ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

УДК 575.111:576.315

ТАНДЕМНЫЕ ПОВТОРЫ В ГЕНОМЕ СВИНЬИ Sus scrofa, ИХ ЛОКАЛИЗАЦИЯ В ХРОМОСОМАХ И ЯДРАХ КЛЕТОК СПЕРМАТОГЕННОГО РЯДА

© 2019 г. Н. Г. Иванова^{1, *}, В. Н. Стефанова¹, Д. И. Остромышенский¹, О. И. Подгорная^{1, 2, 3}

¹Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064 Россия ²Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра цитологии и гистологии, Санкт-Петербург, 199034 Россия

 3 Дальневосточный федеральный университет, Школа биомедицины, Владивосток, 690922 Россия

*e-mail: Nadyaxs@gmail.com Поступила в редакцию 18.11.2018 г. После доработки 16.01.2019 г. Принята к публикации 30.01.2019 г.

Методы биоинформатики позволяют найти и аннотировать большие тандемные повторы (ТП) в сборках геномов разных организмов. В настоящей работе анализировали геномную сборку свиньи *Sus scrofa* (в базе данных NCBI Sscrofa10.2) и выявили набор ТП, характерных для вида, а также картировали некоторые из них методом FISH на метафазных хромосомах с помощью рассчитанных нами коротких олигонуклеотидных зондов (Sscrf_335A, Sscrf_243A, Sscrf_15A, Sscrf_50A). Все ТП, присутствующие в базе данных Repbase для свиньи, выявляются с помощью биоинформатических методов, но кроме них найдено еще 18 новых семейств ТП в сборке Sscrofa10.2. Набор найденных TП в сборке Sscrofa10.2 по сравнению с человеком и мышью отличается бо́льшей длиной мономеров. Зонды Sscrf_15A и Sscrf_243A выявляют набор акроцентрических (Ac) хромосом, зонд Sscrf_50A — набор суб/метацентрических (Mc) хромосом, зонд Sscrf_335A метит все хромосомы. Использовании всех зондов в профазе I мейоза наблюдали образования в виде колец, которые не описаны в литературе. Мы показали следующее: 1) сконструированные нами зонды выявляют Mc- и Ac-наборы хромосом; 2) в сперматозоидах существует характерный паттерн для каждого зонда; 3) вероятно, центромерные зонды дают возможность наблюдать сборку центромерного района.

Ключевые слова: тандемные повторы, организация хроматина, spermFISH. **DOI:** 10.1134/S0016675819070075

Развитие методов секвенирования и сборки геномов, а также развитие методов обработки данных высокопроизводительного секвенирования позволяют найти и аннотировать большие тандемные повторы (ТП), которые также называют сателлитной ДНК (сатДНК), в сборках геномов различных организмов. Особенности организации строения ТП затрудняют сборку, аннотирование и картирование гетерохроматиновых районов хромосом, которые содержат ТП как основной компонент [1]. Ранее в нашей лаборатории был разработан биоинформатический метод, позволяющий найти ТП в геномных сборках [2]. Термин "большие тандемные повторы" (ТП), который мы используем в настоящей работе, поддается формализации, так как все характеристики ТП имеют численное выражение. Исторически сложилось, что для некоторых последовательностей ТП используют термин "сателлитная ДНК" (SSAT), например, SSAT_A и SSAT_B свиньи в Repbase.

Поиски цитогенетических маркеров центромерных районов хромосом свиньи ведутся давно. Разрешение, получаемое методом FISH, не дает возможности определить точную локализацию зонда в области первичной перетяжки – центромерную или прицентромерную. Поэтому локализацию большинства зондов описывают как центромерную в широком смысле, т.е. в области первичной перетяжки хромосомы без уточнения позиции.

Для классификации хромосом в цитогенетических исследованиях используют дифференциальное окрашивание, хромосом-специфичные зонды, полученные с помощью микродиссекции или цитофлуорометрической сортировки хромосом и последующей ПЦР-амплификации. Хромосом-специфичные зонды расположены в сперматозоидах свиньи неслучайным образом [3]. Однако при таком подходе не выявляются гетерохроматиновые участки, определяющие пространственную организацию хромосом в ядрах, кроме того, не видны хромосомные ассоциации в интерфазном ядре (степень близости хромосом в ядре сперматозоида). Ставя задачу настоящей работы, мы предполагали, что предложенные нами и используемые впервые зонды позволят прояснить вопрос о положении гетерохроматиновых районов хромосом в сперматогенезе.

В сперматозоидах млекопитающих ДНК достигает максимальной степени компактизации в почти кристаллическую структуру [4, 5]. Хромосомы упакованы в тороиды, которые, плотно прилегая, располагаются друг над другом [6]. Хромосомные территории организованы неслучайно и в отличие от соматических клеток здесь хромосомы свернуты так, что их плечи р-и q-соприкасаются. Их теломеры тяготеют к периферии, а центромеры агрегируют в один или несколько хромоцентров ближе к центру ядра [7, 8]. Сперматозоидам свиньи свойственна определенная форма, напоминающая весло с плоской головкой высотой около 3 мкм и вытянутой вдоль на 12 мкм, которая отличает их от яйцевидной формы сперматозоилов человека или сперматозоилов мыши, похожих на крюк. Расположение хромосом в сперматозоидах разной формы важно для последующего развития. В сперматозоидах свиньи теломеры локализованы в центре ядра как несколько конгломератов, центромеры Ас- и Мсхромосом формируют отдельные кластеры [9]. Эти данные были получены с использованием синтетических олигонуклеотидов, рассчитанных на основании клонированных и тестированных ТП свиньи [9].

