

СОДЕРЖАНИЕ ДНК В ЯДРАХ *CYCLOPS KOLENSIS* И *C. INSIGNIS* (CRUSTACEA, COPEPODA)

© В. Ф. Семешин,¹ Л. В. Омелянчук,¹ А. Л. Алексеева,^{1,2} Е. А. Иванкина,¹
Н. Г. Шевелева,³ И. Ф. Жимулев¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск,
²Новосибирский государственный университет и ³Лимнологический институт СО РАН, Иркутск;
¹электронный адрес: semeshin@mcb.nsc.ru

С помощью статической цифровой фельгеновской цитофотометрии изучали диминуцию хроматина (ДХ) у двух видов циклопов: *Cyclops kolensis* и *C. insignis*. Содержание ДНК (в пг на 1 клетку) оценивали по калибровочным зависимостям, построенным для клеток крови 5 организмов с известным содержанием ДНК в диапазоне 1.25—14.70 пг. Согласно полученным данным, диплоидный геном *C. kolensis* содержит около 40 пг ДНК до ДХ и 1.8—2.0 пг ДНК после ДХ. Эти значения сходны для двух изученных популяций *C. kolensis* (московской и байкальской) и в 6—10 раз превышают оценки, известные из литературы (Гришанин, 2008). ДХ у *C. kolensis* достигает 94—96 %. У *C. insignis* содержание ДНК в митотически делящихся клетках как ранних, так и поздних эмбрионов составляло около 7.5 пг, при этом ДХ для этого вида не выявлена. Проведенный анализ показывает, что доминирующий геном *C. kolensis* обладает максимальным содержанием ДНК среди изученных циклопид.

Ключевые слова: диминуция хроматина, цитофотометрия ДНК.

Принятые сокращения: ДХ — диминуция хроматина, CCD — Charge Coupled Device.

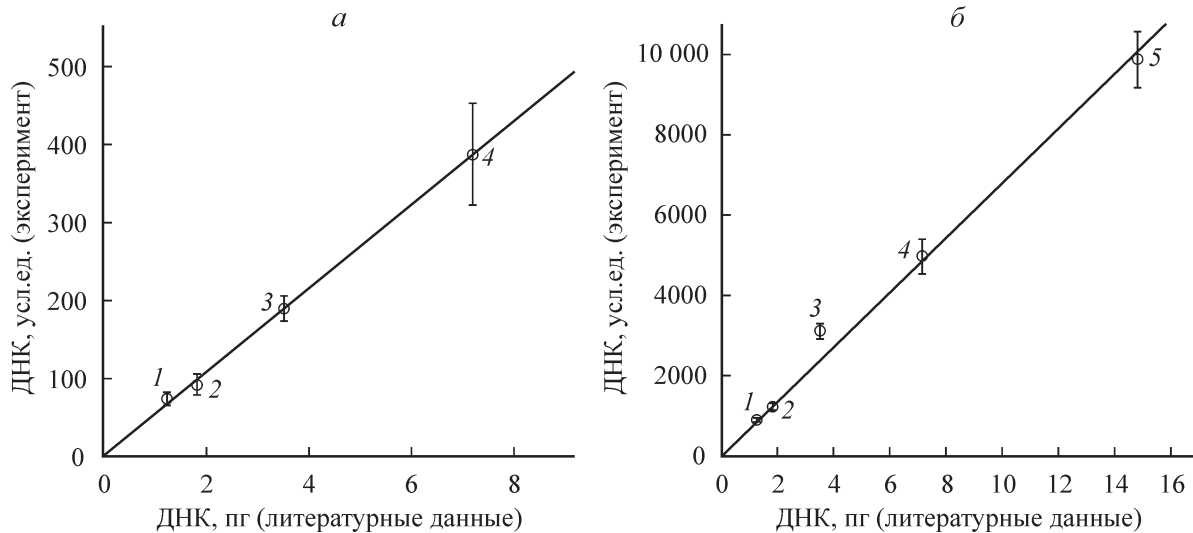
Диминуция хроматина (ДХ) — потеря части геномной ДНК в ходе эмбрионального развития организма — процесс малоизученный. У эукариот ДХ обнаружена лишь у нескольких десятков видов, к которым, в частности, относятся пресноводные ракообразные. В настоящее время наиболее изученным является представитель подкласса Copepoda — *Cyclops kolensis*, у которого на стадии 4 деления дробящегося яйца теряется около 95 % ДНК (Гришанин и др., 1994, 1996, 2006а, 2006б). Такое преобразование генома свидетельствует о том, что весьма существенная его часть не является необходимой для нормального функционирования взрослого организма. Процесс ДХ у циклопов сопровождается формированием многочисленных гранул элиминируемой ДНК, при этом число хромосом остается постоянным. Для понимания механизмов диминуции необходимо прежде всего оценить распространенность этого явления в природе, наличие или отсутствие ДХ у близкородственных видов или в географически изолированных популяциях одних и тех же видов, что в случае ракообразных может быть использовано для установления их филогенетических отношений. В качестве объектов для этих исследований могут быть использованы представители подкласса Copepoda, у которых процесс ДХ возможно зарегистрировать путем анализа содержания ДНК в клетках зародышевой (до ДХ) и соматической (после ДХ) линий.

