

УДК 575.222.7:576.316:577.113.5:004.4

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ХРОМОСОМОСПЕЦИФИЧНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ FISH МИКРОДИССЕКЦИОННЫХ ДНК-ПРОБ С МЕТАФАЗНЫМИ ХРОМОСОМАМИ

© 2012 г. А.Г. Богомолов¹, К.С. Задесенец¹, Т.В. Карамышева¹,
Н.Л. Подколотный^{1,2}, Н.Б. Рубцов^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: mantis_anton@bionet.nsc.ru;

² Институт вычислительной математики и математической геофизики СО РАН,
Новосибирск, Россия;

³ Новосибирский государственный университет

Поступила в редакцию 15 мая 2012 г. Принята к публикации 30 мая 2012 г.

В настоящее время для улучшения результатов гибридизации *in situ* используется супрессия повторенных последовательностей (*chromosomal in situ suppression hybridization* – CISS-гибридизация). Однако CISS-гибридизацию не всегда можно провести. В статье представлен новый подход, позволяющий с помощью компьютерного анализа FISH изображений выделить сигнал хромосомоспецифичных последовательностей ДНК.

Ключевые слова: *Opisthorchis felineus*, *Metorchis xanthosomus*, *Homo sapiens*, мейотические хромосомы, диспергированные повторенные последовательности ДНК, хромосомоспецифичные последовательности ДНК, супрессионная гибридизация *in situ* (CISS), флюоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), анализ изображений.

Введение

Флюоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) в настоящее время является одним из наиболее эффективных и широко используемых методов молекулярной цитогенетики, предназначенных для визуализации изучаемых последовательностей ДНК на цитологическом препарате. Возможности, способы и результаты ее использования во многом зависят от состава конкретных ДНК-проб. ДНК хромосомных районов или целых хромосом включает в себя значительное количество повторенных последовательностей, что обуславливает присутствие в микродиссекционных и сортировочных ДНК-пробах большого количества меченой ДНК, гомологичной как кластеризованной, так диспергированной повторенным последовательностям. Особенности

распределения в хромосомах повторенных последовательностей и их влияние на результаты FISH недавно были детально рассмотрены (Morozkin *et al.*, 2011). При использовании микродиссекционных и сортировочных ДНК-проб для FISH с метафазными хромосомами интенсивный сигнал выявляется не только в районах или хромосомах, которые были использованы для создания ДНК-проб, но также на других хромосомах и хромосомных районах, содержащих гомологичные повторенные последовательности (Рубцов и др., 2005). Традиционно проблема выявления специфичного сигнала решается подавлением гибридизации меченых повторенных последовательностей при проведении предгибридизации ДНК-пробы с 50–100-кратным избытком Cot1 ДНК изучаемого вида. Этот прием получил название

Chromosomal *In Situ* Suppression Hybridization, CISS-гибридизация (Lichter *et al.*, 1988). Использование CISS-гибридизации сталкивается как минимум с двумя проблемами: 1) супрессия гибридации повторенных последовательностей приводит к исчезновению сигнала всех повторенных последовательностей, в том числе и хромосомоспецифичных; 2) в ряде случаев CISS-гибридизация не может быть проведена из-за отсутствия доступной Cot1 ДНК. Если для некоторых видов отсутствует коммерчески доступная Cot1 ДНК, но она может быть получена из соответствующих биологических образцов, то для других получение необходимого количества геномной ДНК практически невозможно.

В настоящей статье предложен метод, позволяющий в результате компьютерной обработки результатов двухцветной FISH ДНК-проб, полученных из разных хромосом, выделить сигналы FISH, обусловленные хромосомоспецифичными последовательностями, представленными в используемых ДНК-пробах. Разработанный метод и программное обеспечение были опробованы в экспериментах по гибридации микродиссекционных ДНК-проб, полученных из хромосом человека, *Opisthorchis felinus* и *Metorchis xanthosomus*.

Материалы и методы

Препараты метафазных хромосом человека получали из трехдневных культур клеток периферической крови здоровых доноров, согласно стандартным процедурам (Henegariu *et al.*, 2001). Препараты митотических и мейотических хромосом готовили из половозрелых марит *O. felinus* и *M. xanthosomus*, как описано ранее (Zadesenets *et al.*, 2012). Мариты *O. felinus* и *M. xanthosomus* были любезно предоставлены В.А. Мордвиновым и А.А. Катохиным (лаборатория молекулярной и клеточной биологии ИЦиГ СО РАН). ДНК-пробы индивидуальных хромосом были получены из хромосом, собранных с цитологических препаратов, окрашенных красителем Гимза (*O. felinus* и *M. xanthosomus*) и методом G-дифференциального окрашивания (хромосомы человека). Микроманипуляционно собранный материал обрабатывали протеинкиназой K, а затем амплифицировали в полиме-

разной цепной реакции (ПЦР) с частично вырожденным праймером 6MW, как описано ранее (Rubtsov *et al.*, 2000). Мечение ДНК, полученной в такой ПЦР, проводили в дополнительных циклах ПЦР в присутствии Alexa Fluor 488-5-dUTP (Molecular Probes, USA), TAMRA (Molecular Probes, USA), SpectrumOrange (Abbott Molecular, USA) (Карамышева и др., 2001).