В настоящей работе мы провели анализ геномной сборки Sscrofa10.2 свиньи S. scrofa и выявили набор ТП, характерных для этого вида, часть из которых тестировали методами цитогенетики. Мы поставили следующие задачи: 1) биоинформатическими методами выявить семейства ТП в геномной сборке Sscrofa10.2; 2) подобрать к ним зонды; 3) сравнить полученные семейства ТП с ранее известными из литературных данных; 4) определить позиции зондов в клетках сперматогенного ряда. Для решения последней задачи мы использовали FISH на препаратах, не обработанных специально для сохранения 3D-структуры. В работе Фостер с соавт. [3] была показана возможность исследования преимушественной локализации хромосом в ядрах сперматозоидов, не обработанных специальным образом для сохранения 3D-структуры. ДНК сперматозоидов и сперматид упакованы настолько плотно, что полностью распластанные ядра получить невозможно. Можно только разрыхлить хроматин для того, чтобы разобщить и разрешить сближенные FISH-

сигналы. При конфокальной микроскопии таких ядер мы получили несколько серийных оптических срезов, из которых представлена максимально информативная проекция. Задача построения 3D-модели расположения ТП в нашей работе не ставилась. В будущем мы планируем провести 3D FISH для создания более полной картины распределения ТП в клетках сперматогенного ряда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск больших тандемных повторов в геномных сборках основывался на методике, предложенной в работе Комиссарова с соавт. [2]. ТП искали в геномной сборке свиньи S. scrofa породы Дюрок Sscrofa10.2, скаченной с сайта www.ncbi.nlm.nih.gov. Для поиска ТП использовали программу TRF (Tandem repeats finder, [10]). Параметры работы программы аналогичны тем, которые описаны в работе [2]: "mismatch" (вес несовпадения) равен 5; максимальная длина мономера равна 2 тпн, остальные значения выставлены по умолчанию. Для обработки результатов работы TRF использовали оригинальную программу, написанную на языке Python (http://github.com/DmitriiOstr/ tandem-repeat-family-finder). Программа была отредактирована, но логика программы осталась прежней и была проверена по сходимости данных.

Из результатов работы TRF удаляли вложенные повторы, а среди повторов, имеющих одинаковые координаты, оставляли только повтор с наименьшей длиной мономера. Затем оставшиеся повторы фильтровали для удаления микро- и минисателлитов, а также повторов со слишком коротким полем. Кандидатов в большие TП определяли по следующим параметрам (критериям): длина мономера больше 4 пн, длина поля больше 2 тпн, содержание GC – от 20 до 80%, информационная энтропия поля больше 1.76.

Для поиска семейств ТП сравнивали поля ТП друг с другом, используя программу BLASTN со значением параметра E-value 10e-16 и параметра DUST = "no". Затем строили граф, в котором вершинами служили поля ТП. Для полученного графа искали компоненты связности. Поля ТП, соответствующие вершинам в каждом компоненте связности графа, считали принадлежащими к одному семейству ТП. Поля с комбинированными мономерами, которые объединяли неродственные семейства, были изъяты из анализа.

Для поиска совпадений с известными повторами использовали программу BLASTN со значением E-value 10e-10 и DUST = "no". Для поиска совпадений с диспергированными повторами сравнивали поля найденных семейств ТП с повторами китообразных и парнокопытных из базы данных Repbase версии 21.01.

Зонд	Соответствует в Repbase	Последовательность
15A	SSRS2	TGCAGTGGATTTTATGCAGC
335A	SSAT	GCAAGCGTTGCTTTCCTGA
50A	SAT-1_SSc	TCGACCAGCTGTCCCGGCC
243A		AGACTGCAGGTGCTCCAGATGAGCC

Таблица 1. Последовательности зондов, использованные для постановки FISH

Для оценки содержания ТП в геноме свиньи использовали программу Bowtie2 с параметром чувствительности "local". С помощью этой программы исходные риды чтения генома выравнивали на все поля ТП. принадлежащих к одному семейству. Доля ридов (%), выравненных на поля ТП, служила оценкой содержания в геноме семейства ТП. Выравнивания проводили на риды из рана ERR173170 1, хранящиеся в архиве: http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/ERX149133. Kaчество чтения последовательностей в каждом файле проверено программой FASTQC (http:// www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) и при необходимости последовательности прочтений (ридов) обрезаны с помощью программы Trimmomatic (http://www.usadellab.org/cms/ ?page=trimmomatic).

Номенклатура тандемных повторов. Устоявшейся номенклатуры для ТП не существует, поэтому при выборе названия для новых семейств ТП мы использовали схему, предложенную ранее [2]. Название семейства ТП состоит из двух частей: в первой указывается аббревиатура видового названия животного, в геноме которого обнаружено семейство ТП, во второй части цифра указывает на размер минимального мономера (пн) среди полей ТП семейства, а следующая за ней буква используется для дифференциации семейств ТП с одинаковой длиной мономера. Видовое название не приводится в таблицах и подписях под рисунками.

Расчет коротких олигонуклеотидных зондов для метода FISH. Для FISH подобрали короткие одноцепочечные олигонуклеотидные зонды к каждому из выбранных семейств ТП. Подбор осуществляли собственной программой на языке Python со следующим алгоритмом: 1) все поля, принадлежащие к семейству ТП, выбрали из полногеномной сборки; 2) для полей рассчитывали частоты всех возможных К-меров с длиной слова (К), равной 12 [11]; 3) для создания пробы брали наиболее часто встречающиеся К-меры; 4) для подбора оптимальных праймеров увеличивали длину до 20-25 пн. Контроль качества нуклеотидов (например, отсутствие вторичной структуры) осуществляли программой Primer3. Зонды подбирали для максимально гомогенного поля, чтобы на начальном этапе охватить все возможные поля ТП. Названия зондов соответствуют названию семейств ТП.

Видовое название не приводится в таблицах и подписях под рисунками.

Получение препаратов метафазных пластинок хромосом из лимфоцитов периферической крови и препаратов из семенников хряков. Материалом для исследования служили клетки крови, полученной от свиней Sus scrofa domesticus из свинокомплексов Ленинградской области, а также семенники, полученные при кастрации хряков породы Ландрас. Эксперименты проведены в соответствии с Гарантийным регистрационным номером F18-00380 Института цитологии РАН (период действия 12.10.2017-31.10.2022) по защите животных, которых выращивают на экспериментальных фермах и используют в научных целях. Препараты метафазных хромосом для анализа получены из лейкоцитов периферической крови по стандартному протоколу, разработанному для хромосом человека [12].

Гомогенат семенников центрифугировали и отмывали фосфатным буфером, выдерживали в гипотоническом растворе (0.075 М КСІ) 20 мин и фиксировали осадок клеток смесью метанол—ук-сусная кислота в соотношении 3 : 1.

Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH). Для гибридизации использованы синтезированные олигонуклеотиды (Синтол, Бигль, Россия), модифицированные по 5'- и 3'-концам биотином. Для флуоресцентной гибридизации in situ использовали метод, разработанный для хромосом свиньи [13]. Гибридизацию проводили во влажной камере при 37°С в течение 16-18 ч. Для детекции биотина использовали стрептавилин, конъюгированный с Alexa 546 (ThermoFisher Scientific, USA), для усиления сигнала – биотинилированный антистрептавидин (Vector Laboratories, USA), затем снова стрептавидин, конъюгированный с Alеха 546; все концентрации соответствовали прописи производителя. В заключение наносили раствор антифейда Prolong Gold с флуорохромом DAPI (ThermoFisher Scientific, USA). Последовательности олигонуклеотидных зондов, использованных для FISH-анализа, представлены в табл. 1.

Препараты просматривали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LEICA TCS SP5 (ИНЦ РАН) или LEICA DM4000B (ЦКП "Хромас"). *FISH на клетках сперматогенного ряда.* Эксперименты проводили как описано в работе [14]. Ключевыми моментами являются обработка 0.2%-ным Tween-20 в PBS в течение 5 мин и выдерживание клеток на стеклах 30 мин в растворе гепарина (0.1 мг/мл), содержащем 1 мМ DTT в PBS, которые делают компактный хроматин клеток, главным образом сперматозоидов, доступным для зонда.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика ТП in silico и их картирование на метафазных хромосомах

Для поиска ТП использовали сборку генома свиньи S. scrofa (Sscrofa10.2). Значение метрики N50 контигов показывает наибольшую длину контига N, такую, что сумма длин контигов ≥N дает не менее 50% длины сборки. Величина метрики N50 и ее применимость для оценки качества сборки зависят в первую очередь от размера генома, и для геномов близких размеров значение N50 вполне может использоваться для сравнения качества сборок [15]. В базе данных значение N50 для контигов Sscrofa10.2 составляет 69474 пн. Эта же метрика N50 для сборок генома человека и мыши на порядок выше. Сборка Sscrofa10.2 является наиболее законченной сборкой по сравнению с другими сборками свиньи. В табл. 2 приведены обнаруженные ТП в убывающем порядке по значению содержания ТП в геноме.

Хромосомный набор у свиньи состоит из 18 пар аутосом (12 пар Мс-хромосом и 6 пар Асхромосом) и двух половых хромосом (Х и Ү) [16]. Окрашивание флуорохромами показало, что центромеры всех Ас-хромосом ярко окрашиваются DAPI (обогащены АТ-парами оснований ДНК), а Мс-хромосомы окрашиваются хромомицином АЗ (обогащены ГЦ-парами ДНК) [17]. Молекулярно-цитогенетическими методами на Мс-хромосомах (1-12) и Х-хромосоме было выявлено Мс1-семейство сатДНК, а на Ас-хромосомах (13-18) – семейство Ас2 [18]. Эти описанные два мажорных семейства сатДНК были обнаружены после рестрикции тотальной ДНК и последующего клонирования и картирования фрагментов Mc1 и Ac2 [18]. Mc1 cootветствует SSAT_A и SSAT_B по базе Repbase и Sscrf 335А по табл. 2, в которой названия ТП приведены в соответствии с нашей номенклатурой. Ac2 соответствует SSRS2 по Repbase и Sscrf 15A по табл. 2. Найденное ранее подсемейство Mc2 соответствует Ssat-1_Ssc, которое находится в геномной сборке на хромосомах 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11; соответствует Sscrf_50А – в табл. 2. Клонированный повтор MSAT-1_SSc считают специфичным для хромосомы 11 [19] (Sscrf 38А в табл. 2). В литературе для Мс-хромосом описаны еще несколько семейств сатДНК [20, 21]. Праймеры на основе Mc1 и Ac2 использовали для мечения центромер соответствующих групп хромосом *in situ* методом PRINS [22]. Эти сатДНК заложены в базу данных повторов Repbase [21, 23]. Из космиды был клонирован фрагмент размером ~3 тпн, который оказался специфичным для хромосомы 9 [21]. Хромосомная специфичность достигается за счет повторов высшего порядка (HOR, high order гереаts) и зонд должен быть длинным. Для мажорных ТП неудивительно наличие HOR и соответственно хромосом-специфичных вариантов [2].

Все ТП у свиньи, присутствующие в Repbase, выявляются методом, который используется в нашей лаборатории, но кроме них найдено еще 30 новых семейств ТП в сборке Sscrofa10.2. Таким образом, найдены отсутствующие в Repbase новые ТП, которые не описаны и не картированы. По набору найденных ТП свинья отличается от человека и мыши бо́льшей длиной мономеров [24].

Самым представленным повтором в геномной сборке Sscrofa10.2 является семейство Sscrf_15A. Его значительно больше (~0.6%), чем остальных семейств ТП. Это семейство ТП имеет высокую степень сходства с клонированным прицентромерным повтором SSRS2. Следующее семейство ТП Sscrf_335A (69 полей в сборке Sscrofa10.2). Это семейство обладает сходством с клонированным ранее центромерным повтором SSAT [21]. Клонированный повтор локализовали на центромере хромосомы 9, что предполагает его хромосомную специфичность за счет HOR-структуры [21], однако *in silico* мы нашли его на бо́льшем числе хромосом (табл. 2).

Из вновь выявленных повторов мы выбрали повтор Sscrf_243A, относительно богатый по содержанию GC (59%), не имеющий сходства с диспергированными повторами, но с возможной хромосомной специфичностью, определенной *in silico* на 5-й хромосоме.

Подсемейство Mc2 (SAT-1_SSc по Repbase и Sscrf 50A по табл. 2) было определено как специфичное для хромосомы 11 и дающее более слабый сигнал в центромерных районах других Мс-хромосом [19]. Поиск по геномной сборке in silico показал, что семейство Sscrf_50A присутствует на Мс-хромосомах 1, 2, 4, 5, 8, 9 и 11, хотя не на всех. In silico это семейство не обнаружено на хромосомах 3, 6, 7, 10 и 12. Семейство Sscrf 50A богато содержанием GC (65%). Это семейство имеет относительно высокое содержание в геноме (табл. 2). Для 11-й хромосомы in silico найдено специфичное для нее семейство ТП (Sscrf 38A), которое имеет одно поле. Это семейство присутствует в базе данных Repbase и обозначено MSAT-1_SSc (табл. 2).