В яйцевых мешках самок циклопов, где происходит ДХ, содержится несколько десятков зародышей, это существенно ограничивает их массовый анализ и делает статическую цитометрию единственным методом, при-

годным для такого рода исследований. Ранее мы сообщали (Омелянчук и др., 2010) об успешном применении для цитометрических измерений цифровой техники с использованием CCD-камер в модельных экспериментах. В данной работе мы применили этот метод для определения содержания ДНК в ядрах клеток *C. kolensis* и *C. insignis*, находящихся на стадиях до и после ДХ.

Материал и методика

Сбор самок циклопов (*C. kolensis* и *C. insignis*) с яйцевыми мешками проводили в апреле 2009 и 2010 гг. в Марьинском пруду на Воробьевых горах, г. Москва, и в августе 2009 г. в прибрежной части озера Байкал вблизи стационара Лимнологического института, г. Иркутск, в поселке Большие Коты (*C. kolensis*). Самок с развитыми яйцевыми мешками фиксировали в смеси этанол : уксусная кислота (3 : 1) в течение 20 мин на льду, отмывали дважды в 96%-ном этаноле и хранили в 70%-ном спирте на холоде до использования. Фиксированные яйцевые мешки отделяли иглой от тела самки циклопа и отмывали от спирта в воде (2 раза по 5 мин), помещали на предметное стекло и разделяли их на икринки в капле 45%-ной уксусной кислоты. Препарат накрывали покровным стеклом (не раздавливая), скальвали покровное стекло после замораживания в жидком азоте, промывали в двух сменах 96%-ного этанола и высушивали. Процедуру окраски по Фельгену проводили по стандартному методу (Rash, 2003) строго одновременно, включая 20—35 препаратов в



Калибровочные зависимости, построенные по содержанию ДНК в ядрах клеток крови.

По оси абсцисс — содержание ДНК по данным литературы (<http://www.genomesize.com>); по оси ординат — измеренное в эксперименте содержание ДНК. Использовали микроскопы Axiovert (а) и Leica (б). Точки: 1 — *Gallus domesticus*, 2 — *Danio rerio*, 3 — *Homo sapiens*, 4 — *Rana arvalis*, 5 — *Pleurodeles waltl*. Вертикальные отрезки — среднее квадратичное отклонение.

