

## ПАРАЛЛЕЛЬНОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ НОВОСИНТЕЗИРОВАННОЙ РНК И ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ НА УЛЬТРАСТРУКТУРНОМ УРОВНЕ: МОДИФИКАЦИЯ ПРОТОКОЛА ДЛЯ ИММУНОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© И. О. Боголюбова,\* Д. С. Боголюбов

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;*

*\* электронный адрес: ibogol@mail.ru*

В настоящей работе мы представляем новую модификацию протокола, позволяющего одновременно выявлять на ультраструктурном уровне новосинтезированную РНК и репрезентативные ядерные белки с помощью иммуноэлектронной микроскопии. В качестве тест-системы использованы ранние эмбрионы мыши, инъецированные Br-УТФ. В данном случае стандартная методика обработки ультратонких срезов смесью соответствующих первичных антител дает неудовлетворительные результаты, по-видимому из-за несоответствия блокирующих буферных растворов и разбавителей. Мы использовали новый вариант методики, состоящий из двух этапов — полного цикла обработки срезов на сетках антителами к определенному ядерному белку и полного цикла обработки этих же срезов антителами, распознающими Br-УТФ. В промежутке между этапами срезы высушиваются, тем самым исключается смешивание буферных растворов, используемых в первом и втором циклах иммуномечения. Мы демонстрируем результативность данного протокола и специфичность наблюдаемого иммуномечения на примерах одновременного выявления новосинтезированных РНК, а также белка ATRX и одной из функциональных модификаций гистонов H4K5ac.

**Ключевые слова:** иммуноэлектронная микроскопия, двойное иммуномечение, Br-УТФ, эмбрионы мыши.

**Принятые сокращения:** ATRX — хроматинремоделирующий белок, мутации в гене которого приводят к  $\alpha$ -талассемии/умственной отсталости, связанной с X-хромосомой ( $\alpha$ -thalassemia/mental retardation syndrome X-linked); Br-дУ — 5-бромодезоксиуридин; Br-УТФ — 5-бромоуридин-5'-трифосфат; H4K5ac — гистон H4, ацетилированный по остатку лизина-5.

В течение последних примерно 25 лет в клеточной биологии для локализации участков транскрипции и новосинтезированной РНК широко используют в качестве предшественников синтеза РНК галогенсодержащие аналоги нуклеотидов, в частности натриевую соль 5-бромоуридина-5'-трифосфата (Br-УТФ) (Jackson et al., 1993; Wansink et al., 1993, 1994). Соответствующая методика (BrUTP assay) в разных модификациях практически полностью заменила классический метод авторадиографии, так как в отличие от него она не требует использования радиоактивного предшественника ( $^3\text{H}$ -уридина) и дорогостоящей фотоземли, наличия специального помещения для фоторабот, а также длительного времени экспозиции материала, особенно в случае проведения исследований на ультраструктурном уровне. Использование Br-УТФ позволяет легко локализовать включение предшественника путем несложной процедуры иммунодетекции не только на светооптическом, но и на ультраструктурном уровне с помощью соответствующих коммерческих антител. Хотя в ряде исследований последних лет по ряду причин предложено использовать другие предшественники синтеза РНК, например флуороуридин (Fl-U) (Hendzel et al., 1998; Boisvert et al., 2000; Kieβlich et al.,

2002), применение Br-УТФ остается широко распространенным способом выявления первичных транскриптов для оценки эффективности РНК-синтетической активности клетки. Определенная проблема заключается в низкой проницаемости клеточных мембран для Br-УТФ, однако в случае культивируемых *in vitro* соматических клеток она решается добавлением в среду детергента Тритона X-100 (Smарко et al., 1999). В случае значительно более крупных клеток (ооцитов беспозвоночных и позвоночных, зигот и 2—4-клеточных эмбрионов млекопитающих) эффективным способом решения данной проблемы является техника микроинъекций (Bogolyubov, 2007; Почукалина, Парфенов, 2008; Bogolyubova, 2011).

Многочисленный личный опыт работы в области иммунодетекции различных ядерных антигенов показал, что в некоторых случаях для одновременного выявления некоторых специфических ядерных белков и участков транскрипции (с помощью инъекций Br-УТФ) требуется определенная модификация традиционно используемых протоколов. Прежде всего это касается иммуноэлектронной микроскопии, которая, с одной стороны, позволяет исследовать внутриядерное распределение мест включения Br-УТФ при высоком разрешении, но, с другой стороны,

предъявляет повышенные требования к аффинности и специфичности используемых антител, особенно в случае их использования на ультратонких срезах (post-embedding), а также к подбору буферных растворов.