In silico обнаружено много (31) семейств ТП, присутствующих только на одной хромосоме

Семейство ТП	Содержание в геноме, %	Количество полей, шт.	GC%	Repbase	Расположение на хромосомах <i>in silico</i>	Расположение in situ
15A	0.56625	37	44	SSRS2	12, 16, 6, 3	Цен Ас
335A	0.06963	69	47	SSAT	1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 13, 17, 18	Цен Мс, Х
50A	0.02912	23	65	SAT-1_SSc	1, 2, 4, 5, 8, 9, 11	Цен Мс, Х
1985A	0.01702	2	43	SSRS1	18	
50B	0.00309	1	55	MER41B_SS-LTR	1	
84A	0.00244	4	41		1, 2, 8, 14	
190A	0.00157	3	59	L1_SS	2, 5	
1559A	0.00101	2	50		Х	
23A	0.00088	2	49		3	
768A	0.00067	2	49		2	
39A	0.00041	2	50		4	Mc
120A	0.00033	1	63		7	
234A	0.00024	1	50		12	
63B	0.00022	2	56		14	
853A	0.00019	2	64		9	Цен Ас
366A	0.00015	1	58		14	
291A	0.00007	1	55		4	
63A	0.00006	2	52		6	
99A	0.00005	1	56		2	
37A	0.00003	1	42		5	
456A	0.00003	1	58		13	
818A	0.00002	1	54		2	
243A	0.00002	2	59		5	Цен Ас
1311A	0.00002	2	59		15	
128A	0.00001	1	51		6	
29A	0.00001	1	52		8	
30A	0.00001	1	52		18	
327A	0.00001	1	73		4	
32A	0.00001	2	43		1	
96A	0.00001	2	61		18	
82A	0	1	52		7	
28A	0	1	56		10	
141A	0	1	49		6	
38A	0	1	64	MSAT-1_SSc	11	
288A	0	1	34		9	
27A	0	1	74		13	
65A	0	1	43		5	

Таблица 2. Семейства ТП в геномной сборке Sscrofa10.2

Примечание. GC% – усредненное содержание GC в TП в процентах; сходство ТП по Repbase; позиции ТП на хромосомах, предсказанные *in silico* и выявленные *in situ*. Ас – акроцентрические хромосомы, Мс – метацентрические хромосомы, Цен – центромера. Полужирным выделены ТП, для которых проведена FISH на метафазных пластинах.



Рис. 1. Гибридизация зондов (приведены на каждой панели) на метафазных пластинках лимфоцитов свиньи. Зонд 15А дает сигналы на Ac-хромосомах, зонд 335А дает сигналы на всех хромосомах, хотя и с разной интенсивностью. 50А дает сигналы на Mc-хромосомах; зонд 243А дает сильные сигналы на Ac-хромосомах, есть более слабые сигналы на некоторых Mc-хромосомах, например на 5-й. Отмечены хромосомы 5 и 11. Масштабный отрезок 10 мкм.

(табл. 2). Семейств ТП, локализующихся исключительно на одной хромосоме *in silico*, нет всего у четырех хромосом – у двух маленьких Ас-хромосом (16 и 17), Ү-хромосомы и хромосомы 3. На Y-хромосоме не удалось обнаружить ни одного семейства больших ТП. Данные FISH на метафазных хромосомах показывают, что из использованных зондов, обнаруженных в геномной сборке на одной или нескольких хромосомах, два (Sscrf 15A и Sscrf 243А) гибридизовались в центромерном районе Ас-хромосом, один (Sscrf 335A) - на всех хромосомах и один (Sscrf_50A) - на Mc-хромосомах (рис. 1). Таким образом, данные in silico недостаточны для предсказания позиций зонда и обязательно нуждаются в экспериментальной проверке.

Центромерный ТП для свиньи не известен. В процессе анализа мы нашли повтор Sscrf 1985A, хорошо представленный в сборке и сходный с SSRS1 (табл. 2). Повтор SSRS1 по классификации Repbase не относится к сатДНК (ТП), но специфичен для Y-хромосомы. Повтор SSRS1 длиной 3832 пн выравнивается практически по всему полю повтора Sscrf 1985А (на хромосоме 18 поле этого ТП составляет 13517 пн. а на некартированном скэффолде – 9695 пн) с невысокой степенью идентичности (около 67%). Вероятно, несмотря на известную уникальную структуру ТП половых хромосом [25], этот ТП ошибочно принимали за повтор, специфичный для У-хромосомы. Sscrf 1985А может оказаться вариантом центромерного ТП, специфичного для У-хромосомы, подобно Ү-хромосомному варианту минорного центромерного сателлита мыши [26]. До экспериментальной проверки предположения мы считаем использованные в настоящей работе зонды для ТП прицентромерными.

ТП в клетках сперматогенного ряда

Для гибридизации с ДНК клеток сперматогенряда мы использовали четыре зонда ного (Sscrf 15A, Sscrf 335A, Sscrf 50A, Sscrf 243A). Теломерный зонл лает 6—16 сигналов на ялро, что говорит об ассоциации хромосом в сперматозоидах [9]. Зонд Sscrf_335А (для всех хромосом) дает тот же порядок числа сигналов. В предельном случае они слиты вместе в центре ядра в хромоцентр, но чаще распадаются на 6-10 отдельных сигналов. Группа сигналов регулярно находится в нижней части ядра (рис. 2, зонд Sscrf_335A, ряд sp). Число сигналов в сперматозоидах зависит от природы зонда, специфичного для определенного подтипа хромосом. Ас-центромеры сливаются преимущественно в один или два хромоцентра (рис. 2, зонды Sscrf 15A и Sscrf 243A, ряд sp), тогда как Мс-центромеры ассоциируют в меньшие и более многочисленные кластеры (рис. 2, зонд Sscrf 50A, ряд sp).

Зонды Sscrf_15A и Sscrf_243A (Ac) дают сходную картину – обширный сигнал на середине ядра (рис. 2, зонды Sscrf_15A и Sscrf_243A, ряд sp). Второй сигнал в верхней части ядра при использовании зонда Sscrf_243A, видимо, принадлежит Mc-хромосомам, которые выявляются этим зондом на метафазных пластинках (рис. 1, зонд Sscrf_243A). Если на метафазной пластинке зонд Sscrf_50A выявляет семь пар Mc-хромосом, то в сперматозоидах – четыре ярких сигнала в области экватора и два сигнала в верхней и нижней частях ядра, т.е. в среднем по одному сигналу на одну центромеру. Результаты FISH в целом совпадают с данными, опубликованными другими авторами [9].

