

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ДНК В ЯДРЕ

© Ю. Г. Пичугин,^{2,3} К. А. Семьянов,⁴ А. В. Чернышев,^{2,3}
И. Г. Пальчикова,^{3,5} Л. В. Омелянчук,^{1,3,*} В. П. Мальцев^{2,3}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,

² Институт химической кинетики и горения СО РАН, Новосибирск,

³ Новосибирский государственный университет,

⁴ Институт цитологии и генетики СО РАН и ⁵ Конструкторско-технологический институт научного приборостроения СО РАН, Новосибирск;

* электронный адрес: ome@mcb.nsc.ru

В работе предложен новый теоретический подход для анализа гистограмм содержания ДНК, полученных методом проточной цитофотометрии, в клетках имагинальных дисков *Drosophila melanogaster*. Расчетная модель дает возможность определения числа клеток в фазах клеточного цикла G₁, G₂(M) и S. Показано, что точность измерений количества ДНК в фазах G₁ и G₂(M) лимитируется точностью аппаратной установки нуля проточного цитометра. Применение расчетного нуля проточного цитометра и использование делящихся клеток в качестве стандартов содержания ДНК способны многократно увеличить точность измерений содержания ДНК в ядрах данного вида. В работе также проведен сравнительный анализ погрешностей различных методов измерения содержания ДНК в ядрах клеток. Для методов проточной флуоресцентной цитометрии, конфокального сканирования и цитофотометрии ядер, окрашенных по Фельгену, показано, что в настоящее время среднеквадратичные погрешности измерений содержания ДНК лежат в интервале значений, который считается приемлемым для биологических исследований (0.02 < CV < 0.06).

Ключевые слова: флуоресцентная проточная цитометрия, содержание ДНК, клеточный цикл.

Определение содержания ДНК в клеточном ядре является распространенным методом цитологического исследования, результаты которого важны для геномных исследований и для практической медицины. Известны следующие подходы к определению количества ДНК в ядре: флуоресцентная проточная цитометрия, цитофотометрия ядер, окрашенных фуксином, и флуоресцентная сканирующая цитометрия. Приборная база и подготовка клеточного материала для этих методов существенно различаются. Для проточной цитометрии используют методы разрушения ткани с последующей окраской ядер флуорохромом. Для флуоресцентной сканирующей цитометрии используют фиксированные и окрашенные флуорохромом цельные органы. В методе цитофотометрии используются давленные в уксусной кислоте (или другом фиксаторе) фиксированные препараты органов. Точность проводимых измерений количества ДНК зависит от процедуры приготовления образцов, точности используемых приборов и методов математической обработки экспериментальных данных.

Метод флуоресцентной проточной цитометрии состоит в пропускании струи жидкости, содержащей клетки с окрашенными ядрами (или собственно ядра), через лазерный луч с последующим детектированием флуоресценции красителя от каждой клетки. Результаты, полученные с помощью проточной цитометрии, позволяют исследовать соотношение фаз клеточного цикла в популяции кле-

ток (De la Cruz, Edgar, 2008). Фазы клеточного цикла G₁ и G₂(M) выявляются на ДНК-гистограмме в виде пиков. Соотношение уровней флуоресценции ядер клеток, соответствующих пикам G₁ и G₂(M) (при использовании внешней калибровки) дает диплоидное и тетраплоидное содержание ДНК для исследуемого организма. Наиболее распространенным подходом к количественному определению фракции клеток, находящихся в фазе синтеза ДНК S, является аппроксимация межпикового интервала на ДНК-гистограмме с помощью модели прямоугольника (Stal, Baldetorp, 1998).