Несмотря на то что в практике ультраструктурных исследований одновременное выявление включения Br-УТФ и некоторых ядерных антигенов в ряде случаев было успешным на соматических клетках (Smarko et al., 1999, 2000), мы обнаружили, что использование протоколов пробоподготовки, описанных в этих статьях и ставших традиционными, в некоторых случаях оказалось неприменимым к эмбриональному материалу, инъецированному Br-УТФ. При использовании стандартной схемы пробоподготовки, которая включает в себя фиксацию формальдегидом, заключение материала в акриловую смолу LR white и использование желатинсодержащих буферных растворов и демонстрирует высокую эффективность при выявлении широкого спектра ядерных белков на ультраструктурном уровне (Bogolyubova, Bogolyubov, 2017), в случае использования антител к Br-УТФ мы зачастую наблюдали выраженную неспецифическую реакцию, в том числе и в контрольных экспериментах на неинъецированном материале с использованием широкой палитры разведений антител (от 1 : 50 до 1 : 10 000). В свою очередь использование буферных растворов, рекомендуемых производителем для антител, распознающих Br-УТФ, существенно снижает эффективность иммуноэлектронного выявления других ядерных антигенов. В связи с этими методическими проблемами мы предприняли попытку модифицировать протокол иммуноэлектронного мечения для одновременного выявления мест включения Br-УТФ и некоторых эндогенных ядерных белков и в качестве репрезентативных выбрали одну из модифицированных форм гистонов (H4K5ac) и хроматинремоделирующий белок ATRX.

Предлагаемая нами модификация протокола иммуноцитохимических реакций на ультраструктурном уровне предполагает последовательную обработку материала с использованием буферных растворов, наиболее подходящих для каждого из антител: к Br-УТФ (рекомендации производителя; Sigma-Aldrich) или к определенному ядерному белку («стандартная процедура»; Bogolyubova, Bogolyubov, 2017). Такой подход по сравнению с обычным использованием смеси разных антител (Smarko et al., 1999) несколько удлиняет продолжительность эксперимента, но демонстрирует надежные и специфические результаты. В настоящей статье мы приводим подробное описание модифицированного протокола и иллюстрируем его эффективность на примере одновременного выявления Br-УТФ и некоторых ядерных белков (ATRX и H4K5ac) в бластомерах двухклеточных эмбрионов мыши на ультраструктурном уровне.

## Материал и методика

**Получение эмбрионов.** Тестовым объектом исследования служили двухклеточные эмбрионы мыши линии BALB/c, полученной из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл., Россия). Для синхронизации половых циклов и стимуляции овуляции самкам последовательно (с интервалом 44–48 ч) вводили сывороточный (Folligon, Intervet, Голландия) и хорионический (Chorulon, Intervet, Голландия) гонадотропины по 10 МЕ на особь. Эмбрионы извлекали через 46 ч после инъекции хориониче-

ского гонадотропина в среду F10 (Sigma-Aldrich), содержащую 25 мМ HEPES.

Микроинъекции в цитоплазму эмбрионов проводили с помощью микроинъектора Eppendorf 5242 (Германия) и микроманипулятора Narishige ММО-202ND (Япония), смонтированного на базе инвертированного микроскопа Leica DM IRB (Германия), с использованием микрокапилляров Femtotips® II (Eppendorf) и удерживающей микропипетки Cook® К-НPIP-1035. При проведении микроинъекций эмбрионы помещали в каплю среды объемом примерно 50 мкл. Для микроинъекций использовали раствор 100 мМ натриевой соли Br-УТФ (Sigma-Aldrich), приготовленный на инъекционном буфере, который содержал 140 мМ KCl и 2 мМ пиперазина-N,N'-бис(2-этансульфоукислоты) (PIPES), pH 7.4 (Wan-sink et al., 1994). В каждую клетку вводили объем жидкости, равный примерно 5 % объема бластомера (Smarko et al., 1999). Материал фиксировали спустя 15 мин после инъекции.

