenetic studies in sheep and goats. 3 variants of using hypotonic solutions were considered: 0.56% solution of potassium chloride; distilled water and 0.56% solution of potassium chloride; 2% solution of sodium citrate and 0.56% solution of potassium chloride (1:1). For the cultivation of peripheral blood cells, blood was taken from the jugular vein of animals (goats $n = 8$, sheep $n = 11$).

Results. The cells were cultured according to the generally accepted method. The results of the conducted studies showed that the quality of the preparations differed depending on the components used. The optimal parameters for the preparation of chromosomes with a good distribution were obtained by culturing sheep lymphocyte cells using 0.56% potassium chloride as a hypotonic solution (20 min) and ranged from 14.29 to 25.00%. For cytogenetic studies in goats, optimal results were found when using a 2% solution of sodium citrate with a 0.56% solution of potassium chloride (1:1) for 20 minutes — from 13.33 to 25.00%. Each option allowed to reduce the loss of cells during the preparation of chromosome preparations for a certain type of animal. Thus, the developed protocol for obtaining metaphase plates using a 2% solution of sodium citrate with a 0.56% solution of potassium chloride (1:1) as a hypotonic solution is optimal when used in goats, while the classical method (0.56% solution of potassium chloride) was most suitable for sheep.

Поступила: 17 мая
После доработки: 30 мая
Принята к публикации: 10 июня

Received: 17 May
Revised: 30 May
Accepted: 10 June

Введение

Цитогенетические исследования можно использовать для мониторинга здоровья домашнего скота, в том числе выявления носителей наследственных аномалий [1, 2]. Наиболее простым, быстрым и воспроизводимым способом, используемым при получении препаратов хромосом с целью анализа кариотипов животных, является культивирование клеток крови (лейкоцитов периферической крови) [3, 4].

Инкубирование клеток в гипотоническом растворе обеспечивает набухание и разрыв ядер. Обработка клеточной суспензии гипотоническим раствором имеет важное значение для получения высококачественных образцов и обеспечивает отделение хромосом друг от друга в процессе раскапывания клеток на предметные стекла [5]. В это время происходит снижение процесса набухания клеток, разрушение межхромосомных связей, также способствующих отделению хромосом друг от друга и позволяющих избежать в дальнейшем клеточных нарушений и получить хорошее распластывание хромосом на препаратах [6, 7]. Недостаточная обработка гипотоническим раствором приводит к тому, что хромосомы выглядят на препаратах узловатыми, с множественными перекрытиями клеток и наложениями, что затрудняет их распознавание. Необходимо помнить, что при использовании раствора большой концентрации, продолжительное время происходит разрыв ядер с последующей потерей отдельных хромосом и на препаратах наблюдаются неполные хромосомные наборы [8, 9, 10]. Чрезмерная гипотоническая обработка вызывает диспергирование хромосом и появление так называемых «пушистых» хромосом.

Цель нашего исследования направлена на подбор гипотонического раствора, используемого для получения препаратов метафазных пластинок, овец и коз.

Методика

Исследования были проведены в лаборатории клеточной инженерии ФГБНУ ФИЦ ВИЖа им. Л.К. Эрнста. Объектом исследований были козы ($n = 8$) и овцы ($n = 11$), содержащиеся на физиологическом дворе ВИЖа. Через 2 ч после взятия крови проводили подготовку для культивирования клеток лимфоцитов по методике, описанной П.М. Кленовицким с коллегами (2007) [11] с некоторыми изменениями, направленными на подбор гипотонических растворов: 1 вариант — 0,56%-ый хлорид калия; 2 вариант двухступенчатый — дистиллированная вода (1 раствор), затем 0,56%-ый хлорид калия (2 раствор); 3 вариант — 2%-ый цитрат натрия и 0,56%-ый хлорид калия (1:1) (смесь).

Анализ хромосом проводили с использованием программы VideoTest Карио 3.1. Фотосъемка метафазных пластинок была проведена с использованием камеры Альтами 3М Пикс и микроскопа Альтами БИО1, изображения были получены с помощью программы AltamiStudio 3.4.0. (увеличение $\times 100$). Полученные данные обрабатывали при помощи компьютерной программы SPSS Statistics 23.0.

Результаты

В результате исследований, направленных на улучшение качества препаратов хромосом и определения наиболее подходящего гипотонического раствора, было рассмотрено несколько вариантов прописей протоколов. Использование 0,56%-го гипотонического раствора хлорида калия (30 мин при $t = 37,4^\circ\text{C}$) было рассмотрено как классический метод культивирования лимфоцитов животных. Этот способ, в зависимости от вида животных, позволил получить следующие данные: у овец процент метафазных пластинок, доступных для подсчета составил от 25,00 до 42,86%; коз — от 8,33 до 11,11% (таблица 1).

Следующим вариантом гипотонической обработки культуры клеток было рассмотрено использование дистиллированной воды в течение 15 мин (при $t = 37,4^\circ\text{C}$). После этого инкубирование продолжили с 0,56%-ым раствором хлорида калия в течение 20 мин (при $t = 37,4^\circ\text{C}$). Этот способ не позволил получить препараты хромосом.

При использовании 2%-го раствора цитрата натрия и 0,56%-го раствора хлорида калия (1:1) в качестве гипотонического раствора было отмечено лучшее распределение хромосом по сравнению с 0,56%-ым раствором хлорида калия (классический метод) у коз. Количество качественных цитогенетических препаратов у данного вида составило от 26,67 до 65,50%, в то время как у овец — 20,00%.

