

КАРИОТИПИРОВАНИЕ АМОЕБА PROTEUS

© С. Ю. Демин, М. А. Бердиева, Ю. И. Подлипаева, А. Л. Юдин, А. В. Гудков¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

¹ электронный адрес: pelgood1@gmail.com

В статье приведен разработанный нами способ получения спрэдов митотических хромосом *Amoeba proteus* и описан процесс кариотипирования этого вида амёб. Настоящий протокол позволяет получать расправленные хромосомы с характерным рисунком хромомеров у индивидуальных хромосом. Показано, что в метафазе митоза у амёб штамма В (один из типовых штаммов *A. proteus* в Коллекции штаммов свободноживущих амёб Института цитологии РАН) содержится 27 пар хромосом. Установлено, что рисунок хромомеров является хромосомоспецифичным признаком. Представлена кариограмма изображений DAPI- и YоYо1-бэндирированных индивидуальных хромосом амёб штамма В из 5 разных спрэдов митотических клеток.

Ключевые слова: *Amoeba proteus*, митоз, хромосомы, кариотипирование.

Несмотря на более чем двухвековую историю изучения амёб, относящихся к виду *Amoeba proteus*, целый ряд ключевых моментов в биологии этих одноклеточных организмов остается нерасшифрованным. Так, все многочисленные попытки определить число хромосом этих облигатно агамных простейших, предпринимавшиеся ранее, нельзя признать удовлетворительными. До сих пор принято считать, что число хромосом *A. proteus* достигает 500 или более (Ord, 1973; Yudin, 1990; Марахова и др., 1993; Махлин, 1993), но эти данные носят лишь предположительный характер. Дело в том, что изучение кариотипа *A. proteus* вплоть до последнего времени наталкивалось на три казавшихся непреодолимыми препятствия.

Во-первых, для описания кариотипа пригодны только метафазные клетки, количество которых в асинхронной лабораторной культуре *A. proteus* весьма незначительно. Их число можно приблизительно оценить через соотношение длительности всего клеточного цикла и метафазы митоза. Клеточный цикл у амёб этого вида, культивируемых в оптимальных условиях, составляет 40–70 ч при 17–25 °С (Ord, 1968; Sopina, 1976; Makhlin et al., 1979; Rogerson, 1980; Афонькин, 1983). При этом длительность метафазы митоза, согласно данным прижизненных наблюдений, не превышает 5 мин (Chalkley, Daniel, 1933). Однако в действительности эта стадия, видимо, еще короче, поскольку на профазу, по результатам той же работы, приходится около 10 мин. Согласно нашим экспериментальным данным, соотношение профазных и метафазных клеток на цитологических препаратах *A. proteus* штамма В составляет не менее 10 : 1. Соответственно и продолжительность этих фаз митоза должна различаться примерно на порядок. Отсюда следует, что на цитологических препаратах асинхронной культуры амёб метафазные клетки не могут встречаться с частотой более 0.05 %. Понятно, что в такой ситуации помогла бы синхронизация культуры амёб по клеточному циклу, однако буквально

до недавнего времени надежных методов такой синхронизации не существовало (Yudin, 1990; Махлин, 1993).

Во-вторых, как уже упоминалось ранее в литературе (Ord, 1973; Yudin, 1990; Марахова и др., 1993; Махлин, 1993), а недавно было подтверждено данными оптической томографии (Демин и др., 2015), линейные размеры митотических хромосом в интактных клетках *A. proteus* слишком малы для проведения надежного кариотипирования.

Наконец, в-третьих, необходимым условием проведения полноценного кариотипического исследования является необходимость высокого «выхода» спрэдов митотических хромосом на предметном стекле, что на практике оказывается весьма проблематичным в силу специфических особенностей морфологии ядер и протекания ядерного цикла у *A. proteus*. В метафазе у этого вида амёб сохраняются обширные фрагменты ядерной оболочки. И хотя такой тип митоза был обозначен как полуоткрытый (Gromov, 1985), в отношении кариотипирования он мало чем отличается от закрытого митоза, для которого до настоящего времени не было разработано надежных техник спрэдинга хромосом на поверхности предметного стекла.

Настоящая работа посвящена разрешению упомянутых выше «непреодолимых» препятствий для кариотипирования *A. proteus* путем использования и адаптирования к изучаемому объекту ряда новейших методических разработок.