**Конфокальная микроскопия.** Материал фиксировали в течение 40–60 мин при комнатной температуре в 4%-ном растворе формальдегида, приготовленном из параформальдегида (Ted Pella, США) на PBS, после чего дофиксировали в 2%-ном растворе формальдегида не менее 12 ч при 4 °C. После отмывки в PBS материал обрабатывали 0.5%-ным раствором Тритона X-100 на PBS в течение 10 мин, затем инкубировали в течение 10 мин в блокирующем буфере, который содержал 5 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США), приготовленной на специальном разбавителе для антител к Br-УТФ. Разбавитель представляет собой PBS, содержащий 1 % бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0.5 % Tween-20 и 0.1 % азидата натрия, pH 7.4. Инкубацию в растворе первичных антител (см. ниже) проводили во влажной камере в течение ночи при 4 °C. Затем проводили обработку в смеси соответствующих вторичных антител, конъюгированных с флуорохромами FITC или Alexa-568 (Molecular Probes, США), в рабочих концентрациях 1 : 128 и 1 : 200 соответственно в течение 1.5 ч при комнатной температуре, после чего материал заключали в среду Vectashield® (Vector Laboratories, США), содержащую 0.25 мкг/мл 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI), для одновременного выявления ДНК. Анализ препаратов проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа TCS SP5 (Leica, Германия), используя набор соответствующих лазеров и объектив 40×/1.25. Для совмещения цифровых изображений использовали программу ImageJ 1.37a.

В качестве первичных антител, распознающих включение Br-УТФ, использовали мышиные моноклональные антитела к Br-дУ (клон BU-33, Sigma-Aldrich), которые распознают Br-УТФ с высокой специфичностью и аффинностью (Vanderlaan, Thomas, 1985). Раствор антител готовили на разбавителе, состав которого описан выше, рабочая концентрация антител составляла 1 : 1000. Адекватная рабочая концентрация антител была определена в контрольных экспериментах с неинъецированным материалом.

Для параллельного выявления репрезентативных ядерных белков использовали кроличьи поликлональные антитела к гистону H4, ацетилированному по остатку лизина-5 (H4K5ac) (Abcam), при разведении 1 : 500 и кроличьи поликлональные антитела H-300 (Santa Cruz Biotechnology) к хроматинремоделирующему белку ATRX при разведении 1 : 100.

Иммуноэлектронная микроскопия. Материал фиксировали в PBS, содержащем 4 % формальдегида, приготовленном из параформальдегида, и 0.5 % глутаральдегида (Polyscience, США), в течение 1.5 ч при комнатной температуре, затем — в течение ночи в 2%-ном формальдегиде, приготовленном на PBS без добавления глутаральдегида, при 4 °С. После фиксации материал промывали в PBS, затем — 10 мин в PBS, содержащем 0.05 М хлорида аммония (Sigma-Aldrich), обезвоживали в серии этанола возрастающей концентрации (до 85 %) и заключали в акриловую смолу LR white (Sigma-Aldrich). Ультратонкие срезы толщиной 70—80 нм готовили с помощью ультрамикротомы Reichert Ultracut E (Австрия) и собирали на никелевые сетки.

Одновременное выявление включения Br-УТФ и репрезентативных ядерных белков (H4K5ac и ATRX) проводили по следующей схеме.

1. Для иммуноцитохимического выявления эндогенных белков использовали описанную ранее процедуру (Bogolyubova, Bogolyubov, 2017). Сетки инкубировали в течение 10 мин в блокирующем буфере, содержащем 0.5 % желатина из кожи холодноводных рыб (Sigma-Aldrich) и 0.02 % Tween-20 на PBS, pH 7.4, затем — в растворе соответствующих первичных кроличьих антител в течение ночи при 4 °С.

2. После отмывки в PBS, содержащем 0.1 % желатина и 0.02 % Tween-20 (5×2 мин), сетки обрабатывали вторичными козьими антителами против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с частицами коллоидного золота размером 15 нм, в течение 1.5 ч при комнатной температуре во влажной камере, после чего отмывали в том же буферном растворе (2×2 мин), споласкивали дистиллированной водой и высушивали.

3. Далее те же сетки со срезами во влажной камере инкубировали в течение 10 мин в блокирующем буфере (5%-ный раствор эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота на разбавителе для антител к Br-УТФ; см. выше), затем — в растворе первичных антител к Br-УТФ в течение ночи при 4 °С.