FISH микродиссекционных ДНК-проб, полученных из хромосом 1, 2, 18 и 19 человека, с хромосомами человека проводили как по стандартному протоколу CISS-гибридации, так и без супрессии гибридации повторенных последовательностей (Lichter *et al.*, 1988). FISH ДНК-проб, полученных из хромосом 1 и 2 *M. xanthosomus* и хромосом 1 и 2 *O. felinus*, с хромосомами *M. xanthosomus* и *O. felinus* проводили с хромосомами исходных видов без использования Cot1 ДНК (Zadesenets *et al.*, 2012). Общее окрашивание хромосом проводили красителем DAPI.

Микроскопический анализ был выполнен на микроскопе AxioPlan 2 Imaging microscope (Zeiss, Germany) с набором фильтров 49 (Zeiss, Germany), SP101 FITC (CHROMA, USA) и SP103v1 Cy3tmv1 (CHROMA, USA) CCD-камерой (CV M300, JAI Corporation, Japan). Для регистрации использовали программное обеспечение ISIS4 (METASystems GmbH). Микроскопию проводили в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Результаты регистрации сигнала каждого флуорохрома проводили в отдельных каналах: два канала – результаты регистрации сигналов FISH, один канал – окраска хромосом красителем DAPI.

Результаты

В результате проведения FISH микродиссекционных ДНК-проб была получена коллекция микроизображений метафазных пластинок человека и мейотических хромосом *M. xanthosomus* и *O. felinus*, которая включала FISH хромосомоспецифичных ДНК-проб человека (HSA 1, 2, 18, 19), *M. xanthosomus* (1 и 2), *O. felinus* (1 и 2) с хромосомами исходных видов.

Для выявления сигнала FISH хромосомоспецифических последовательностей учитывали следующие принципы формирования микроскопических изображений: суммарный сигнал

в каждой точке полутонового изображения (распределение интенсивности сигнала по каждому из каналов, в которых регистрировали сигналы FISH) представлял собой сумму сигнала FISH с хромосомоспецифичными последовательностями ДНК, представленными в микродиссекционной ДНК-пробе соответствующей хромосомы, сигнала FISH с диспергированными повторами, представленными в обеих микродиссекционных ДНК-пробах (диспергированные повторы, характерные для всех эухроматиновых районов хромосом, и кластерированные повторы, присутствующие в обеих хромосомах, из которых были получены микродиссекционные ДНК-пробы) и фонового сигнала, обусловленного оптической системой микроскопа и системой регистрации сигнала (рис. 1).

Таким образом, районам хромосом, из которых была получена ДНК-проба, соответствовала сумма специфического и неспецифического сигналов, тогда как районам остальных хромосом – только неспецифический сигнал (рис. 2). Сигнал FISH хромосомоспецифических последовательностей можно оценить как разницу между суммарным и неспецифическим сигналами. Разработка программного обеспечения, определяющего разницу между специфическим и неспецифическим сигналами, дает в руки исследователя инструмент для идентификации хромосом и хромосомных районов при проведении FISH без супрессии гибридизации повторенных последовательностей. Следует отметить, что результаты визуализации сигнала хромосомоспецифичных последовательностей

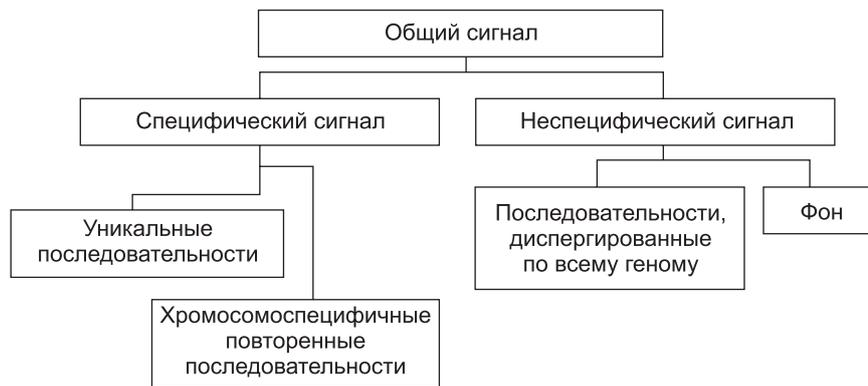


Рис. 1. Типы сигналов на FISH изображении. Под фоном подразумеваются различные шумы, которые, как правило, всегда присутствуют на изображениях.