В 2013 г. нами был предложен новый подход к решению вопроса о синхронизации клеточных циклов амёб в культуре, позволяющий увеличить частоту встречаемости метафазных ядер на цитологических препаратах до 0.5 % (Podlipaeva et al., 2013). В настоящем исследовании мы использовали этот протокол с незначительными модификациями (см. раздел «Материал и методика»).

Линейные размеры митотических хромосом в интактных клетках *A. proteus*, как было сказано выше, слишком

малы для кариотипирования. Однако известно, что инкубация клеток позвоночных и беспозвоночных животных в гипотонических солевых растворах и спрэдинг фиксированных после гипотонии митотических клеток на поверхности предметного стекла позволяют значительно увеличить размеры хромосом. Сначала хромосомы удлиняются внутри живых клеток в ходе обработки последних гипотоническим солевым раствором (Barnitzke et al., 1981), а затем они еще удлиняются при распластывании по поверхности предметного стекла, когда фиксированные клетки подвергаются давлению (Claussen et al., 1994; Hliscs et al., 1997). На препаратах дифференциально окрашенных хромосом такого растягивания оказывается вполне достаточно для выявления их продольной неоднородности даже без дополнительных специальных обработок и окрасок (Comings, 1978; Ronne et al., 1979; Squarzozi et al., 1994).

Наконец, для удаления на цитологических препаратах амёб ядерной оболочки, которая мешает полноценному спрэдингу хромосом, мы применили метод раздавливания при высоком давлении («high pressure squashing technique»). Этот метод был исходно разработан для повышения разрешения дисковой структуры политепных хромосом двукрылых насекомых (Novikov et al., 2007; George et al., 2010) и впоследствии был успешно применен для получения спрэдов митотических хромосом из фрагментов тканей беспозвоночных животных, фиксированных после гипотонической обработки (Solovyeva et al., 2016). В последнем случае при использовании режима постепенного повышения давления происходили разрыв и удаление ядерных оболочек и в конечном итоге — спрэдинг хроматина и сегрегация индивидуальных хромосом, сопровождаемая расправлением (линеаризацией) сегрегированных хромосом с проявлением хромомерного рисунка. Рисунок хромомеров был хорошо воспроизводимым, каких-либо признаков деструкции хромосом (разломов или смазывания хромомерного рисунка) не наблюдали.

Материал и методика

Работа выполнена на клетках культуры *A. proteus* штамма В из коллекции штаммов свободноживущих амёб Института цитологии РАН (Goodkov et al., 2014). Этот штамм исторически является одним из типовых штаммов вида *A. proteus* в коллекции и всесторонне охарактеризован в большом количестве экспериментальных работ (см.: Goodkov et al., 2015). Лабораторную культуру амёб поддерживали по стандартной методике на минеральной среде Прескотта (Prescott, Carrier, 1964) при комнатной температуре; каждые 48 ч амёб кормили инфузориями *Tetrahymena pyriformis* GL (Юдин, 1975).

Синхронизацию клеток в культуре осуществляли согласно протоколу, разработанному нами ранее (Podlipayeva et al., 2013), с незначительными изменениями — вместо 30%-ного раствора белка из перепелиных яиц использовали 25 %-ный раствор бычьего сывороточного альбумина в среде Прескотта, куда помещали амёб после 2 сут голодания. В этих условиях все амёбы одновременно прекращают локомоцию, округляются и приступают к питанию пиноцитозом. Через 1—2 ч амёб отмывали и помещали в обычную минеральную среду Прескотта. Спустя 39—41 ч содержания в этой среде при комнатной тем-

пературе клетки отмывали 0.025%-ным раствором Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, США) (для предотвращения их последующей агрегации) и концентрировали в пробирках Eppendorf (1.5 мл) с помощью центрифугирования при 1500 об/мин 2 мин (микроцентрифуга Eppendorf MiniSpin, Eppendorf International). После удаления супернатанта осадок клеток встряхивали с помощью вортекса и к полученной взвеси добавляли по каплям гипотонический раствор 2.5 mM KCl в бидистиллированной воде (superQ) при постоянном встряхивании. Гипотоническую обработку клеток осуществляли при комнатной температуре в течение 20 мин при соотношении объемов клеток и гипотонического раствора 1 : (25—30). После этого клетки осаждали центрифугированием (2 мин, 1500 об/мин) и осторожно удаляли супернатант. Осадок клеток ресуспендировали с помощью вортекса и полученную взвесь фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (1 : 3), аккуратно добавляя фиксатор при постоянном встряхивании во избежание агрегации клеток. Объем фиксатора доводили до 1 мл, после чего клетки переосаждали и переводили в свежую порцию фиксатора. Пробирки с фиксированными клетками хранили в холодильнике при -20°C .