4. После 5-кратной отмывки разбавителем (по 2 мин в каждой смене) сетки обрабатывали в течение 1.5 ч при комнатной температуре вторичными козьими антителами против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с частицами коллоидного золота размером 10 нм (Aurion, Нидерланды), при разведении 1 : 10. Затем сетки отмывали в разбавителе (2×2 мин), споласкивали дистиллированной водой и высушивали на фильтровальной бумаге плотностью 4/N (80 г/м<sup>2</sup>) до полного высыхания (4—6 ч) при комнатной температуре.

5. Сетки контрастировали в течение 10 мин в насыщенном растворе уранил-ацетата (Electron Microscopy Sciences, США) в 70%-ном этаноле и просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

В качестве контрольного материала использовали: 1) инъекцированные Br-УТФ эмбрионы, ультратонкие срезы которых обрабатывали по описанной схеме без использования первичных антител, инкубируя сетки на этапах 1 и 3 в соответствующем буферном растворе, не содержащем антител; 2) неинъекцированные эмбрионы, ультратонкие срезы которых были обработаны по описанной процедуре.

Для оценки различий в интенсивности мечения проводили подсчет количества зерен коллоидного золота на

случайно выбранных полях зрения площадью 9 мкм<sup>2</sup>. Достоверность выявляемых различий оценивали с использованием критерия Манна—Уитни.

## Результаты и обсуждение

На поздней двухклеточной стадии эмбрионального развития мыши (возраст эмбрионов 46 ч после введения самкам хорионического гонадотропина) ядра бластомеров являются транскрипционно активными, поскольку к этому времени уже завершаются основные события активации эмбрионального генома (Li et al., 2014). Ультраструктура ядер бластомеров мыши в период активации эмбрионального генома характеризуется рядом специфических особенностей (Fakan, Odartchenko, 1980), связанных с особым функциональным статусом эмбрионов на начальных стадиях развития, и потому доимплантационные эмбрионы мыши представляют собой интересную экспериментальную модель для сравнительного исследования функциональной морфологии клеточного ядра.

Для локализации участков транскрипции и выявления новосинтезированных РНК в ядрах эмбрионов млекопитающих, в том числе на ультраструктурном уровне, удобно использовать метод введения Br-УТФ в качестве аналога уридина. Включившийся предшественник традиционно выявляют с помощью доступных коммерческих антител к Br-дУ. Такие антитела с высокой эффективностью распознают бромоеуридин, поскольку не способны различать антигены по остаткам сахаров — рибозы или дезоксирибозы (Vanderlaan, Thomas, 1985). Техника микроинъекций в двухклеточные эмбрионы мыши сама по себе проблем не представляет при наличии подходящего сертифицированного оборудования (микроинъектора и микроманипулятора) и расходных материалов (удерживающих микрокапилляров и микропитеток), используемых в практике экстракорпорального оплодотворения человека.

В нашей исследовательской практике проблемы возникли при попытке одновременного выявления включившегося Br-УТФ и некоторых эндогенных ядерных белков в ходе электронно-микроскопического исследования. Традиционно мы использовали в экспериментах по двойному иммуномечению смесь соответствующих антител (Smarko et al., 1999), что существенно ускоряет процесс и обычно дает надежные воспроизводимые результаты. В таких экспериментах мы используем хорошо зарекомендовавшие себя желатинсодержащие буферные растворы на PBS (Bogolyubova, Bogolyubov, 2017). Неожиданно, по непонятной пока причине, в случае совместного использования антител к Br-УТФ и к репрезентативным ядерным белкам H4K5ac и ATRX это оказалось невозможным в наших экспериментах на ультраструктурном уровне (в силу неспецифичной или слабой реакции). В отношении локализации эндогенных белков мы решили не подбирать буферные растворы взамен традиционно используемых в нашей лаборатории, однако решили разделить во времени обработку антителами к этим белкам и к Br-УТФ. В последнем случае мы использовали буферные растворы, рекомендованные фирмой-производителем (Sigma-Aldrich) для флуоресцентной микроскопии, впервые применив их в электронно-микроскопическом исследовании. Предлагаемая нами модификация протокола для иммуноэлектронной микроскопии хотя и удлиняет время пробоподготовки, дает возможность исполь-