Стадии сперматогенеза в процессе мейотического деления использовали, чтобы проследить, как образуется укладка хроматина сперматозоида (рис. 3, зонд Sscrf_335A). Сигнал зондов часто наблюдали в виде кольца, особенно у сперматоцитов I порядка. Кольцевые структуры наблюдали со всеми использованными зондами (рис. 2,

803



Рис. 2. Гибридизация (FISH) клеток сперматогенного ряда с зондами ТП, указанными на каждой панели. SI – ядра сперматоцитов 1-го порядка (профаза 1-го деления мейоза), SII – ядра сперматоцитов 2-го порядка, sp – сперматозоиды. Масштабный отрезок для всех изображений 10 мкм. ДНК окрашена DAPI (синий), зонд красный.

Sscrf_15A, Sscrf_50A и Sscrf_243A; рис. 3). Кольца расположены в районах, сравнительно слабо окрашенных DAPI. Кольца могут быть результатом объединения центромер разных хромосом, а

могут принадлежать каждой отдельной хромосоме. Чтобы проверить эти предположения, мы учитывали число сигналов в сперматоцитах и сперматозоидах по отношению к числу сигналов



Рис. 3. Центромеры на разных стадиях укладки, гибридизация с зондом 335А. SI – сперматоциты 1-го порядка, SII – сперматоциты 2-го порядка, sp – сперматозоиды. *I* – профаза 1-го митоза, пахитена; *2* – профаза 2-го мейоза; *3* – ряд сперматид; *4* – сперматозоиды. На панели *2* и *3* приведено черно-белое изображение хроматина ядер (окраска DAPI). Зонд к Sscrf_335А.

на метафазных пластинках (табл. 3). Число сигналов варьирует в зависимости от эффективности гибридизации, и слабые сигналы проявляются не регулярно, а общий результат числа сигналов не дает возможности отдать полное предпочтение какой-либо из двух гипотез, однако не исключает возможности того, что мы наблюдаем именно сборку отдельных центромер (табл. 3, рис. 4).

Число сигналов в сперматоцитах 1-го порядка в среднем в 2 раза меньше, чем таковое для метафазных пластинок. Сигналы Ас-хромосом (зонды Sscrf_15A и Sscrf_243A) проявляют большую тенденцию к слиянию, чем сигналы Mc-хромосом (зонд Sscrf_50A). Можно думать, что в профазе 1-го деления мейоза (2*n*) мы наблюдаем сигна-

34.9

лы отдельных хромосом (рис. 2, ряд SI), а кольцо отражает образование центромеры одной хромосомы.

Центромеры в виде двух параллельных линий (рис. 4, a''', a', a''') наблюдали при иммунофлуоресценции [27], однако изображений кольцевых образований на мейотических хромосомах нам не удалось найти в доступной литературе. Двойные кольца (рис. 4, a, a', a'') мы наблюдали чаще на стадии пахитены. Стадию пахитены определяли по морфологическим критериям состояния хроматина, когда уже произошло сближение гомологов [28]. Полагаем, что наш набор зондов, расположенных в прицентромерных районах, позволяет

8.1

0.23

_							
Зонд		Среднее число сигналов					
	метафазы (М)	сперматоциты І порядка	сперматозоиды (С)	отношение С/М			
15A	10.8	8.1	2.4	0.22			
50A	14.0	7.7	6.3	0.45			
243A	18.0	9.0	3.9	0.21			

Таблица 3. Среднее число сигналов для метафаз, клеток сперматогенного ряда и сперматозоидов

Примечание. Данные по трем независимым экспериментам. Количество обработанных ядер: метафазы — 30, клетки сперматогенного ряда и сперматозоидов — 50. Приведено отношение числа сигналов в сперматозоидах к числу сигналов на метафазах.

16.3

335A



Рис. 4. Кольцевые структуры, характерные для клеток SI сперматогенного ряда. Зонды указаны на каждой панели. Масштабный отрезок 1 мкм.

проследить как образование отдельных центромер, так и объединение гомологичных бивалентов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Два семейства прицентромерных сателлитных повторов Mc1 и Ac2 свиньи, которые ранее описаны как специфичные для Мс- и Ас-хромосом соответственно [18], при анализе геномной сборки Sscrofa10.2 биоинформатическими методами оказались менее строго распределенными по подгруппам хромосом. Для семейства ТП Sscrf_335A (гомологичное Mc1) in silico находятся поля, локализованные не только на Мс-хромосомах. но также на Ас-хромосомах 13, 17 и 18 (табл. 2). Данные о том, что это семейство повторов характерно только для Мс-хромосом, получены цитологическим методом [18], в то время как анализ in silico более чувствителен. Однако известно, что экспериментально клонированные повторы семейства Mc1 (Sscrf 335A) при мягких условиях гибридизации находили на всех хромосомах, кроме Y-хромосомы [20]. Семейство Sscrf_15A, которое гомологично Ac2, т.е. клонировано как семейство, характерное для Ac-хромосом, *in silico* обнаруживается только на одной Ac-хромосоме (16) и еще на трех Mc-хромосомах — 3, 6 и 12 (табл. 2). Это может объясняться тем, что, во-первых, возможны ошибки сборки; во-вторых, эти семейства могут быть еще более вариабельными, чем предполагалось ранее [18], и иметь дивергировавшие повторы как на Ac-, так и на Mc-хромосомах.

Наличие семейств Mc1 на Ac-хромосомах и Ac2 на Mc-хромосомах согласуется с гипотезой о недавнем происхождении Ac-хромосом свиньи [29]. Методы биоинформатики, разрешение которых выше, чем у метода FISH, свидетельствуют о расселении TП по разным типам хромосом.

Зонды Sscrf_335А и Sscrf_15А, рассчитанные по найденным *in silico* ТП, оказались похожими на использованные в других исследованиях [9, 20, 22].



Рис. 5. Объединение центромер Ас-хромосом в интерфазных специализированных клетках (клетках Сертоли). В присутствии сигнала на семи парах хромосом на метафазной пластине всегда выделяются четыре хромоцентра, но не во всех хромоцентрах присутствует сигнал. Клетки Сертоли определены по состоянию хроматина (окраска DAPI), характерного для активно синтезирующих клеток.