Для приготовления препаратов спрэдов ядер мы воспользовались методикой, описанной в работе Соловьевой и соавторов (Solovyeva et al., 2016). Использовали предметные стекла, покрытые полилизинном (Thermo Scientific). На поверхность стекла с помощью микропипетки наносили 40—50 мкл концентрированной взвеси клеток. Избыток фиксатора быстро убрали с помощью полоски фильтровальной бумаги. На клетки наносили 10 мкл 50%-ной пропионовой кислоты и сразу после этого накрывали покровным стеклом 18×18 мм, обработанным силиконом SL-2 (Sigma-Aldrich, США).

Клетки раздавливали с помощью вертикальных гидравлических тисков с манометром для контроля развиваемого давления. Давление между плоскопараллельными губками тисков в течение 90—120 с плавно повышали до 230 кг/см². После этого давление сбрасывали, вынимали препарат и помещали его в жидкий азот. С замороженного препарата с помощью бритвенного лезвия удаляли покровное стекло. Предметное стекло с клетками проводили через серию спиртов повышающейся концентрации (этанол 50, 70 и 96 %), а затем высушивали. Полученные препараты помещали в герметичный контейнер и хранили при -20°C .

Препараты окрашивали ДНК-тропными флуоресцирующими красителями. Использовали свежеприготовленные растворы либо бисинтеркалятора иодид YoYo1 (1 мкг/мл, Invitrogen Corporation, США) в PBS в течение 15 мин при комнатной температуре, либо DAPI (3 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США) на буфере Мак-Илвейна pH 7.0 при таких же экспозиции и температуре. Перед окрашиванием YoYo1 препараты обрабатывали РНКазой А. В некоторых случаях после обработки РНКазой А препараты дополнительно обрабатывали коллагеназой. Предобработку препаратов клеток ферментами осуществляли согласно описанным ранее протоколам (Khodyuchenko et al., 2012). Препараты инкубировали в растворе РНКазы А в 2-кратном SSC (saline-sodium citrate buffer, 100 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США) в течение 1 ч при 37°C , а затем отмывали по 5 мин в двух сменах 2-кратного SSC. Обработку препаратов раствором коллагеназы (1 мг/мл, Sigma-Aldrich, США) в PBS осуществляли в течение 7 мин при комнатной температуре и отмывали по 5 мин

в трех сменах PBS. Окрашенные препараты заключали в ProLongR Gold antifade (Invitrogen Corporation, США). Изображения хромосомных спрэдov изучали с помощью микроскопа Axio Scope A1 (Zeiss, Германия) со штатной цифровой камерой и программным обеспечением для фотосъемки. Контрастирование и необходимую обработку полученных изображений хромосом осуществляли с помощью программ ImageJ и AdobePhotoshop CS4, используя ранее опубликованные приемы (Demin et al., 2011).

Результаты и обсуждение

Обработка *A. proteus* гипотоническими растворами в традиционных для цитогенетики клеток позвоночных и беспозвоночных животных концентрациях оказалась малоэффективной. Необходимое воздействие на амёб оказывают только сильно разбавленные гипотонические растворы, приготовленные на бидистиллированной воде. При использовании растворов KCl оптимальной для кариотипирования оказалась концентрация 2.5 мМ. Кроме того,