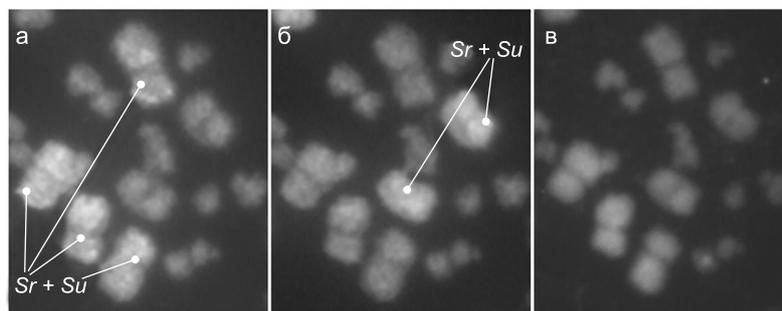


Рис. 2. Двухцветный FISH хромосом *M. xanthosomus* с ДНК-зондами из хромосом 1 (а) и 2 (б) *M. xanthosomus*.

Отмечены хромосомы, содержащие ДНК, специфичную хромосоме, из которой были получены ДНК-зонды. В отличие от других хромосом, на них был зарегистрирован не только неспецифический (Sr), но и сигнал хромосомоспецифических последовательностей (Su); (в) – общая окраска хромосом красителем DAPI. На микрофотографии приведен фрагмент двух пластинок мейотических хромосом.

с помощью компьютерного вычитания сигнала FISH повторенных последовательностей, представленных на другой хромосоме, могут отличаться от результатов традиционной CISS-гибридизации, так как в случае проведения CISS-гибридизации происходит супрессия гибридации всех повторенных последовательностей, включая хромосомоспецифичные. Таким образом, сопоставление результатов CISS-гибридизации и компьютерного выделения хромосомоспецифичного сигнала может помочь в определении локализации хромосомоспецифичных повторов (специфичных относительно хромосом, ДНК-пробы которых использовали в эксперименте).

В обработке микроскопических изображений оценка интенсивности специфического сигнала может быть получена в результате анализа FISH с ДНК-пробой другой хромосомы следующим образом:

для каждой точки (пикселя) изображения $i_{sa} = i_a - i_b$, а $i_{sb} = i_b - i_a$, где i_a – интенсивность сигнала FISH микродиссекционной ДНК-пробы, полученной из хромосомы a ; i_b – интенсивность сигнала FISH микродиссекционной ДНК-пробы, полученной из хромосомы b ; i_{sa} – рассчитанная интенсивность сигнала FISH хромосомоспецифичных последовательностей, представленных в микродиссекционной ДНК-пробе, полученной из хромосомы a ; i_{sb} – рассчитанная интенсивность сигнала FISH хромосомоспецифичных последовательностей, представленных в микродиссекционной ДНК-пробе, полученной из хромосомы b .

Возможность реализации такого подхода и его эффективность обусловлены проведением сравнения интенсивности сигналов FISH разных ДНК-проб в одних и тех же точках изображения препарата, что определяет идентичность условий, в которых проходили гибридизация и регистрация сигнала. Отношение интенсивности сигналов зависело только от состава ДНК, использованных ДНК-проб. Это подтверждают и результаты использования таких методов многоцветной FISH, как сравнительная геномная гибридизация и многоцветный бэндинг хромосом (Рубцов, Карамышева, 2000). Необходимо учесть, что регистрируемая интенсивность зависит от многих факторов, в частности от времени экспозиции. Это делает необходимым

проведение нормировки сигналов. При проведении количественной обработки сигналов также необходимо принять меры к повышению устойчивости сигнала и выделения районов, к которым должна быть применена предлагаемая обработка.

В связи с этим в предлагаемый метод были включены следующие этапы: 1) фильтрация; 2) сегментация; 3) выделение масок объектов – используется адаптированный под задачу алгоритм рекурсивной маркировки (Шапиро, Стокман, 2006); 4) распознавание объектов; 5) нормировка сигнала и выделение специфического сигнала; 6) линейное контрастирование (Софьер, 1996).

Фильтрация

Фильтрация использовалась для повышения устойчивости анализируемого сигнала, подавления помех и сглаживания неравномерного распределения сигнала при регистрации. В нашей работе для сглаживания сигнала использовался медианный фильтр (Гонсалес, Вудс, 2005). Основной задачей, которую решало применение медианного фильтра, являлось подавление импульсных шумов, к которым разрабатываемый метод оказался очень чувствителен. Отметим, что часть аддитивных шумов удаляется при вычислении специфического сигнала.

Сегментация

Для выделения на изображении участков, занятых хромосомами, использовали окрашивание красителем DAPI. Для сегментации были выбраны и использованы методы пороговой сегментации, основанные на анализе распределений характеристик пикселей. Основной проблемой их использования является выбор порога. В настоящее время предложено несколько подходов автоматической подборки значения порога: triangle (Zack *et al.*, 1977), isodate (Calvard, Ridler, 1978), Otsu (Otsu, 1979). Также существует возможность задания значения порога интерактивно. Однако даже при оптимально выбранном пороге сегментация не всегда дает хорошие результаты. В первую очередь это связано с проблемами формирования изображения и его качества. В случае препара-

тов метафазных хромосом одной из проблем могут оказаться их множественные контакты и перекрытия. Например, недостаточная гипотоническая обработка или приготовление препаратов в неоптимальных условиях приводят к многочисленным наложениям хромосом в метафазной пластинке.