Наши олигонуклеотидные зонды подобраны к максимально часто встречающимся К-мерам этих семейств и, соответственно, чаще встречаются в сборке Sscrofa10.2, чем зонды, использованные в цитированных работах (Sscrf_335A/SSCSR2A (SSAT_A) соответствует 591/380; Sscrf_15A/Ac6 (SSRS2) соответствует 6391/4851). FISH с зондами, сконструированными на основании данных, полученных *in silico*, в основном согласуются с данными из литературы [9].

Организация хромосом при сперматогенезе

Организация хроматина в сперматозоидах кардинально отличается от соматических клеток, хотя слияние центромер хромосом в хромоцентрах можно наблюдать и в специализированных клетках (рис. 5). Литературные данные работ, сделанных на сперматозоидах разных видов, свидетельствуют о том, что хромосомные территории различимы в сперматозоидах и организованы неслучайным образом [4, 8]. Достигнут значительный прогресс в понимании важности организации ядра сперматозоида; известно, что нарушение этой организации ведет к нарушениям развития зиготы и снижает фертильность. В отношении клеток человека (как максимально изученного вида) пришли к выводу, что организация хромосомных территорий в лимфоцитах и сперматозоидах сходна и зависит от величины хромосомы и плотности генов в ней [30].

В сперматозоидах быка самая большая (1-я) и самая маленькая (29-я) хромосомы тяготеют к противоположным концам ядра: хромосома 1 преимущественно локализована в акросомной части, тогда как хромосома 29 находится в базальной части ядра [8]. В сперматозоидах свиньи наблюдали кластеризацию центромер в зависимости от типа хромосом [9]. Нет корреляции между величиной хромосомы и ее позицией в ядре: мамосомы 1, 6 и 13 тяготеют к внутренней части ядра [3]. На основе литературных данных можно сделать вывод, что длинные хромосомы вытянуты по длинной оси ядра – показано для хромосомы 1 [31] и хромосом 14, 15 [32-34]. Тенденцию к распределению хромосом вдоль длинной оси наблюдали в работе [35]: Мс-хромосомы 11 и 10 обнаружили ближе к верхней части ядра, а Ас-хромосому 18 и Мс-хромосому 1 — ближе к хвостовой части. Согласно работе [36], Ас-хромосома 13 занимает промежуточное положение, ближе к хвостовой части. Эти работы [35, 36] выполнены с использованием в качестве зондов бактериальных искусственных хромосом (ВАС) или хромосомных красок (отдельных сортированных хромосом, меченых с помощью DOP-праймера). Такие зонды, в отличие от использованных в настоящей работе, далеко не всегда гибридизуются с прицентромерным районом [37, 38]. Использование зондов ТП позволяет следить

ленькие хромосомы 11, 18 и Ү находят как у края,

так и внутри ядра сперматозоида, большие хро-

именно за центромерными районами и их перемещением при сперматогенезе. По литературным данным центромеры Ас-хромосом кластеризуются в один или два хромоцентра, а центромеры Мсхромосом – в более многочисленные, но и более мелкие хромоцентры [9]. Зонд, выявляющий центромеры всех хромосом в настоящей работе (Sscrf_335A), используется впервые (рис. 2). Он позволяет видеть, как центромерные районы распределяются по длине сперматозоида (рис. 3). Картина соответствует схеме, предложенной в работе [39] для сперматозоидов человека, где подчеркивается внутреннее, но не центральное, расположение центромер без тотального слияния в хромоцентр в отличие от ранее предложенной схемы [4, 40].

Зонд Sscrf 50А позволяет видеть, что при кластеризации Мс-хромосом в ядрах сперматозоидов видны шесть сигналов, что соответствует попарной кластеризации (рис. 1, рис. 2). Зонд Sscrf 243А дает два дополнительных сигнала по сравнению с зондом Sscrf 15А, дающим в среднем два сигнала. Вероятно, дополнительные сигналы от зонда Sscrf 243А по сравнению с зондом Sscrf 15A связаны с Мс-хромосомами, которые также содержат этот ТП (рис. 1). Хромосомы 5 и 11 занимают максимально периферическое положение в ядре сперматозоида у свиньи [3]. На метафазных пластинках (рис. 1) они определены по сходству с таковыми стандартного кариотипа свиньи [41]. Именно хромосома 5 (Мс) метится зондом Sscrf_243А дополнительно к набору Ас-хромосом (рис. 1). Мы планируем проверить это предположение с помощью зондов, специфичных для хромосомы 5. Зонды, полученные на основании методов биоинформатики и проверенные в настоящей работе, при гибридизации в основном подтверждают литературные данные и пригодны для дальнейшей работы.

Организация центромерного района

Не вызывает сомнения, что в основе укладки хромосом, и соответственно центромер, лежит петлевая организация [4, 28]. Прицентромерные ТП организованы в большие поля, которые, например, у мыши и человека составляют до 10% генома. Известны транскрипты ТП, обнаруженные в раннем эмбриональном развитии разных организмов [42, 43] и в клетках опухолей [1]. Для клеток подавляющего большинства высших эукариот известны лишь несколько мажорных ТП. Даже бурное развитие техник секвенирования и сборки геномов не дало алгоритмов сборки ТП. В сборках геномов большинства высших эукариот в центромерной (прицентромерной) области находится незаполненный промежуток — Golden Path Gap (GPG). Геном свиньи не является исключением, поэтому невозможно оценить истинный размер полей найденных ТП. Максимально длинное поле ТП, найденное в геномной сборке Sscrofa10.2, составляет 47744 пн для семейства Sscrf 15A, что практически соответствует экспериментальной оценке величины петель ДНК сперматозоида – 20-50 тпн [7]. Петли в районе центромеры могут быть меньше [44] и соответствовать величине даже меньшим полям ТП. Петли, выступающие за ось хромосом с торца хромосомы. выглядят как розетка [45]. Можно предполагать, что именно такие поля, организованные в виде розетки петель, мы наблюдаем в процессе организации мейотических хромосом. Это предположение может быть проверено при использовании в качестве зонда ТП строго для одной хромосомы; такие ТП по нашим предварительным данным обнаружены

у хомяков. У мыши ассоциацию как бивалентов, так и отдельных хромосом наблюдали в районе гетерохроматина [46]. Мы предполагаем использовать метод иммуноFISH, т.е. антитела против элементов синаптонемного комплекса, и зонды к ТП для того, чтобы проверить, справедливо ли это в случае двойных колец (рис. 4, Sscrf_15A, *e*, и зонд Sscrf_50A, *a*').