каждой серии. После гидролиза в 5 N HCl в течение 30 мин при комнатной температуре препараты окрашивали реактивом Шиффа в течение 2 ч, промывали в сернистых водах (8 смен по 5 мин), обезвоживали в серии спиртов и заключали в канадский бальзам. В каждую процедуру окрашивания включали препараты мазков крови нескольких организмов (так называемые стандарты), для которых из данных литературы известно содержание ДНК в расчете на гаплоидный набор хромосом (табл. 1). Дальнейшие цитофотометрические измерения и обработку цифровых изображений проводили, как описано ранее (Омелянчук и др., 2010), используя инвертированный микроскоп Axiovert-200 (Carl Zeiss, Германия, об. 20×) и прямой микроскоп DM-4000 (Leica, Германия, об. 40×) в режиме проходящего света. Измерения на микроскопе фирмы Leica позволяли получать изображения с 12-битовой дигитализацией интенсивности пикселя (в случае Axiovert получать изображения можно было только с 8-битовой дигитализацией).

Результаты и обсуждение

Для оценки относительного содержания ДНК в ядрах клеток циклопов мы проводили анализ калибровочных кривых, построенных для клеток крови пяти организмов (табл. 1). Линейная зависимость средних значений измеренного нами содержания ДНК в клетках крови (усл. ед.) и данных из литературы (<http://www.genomesize.com>) для каждой серии (всего их было 6) оптимальным образом (метод хи-квадрат) аппроксимирует полученные экспериментальные данные (см. рисунок).

На рисунке, а, б приведены калибровочные графики для экспериментов, выполненных на микроскопах Axiovert-200 и DM-4000. Можно видеть, что разброс средних значений содержания ДНК в ядрах использованных организмов на рисунке, а больше разброса данных, приведенных на рисунке, б. Мы связываем это с тем, что использованные параметры получения имиджей во втором случае оказались более точными для цитометрических измере-

ний. Особенно важно, что разброс значений у лягушки *Rana arvalis* (см. рисунок, б) существенно меньше, чем в предыдущем эксперименте (см. рисунок, а). Таким образом, совершенствование оптической схемы регистрации изображений действительно улучшает результаты.

Из представленных графиков видно, что наименьший разброс экспериментальных значений наблюдался для *Gallus domesticus*, *Danio rerio* и *Homo sapiens* и наибольший — для представителей класса Amphibia — *R. arvalis* и *Pleurodeles waltl*. Поэтому в дальнейших оценках абсолютного содержания ДНК мы использовали средние значения ДНК в эритроцитах *G. domesticus*.

Следует отметить, что при построении калибровочных кривых (всего было проведено 8 экспериментов) мы использовали лишь те из них, которые с наибольшей точностью пересекали точку начала координат, считая эти данные наиболее надежными. Отклонения от нулевой точки могут возникать при уменьшении времени отмывки препаратов в сернистых водах (например, в случае проведения этой процедуры в течение 20 мин по стандартному протоколу вместо 40 мин, применяемых нами).

Результаты измерений содержания ДНК в ядрах клеток *C. kolensis* представлены в табл. 2. Наиболее качественные калибровочные данные по клеткам крови были

Таблица 1

Содержание ДНК в гаплоидных геномах (1С, пг) исследованных организмов

Вид	ДНК, пг (1С)	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
<i>Pleurodeles waltl</i>	14.77—25.63	»

Примечание. Использованы известные данные: <http://www.genomesize.com>.