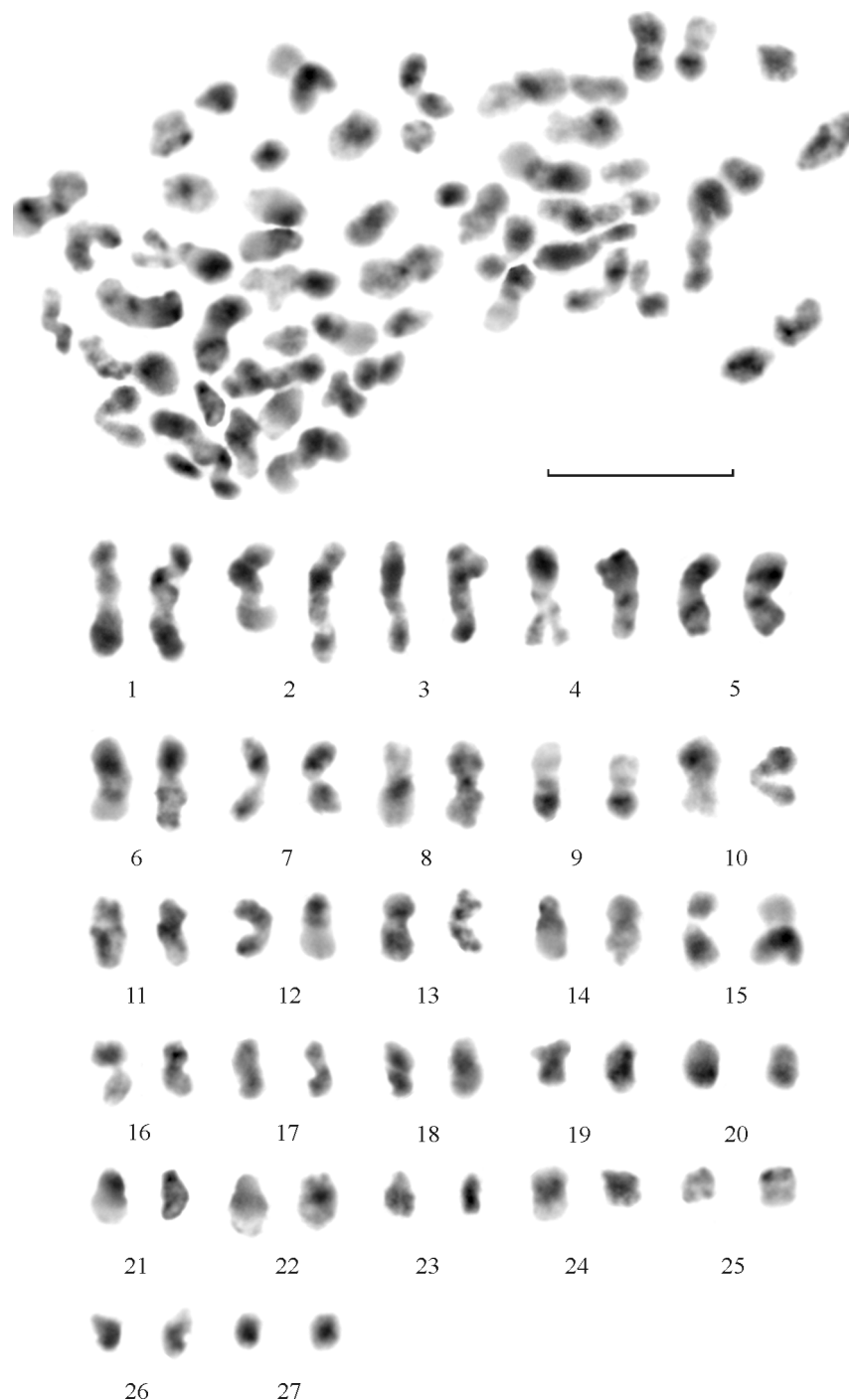


Рис. 1. Негативное изображение типичного спрэда метафазных хромосом и кариогамма *Amoeba proteus* штамма В. Цифрами отмечены номера групп индивидуальных хромосом. Окрашивание раствором YoYo1 иодида после предобработки РНКазой А. Масштабный отрезок — 10 мкм.



Рис. 2. Банк негативных изображений YоYо1- и DAPI-бэндируемых индивидуальных хромосом *Amoeba proteus* штамма В из 5 разных спрэдов митотических клеток.

Цифрами отмечены номера групп индивидуальных хромосом, *рвездочкой* — YоYо1-бэндируемые хромосомы, предобработанные РНКазой А, *решеткой* — YоYо1-бэндируемые хромосомы, предобработанные РНКазой и коллагеназой.

