

ИНТЕГРАЛЬНЫЙ МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ДНК В КЛЕТКЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИФРОВОЙ МИКРОФОТОГРАФИИ

© Л. В. Омелянчук,¹ В. Ф. Семешин,¹ А. Л. Алексеева,^{1,2}
И. Г. Пальчикова,³ И. Ф. Жимулев¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск,

² Новосибирский государственный университет

и ³ Конструкторско-технологический институт научного приборостроения СО РАН, Новосибирск;
электронный адрес: ome@bionet.nsc.ru

Апробирован метод оценки количества ДНК в ядрах, окрашенных по Фельгену, с помощью цифровых изображений на CCD-камерах. Измерения проводили в монохромном режиме (650×514 пикселей) с длиной световой волны 551 нм. С помощью ступенчатого ослабителя показана линейная зависимость сигнала элементов фотоматрицы от количества падающего света. Предложен способ учета бликов оптики, найдены оптимальные параметры настройки микроскопа и камеры для денситометрических измерений. Показано, что вклад в проводимые измерения собственной флуоресценции ядер, окрашенных по Фельгену, пренебрежимо мал. Денситометрическое измерение количества ДНК в клетках крови четырех видов позвоночных (*Gallus domesticus*, *Danio rerio*, *Homo sapiens* и *Rana arvalis*) показывает хорошее соответствие с данными литературы (<http://www.genomesize.com>). Точность полученных измерений сравнима с точностью данных, полученных ранее с помощью других методов цитофотометрии. Поскольку в настоящее время технические параметры CCD-камер постоянно улучшаются, предлагаемый метод количественного определения ДНК ядер имеет перспективу для развития.

Ключевые слова: цитофотометрия ДНК, цифровые изображения, пиксель, фотоматрица, клетки крови.

Принятое сокращение: CCD — Charge Coupled Device.

Цитофотометрическое определение количества ДНК в клетке с помощью реакции Фельгена является одним из фундаментальных методов цитохимии и широко используется в биологии и медицине. В основе этого метода лежит стехиометрическое связывание фуксинсернистой кислоты с альдегидными группами, возникающими в результате кислотного гидролиза оснований ДНК. Дальнейшая оценка поглощенного света окрашенными структурами позволяет судить о содержании в них ДНК. Очевидным достоинством этого метода является возможность анализа малых групп клеток, детектируемых на препаратах *in situ* (рассмотрение флуоресцентных методов количественного измерения содержания ДНК выходит за рамки настоящей работы).

Денситометрические методы определения ДНК рассмотрены ранее в монографии Агроскина и Папаяна (1977) и включают в себя метод сканирования, двух- и многоволновой методы, фотоэмульсионный и интегральный методы. В последнее время наибольшее распространение получил метод сканирования (Rash et al., 2008), как правило, использующий стандартный сканер Vickers M86. Однако высокая стоимость этих приборов делает их малодоступными для практического использования. Альтернативным и более перспективным подходом в этой области может оказаться аппаратура, использующая цифровую технику. Поскольку в настоящее время происходит

существенный прогресс в разработке CCD-камер для микроскопов, мы поставили перед собой задачу адаптировать денситометрический метод, в котором фотоэмульсионное детектирование света (или фотокатодное в интегральном методе) заменено детекцией с помощью фотоматрицы.

Материал и методика

Фиксация и обработка материала. Для отработки метода использовали клетки (мазки) крови нескольких организмов (см. таблицу), для которых известно содержание ДНК в расчете на гаплоидный набор хромосом (1С) (<http://www.genomesize.com>) и широко используется в качестве стандарта для сравнительной оценки содержания ДНК у других видов животных и растений.

Мазки крови фиксировали в смеси 96%-ного этанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1) в течение 20 мин, отмывали в трех сменах этанола и высушивали. Гидролиз ДНК проводился в 5 N HCl в течение 30 мин при комнатной температуре (Магакян и др., 1980; Rasch, 2003). Окраску препаратов по Фельгену осуществляли по стандартному протоколу: окрашивание реактивом Шиффа в течение 2 ч, отмывка в сернистых водах от 15 до 40 мин (3—8 смен), обезвоживание в серии спиртов и заключение в канадский бальзам.