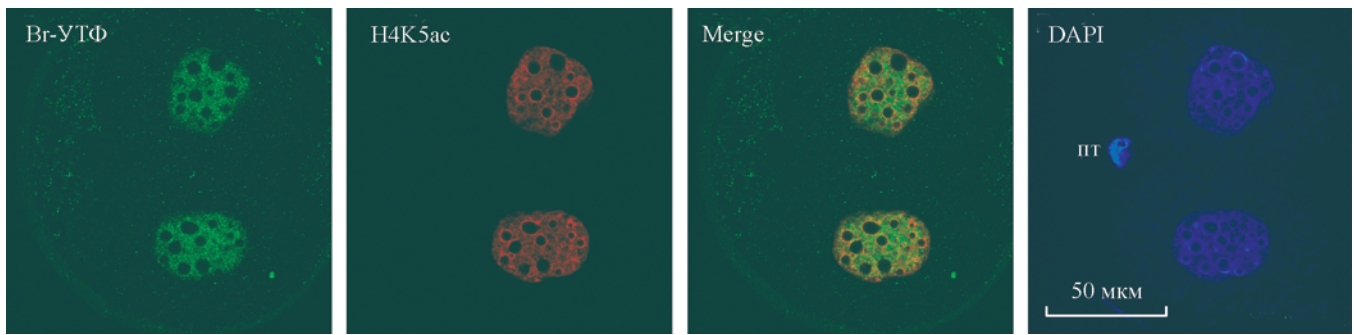


Рис. 1. Результаты двойного иммуномечения двухклеточного эмбриона мыши, инъецированного Br-УТФ, после обработки антителами к Br-дУ (зеленый сигнал) и гистону H4, ацетилированному по остатку лизина-5 (H4K5ac, красный сигнал), на светооптическом уровне. Конфокальная микроскопия.

Merge — совмещенное изображение по двум каналам. ДНК окрашена DAPI (синий сигнал). пт — полярное тельце.

зывать для каждого вида антител оптимально подходящие буферные растворы, что повышает количество зерен коллоидного золота, выявляемых на срезах, не снижая специфичности иммуоцитохимической реакции.

На рис. 1 представлены результаты одновременного выявления на светооптическом уровне сайтов включения Br-УТФ и локализации гистона H4, ацетилированного по остатку лизина-5 (H4K5ac), в транскрипционно активных двухклеточных эмбрионах мыши с использованием смеси антител и буферных растворов, рекомендуемых производителем антител, распознающих Br-УТФ (подробнее см. раздел «Материал и методика»). В нуклеоплазме выявляются многочисленные мелкие фокусы флуоресценции, распределенные по всему объему ядра, за исключением проядрышек (nucleolus precursor bodies) — специфических ядерных образований доимплантационных эмбрионов млекопитающих (подробнее см.: Fléchon, Ко-

ре́спу, 1998) (рис. 1, зеленый сигнал). Подобный характер мечения стабильно воспроизводится, а специфичность связывания антител подтверждается в дополнительных экспериментах с использованием как неинъецированных, так и инъецированных эмбрионов, обработанных РНКазой (не показано). На светооптическом уровне данный подход не препятствует успешному одновременному выявлению эндогенных ядерных белков, например H4K5ac (рис. 1, красный сигнал).

В то же время, как отмечено выше, в случае иммуноэлектронного выявления участков включения Br-УТФ одновременно с другими ядерными антигенами подобная методика оказалась неэффективной (выявляются только отдельные частицы коллоидного золота). На рис. 2 показаны результаты, полученные с использованием модифицированного нами протокола. Представленные изображения демонстрируют и частицы коллоидного зо-