критичным фактором оказалось также соотношение объемов клеток и гипотонического раствора. Оптимальные результаты получаются при использовании соотношения 1 : (25—30). Отклонение от этого соотношения в ту или иную сторону приводит к ухудшению качества спрэдов хромосом — либо к излишней компактизации хроматина, либо к избыточному его разрыхлению («распушению»).

Нами было изготовлено и просмотрено несколько тысяч спрэдов ядер подвергнутых гипотонической обработке амёб. Из всего количества имевшихся на препаратах митотических ядер было найдено 5 метафазных и 18 позднепрофазных—прометафазных спрэдов хромо-

сом, пригодных для кариотипирования. Все метафазные и часть позднепрофазных—прометафазных ядер были кариотипированы.

Установлено, что базовый набор хромосом *A. proteus* штамма В составляет 27 пар хромосом, каждая пара гомологична по рисунку хромомеров (бэндов) (рис. 1). Полученные метафазные кариограммы не отличались друг от друга по числу и морфологии индивидуальных хромосом, так что представленную в настоящей работе кариограмму можно считать типовой (рис. 2).

Для дифференциального окрашивания хромосом мы использовали два ДНК-тропных флуорохрома с разными

мишенями. Краситель DAPI ассоциирует с малой бороздкой ДНК и имеет повышенное сродство к АТ-парам нуклеотидов (Karuscinski, 1995). Он дает картину дифференциального окрашивания хромосом при продольной неоднородности хромосом по распределению как АТ-богатых локусов хроматина, так и участков с умеренным содержанием АТ-пар, но резко различающихся уровнем упаковки хроматина. Краситель YoYo1 иодид относится к ДНК бисинтеркаляторам и не является нуклеотид-специфичным агентом (Rye et al., 1992). Картины дифференциального окрашивания хромосом он может дать только при наличии продольной неоднородности хромосом по упаковке хроматина. Теоретически эти красители могут давать разную картину дифференциального окрашивания хромосом, однако у *A. proteus* этого не происходит (рис. 2). Хромомерный рисунок при окрашивании этими красителями оказался очень похожим, хотя и не совсем идентичным. Это означает, что хромомеры и интерхромомеры хромосом амёбы не различаются существенным образом между собой по содержанию АТ-пар нуклеотидов. Рисунок YoYo1-окрашивания индивидуальных хромосом амёбы не выявил дополнительных бэндов по сравнению рисунком при DAPI-окрашивании, из чего следует, что в хромосомах *A. proteus* штамма В нет негативных GC-богатых бэндов.

В целом рисунок DAPI- и YoYo1-бэндирирования хромосом *A. proteus* штамма В оказался хорошо воспроизводимым. Предобработка ферментами, на наш взгляд, положительно сказывается на разрешении рисунка хромосом, особенно в случае последовательной предобработки РНКазой и коллагеназой (рис. 2).

По данным оптической томографии, размер профазных митотических ядер *A. proteus* значительно уменьшается к моменту наступления метафазы (Демин и др., 2015), что, по всей видимости, обусловлено элиминацией так называемой избыточной ДНК (см.: Афонькин, 1983; Махлин, 1987, 1993; Afon'kin, 1989) к концу профазы митоза в результате ее экстррузии из ядра (Демин и др., 2015). Иными словами, как показывают результаты настоящего исследования, к началу метафазы все «сверхштатные» хромосомы уже элиминированы из ядра амёбы. Однако еще в поздней профазе в ряде случаев могут встречаться отдельные «сверхштатные» хромосомы, имеющие рисунок хромомеров базового набора. Чаше всего, хотя и не всегда, это самые мелкие хромосомы набора.

Таким образом, результаты настоящей работы полностью подтверждают высказанную нами ранее гипотезу (Демин и др., 2015) о том, что базовое число хромосом вида *A. proteus* значительно меньше, чем было принято считать до сих пор (см.: Ord, 1973; Yudin, 1990; Марахова и др., 1993; Махлин, 1993). Не вызывает сомнения тот факт, что в ядерном цикле *A. proteus*, по крайней мере у исследованного нами штамма амёб, в обязательном порядке имеет место элиминация методом экстррузии «сверхштатных» хромосом, которая может «растягиваться» вплоть до поздней профазы митоза. Подробное описание этого явления не входит в задачу настоящей работы и будет представлено позже в рамках отдельного сообщения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-03451).