Содержание ДНК в гаплоидных геномах (1С)
исследованных организмов по данным базы данных
(<http://www.genomesize.com>)

Вид	ДНК, пг	Клетки
<i>Gallus domesticus</i>	1.25	Эритроциты
<i>Danio rerio</i>	1.68—1.80	»
<i>Homo sapiens</i>	3.50	Лейкоциты
<i>Rana arvalis</i>	4.65—7.17	Эритроциты

Цитофотометрия. Для получения числовых изображений окрашенных по Фельгену ядер клеток использовали инвертированный микроскоп Axiovert-200 (Carl Zeiss, Германия) в режиме проходящего света. Эта модель микроскопа удобна тем, что дает возможность устанавливать дополнительные светофильтры между осветителем и конденсором. Заметим, что установка фильтров в другие участки оптического пути приводит к усилению «паразитной» засветки (блика оптики), что негативно влияет на количественные измерения. Цифровые изображения получали, используя объектив Achroplan 20× с апертурой 0.40. Измерения проводили при максимально закрытых полевой и апертурной диафрагмах, используя интерференционный светофильтр, пропускающий свет с длиной волны 551 ± 10 нм. Поскольку из-за наличия локальных изменений показателя преломления внутри фотометрируемого объема возникают эффекты преломления, отражения и рассеяния, изменяющие первоначальное направление светового пучка, апертура конденсора должна быть меньше апертуры объектива в 2—3 раза (Агроскин, Папаян, 1997).

Цифровое изображение получали с помощью камеры AxioCam MRc (Carl Zeiss, Германия) в монохромном режиме 650×514 пикселей в 8-битовом динамическом диапазоне. Освещение объекта и экспозицию фотосъемки подбирали таким образом, чтобы максимальный сигнал фотоячейки не превышал 100 единиц яркости пикселя (в 8-битовом режиме максимальный сигнал равен 225). Это позволяет избежать искажений интенсивности пикселей, которые сопровождают процедуру превращения сигнала фотоячеек в изображения (о зависимости освещенности/сигнал для фотоматрицы AxioCam MRc см. ниже).

«Паразитная» засветка (блик) существенно искажает результаты измерений (Агроскин, Папаян, 1997). Для ее устранения применили следующий прием. Капли китайской туши наносили на предметное стекло, высушивали и выбирали высохшее пятно, которое не пропускало свет при максимально возможном для микроскопа освещении. Далее материал соскабливали и измельчали таким образом, чтобы кусочки туши оставались плоскими. Поскольку при таком способе измельчения кусочки разламываются в направлении, перпендикулярном плоскости пятна, это дает гарантию их непрозрачности. Далее полученный материал заключали в канадский бальзам. На препарате находили кусочек китайской туши (контрольный объект), размеры которого несколько превышали размеры фотометрируемых ядер, и фотографировали его в тех же условиях, что и ядра (изображение 1). С помощью предметного столика ядра помещали в ту часть поля зрения микроскопа, в котором ранее был снят контрольный объект (изображение 2).

Обработку изображений осуществляли следующим образом. 1. Интенсивности пикселей изображения 1 по пиксельно вычитали из интенсивности пикселей изобра-

жений фотометрируемого ядра (изображения 2), получая изображение 3. 2. На цифровых изображениях ядер (изображении 3) с вычтенным бликом выделяли субимидж собственно ядра и субимидж прозрачного участка, расположенного рядом с ним. Последний использовали для определения интенсивности падающего света при помощи суммирования интенсивности пикселей и деления этой величины на общее количество пикселей. Интенсивность каждого пикселя субимиджа собственно ядра нормировали на среднюю интенсивность падающего света. Полученная таким образом цифровая матрица состоит из чисел, отражающих коэффициент пропускания (τ) света участками ядра. 3. Оптическую плотность для каждой элементарной сканируемой площадки вычисляли по формуле $D = -\lg \tau$ (согласно закону Бугера—Ламберта—Бэра). 4. В методе сканирования содержание ДНК в ядре считается пропорциональным сумме оптических плотностей элементарных сканируемых площадок (Агроскин, Папаян, 1997, с.160, формула V.1). Исходя из этого в качестве меры содержания ДНК в ядре использовали сумму логарифмов матрицы коэффициентов пропускания, взятую с обратным знаком.