Изображения хромосом метафазной пластинки после проведения автоматической сегментации нуждались в дополнительной обработке: удаление объектов шумов из обработки (ядра клеток, не полностью вошедшие в кадр хромосомы), разделение объектов (наложенные и соприкасающиеся хромосомы, отмеченные программой как одно целое). Часть объектов-шумов может быть автоматически обнаружена при использовании информации об их площади и эксцентриситете. На данный момент разделение хромосом выполняется пользователем интерактивно. Частично проблема разделения хромосом может быть решена использованием полуавтоматического метода разделения хромосом (Ji, 1989).

Распознавание образов (объектов)

На этапе «распознавание объектов» проводится определение хромосом, содержащих специфический сигнал. Для этого хромосомы разделяются на три класса: хромосомы, содержащие ДНК, специфичную хромосоме, из которой была получена первая ДНК-проба, использованная в эксперименте (класс 1); хромосомы, содержащие ДНК, специфичную хромосоме, из которой была получена вторая ДНК-проба, использованная в эксперименте (класс 2); хромосомы, не содержащие ДНК, специфичную хромосомам, из которых были получены ДНК-пробы (класс 3). Под распознаванием объектов (в нашем случае хромосом) понимают процедуру принятия решения о принадлежности объекта к одному из классов. Процедура принятия решений в общем виде заключается в следующем. Каждый из N классов представлен в Q -мерном (Q – размерность вектора признаков) пространстве, называемом признаковым пространством. Каждый объект в этом случае задается точкой Q -мерного пространства. Считается, что все объекты одного класса группируются в Q -мерном признаковом

пространстве компактно (гипотеза компактности), поэтому расстояние между объектами одного класса меньше, чем расстояние между объектами различных классов (Гонсалес, Вудс, 2005). В качестве признака для классификации в настоящей работе используется соотношение сигналов по двум каналам, а в качестве метода распознавания – метод минимального расстояния (Гонсалес, Вудс, 2005).

Определение отношения сигналов FISH требует предварительного проведения их нормировки. Для этого необходимо определить нормировочный (поправочный) коэффициент. При вычислении этого коэффициента используется гистограмма интенсивности, построенная для каждого канала (сигнал вне объектов обнуляется).

Рассмотрение гистограммы одного из каналов, содержащих результаты FISH, показало, что, как правило, она является бимодальной. Причем первый пик связан с неспецифическим сигналом, а второй (в области с высокими интенсивностями) – с общим сигналом. Учитывая этот факт, можно предложить следующие способы вычисления нормировочного коэффициента:

1. Отношение средних интенсивностей сигналов по всем хромосомам. Для обоих каналов с результатами FISH вычисляется средняя интенсивность сигнала:

$$M = \sum_{i=0}^{255} w_i \cdot i, \quad (1)$$

где M – средняя интенсивность сигнала, w_i – отношение количества точек с заданной интенсивностью i на гистограмме интенсивности к количеству всех точек, содержащихся в объектах.

Отношение вычисленных значений и есть поправочный коэффициент. На значение коэффициента влияет интенсивность общего сигнала. Поэтому предварительная нормировка с таким поправочным коэффициентом чувствительна к количеству и размерам хромосом, содержащих ДНК, специфичную хромосомам, из которых были получены ДНК-пробы.

2. Отношение средних интенсивностей сигналов с предварительной обработкой гистограммы интенсивности. Для того чтобы уменьшить влияние общего сигнала на значение коэффициента, из вычислений убираются пик и

его окрестности, связанные с общим сигналом. Для этого к гистограммам интенсивности обоих каналов, содержащих результаты FISH, применяется алгоритм Triangle. Далее коэффициент вычисляется так же, как описано выше.

Влияние размеров хромосом на коэффициент поправки можно снизить. Для этого строится усредненная гистограмма интенсивности, тогда средняя интенсивность вычисляется как:

$$M = \sum_{i=0}^{255} w_i \cdot i, w_i = \sum_{j=0}^n w_{ij}, \quad (2)$$

где M – средняя интенсивность сигнала, w_{ij} – отношение количества точек с заданной интенсивностью i на гистограмме интенсивности к количеству всех точек, содержащихся в j -м объекте, n – количество объектов.

Коэффициент позволяет выровнять уровни интенсивности сигналов в точке, для этого необходимо умножить значение интенсивности сигнала по одному из каналов на коэффициент поправки. Таким образом, в случае равномерного распределения повторенных последовательностей в хромосомных районах соотношение сигналов для районов хромосом, не содержащих последовательностей, специфичных хромосомам, из которых были получены ДНК-пробы, приблизительно равно 1. Для районов хромосом, из которых были получены ДНК-пробы (класс 1 и класс 2), отношение суммарного сигнала, представляющего сигнал хромосомоспецифических и неспецифических последовательностей к сигналу только неспецифических последовательностей, существенно превышает единицу.