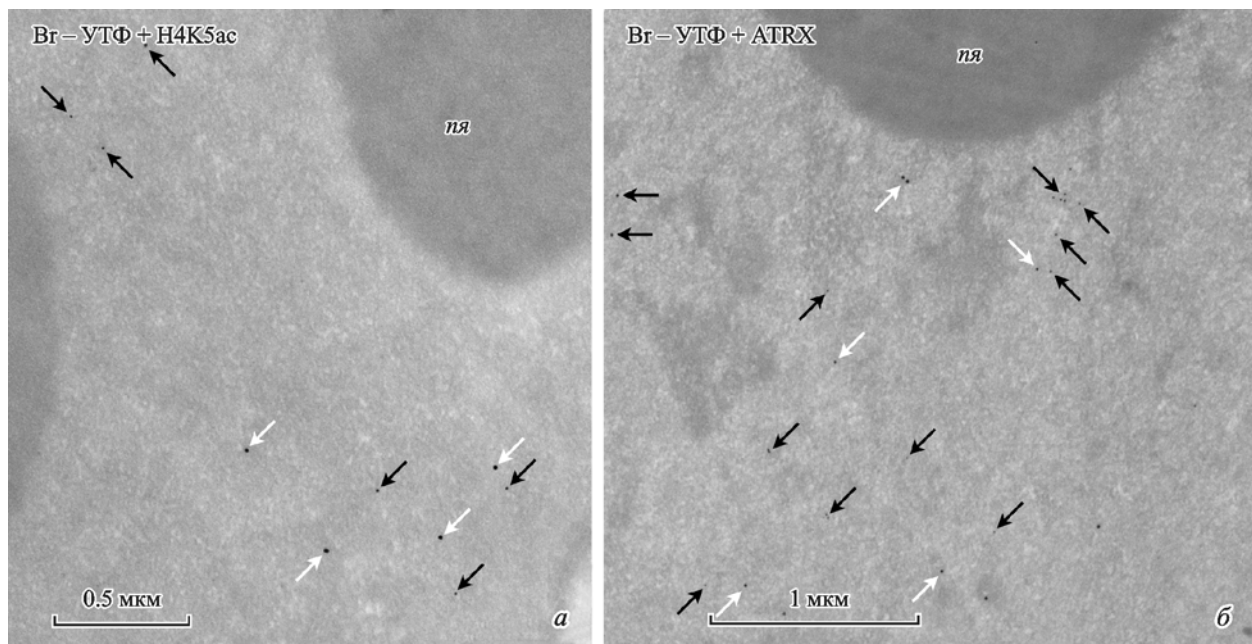


Рис. 2. Результаты двойного иммуномечения двухклеточных эмбрионов мыши, инъецированных Br-УТФ, после обработки антителами к Br-дУ (частицы золота 10 нм, черные стрелки) и двум эндогенным ядерным белкам (частицы золота 15 нм, белые стрелки) — H4K5ac (а) и ATRX (б) — на ультраструктурном уровне.

Представлены фрагменты ядер двухклеточных эмбрионов. Иммуноэлектронная микроскопия. Процедура совместного выявления включения Br-УТФ и ядерных белков описана в разделе «Материал и методика». пя — проядрышки.

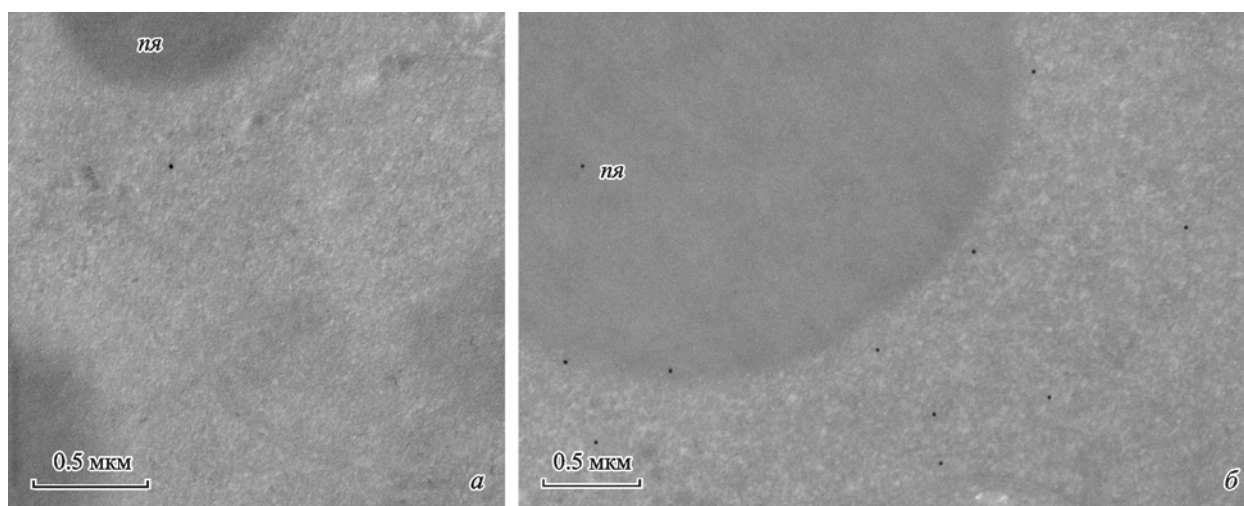


Рис. 3. Ультраструктурные микрофотографии контрольных образцов ядер двухклеточных эмбрионов мыши. Иммуноэлектронная микроскопия.