Результаты и обсуждение

Оптимальные параметры получения цифровых изображений. Параметры получения цифровых изображений существенно влияют на точность измерений. Мы провели сравнительное исследование, в котором съемку одних и тех же ядер осуществляли в различных режимах, и полученные данные о содержании ДНК сравнивали с данными из литературы. В использованной нами фотокамере максимальное разрешение 1300×1030 пикселей реализуется путем числовых аппроксимаций. Поэтому мы использовали разрешение камеры 650×514 , которое достигается без аппроксимаций. В этом режиме элементарным фоторегистрирующим элементом является каждая ячейка фотоматрицы. В наших экспериментах применение линзы промежуточного увеличения $2.5 \times$ (для просцирования промежуточного изображения на цифровую камеру) и объединение сигналов с 4 ячеек (бининг 2×2) привели к уменьшению дисперсии измерений содержания ДНК в ядрах. Вероятно, введение промежуточного увеличения и бининг фотоматрицы приводят к простому улучшению соотношения сигнал/шум в наших экспериментах. Однако нельзя полностью исключить, что введение этих факторов способствовало минимизации так называемой ошибки распределения, возникающей вследствие различной компоновки поглощающего вещества в фотометрируемом объеме (Агроскин, Папаян, 1997).

Блик оптики. «Паразитная» засветка, возникающая вследствие рассеяния света на оптике, приводит к искажению результатов измерений. Мы использовали метод фотометрирования непрозрачных частиц (Агроскин, Папаян, 1997) для оценки блика в наших экспериментах. Поскольку цифровые фотографии были получены в режиме с максимальной интенсивностью пикселя, равной 100, интенсивность пикселей непрозрачных объектов (уровень блика) оказалась равной величине порядка 10. Таким образом, вклад «паразитной» засветки не является пренебрежимо малым. В разделе «Материал и методика» приведен примененный нами способ количественного учета эффекта «паразитной» засветки.

Собственная флуоресценция. Как известно, ДНК, окрашенная по Фельгену, флуоресцирует (Chieso, Derenzini, 1999). При возбуждении светом длиной волны 442 нм спектр флуоресценции такой ДНК лежит в пределах 580—680 нм (Berns, 1979). Для того чтобы понять, может ли эта флуоресценция искажать результаты денситометрических измерений, был поставлен следующий эксперимент. Изображение окрашенного ядра, полученное с помощью объектива 40×, фотографировали в следующих трех режимах: 1) интерференционные фильтры 610 и 617 нм расположены в системе конденсора; 2) фильтр 610 нм расположен в системе конденсора, а фильтр 617 нм — после объектива; 3) фильтр 617 нм расположен в системе конденсора, а фильтр 610 нм — после объектива. Поскольку флуоресценция может возникать только в случае, когда возбуждение проводится в более коротковолновой области спектра, чем детектируемый свет, в режиме 3 возбуждение флуоресценции исключено. На изображениях определяли среднюю интенсивность пикселей на ядре, которая для использованных схем опыта составила 62.40, 62.75 и 62.70 соответственно. Таким образом, в используемой нами схеме денситометрических измерений вклад собственной флуоресценции ДНК, окрашенной реактивом Шиффа, является пренебрежимо малым. Различия в интенсивностях изображений ядра в описанных схемах опытов объясняются разницей бликов оптики при установке фильтров в оптическую систему.