Рассмотрим отношение (r) интенсивностей сигналов, полученных при гибридизации с первой ДНК пробой, к сигналам, полученным при проведении гибридизации со второй ДНК пробой. Каждый объект i будет представлен в пространстве признаков вектором $(r_i, 1/r_i)$, где r_i – отношение средних интенсивностей сигналов по объекту. Тогда класс 3 будет представлен в пространстве признаков вектором $(1, 1)$; класс 1 будет представлен объектом $(r_{max}, 1/r_{max})$ с максимальным соотношением r_{max} сигналов; класс 3 будет представлен объектом $(r_{min}, 1/r_{min})$ с минимальным соотношением r_{min} .

В идеальном случае в пространстве признаков наши классы примут вид, показанный на рис. 3, а. Однако в действительности соотношения несколько другие (рис 3, б, в).

Для измерения параметров признаков объектов (соотношений сигналов по двум каналам) необходимо вычислить средний сигнал по каналам внутри маски объекта. В работе используются два способа усреднения сигналов:

1) средний сигнал:

$$a = \sum_{j=1}^n I(j)/n, \quad (3)$$

где a – средний сигнал по каналу, n – количество точек, принадлежащих объекту, $I(j)$ – интенсивность сигнала по каналу в точке j .

2) средний максимальный сигнал:

$$am = \sum_{j=1}^n I(j)_{max}/n, \quad (4)$$

где am – средний максимальный сигнал по каналу, n – количество перпендикуляров, проведенных к оси инерции объекта (Журавель, 2012), $I(j)_{max}$ –

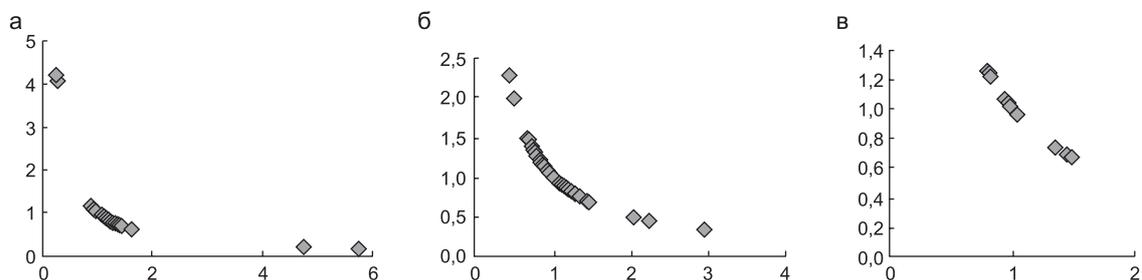


Рис. 3. Распределение объектов в пространстве признаков. Каждая точка соответствует объекту, а по осям откладываются значения признаков объекта (соотношение сигналов по двум каналам).

а – распределение для хромосом человека, полученное с использованием CISS-гибридизации. Этот случай очень близок к идеальному, так как значительно снижен уровень сигнала с повторенных последовательностей (как хромосомоспецифичных, так и диспергированных повторенных последовательностей); б – распределение соотношений в пространстве признаков, полученное для двухцветного FISH хромосом человека без супрессии; в – распределение соотношений в пространстве признаков для двухцветного FISH хромосом *M. xanthosomus*.

максимальная интенсивность в точке, принадлежащей объекту и j -му перпендикуляру.

При распластывании хромосомы на стекле сигнал на краях хромосомы может отличаться по интенсивности от сигнала в ее центральной части. Это может быть связано либо с различной доступностью ДНК хромосомы для ДНК-пробы, либо с различиями в ориентации поверхности хромосомы в различных ее участках. Поэтому более целесообразно использовать второй метод усреднения сигнала.

В некоторых случаях количество классов может отличаться от трех. Например, когда вместо одного из хромосомоспецифических зондов будет использована геномная ДНК, тогда количество классов будет равно двум. Для этого в методе используется критерий Ирвина (Третьяк, 2004), который позволяет оценить количество классов на изображении. Согласно этому критерию, аномальной считается точки ряда Y_t , отстоящая от предыдущей точки Y_{t-1} на величину, большую среднеквадратического отклонения ($\lambda_t > \lambda_q$):

$$\lambda_t = |Y_t - Y_{t-1}| / \sigma, \quad \lambda_t > \lambda_q, \quad (5)$$

где σ – среднеквадратическое отклонение, вычисленное по всем значениям выборки, λ_q – критическое (табличное) значение.

Из гипотезы о компактности классов следует, что если можно разбить множество на два класса, то между ними должен существовать достаточно большой промежуток (рис. 3). Поэтому в общих чертах процедуру принятия решения можно свести к поиску достаточно больших отрезков (5) между точками в пространстве признаков. После классификации объектов можно переопределить коэффициент поправки и провести повторно процедуру распознавания. Новый коэффициент использует гистограмму интенсивности, построенную для объектов, отнесенных к классу 3 (унимодальная гистограмма).