Список литературы

- Афонькин С. Ю. 1983. Содержание ДНК в ядрах разных штаммов *Amoeba proteus* по данным цитофлуориметрии. Цитология. 25 (7) : 771—776. (Afon'kin S. Yu. 1983. The maintenance of DNA in nuclei of different strains of *Amoeba proteus* according to a cytofluorimetry. Tsitologiya. 25 (7) : 771—776.)
- Демин С. Ю., Бердиева М. А., Подлипаева Ю. И., Юдин А. Л., Гудков А. В. 2015. Организация хроматина в клеточном цикле *Amoeba proteus* по данным оптической томографии. Цитология. 57 (11) : 813—822. (Demin S. Yu., Berdieva M. A., Podlipaeva Yu. I., Yudin A. L., Goodkov A. V. 2016. Optical tomography analysis of *Amoeba proteus* chromatin organization at various cell cycle stages. Cell Tissue Biol. 10 : 84—94.)
- Марахова Н. В., Сопина В. А., Скарлато С. О., Громов Д. Б. 1993. Выявление молекул ДНК хромосомного размера у *Amoeba proteus* методом электрофореза в пульсирующем поле. Докл. РАН. 330 (6) : 794—796. (Marakhova N. V., Sopina V. A., Skarlato S. O., Gromov D. B. 1993. Separation of chromosome-sized DNA from *Amoeba proteus* by transverse alternating-field electrophoresis. Dokl. RAS. 330 (6) : 794—796.)
- Махлин Е. Е. 1987. Вариабельность количества ДНК, синтезируемой в ядрах амёб *Amoeba proteus*, в клеточном цикле. Цитология. 29 (12) : 1379—1384. (Makhlin E. E. 1987. Variability of DNA quantity synthesized in *Amoeba proteus* nuclei during the cell cycle. Tsitologiya. 29 (12) : 1379—1384.)
- Махлин Е. Е. 1993. Синтез избыточной ДНК в ядрах амёб *Amoeba proteus* в клеточном цикле. Цитология. 35 (3) : 109—121. (Makhlin E. E. 1993. The extra DNA synthesis in *Amoeba proteus* nuclei during the cell cycle. Tsitologiya. 35 (3) : 109—121.)
- Юдин А. Л. 1975. Амёба. В кн.: Объекты биологии развития. М.: Наука. 5—12. (Yudin A. L. 1975. Amoeba. In: Objects of developmental biology. Moscow: Nauka. 5—12.)
- Афон'кин С. Ю. 1989. Induced and spontaneous polyploidization in large amoebae. Int. Rev. Cytol. 115 : 231—266.
- Barnitzke S., Bullerdiek J., Schloot W. 1981. Effects of hypotonic treatment on human metaphase chromosome length. Cytobios. 31 : 75—80.
- Chalkley H. W., Daniel G. E. 1933. The relation between the form of the living cell and the nuclear phases of division in *Amoeba proteus* (Leidy). Physiol. Zool. 6 : 593—619.
- Claussen U., Mazur A., Rubtsov N. 1994. Chromosomes are highly elastic and can be stretched. Cytogenet. Cell Genet. 66 : 120—125.
- Comings D. E. 1978. Mechanisms of chromosome banding and implication for chromosome structure. Ann. Rev. Genet. 12 : 25—46.
- Demin S., Pleskach N., Svetlova M., Solovyeva L. 2011. High-resolution mapping of interstitial telomeric repeats in Syrian hamster metaphase chromosomes. Cytogenet. Genome Res. 132 : 151—155.
- George P., Sharakhova M. V., Sharakhov I. V. 2010. High-resolution cytogenetic map for the African malaria vector *Anopheles gambiae*. Insect Mol. Biol. 19 : 675—682.
- Goodkov A. V., Yudin A. L., Podlipaeva Yu. I. 2014. Collection of the proteus-type amoebae at the Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences. I. History, goals and research field. Protistology. 8 (2) : 71—75.
- Goodkov A. V., Yudin A. L., Podlipaeva Yu. I. 2015. Collection of the proteus-type amoebae at the Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences. II. Index of strains and list of publications. Protistology. 9 (2) : 99—111.
- Gromov D. B. 1985. Ultrastructure of mitosis in *Amoeba proteus*. Protoplasma. 126 : 130—139.
- Hliscs R., Muhlig P., Claussen U. 1997. The spreading of metaphase is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. Cytogenet. Cell Genet. 76 : 167—171.
- Khodyuchenko T., Gaginskaya E., Krasikova A. 2012. Non-canonical Cajal bodies form in the nucleus of late stage avian oocytes lacking functional nucleolus. Histochem. Cell Biol. 138 : 57—73.