Линейная зависимость сигнала фотоячейки от количества падающего света. Фотоматериалы, которые ранее использовали для денситометрического определения количества ДНК в ядрах, характеризуются нелинейной зависимостью почернения фотослоя

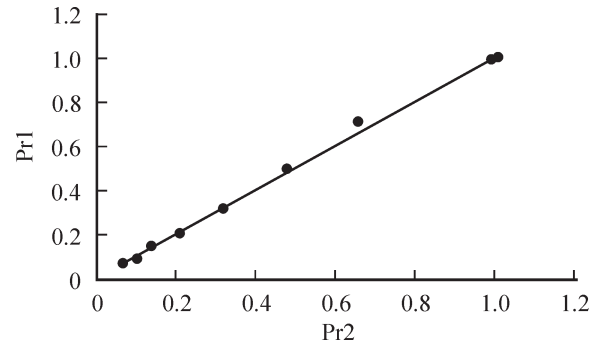


Рис. 1. Зависимость величины сигнала, регистрируемого фотоматрицей (Pr1), от количества света, прошедшего через различные ступени стандартного ступенчатого ослабителя (Pr2).

от логарифма количества лучистой энергии, достигшей фотослоя (Агроскин, Папаян, 1977). Цифровое фотографирование с помощью фотоматрицы основано на принципиально другом способе получения изображений. Мы охарактеризовали свойства используемой фотоматрицы в режиме освещения, использованного нами в денситометрических экспериментах, с помощью ступенчатого ослабителя. Для этого вместо препарата брали ступенчатый ослабитель, имеющий ступени с пропусканием 100, 70.79, 50.12, 31.62, 19.95, 14.8, 8.91, 6.31 и 100 % соответственно. На изображениях ступеней ослабителя выделяли область, в которой в дальнейшем осуществляли денситометрические измерения и определяли среднюю интенсивность пикселя. Среднюю интенсивность пикселя на первой и девятой ступенях приняли за единицу и определили относительные пропускания ступеней.