Нормировка сигнала и выделение специфического сигнала

Нормировка сигнала зависит от класса, к которому отнесли объект. Под нормировкой понимается действие (6) для сигналов в каждой точке объекта по каждому каналу, содержащему результаты FISH:

$$V_{new} = V_{old} \cdot 225 / V_n, \quad (6)$$

где V_{new} – новое значение в точке, V_{old} – старое значение в точке, V_n – величина относительно которой производится нормировка.

В работе применяются два способа нормировки сигнала: обычная и с выравниванием уровней сигналов.

Обычная нормировка. Для каждой точки хромосомы, принадлежащей к классу 1 или 2, нормировка сигнала проводится относительно максимальной интенсивности сигнала по объекту, а для хромосом, принадлежащих к классу 3, – относительно максимальной интенсивности сигнала по всем объектам. Нормированные сигналы вычитаются и в зависимости от знака разности результаты записываются в разные каналы.

Нормировка с выравниванием уровней сигналов. Нормировка для хромосом, принадлежащих к классам 1 и 2, проводится так же, как и для обычной нормировки. Что касается хромосом, принадлежащих к классу 3, то нормировка сигнала в разных каналах проводится относительно разных величин – относительно максимальной интенсивности сигнала по каналу (точки рассматриваются в пределах объекта). Нормированные сигналы вычитаются и в зависимости от знака разности результаты записываются в разные каналы. Если обычная нормировка позволяет выявить специфический сигнал даже у ошибочно классифицированного объекта, то нормировка с выравниванием уровней сигнала чувствительна к ошибкам классификации.

Результаты апробации метода выявления хромосомоспецифического сигнала

Проведен анализ более 100 микроскопических изображений. Обработка изображений проводилась согласно предложенному методу, с использованием различных способов нормировки сигнала. Полученные результаты показали, что предложенный метод позволяет выделить специфический сигнал в районах хромосом описторхид после проведения FISH без супрессии гибридизации повторенных последовательностей (рис. 4).

Точность метода можно оценить по результатам классификации (табл. 1, 2). Для оценки метода были использованы ошибки первого (7) и второго (8) рода.

$$E_1 = x_1 / (N_1 + N_2), \quad (7)$$

где x_1 – число хромосом, ошибочно отнесенных к классу 3, N_1 – количество объектов класса 1, N_2 – количество объектов класса 2.

$$E_2 = x_2 / N_3, \quad (8)$$

где x_2 – число хромосом, которые содержат только неспецифический сигнал, но были отнесены к одному из классов со специфическим сигналом. N_3 – количество хромосом, содержащих неспецифический сигнал.

Большие ошибки метода, полученные для хромосом *M. xanthosomus*, в первую очередь связаны с тем, что в выборку включены изображения с малым количеством объектов ($n < 7$), и критерий Ирвина (как и все статические методы, зависящий от количества объектов в выборке) не может найти достаточно большие отрезки.

Обсуждение

Предложенный метод не только выделяет на изображении хромосомоспецифические последовательности, но и позволяет выявить особенности распределения разного типа повторенных последовательностей. Обычно интенсивный сигнал связан с кластером повторенных последовательностей. При сравнении исходного изображения и обработанного можно оценить относительную концентрацию различных типов повторенных последовательностей в разных районах. Так, например, на рис. 4 в прицентромержном районе на хромосоме 1 интенсивный сигнал остался после обработки. Это указывает на то, что, скорее всего, район богат повторенными последовательностями, отличными от повторенных последовательностей хромосомы 2.

Метод обладает дополнительным преимуществом перед CISS-гибридизацией (рис. 5). Супрессия повторенных последовательностей, в отличие от предложенного метода, подавляет уровень сигнала всех повторенных последовательностей, как диспергированных, так и хромосомоспецифических повторенных последовательностей. Как вариант метода можно использовать в качестве одной из ДНК-проб меченую геномную ДНК. При использовании такого рода ДНК-пробы интенсивность сигнала уникальных последовательностей с районами

Таблица 1

Результаты распознавания объектов на изображении двухцветного FISH хромосом человека с ДНК-зондами из хромосом человека 18 и 19

Типы усреднения сигнала	X_1	X_2	E_1	E_2
Средний сигнал	13	10	0,1238	0,0071
Средний максимальный сигнал	2	13	0,019	0,0154

Примечание. X_1 – число хромосом, ошибочно отнесенных к классу 3, X_2 – число хромосом, которые содержат только неспецифический сигнал, но были отнесены к одному из классов со специфическим сигналом, E_1 – ошибка первого рода, E_2 – ошибка второго рода. Всего на изображениях было 951 хромосома, из них 105 содержали ДНК, специфичную хромосомам, из которых были получены ДНК-пробы.