- Kapuscinski J. 1995. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech. Histochem.* 70 : 220—233.
- Makhlin E. E., Kudryavtseva M. V., Kudryavtsev B. N. 1979. Peculiarities of changes in DNA content of *Amoeba proteus* nuclei during interphase. *Exp. Cell Res.* 118 : 143—150.
- Novikov D. V., Kireev I., Belmont A. S. 2007. High-pressure treatment of polytene chromosomes improves structural resolution. *Nat. Methods.* 4 (6) : 483—485.
- Ord M. J. 1968. The synthesis of DNA through the cell cycle of *Amoeba proteus*. *J. Cell Sci.* 3 : 483—491.
- Ord M. J. 1973. Chemical mutagenesis. In: *The biology of amoeba*. New York: Acad. Press. 349—370.
- Podlipaeva Yu., Demin S., Goodkov A. 2013. New method for cell cycle synchronization in *Amoeba proteus* culture. *Protistology.* 8 (1) : 3—7.
- Prescott D. M., Carrier R. F. 1964. Experimental procedures and cultural methods for *Euplotes eurystomus* and *Amoeba proteus*. In: *Methods in cell physiology*. New York; London: Acad. Press. 1 : 85—95.
- Rogerson A. 1980. Generation times and reproductive rates of *Amoeba proteus* (Leidy) as influenced by temperature and food concentration. *Can. J. Zool.* 58 : 543—548.
- Ronne M., Andersen O., Erlandsen M. 1979. Effect of colcemid exposure and methanol acetic fixation on human metaphase structure. *Hereditas.* 90 : 195—201.
- Rye H. S., Yue S., Wemmer D. E., Quesada M. A. et al. 1992. Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications. *Nucl. Acids Res.* 20 : 2803—2812.
- Solovyeva A. I., Stefanova V. N., Podgornaya O. I., Demin S. Iu. 2016. Karyotype features of trematode *Himasthla elongata*. *Mol. Cytogenet.* 9 : 34. Doi: 10.1186/s13039-016-0246-8.
- Sopina V. A. 1976. The multiplication rate of amoebae related to the cultivation temperature. *J. Therm. Biol.* 1 : 199—204.
- Squarizoni S., Cinti C., Santi S., Valmori A., Maraldi N. 1994. Preparation of chromosome spreads for electron (TEM, SEM, STEM), light and confocal microscopy. *Chromosoma.* 103 : 381—392.
- Yudin A. L. 1990. *Amoeba* and other protozoa. In: *Animal species for developmental studies. Invertebrates*. New York; London: Consultants Bureau. 1 : 1—11.

Поступила 25 VII 2016

KARYOTYPING OF *AMOEBA PROTEUS*

S. Yu. Demin, M. A. Berdieva, Yu. I. Podlipaeva, A. L. Yudin, A. V. Goodkov¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

¹ e-mail: pelgood1@gmail.com

In this paper, the protocol which we have developed to get satisfactory spreads of *Amoeba proteus* mitotic chromosomes is presented, and the process of karyotyping of this amoeba species is described. This protocol allows obtaining of extended chromosomal with repeatable chromomeres pattern in individual chromosomes. We have shown that metaphase in «B»-strain amoebae (one of the type strains of *A. proteus* in the Amoebae Strains Collection at the Institute of Cytology) contains 27 chromosome pairs with homologous chromomeric pattern. It is ascertained that chromomeric pattern is chromosome-specific feature. The bank of images of DAPI- and YoYo1-banded metaphase chromosomes of «B»-strain of *A. proteus* is presented.

Key words: *Amoeba proteus*, mitosis, chromosomes, karyotyping.