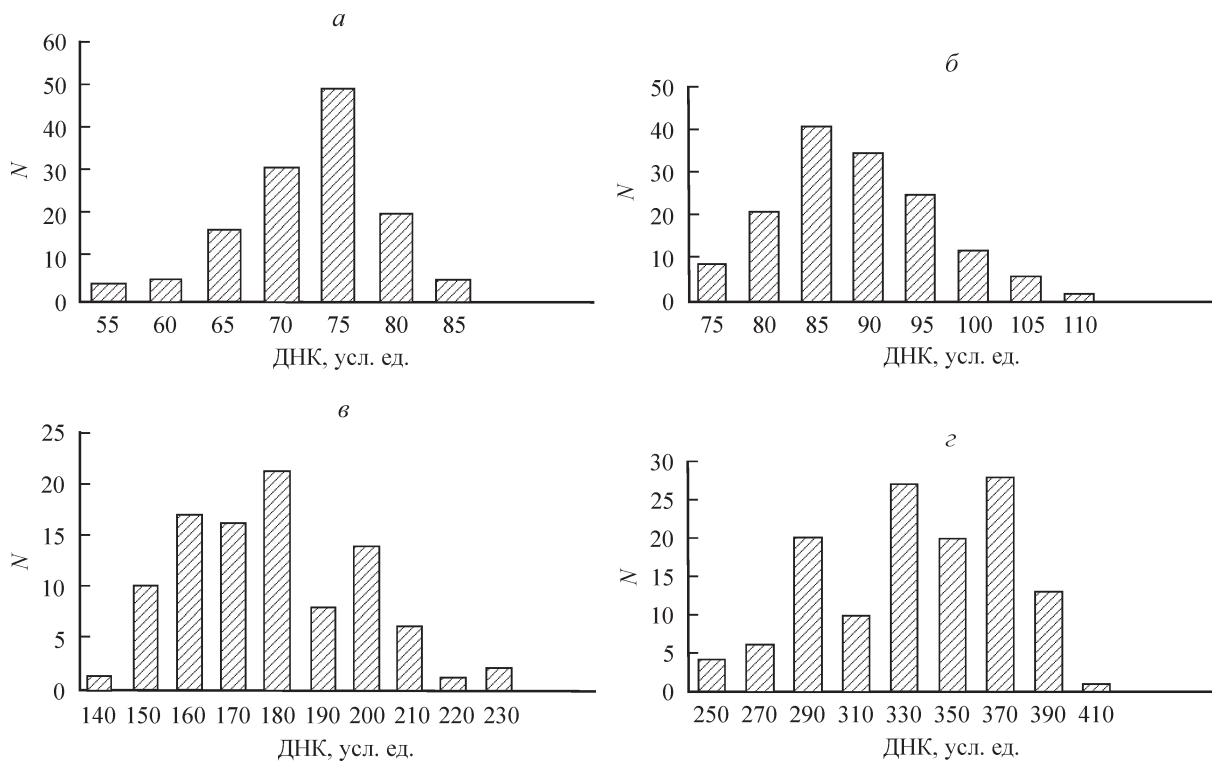


Рис. 2. Результаты денситометрических измерений содержания ДНК в индивидуальных ядрах неделящихся клеток крови.

По горизонтали — содержание ДНК, усл. ед.; по вертикали — число ядер, N . а — *Gallus domesticus* ($n = 131, m = 73.60 \pm 0.57$), б — *Danio rerio* ($n = 152, m = 90.70 \pm 0.62$), в — *Homo sapiens* ($n = 97, m = 183.4 \pm 2.1$), г — *Rana arvalis* ($n = 135, m = 374.5 \pm 4.1$), где n — общее число проанализированных ядер, m — среднее содержание ДНК в ядре.

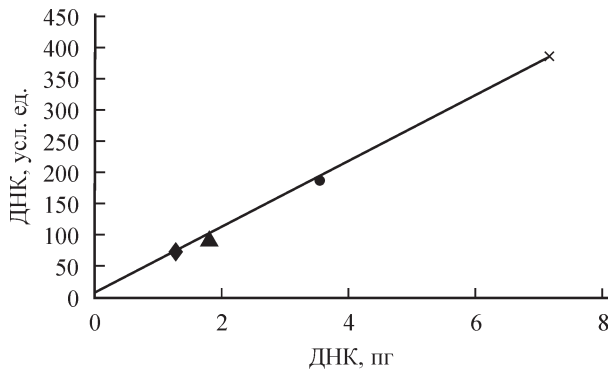


Рис. 3. Зависимость между измеренным содержанием ДНК в клетках крови (усл. ед.; по данным рис. 2) и содержанием ДНК, известным из литературы (пг на 1 клетку; см. таблицу).

Ромб — *Gallus domesticus*, треугольник — *Danio rerio*, кружок — *Homo sapiens*, крестик — *Rana arvalis*.

На рис. 1 изображен график зависимости пропускания ступеней ослабителя Pr1 (экспериментальные данные) от величины стандартного пропускания ступеней ослабителя Pr2, что указано в паспорте прибора. На этом рисунке приведена линейная зависимость ($Pr1 = k \cdot Pr2$, где $k = 0.98$), подобранная к экспериментальным точкам с помощью метода наименьших квадратов. В области малых пропусканий график описывается линейной зависимостью. Отклонение от линейности в области больших пропусканий не превышает 10 % от величины пропускания.

Денситометрические измерения ДНК в клетках крови. Для экспериментальной проверки предлагаемого метода мы провели две независимые окраски клеток крови четырех организмов с известным геномным содержанием ДНК. На рис. 2, а–г приведены суммарные гистограммы, отражающие распределение ДНК в ядрах по данным измерений с помощью цифровых имиджей в усл. ед. Можно видеть, что варьирование полученных значений в индивидуальных ядрах составляет приблизительно 10 % от средних величин.

На рис. 3 приведен график зависимости между измеренными (рис. 2) средними значениями содержания ДНК в клетке (в усл. ед.) и известными (в пг на 1 клетку) из литературы (см. таблицу). Зависимость между этими величинами имеет линейный характер, а наклонная прямая пересекает ось ординат в точке менее 10 усл. ед. Такая величина примерно соответствует варьированию сигналов фона наших препаратов (см. раздел «Материал и методика») и представляет собой естественную ошибку измерений, возникающую вследствие остаточной окраски цитоплазмы. В пользу такого заключения свидетельствуют данные, полученные при уменьшении продолжительности отмывки препаратов в сернистых водах: сокращение отмывки до 20 мин приводит к заметному увеличению фоновых значений (до 30 усл. ед.).