В таблице 2 представлены количественные данные метафазных пластинок при использовании различных гипотонических растворов. При этом учитывали метафазные пластинки хорошего качества и хорошего качества с небольшими наложениями. Из представленных данных видно, что общее количество клеток при получении хромосом колебалось от 2 до 19 и максимальным было при получении на одном стекле 3 метафазных пластинок.

На рисунке схематически изображено количество метафазных пластинок в зависимости от полученного качества.

Таблица 1. Использование гипотонических растворов в зависимости от вида животных

Table 1. Use of hypotonic solutions depending on the type of animal

Вид животного	Гипотонический раствор	Результаты
Овцы Козы	0,56% хлорид калия (30 мин)	>25% <12%
Овцы	Дист. вода (15 мин), 0,56% хлорид калия (20 мин)	—
Овцы Козы	2% цитрат натрия и 0,56% хлорид калия (1:1) (20 мин)	20% >26%

Таблица 2. Количество метафазных пластинок, полученных при исследовании

Table 2. The number of metaphase plates obtained in the study

Кол-во мет. пластинок	Гип. раствор		Всего
	цитрат натрия + хлорид калия	хлорид калия	
0	7	13	20
1,0	1	3	4
2,0	4	2	6
3,0	8	11	19
4,0	1	1	2
Всего	21	30	

Стоит отметить, что количество препаратов хорошего качества с небольшими наложениями при использовании в качестве гипотонического раствора как 2%-го цитрата натрия + 0,56%-го хлорида калия (1:1), так и 0,56%-го хлорида калия было практически одинаковым. Это указывает на то, что данные растворы можно использовать при цитогенетических исследованиях животных.

Выводы

Таким образом, наиболее эффективным методом получения митотических клеток в метафазе для визуализации хромосом у коз является использование в качестве гипотонического раствора 2,0%-го цитрата натрия и 0,56%-го хлорида калия (1:1). При исследовании метафазных пластинок овец наилучшие результаты были получены при классическом методе (0,56%-го раствор хлорида калия).

Рис. Сравнительные показатели метафазных пластинок в зависимости от типа гипотонического раствора (А — хорошего качества, Б — хорошего качества с небольшими наложениями)

Fig. Comparative indicators of metaphase plates depending on the type of hypotonic solution (A — good quality, B — good quality with small overlays)

Работа выполнена в рамках государственного задания при финансовой поддержке фундаментальных научных исследований Минобрнауки РФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang S, Su Y, Ding S, Cai Y, Wang J. Cytogenetic analysis of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, using chromosome banding and fluorescence in situ hybridization. *Hydrobiol.* 2010; 638: 1-10. DOI:10.1007/s10750-009-9980-9.
2. Udriou I and Sgura A. Cytogenetic tests for animal production: state of the art and Perspectives. *Animal Genetics.* 2017; 48: 505-515. doi: 10.1111/age.125.
3. Yahaya MS., Salisi MS., Isa NMMd, Haron AW and Peter ID. Application of Veterinary Cytogenetics in Domestic Animals: A Review. *Annual Research & Review in Biology.* 2019; 33(1): 1-16. DOI: 10.9734/ARRB/2019/v33i130112.
4. Chourrout D and Happe A. Improved methods of direct chromosome preparation in rain bow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture.* 1986; 52: 255-261.
5. Karami A, Araghi PE, Syed MA, Wilson SP. Chromosome preparation in fish: effects of fish species and larval age. *Int. Aquat. Res.* 2015; 7: 201-210. DOI 10.1007/s40071-015-0104-z.
6. Wood KW, Cornwell WD, Jackson JR. Past and future of

the mitotic spindle as an oncology target. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2001; 1: 370-377. doi: 10.1016/s1471-4892(01)00064-9.

7. Moore CM, Best RG. Chromosome preparation and banding. In: *Encyclopedia of Life Sciences.* Hoboken: John Wiley & Sons.; 2001. p.1-7. doi:10.1038/npg.els.0001444.

8. Kang J-U. Overview of Cytogenetic Technologies. *Korean J. Clin. Lab. Sci.* 2018; 50(4): 375-381. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2018.50.4.375>.

9. Pradeep PJ, Sriyaya TC, Zain RBM, Papini A & Chatterji AK. A Simple Technique for Chromosome Preparation from Embryonic Tissues of teleosts for Ploidy Verification. *Caryologia.* 2011; 64 (2): 235-241. DOI: 10.1080/00087114.2002.10589788.

10. Макгрегор Г., Варли Дж. Методы работы с хромосомами животных. М.: Мир. 1986. 268 с. [Makgregor G., Varli Dzh. Metody` raboty` s xromosomami zhivotny`x. M.: Mir. 1986. 268 p. (In Russ.)]

11. Кленовицкий П.М., Багиров В.А., Зиновьева Н.А., Насибов Ш.Н., Иолчиев Б.С. Цитогенетика животных. М. 2007. 81 с. [Klenoviczkij P.M., Bagirov V.A., Zinov`eva N.A., Nasibov Sh.N., Iolchiev B.S. Citogenetika zhivotny`x. M. 2007. 81 p. (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ:

Новгородова Инна Петровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии, Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста)

ABOUT THE AUTHORS:

Inna P. Novgorodova, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher of the Laboratory of Cell Engineering, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member