Т а б л и ц а 2

Количество ДНК (пг) в клетках *Cyclops kolensis* и *C. insignis*

Номер эксперимента, популяция (поп.) ^а	Додиминуционное развитие			Постдодиминуционное развитие		Элиминируемая ДНК, %
	анафаза (А, 2С)	метафаза (М, 4С)	направительные тельца (1С)	поздние эмбрионы (2С)	ноги имаго (2С)	
1. <i>C. kolensis</i> , московская поп. (Axiovert-200)	39.9 $\sigma = 3.5$ $n = 28$	80.8 $n = 1$	21.2 $\sigma = 1.27$ $n = 23$		1.82 $\sigma = 0.24$ $n = 18$	95.4—95.7
2. <i>C. kolensis</i> , московская поп. (Axiovert-200)	41.5 $\sigma = 3.6$ $n = 69$	84.8 $\sigma = 8.3$ $n = 44$			1.98 $\sigma = 0.18$ $n = 14$	95.2—95.3
3. <i>C. kolensis</i> , московская поп. (DM-4000)	40.6 $\sigma = 3.6$ $n = 38$	80.9 $\sigma = 6.9$ $n = 177$	20.6 $\sigma = 2.8$ $n = 28$	1.6 $\sigma = 0.12$ $n = 13$	1.77 $\sigma = 0.17$ $n = 38$	95.6—96.1
4. <i>C. kolensis</i> , байкальская поп. (Axiovert-200)	40.7 $\sigma = 3.4$ $n = 3$	85.6 $\sigma = 10.8$ $n = 49$		1.66 $\sigma = 0.36$ $n = 24$	1.52 $\sigma = 0.28$ $n = 50$	96.1—96.4
5. <i>C. kolensis</i> , байкальская поп. (Axiovert-200)		106.5 $\sigma = 15.1$ $n = 8$	18.9 $\sigma = 4.0$ $n = 7$	2.02 $\sigma = 0.45$ $n = 43$	2.08 $\sigma = 0.43$ $n = 50$	96.2
6. <i>C. insignis</i> , московская поп. (DM-4000)	7.5 $\sigma = 0.46$ $n = 51$	14.9 $\sigma = 1.04$ $n = 120$	3.7 $\sigma = 0.44$ $n = 19$	Анафаза 7.4 $\sigma = 0.34$ $n = 30$ Метафаза 14.2 $\sigma = 1.0$ $n = 50$	6.81 $\sigma = 0.36$ $n = 74$	Отсутствует

Примечание. ^а В скобках указан использованный микроскоп. n — число ядер в выборке, σ — стандартное отклонение измеренного количества ДНК в выборке.

получены в первых трех экспериментах (московская популяция циклопов). Для *C. kolensis* в этих экспериментальных сериях (эксперименты 1 и 2, табл. 2) были найдены и измерены анафазы (А) и метафазы (М), соотношение содержания ДНК в которых может служить внутренним контролем качества измерений. Из полученных результатов видно, что в первой серии измерений соотношение М/А (80.8/39.9) составляет 2.03 вместо ожидаемого 2. Таким образом, варьирование содержания ДНК между этими двумя средними значениями будет составлять $(2.03 - 2) / 2 \cdot 100 = 1.5\%$. Во второй экспериментальной серии соотношение М/А = 84.8/41.5 = 2.04. Различие между ними составляет $(2.04 - 2) / 2 \cdot 100 = 2\%$. Варьирование содержания ДНК в анафазе между двумя экспериментальными сериями составляет $(41.5 - 39.9) / 40.7 \cdot 100 = 4\%$, а в метафазе — $(84.8 - 80.9) / 82.8 \cdot 100 = 5\%$. Такая точность удовлетворяет проводимым нами измерениям.

В третьем эксперименте для определения содержания ДНК был использован микроскоп DM-4000. Результаты измерений близки к данным первых двух экспериментов и показывают высокую воспроизводимость значений, получаемых в двух различных системах определения ДНК.

Результаты, полученные для байкальской популяции циклопов (эксперименты 4 и 5, табл. 2), оказались близкими по значениям к данным, полученным для московской популяции. В пересчете полученных значений на гаплоидное содержание ДНК (1С) данные для клеток всех типов дододиминуционного развития хорошо совпадают (анафаза, метафаза и направительное тельце). В клетках после

ДХ эти значения варьируют в большей степени (от 0.83 до 1.04 пг). Нельзя исключать того, что это может быть связано с нахождением этих клеток на разных стадиях митотического цикла, поэтому эти данные могут быть использованы только как ориентировочные величины.

Полученные данные по содержанию ДНК в клетках *C. kolensis* двух различных популяций значительно превышают значения, полученные ранее в работах Гришанина с сотрудниками (1994, 1996, 2006а). Так, согласно цитируемым работам, в клетках *C. kolensis* до ДХ и после нее содержание ДНК (1С) составляло 2.3 ± 0.03 ($n = 91$) и 0.14 ± 0.01 пг ($n = 70$), что в 8.6—11.5 и 5.7—7.4 раза меньше значений, приведенных в табл. 2, соответственно. С другой стороны, наши данные хорошо подтверждают относительные величины элиминируемой ДНК у изучаемого вида. Эти значения варьируют в пределах от 94.7 до 96.4 % против 93.5 %, полученных ранее.