Таблица 2

Результаты распознавания объектов на изображении двухцветного FISH хромосом *M. xanthosomus* с ДНК-зондами из хромосом *M. xanthosomus* 1 и 2

Типы усреднения сигнала	X_1	X_2	E_1	E_2
Средний сигнал	53	17	0,1726	0,0239
Средний максимальный сигнал	21	7	0,0684	0,0098

Примечание. Обозначения как в табл. 1. Всего на изображениях было 1018 хромосом, из них 307 содержали ДНК, специфичную хромосомам, из которых были получены ДНК-пробы.

анализируемой хромосомы снижена, так что ею можно пренебречь. Метод также может быть использован для улучшения результатов двухцветной FISH хромосомоспецифических ДНК-проб как с супрессией, так и без супрессии гибридизации повторенных последовательностей. Дальнейшей перспективой развития предложенного метода является использование данного подхода для анализа 24-цветной FISH, выполненной без супрессии гибридизации повторенных последовательностей.

На наш взгляд, основными недостатками предложенного нами метода являются его чувствительность к импульсному шуму и зависи-

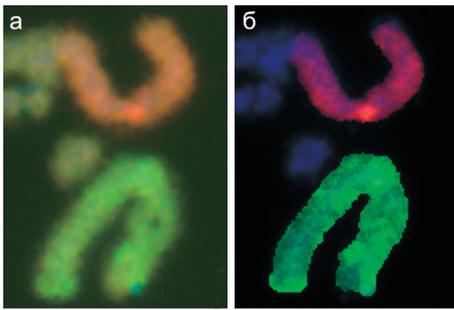


Рис. 4. Двухцветный FISH хромосом *M. xanthosomus* с ДНК-зондами из хромосом *M. xanthosomus* 1 (красный) и 2 (зеленый).

а – исходное изображение; б – результаты применения метода.

мость от количества объектов на изображении. Кроме того, при работе с хромосомами человека возникли проблемы с классификацией некоторых С-позитивных районов хромосом при проведении двухцветной FISH с ДНК-пробами хромосом, контрастными по содержанию LINE- и SINE-повторов. Наиболее контрастной по этому параметру парой являются хромосомы 18 и 19 человека (рис. 6). Однако эта особенность метода при его небольшой модификации может быть использована для анализа закономерностей распределения в хромосомных районах различных типов диспергированных повторовных последовательностей.

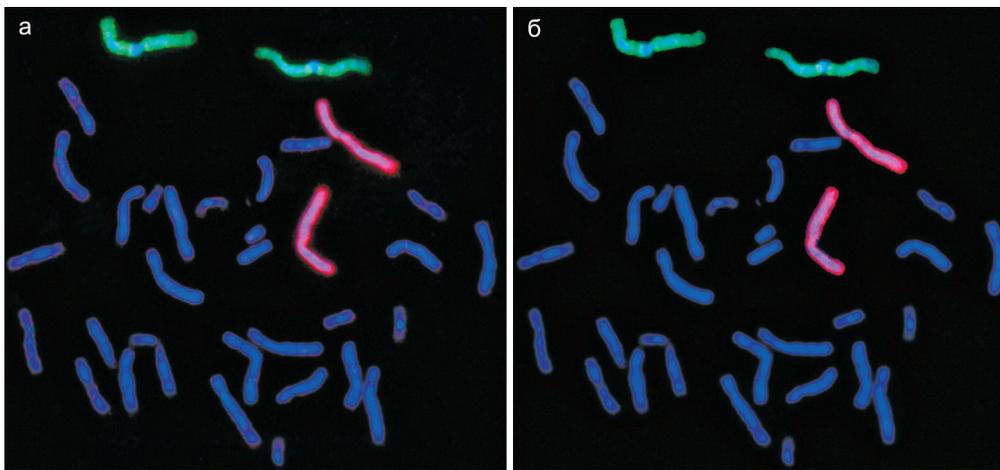


Рис. 5. Двухцветный FISH хромосом человека с ДНК-зондами из хромосом человека 1 (красный) и 2 (зеленый) и с использованием CISS-гибридизации.

а – исходное изображение; б – результаты применения метода.

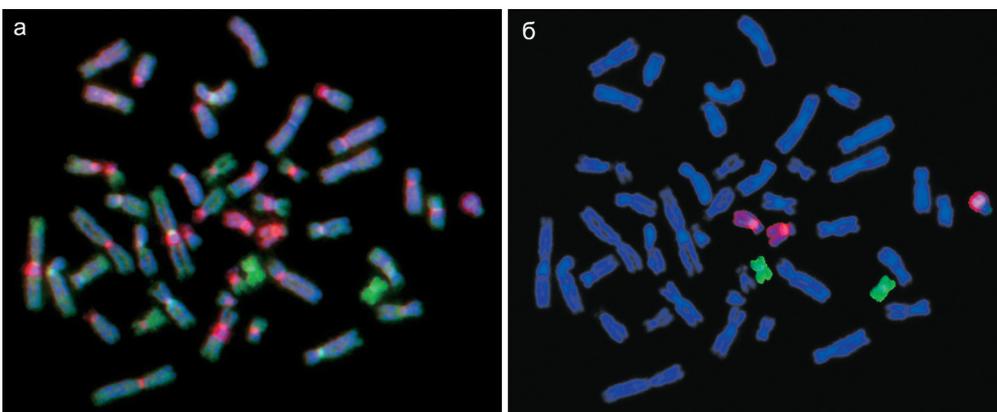


Рис. 6. Двухцветный FISH хромосом человека с ДНК-зондами из хромосом человека 18 (красный) и 19 (зеленый).