*а* — фрагмент ядра blastomera, инъецированного Br-УТФ, но обработанного только вторичными антителами, конъюгированными с частицами коллоидного золота размерами 10 и 15 нм. *б* — фрагмент ядра неинъецированного blastomera после обработки антителами к Br-дУ и гистону H4, ацетилованному по остатку лизина-5 (H4K5ac), выявляется только эндогенный H4K5ac (частицы золота 15 нм). Подробнее о контрольных экспериментах см. в разделе «Материал и методика». *ля* — продрышки.

лота (диаметр 10 нм, *черные стрелки*), соответствующие сайтам включения Br-УТФ, и частицы (диаметр 15 нм, *белые стрелки*), которые соответствуют локализации H4K5ac (рис. 2, *а*) или ATRX (рис. 2, *б*). Не вдаваясь в подробности внутриядерного распределения H4K5ac и ATRX, которые в данном исследовании были выбраны лишь в качестве мажорных и репрезентативных антигенов, отметим, что распределение Br-УТФ, H4K5ac и ATRX, наблюдаемое на ультраструктурном уровне, соответствует данным, полученным с помощью иммунофлуоресцентного мечения (как двойного, так и одностороннего). К примеру, на светооптическом уровне мы никогда не наблюдали колокализации флуоресцентных сигналов в парах Br-УТФ—ATRX и Br-УТФ—H4K5ac, что подтверждает и распределение зерен коллоидного золота, наблюдаемое с помощью иммуноэлектронной микроскопии (рис. 2).

Для проверки специфичности мечения, наблюдаемого в результате использования нашего модифицированного протокола двойного иммуноэлектронного мечения, нами был поставлен ряд контрольных экспериментов, результаты которых представлены на рис. 3. В случае стандартного варианта проверки специфичности иммуномечения мы использовали только вторичные антитела, конъюгированные с частицами коллоидного золота, заменив инкубацию срезов в растворе первичных антител на инкубацию в соответствующем буферном растворе. Как и следовало ожидать, препараты оставались практически полностью немечеными, за исключением единичных (в пределах фоновых значений) зерен золота в поле зрения (рис. 3, *а*).

Для подтверждения визуальных данных нами был проведен подсчет зерен золота на нескольких случайно выбранных полях зрения (площадью 9 мкм<sup>2</sup>). Интенсивность мечения достоверно различалась ( $P \leq 0.01$ ) между контрольным и экспериментальным материалом как для частиц коллоидного золота диаметром 10 нм, соответствующих местам включения Br-УТФ ( $1.0 \pm 0.8$  и  $11.5 \pm 5.2$  соответственно), так и для частиц диаметром 15 нм,

соответствующих локализации H4K5ac ( $1.25 \pm 0.5$  и  $11.1 \pm 3.9$  соответственно).

В другом варианте контрольных экспериментов мы полностью воспроизводили предлагаемую нами методику иммуномечения на ультратонких срезах неинъецированных эмбрионов. В этом случае на срезах сохранились картины распределения метки, характерные для соответствующих эндогенных белков, в частности H4K5ac (рис. 3, *б*). Разница в числе зерен золота, соответствующих потенциальным местам включения Br-УТФ на контрольных и экспериментальных препаратах ( $3.0 \pm 1.1$  и  $11.5 \pm 5.27$  соответственно), также была подтверждена с помощью критерия Манна—Уитни ( $P \leq 0.01$ ).

Таким образом, предложенная нами модификация протокола обработки ультратонких срезов дает возможность успешно сочетать использование антител к Br-дУ (для локализации мест включения Br-УТФ) и антител к репрезентативным эндогенным белкам (H4K5ac и ATRX), позволяя на ультраструктурном уровне выявлять ядерные белки одновременно с новосинтезированными транскриптами РНК. При этом неспецифическое связывание антител является минимальным, а характер распределения изучаемых антигенов соответствует результатам, полученным с помощью конфокальной микроскопии.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО по государственному заданию № 0124-2016-0003 (рег. ЦИТиС № АААА-А17-117032350035-4).

#### Список литературы

- Почукалина Г. Н., Парфенов В. Н. 2008. Трансформация ядрышек ооцитов антральных фолликулов мыши. Выявление коилина и компонентов комплекса РНК-полимеразы I. Цитология. 50 (8) : 671—680. (Pochukalina G. N., Parfenov V. N. 2008. Nucleolus transformation in mouse antral follicles: distribution of coilin and components of RNA-polymerase I complex. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 2 : 522—530.)