Таким образом, наши данные показывают, что содержание ДНК в дододиминуционных клетках *C. kolensis* является наибольшим для циклопид и одним из наибольших среди многоклеточных животных (<http://www.genomesize.com>). Для цитометрических измерений содержания ДНК у видов, содержащих столь большое количество ДНК, требуются адекватные контроли. Необходимо, чтобы при построении калибровочной зависимости были использованы виды как с большим, так и с малым содержанием ДНК, поскольку это позволяет правильно определить наклон калибровочной прямой (от значения которого в наибольшей степени зависит определяемая величина).

Определение количества ДНК в делящихся клетках *C. insignis* на ранних и поздних стадиях дробления, а также в соматических клетках ног циклопов не выявило достоверных различий между ними (эксперимент 6, табл. 2). Из полученных данных можно сделать вывод о том, что ДХ у этого вида если и происходит, то на крайне низком уровне или отсутствует вовсе. Во всяком случае, достоверно зарегистрировать этот процесс нам не удалось, что соответствует ранее полученным данным (Grishanin et al., 2004; Гришанин, 2008). Однако диплоидное содержание ДНК в ядрах клеток *C. insignis*, по нашим оценкам, составляет 7.5 пг и расходится с данными цитируемой работы, где приводится значение 4.3 пг (Гришанин, 2008). В этом случае соотношение среднего содержания ДНК в диплоидных клетках между *C. insignis* и *C. kolensis*, по нашим данным, составляет 3.7 вместо 15, полученных ранее.

Таким образом, мы подтверждаем два факта, обнаруженных ранее Гришаниным (2008). Первый из них состоит в том, что между двумя географически изолированными популяциями *C. kolensis* отсутствуют не только морфологические, но и цитогенетические различия и уровень ДХ примерно одинаков. С другой стороны, два близкородственных вида циклопов *C. kolensis* и *C. insignis* (Загоскин, 2009) отличаются не только по количеству ДНК в геноме, но и отсутствием ДХ у одного из них (Grishanin et al., 2004; Акифьев, Гришанин, 2005; Гришанин и др., 2006б). Считается, что у близкородственных видов число генов, обеспечивающих их жизнедеятельность, должно быть примерно одинаковым. Различие содержания ДНК в диплоидных ядрах этих видов до диминуции составляет $40 - 7.5 = 32.5$ пг, и, по-видимому, эта величина представляет собой «избыточную» ДНК (Гришанин и др., 2006б), которая не участвует в процессах дифференцировки и гистогенеза у циклопов. После ДХ у *C. kolensis* содержание ДНК в диплоидном геноме составляет около 2 пг. Исходя из сходного количества генов, вовлеченных в функционирование соматических тканей у близкородственных видов, можно предположить, что минимально необходимое количество ДНК для *C. insignis* составит около 2 пг, тогда количество ДНК, которая, возможно, не кодирует жизненно важные гены для соматической ткани, равно $7.5 - 2 = 5.5$ пг. Причины значительных различий по количеству «избыточной» ДНК в зародышевых клетках обоих видов остаются неясными.

У большинства эукариот процесс ДХ отсутствует, функциональная инактивация участков генома проявляется как их гетерохроматинизация. Сохранение «избыточной» ДНК в зародышевой линии клеток у *C. kolensis*, а впоследствии и в формирующихся гаметах может быть связано как с процессами гаметогенеза, оплодотворения, начала дробления зиготы и элиминации хроматина, так и с другими процессами, требующими дальнейшего изучения.

Авторы выражают искреннюю благодарность А. К. Гришанину за помощь в работе и обсуждение полученных данных, а также сотрудникам Лимнологического института СО РАН С. В. Кирильчику, А. В. Купчинскому, О. А. Тимошкину, А. Л. Новицкому и сотруднику Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН А. В. Иванкину за помощь в сборе материала.