а – исходное изображение; б – результаты применения метода.

Литература

- Гонсалес Р., Вудс Р. Цифровая обработка изображений. М.: Техносфера, 2005. С. 350–351, 989–991.
- Журавель И.М. Краткий курс теории обработки изображений. 2012. Доступен на: <http://matlab.exponenta.ru/imageprocess/book2/index.php>.
- Карамышева Т.В., Матвеева В.Г., Шорина А.Р., Рубцов Н.Б. Клинический и молекулярно-цитогенетический анализ редкого случая мозаицизма по частичной моносомии 3p и частичной трисомии 10q у человека // Генетика. 2001. Т. 37. № 6. С. 811–816.
- Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В., Гайнер Т.А. Современные методы молекулярно-цитогенетического анализа и диагностика хромосомных патологий // Геномика – медицине. М.: Академкнига, 2005. С. 219–235.
- Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В. Многоцветие современной цитогенетики или multicolor FISH today // Информ. вестник ВОГиС. 2000. № 1. С. 13–15.
- Софьер В.А. Компьютерная обработка изображений. Ч. 2. Методы и алгоритмы // Сорос. образоват. журнал. 1996. № 3. С. 111.
- Третьяк Л.Н. Обработка результатов наблюдений. Оренбург: ГОУ ОГУ, 2004. С. 44–45.
- Шапиро Л., Стокман Дж. Компьютерное зрение. М.: БИНОМ, 2006. С. 87, 120–124.
- Calvard S., Ridler T.W. Picture thresholding using an iterative selection method // IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics. 1978. V. 8. No. 8. P. 630–632.
- Henegariu O., Heerema N., Wright L. *et al.* Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing // Cytometry. 2001. V. 43. P. 101–109.
- Ji L. Intelligent splitting in the chromosome domain // Pattern Recognition. 1989. V. 22. No. 5. P. 519–532.
- Lichter P., Cremer T., Borden J. *et al.* Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries // Hum. Genet. 1988. V. 80. No. 3. P. 224–234.
- Morozkin E.S., Loseva E.M., Karamysheva T.V. *et al.* A method for generating selective DNA probes for the analysis of C-negative regions in human chromosomes // Cytogenet. Genome Res. 2011. V. 135. No. 1. P. 1–11.
- Otsu N. A threshold selection method for gray-levels histograms // IEEE Trans. on Pat. Anal. and Machine Int. 1979. V. 13. P. 583–598.
- Rubtsov N., Riemann I., Trifonov V. *et al.* Chromosome microdissection using NIR femtosecond laserpulses and generation of band specific DNA-libraries with DOP-PCR // Cell Mol. Biol. 2000. V. 46. Abstr. 200.
- Zack G.W., Rogers W.E., Latt S.A. Automatic measurement of sister chromatid exchange frequency // J. Histochem. Cytochem. 1977. V. 25. No. 7. P. 741–753.
- Zadesenets K.S., Karamysheva T.V., Katokhin A.V. *et al.* Distribution of repetitive DNA sequences in chromosomes of five opisthorchid species (Trematoda, Opisthorchiidae) // Parasitol. Internat. 2012. V. 61. No. 1. P. 84–86.

**VISUALIZATION OF CHROMOSOME-SPECIFIC DNA SEQUENCES
BY FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION
OF MICRODISSECTION DNA PROBES WITH METAPHASE CHROMOSOMES**

A.G. Bogomolov¹, K.S. Zadesenets¹, T.V. Karamysheva¹, N.L. Podkolodnyi^{1,2}, N.B. Rubtsov^{1,3}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: mantis_anton@bionet.nsc.ru;

² Institute of Computational Mathematics and Mathematical Geophysics, SB RAS,
Novosibirsk, Russia;

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Presently, suppression of repetitive DNA sequences (chromosomal *in situ* suppression hybridization, CISS-hybridization) is used to improve the results of fluorescence *in situ* hybridization (FISH). However, in some cases the suppression cannot be performed, because sufficient amounts of DNA of some species are not available. This article presents a new approach, which allows visualization of a signal from chromosome-specific DNA sequences by means of computer-assisted analysis of FISH images.

Key words: *Opisthorchis felinus*, *Metorchis xanthosomus*, *Homo sapiens*, meiotic chromosomes, interspersed repetitive DNA, chromosome-specific DNA sequences, fluorescence *in situ* hybridization (FISH), chromosomal *in situ* suppression hybridization (CISS-hybridization), image analysis.