Область применения метода. Предлагаемый нами денситометрический метод определения количества ДНК обладает точностью измерений, сходной с точностью описанных ранее приборов и процедур. Особенность нашего метода состоит в том, что он реализован на основе микроскопа и цифровой камеры, обычно применяемых в других биологических исследованиях и входящих в оснащение многих лабораторий. Использование рассмотренных параметров настройки микроскопа, цифровой камеры, интерференционного фильтра в максимуме поглощения красителя Фельгена и предлагаемого способа учета блика позволяет осуществлять денситометрические измерения без закупки дополнительного оборудования. Технические параметры цифровых камер в настоящее время постоянно улучшаются. Увеличиваются возможности денситометрических измерений с использованием цифровых камер. Действительно, как мы видели в наших экспериментах, бининг фотоматрицы и внутреннее не связанное с объективом увеличение улучшают качество получаемых результатов. Это означает, что для денситометрии будут оптимальными цифровые камеры с меньшим физическим размером фоточувствительных элементов, но с более низким уровнем собственных шумов. В рамках предлагаемого метода можно оценить качество окраски реактивом Шиффа, оптимизируя продолжительность процедуры отмывки непрореагировавшего красителя. Предлагаемый метод может быть использован для оценки качества окраски и последующего определения количества ДНК в ядрах более точными методами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 37 и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-08-00651).

Список литературы

- Агроскин Л. С., Папаян Т. В. 1997. Цитофотометрия. Л.: Наука. 295 с.
- Магакян Ю. А., Каралова Е. М., Хачикян Р. Э., Аветисян А. С. 1980. Влияние температуры гидролизующего раствора, концентрации кислоты и продолжительности гидролиза на интенсивность реакции Фельгена. Цитология. 12(9): 1054—1065.
- Berns M. W. 1979. Fluorescence analysis of cells using a laser light source. Cells Biophysics. 1: 1—13.
- Chieco P., Derenzini M. 1999. The Feulgen reaction 75 years on histochem. Cell Biol. 111: 345—358.
- Rasch E.M. 2003. Feulgen-DNA cytophotometry for estimating C-values. In: Drosophila cytogenetics protocols. Methods in molecular biology. Totowa, New York: Humana Press. 247: 163—201.
- Rasch E. M., Wyngaard G. A., Connelly B. A. 2008. Heterochromatin endoreduplication prior to gametogenesis and chromatin diminution during early embryogenesis in *Mesocyclops edax* (Copepoda: Crustacea). J. Morphol. 269: 387—397.

Поступила 2 XI 2009

AN INTEGRAL METHOD FOR QUANTITATIVE CELL DNA CONTENT MEASUREMENTS
BY DIGITAL MICROPHOTOGRAPHY

L. V. Omelyanchuk,¹ V. F. Semeshin,¹ A. L. Alekseeva,^{1,2}
I. G. Palchikova,³ I. F. Zhimulev¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk,

² Novosibirsk State University and

³ Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering SB RAS, Novosibirsk;
e-mail: ome@bionet.nsc.ru

Quantitative nuclei DNA content measurement based on Feulgen reaction and the analysis of CCD images was tested. The measurements were performed in monochrome CCD option (650 × 514 pixels) with the wavelength 551 nm. The linear dependence of photomatrix elements signals on the falling light was shown with the use of multigraded light absorption filter. The optimal microscope and camera setting and an approach for elimination of the optic blur were found. We have shown that the proper Feulgen fluorescence does not affect our measurements. Densitometric DNA content measurements of blood cells of four vertebrate species (*Gallus domesticus*, *Danio rerio*, *Homo sapiens* and *Rana arvalis*) showed good consistence to the literature data (<http://www.genomesize.com>). The precision of our approach is comparable to the other known methods. Current improvement of CCD technical parameters and wide usage of CCD cameras in biological applications gives perspectives for the suggested approach.

Key words: DNA cytometry, digital images, pixel, photomatrix, blood cells.