Некартированные на хромосомах и неаннотированные поля ТП присутствуют в контигах баз данных. Использование методов биоинформатики позволило нам выявить набор ТП в геноме свиньи домашней *S. scrofa* (объекта, важного для народного хозяйства) и определить специфичность изготовленных зондов. Мы показали следующее: 1) короткие олигонуклеотидные зонды выявляют Мс- и Ас-наборы хромосом; 2) в сперматозоидах существует характерный паттерн для каждого зонда; 3) центромерные зонды вероятно, дают возможность наблюдать сборку центромерного района.

Авторы признательны А.Ф. Сайфитдиновой и И.Л. Трофимовой за плодотворную дискуссию, И.А. Гамалей за бесценную помощь в редактировании текста статьи, а также сотрудникам ЦКП "Хромас" (С.-Петербургский университет) за методическую помощь.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (18-04-00238-мол_а), гранта Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и РНФ 19-74-20102.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Подгорная О.И., Остромышенский Д.И., Енукашвили Н.И. Кому он нужен, этот мусор, или темная материя генома // Биохимия. 2018. Т. 83. № 4. С. 610-628.
- Komissarov A.S., Gavrilova E.V., Demin S.J. et al. Tandemly repeated DNA families in the mouse genome // BMC Genomics. 2011. V. 12. № 531. P. 1–21.
- Foster H.A., Abeydeera L.R., Griffin D.K., Bridger J.M. Non-random chromosome positioning in mammalian sperm nuclei, with migration of the sex chromosomes during late spermatogenesis // J. Cell Sci. 2005. V. 116. P. 1811–1820. doi 10.1242/jcs.02301
- Zalensky A., Zalenskaya I. Organization of chromosomes in spermatozoa: an additional layer of epigenetic information? // Biochem. Soc. Transact. 2007. V. 35. № 3. P. 609–611.
- Ward W.S. Organization of sperm DNA by the nuclear matrix // Am. J. Clin. Exptl Urol. 2018. V. 6(2). P. 87–92.
- 6. Govin J., Escoffier E., Rousseaux S. et al. Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone vari-

ants during mouse spermiogenesis // J. Cell Biol. 2007. V. 176. P. 283–294. doi 10.1083/jcb.200604141

- Ward W.S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization// Mol. Human Reprod. 2010. V. 16. № 1. P. 30–36. doi 10.1093/molehr/gap080
- Chagin V., Zalensky A., Nazarov I., Mudrak O. Preferable location of chromosomes 1, 29, and X in bovine spermatozoa // AIMS Genet. 2018. V. 5(2). P. 113–123. doi 10.3934/genet.2018.2.113
- Acloque H., Bonnet-Garnier A., Mompart F. et al. Sperm nuclear architecture is locally modified in presence of a robertsonian translocation t(13;17) // PLoS One. 2013. V. 8. I. 10. P. 1–12. doi 10.1371/journal.pone.0078005
- Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences // Nucl. Acids Res. 1999. V. 27. № 2. P. 573.
- Rizk G., Lavenier D., Chikhi R. DSK: k-mer counting with very low memory usage // Bioinformatics. 2013. V. 29. № 5. P. 652–653.
- Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J. et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood // Exptl Cell Res. 1960. V. 20. P. 613–616.
- 13. *Chowdhary B.P., de la Sena C., Harbitz I. et al.* FISH on metaphase and interphase chromosomes demonstrates the physical order of the genes for GPI, CRC, and LIPE in pigs // Cytogenet. Cell Genet. 1995. V. 71. Nº 2. P. 175–178.
- Zalenskaya I., Zalensky A. Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei // Chromosome Res. 2004. V. 12(2). P. 163–173.
- 15. Earl D., Bradnam K., John J.S. et al. A competitive assessment of *de novo* short read assembly methods // Genome Research. 2011. V. 21. № 12. P. 2224–2241. doi/10.1101/gr.126599.111
- Gustavsson I. Standard karyotype of the domestic pig // Hereditas. 1988. V. 109. P. 151–157.
- Schnedl W., Abraham R., Forster M., Schweizer D. Differential fluorescent staining of porcine heterochromatin by chromomycin A3/distamycin A/DAPI and D 287/170 // Cytogenet. Cell Genet. 1981. V. 31(4). P. 249–253.
- Jantsch M., Hamilton B., Mayr B., Schweizer D. Meiotic chromosome behaviour reflects levels of sequence divergence in Sus scrofa domestica satellite DNA // Chromosoma. 1990. V. 99. P. 330–335.
- Riquet J., Mulsant P., Yerle M. et al. Sequence analysis and genetic mapping of porcine chromosome 11 centromeric S0048 marker // Cytogenet. Cell. Genet. 1996. V. 74. P. 127–132.
- Miller J. R., Hindkjaer J., Thomsen P.D. A chromosomal basis for the differential organization of a porcine centromere-specific repeat // Cytogenet. Cell. Genet. 1993. V. 62. P. 37–41.
- Janzen M.A., Buoen L.B., Zhao F., Louis C.F. Characterization of a swine chromosome-specific centromeric higher-order repeat // Mammalian Genome. 1999. V. 10. P. 579–584.
- Rogel-Gaillard C., Bourgeaux N., Save J.C. et al. Construction of a swine YAC library allowing an efficient recovery of unique and centromeric repeat sequences // Mammalian Genome. 1997. V. 8. P. 186–192.