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

Список литературы

- Акифьев А. П., Гришанин А. К. 2005. Некоторые заключения о роли избыточной ДНК и механизмах эволюции эукариот, которые можно сделать на основании изучения диминуции хроматина у Cyclopoidea. Генетика. 41 (4) : 466—479.
- Гришанин А. К. 2008. Цитогенетическое исследование диминуции хроматина у пресноводных ракообразных — новый подход к изучению парадокса размера генома эукариот: Автореф. докт. дис.
- Гришанин А. К., Бойкова Т. В., Маршак Т. Л., Мельник Н. Г., Наумова Е. Ю., Загоскин М. В., Акифьев А. П., Жимулев И. Ф. 2006а. Консерватизм структуры генома в двух популяциях *Cyclops kolensis* (Copepoda, Crustacea), обитающих в прудах г. Москва и о. Байкал. Докл РАН. 408 (5) : 684—687.
- Гришанин А. К., Бродский В. Я., Акифьев А. П. 1994. Соматические клетки *Cyclops strenuus* (Copepoda, Crustacea) теряют при диминуции хроматина более 90 % генома. Докл. РАН. 338 (5) : 708—710.
- Гришанин А. К., Худолый Г. А., Шайхаев З. Г. О., Бродский В. Я., Макаров В. Б., Акифьев А. П. 1996. Диминуция хроматина у *Cyclops kolensis* и *Cyclops strenuus* (Copepoda, Crustacea) — уникальный пример геномной инженерии в природе. Генетика. 32 (4) : 492—499.
- Гришанин А. К., Шеховцов А. К., Бойкова Т. В., Акифьев А. П., Жимулев И. Ф. 2006б. Проблема диминуции хроматина на рубеже XX и XXI веков. Цитология. 48 (5) : 379—397.
- Загоскин М. В. 2009. Сравнительный анализ структурной организации кластера рибосомных генов ракообразных: Автореф. канд. дис.
- Омелянчук Л. В., Семешин В. Ф., Алексеева А. Л., Пальчикова И. Г., Жимулев И. Ф. 2010. Интегральный метод измерения количества ДНК в клетке с использованием цифровой микротографии. Цитология. 52 (4) : 349—353.
- Grishanin A. K., Dams H.-U., Akifiev A. P. 2004. Nuclear DNA and remarks on chromatin diminution in Cyclopoidea Copepods. Zool. stud. 43 (2) : 8—19.
- 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.

Поступила 14 X 2010

DNA CONTENTS IN NUCLEI OF *CYCLOPS KOLENSIS* AND *C. INSIGNIC*
(CRUSTACEA, COPEPODA)

V. F. Semeshin,¹ L. V. Omelyanchuk,¹ A. L. Alekseeva,^{1,2} E. A. Ivankina,¹
N. G. Shevelyova,³ I. F. Zhimulev¹

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

² Novosibirsk State University and ³ Limnological Institute SB RAS, Irkutsk;
e-mail: semeshin@mcb.nse.ru

Chromatin diminution (CD) in two Cyclopoida species, *Cyclops kolensis* and *C. insignis*, was studied by static digital Feulgen cytophotometry. DNA content (pg/cell) was evaluated by standard curves builded up using blood cells of five organisms with known DNA content, which ranged from 1.25 to 14.70 pg. According to data obtained, diploid genome of *C. kolensis* has about 40 pg DNA before CD and 1.8–2.0 pg DNA after CD. These values are similar for both Moscow and Baikal populations of *C. kolensis* and 6–10 times exceed estimates made earlier (Grishanin, 2008). Our data confirm that CD in *C. kolensis* is 94–96 % of DNA. In mitotic dividing cells of *C. insignis*, DNA content was about 7.5 pg both in early and late embryos, and CD was not revealed for this species. The data obtained show that, among Cyclopoida studied, the genome of *C. kolensis* before CD has a maximum content of DNA.

Key words: chromatin diminution, DNA cytophotometry.