*Bogolyubov D. 2007.* Localization of RNA transcription sites in insect oocytes using microinjections of 5-bromouridine 5'-triphosphate. *Folia Histochem. Cytobiol.* 45 : 129—134.

*Bogolyubova I. O. 2011.* Transcriptional activity of nuclei in 2-cell blocked mouse embryos. *Tissue Cell.* 43 : 262—265.

*Bogolyubova I. O., Bogolyubov D. S. 2017.* Detection of RNA polymerase II in mouse embryos during zygotic genome activation using immunocytochemistry. *Methods Mol. Biol.* 1605 : 147—159.

*Boisvert F. M., Hendzel M. J., Bazett-Jones D. P. 2000.* Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J. Cell Biol.* 148 : 283—292.

*Cmarko D., Verschure P. J., Martin T. E., Dahmus M. E., Krause S., Fu X.-D., van Driel R., Fakan S. 1999.* Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Mol. Biol. Cell.* 10 : 211—223.

*Cmarko D., Verschure P. J., Rothblum L. I., Hernandez-Verdun D., Amalric F., van Driel R., Fakan S. 2000.* Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochem. Cell Biol.* 113 : 181—187.

*Fakan S., Odartchenko N. 1980.* Ultrastructural organization of the cell nucleus in early mouse embryos. *Biol. Cell.* 37 : 211—218.

*Fléchon J. E., Kopečný V. 1998.* The nature of the «nucleolus precursor body» in early preimplantation embryos: a review of fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. 6 : 183—191.

*Hendzel M. J., Kruhlak M. J., Bazett-Jones D. P. 1998.* Organization of highly acetylated chromatin around sites of heterogeneous nuclear RNA accumulation. *Mol. Biol. Cell.* 9 : 2491—2507.

*Jackson D. A., Hassan A. B., Errington R. J., Cook P. R. 1993.* Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J.* 12 : 1059—1065.

*Kießlich A., von Mikecz A., Hemmerich P. 2002.* Cell cycle-dependent association of PML bodies with sites of active transcription in nuclei of mammalian cells. *J. Struct. Biol.* 140 : 167—179.

*Li L., Lu X., Dean J. 2014.* The maternal to zygotic transition in mammals. *Mol. Asp. Med.* 34 : 919—938.

*Vanderlaan M., Thomas C. B. 1985.* Characterization of monoclonal antibodies to bromodeoxyuridine. *Cytometry.* 6 : 501—505.

*Wansink D. G., Motley A. M., van Driel R., de Jong L. 1994.* Fluorescent labeling of nascent RNA in the cell nucleus using 5-bromouridine 5'-triphosphate. In: *Cell biology — a laboratory handbook.* San Diego: Acad. Press. 2 : 368—374.

*Wansink D. G., Schul W., van der Kraan I., van Steensel B., van Driel R., de Jong L. 1993.* Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J. Cell Biol.* 122 : 283—293.

Поступила 11 III 2018

#### A COMBINING DETECTION OF NEWLY SYNTHESIZED RNA AND NUCLEAR PROTEINS AT THE ULTRASTRUCTURAL LEVEL: A MODIFICATION OF THE PROTOCOL FOR IMMUNOELECTRON MICROSCOPY

*I. O. Bogolyubova,\* D. S. Bogolyubov*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

\* e-mail: ibogol@mail.ru

In the present work, we propose a novel variant of the protocol that allows a combining reveal of nascent RNA transcripts and representative proteins at the ultrastructural level using immunoelectron microscopy. Early mouse embryos injected with BrUTP were used as a test system. The standard procedure for processing of ultrathin sections with a mixture of the appropriate primary antibodies in this case gives unsatisfactory results, perhaps, due to a mismatch of blocking buffers and diluents. We used a new variant of the technique, which includes two steps: a complete cycle of processing the sections on grids with an antibody to specific nuclear protein and a complete cycle of processing the same sections with an antibody that recognizes BrUTP. In the interval between the steps, the sections are allowed drying, thereby, eliminating the mixing of the buffer solutions used in the first and second cycles of immunolabeling. Here, we demonstrate the effectiveness of this protocol and the specificity of the observed immunolabeling using the examples of simultaneous detection of newly synthesized RNA, as well as ATRX protein and one of the functional histone modifications H4K5ac.

**Key words:** immunoelectron microscopy, double labeling, BrUTP, mouse embryos.