- Akamatsu M., Chen Z., Dziuk P.J., McGraw R.A. A highly repeated sequence in the domestic pig: A gernderneutral probe // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 23. P. 10120.
- Ostromyshenskii D.I., Chernyaeva E.N., Kuznetsova I.S., Podgornaya O.I. Mouse chromocenters DNA content: sequencing and in silico analysis // BMC Genomics. 2018. V. 19. P. 159. doi.org/10.1186/s12864-018-4534-z
- O'Neill M.J., O'Neill R.J. Sex chromosome repeats tip the balance towards speciation // Mol. Ecol. 2018. P. 1–16. doi 10.1111/mec.14577
- Pertile M.D., Graham A.N., Choo K.H., Kalitsis P. Rapid evolution of mouse Y centromere repest DNA belies recent sequence stability // Genome Res. 2009. V. 19. № 12. P. 2202–2213.
- 27. *Qiao H., Chen J.K., Reynolds A. et al.* Interplay between synaptonemal complex, homologous recombination, and centromeres during mammalian meiosis // PLoS Genet. 2012. V. 8. № 6. P. 1–17. doi 10.1371/journal.pgen.1002790
- 28. *Muller H., Scolari V.F., Agier N. et al.* Characterizing meiotic chromosomes' structure and pairing using a designer sequence optimized for Hi-C // Mol. Systems Biol. 2018. V. 14. P. 1–19. doi 10.15252/msb.20188293
- 29. *Tortereau F., Servin B., Frantz L. et al.* A high density recombination map of the pig reveals a correlation between sex-specific recombination and GC content // BMC Genomics. 2012. V. 13. № 586. P. 1–12.
- 30. *Manvelyan M., Hunstig F., Bhatt S. et al.* Chromosome distribution in human sperm a 3D multicolor band-ing-study // Mol. Cytogenet. 2008. № 1. P. 25. doi 10.1186/1755-8166-1-25
- Sembon S., Fuchimoto D., Iwamoto M. et al. A simple method for producing tetraploid porcine parthenogenetic embryos // Theriogenology. 2011. V. 76. P. 598– 606. doi 10.1016/j.theriogenology.2011.03.010
- 32. Orsztynowicz M., Pawlak P., Ole D. et al. Low incidence of chromosome aberrations in spermatozoa of fertile boars // Original Res. 2011. V. 11. № 3. P. 224–235.
- Massip K., Berland H., Bonnet N. et al. Study of interand intra-individual variation of meiotic segregation patterns in t(3;15)(q27;q13) boars // Theriogenology. 2008. V. 70. P. 655–661. doi 10.1016/j.theriogenology.2008.04.026
- 34. Massip K., Bonnet N., Calgaro A. et al. Male meiotic segregation analyses of peri- and paracentric inversions in the pig species // Cytogenet. Genome Res. 2009. V. 125. P. 117–124. doi 10.1159/000227836
- Bonnet-Garnier A., Guardia S., Pinton A. et al. Analysis using sperm-FISH of a putative interchromosomal effect in boars carrying reciprocal translocations // Cytogenet. Genome Res. 2009. V. 126. P. 194–201. doi 10.1159/000245920
- Barasc H., Ferchaud S., Mary N. et al. Cytogenetic analysis of somatic and germinal cells from 38,XX/38,XY phenotypically normal boars // Theriogenology. 2013. V. XXX. P. 1–5. doi 10.1016/j.theriogenology.2013.10.006
- Telenius H., Carter N.P., Bebb C.E. et al. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer // Genomics. 1992. V. 13. P. 718–725.

- Kuznetsova I.S., Ostromyshenskii D.I., Komissarov A.S. et al. LINE related component of mouse heterochromatin and complex chromocenters' composition // Chromosome Res. 2016. V. 24(3). P. 309–323.
- 39. Ioannou D., Millan N.M., Jordan E., Tempest H.G. A new model of sperm nuclear architecture following assessment of the organization of centromeres and telomeres in three-dimensions// Nature Scientific Reports. 2017. V. 7. № 41585. P. 1–14. doi 10.1038/ srep41585
- Zalensky A.O., Allen M.J., Kobayashi A. et al. Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus // Chromosoma. 1995. V. 103. P. 577–590.
- 41. *Hansen-Melander E., Melander Y.* The karyotype of the pig // Hereditas. 1974. V. 77. P. 149–158.
- 42. Enukashvily N.I., Malashicheva A.B., Waisertreiger I.S.-R. Satellite DNA spatial localization and transcriptional activity in mouse embryonic E-14 and IOUD2 stem

cells // Cytogenet Genome Res. 2009. V. 124. P. 277– 287. doi .10.1159/000218132

- Probst A.V., Okamoto I., Casanova M. et al. A strandspecific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development // Dev. Cell. 2010. V. 19. P. 625–638. doi 10.1016/j.devcel.2010.09.002
- 44. Kuznetsova I., Podgornaya O., Ferguson-Smith M.A. High-resolution organization of mouse centromeric and pericentromeric DNA // Cytogenet. Genome Res. 2006. V. 112. P. 248–255. doi 10.1159/000089878
- 45. *Kalitsis P., Zhang T., Marshall K.M. et al.* Condensin, master organizer of the genome // Chromosome Res. 2017. P. 1–16. doi 10.1007/s10577-017-9553-0
- Berríos S., Manterola M., Prieto Z. et al. Model of chromosome associations in *Mus domesticus* spermatocytes // Biol. Res. 2010. V. 43. P. 275–295.

Genomes' Sus scrofa Tandem Repeats and Their Localization on Metaphase Spreads and in the Spermatogenic Cells

N. G. Ivanova^a, *, V. N. Stefanova^a, D. I. Ostromyshenskii^a, and O. I. Podgornaya^{a, b, c}

^aInstitute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia ^bDepartment Cytology and Histology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia ^cFar East Federal University, School of Biomedicine, Vladivostok, 690922 Russia *e-mail: Nadyaxs@gmail.com

It is possible to find large tandem repeat (TR) families in assembled contigs of any genome. In the current work TR have been found in the genome assembly of pig Duroc, species specific TR families annotated and some of them mapped to the metaphase chromosome plates by FISH with the oligo nucleotide probes counted from bioinformatic data. All the TR exist in Repbase revealed by our approach, 18 new pig TR families found in Sscrofa10.2 assembly beside known ones. The pig TR monomers are bigger than in mouse and human genomes. There are 12 pairs of sub/metacentric (Mc) and 6 pairs of of acrocentric (Ac) chromosomes among pigs' set of 18 autosomes. 15A and 243A probes found to be specific for Ac, 50A – for MC, 335A probe label all the chromosomes in centromeric region. This set of probes have been used to trace the centromeric region organization during spermatogenesis. There is specific pattern for each probe in fully formed spermatozoids. In meiotic prophase I all probes label circles, which is not found in the literature. We suppose that the probes newly developed let us footmark the centromeric region arrangement.

Keywords: tandem repeat, chromatin organization, spermFISH.