Другим методом определения содержания ДНК в ядрах является цитофотометрия ядер, окрашенных красителем Фельгена. Цитофотометрические методы определения ДНК рассмотрены ранее в монографии Агроскина и Папаяна (1977) и включают в себя метод сканирования, двух- и многоволновой, фотоэмульсионный и интегральный методы. Наиболее точным в настоящее время является метод сканирования в монохроматическом свете, использующий денситометр Vickers M8 (Rasch et al., 2004). Известен также подход, основанный на анализе цифровых изображений в монохроматическом свете, разработанный для медицины (Puech, Giroud, 1999). Нами разработан и регулярно используется интегральный цитофотометрический метод, основанный на анализе цифровых изображений, получаемых с помощью цифровых камер (Омелянчук и др., 2010; Семешин и др., 2011) с расширенным ди-

намическим диапазоном. Суммирование интенсивности излучения флуоресценции окрашенных ядер по оптическим срезам, получаемым с помощью конфокальной микроскопии, также может использоваться для определения количества ДНК. Данные такого рода экспериментов для ядер клеток имагинальных дисков дрозофилы приведены в наших работах (Лебедева и др., 2010, 2011).

В настоящей работе предложен новый подход для анализа гистограмм содержания ДНК в клетках имагинальных дисков *Drosophila melanogaster*, а также проведен сравнительный анализ особенностей различных методов измерения ДНК.

Материал и методика

Клетки крылового и глазного имагинальных дисков личинок 3-го личиночного возраста линии Nikone A/W *Drosophila melanogaster* выделяли в растворе Хэнкса, диссоциировали с помощью трипсина, окрашивали пропидиум йодидом и подвергали цитометрическому анализу согласно рекомендациям (Vindelov et al., 1983; De la Cruz, Edgar, 2008). Для контроля работы проточного цитометра использовали микросферы CaliBrite™3 среднего размера 6 мкм (Becton Dickinson, США). Анализ распределения клеток проводили на цитофлуориметре FACSAria (Becton Dickinson, США). Экспериментальные распределения формировали по сигналам флуоресценции от полимерных микросфер и от окрашенных клеток.

Обработку полученных данных проводили путем построения аппроксимирующей функции $F(I)$ для экспериментального распределения клеток по уровням интенсивности флуоресценции, связанной с распределением клеток по фазам клеточного цикла. В качестве основы аппроксимации данных для фазы S использовали известную модель (Stal, Baldetorp, 1998), усовершенствованную нами с учетом особенностей проведения эксперимента на проточном цитометре. Функция распределения клеток по количеству ДНК состоит из двух δ -функций, описывающих клетки в фазах G_1 и $G_2(M)$, и из функции $rect$, составленной из двух функций Хэвисайда. Вероятность найти клетку в определенной фазе клеточного цикла ($G_2(M)$, G_1 или S) при условии, что вероятность найти клетку в любой фазе равна 1, пропорциональна времени T прохождения клеткой соответствующей фазы цикла. Функция уширения цитометрического процесса описывает декорреляцию между количеством ДНК в клетке и измеренной интенсивностью флуоресценции, вызванной, например, нестехиометричностью связывания красителя с ДНК, неидеальностью оптической схемы и т. д. Аппроксимирующая функция $F(I)$ представляет собой свертку функции распределения клеток по количеству ДНК и функции уширения в виде нормального распределения с дисперсией σ^2 :

$$F(I) = \int -e^{-\frac{(I-I'+I_b)^2}{\sigma(I_b-I')^2}} \left(\delta(I_{G_1} - I' + I_b) + \frac{T_{G_2}}{T_{G_1}} \delta(2 \cdot I_{G_1} - I' + I_b) + \frac{T_S}{T_{G_1}} H(I' - I_b - I_{G_1}) H(-I' + I_b + 2I_{G_1}) \right) dI',$$

где $\delta(x)$, $H(x)$ — дельта-функция и функция Хэвисайда (Heaviside step function) соответственно. В выражении использованы следующие обозначения: I_{G_1} — интенсивность флуоресценции, соответствующая среднему значению для клеток в фазе G_1 , T_{G_2}/T_{G_1} — отношение длительностей фаз $G_2(M)$ и G_1 , аналогично T_S/T_{G_1} — отношение длительностей фаз S и G_1 , I_b — сдвиг нуля цитометра или интенсивность фонового сигнала (внешняя засветка, остаточное излучение на длине волны возбуждения, балансировка усилительного тракта и др.). Искомые параметры I_{G_1} , σ , I_b , T_{G_2}/T_{G_1} и T_S/T_{G_1} (два последних являются характеристикой клеточного цикла) определяли из сравнения экспериментальных распределений и распределений, рассчитанных с применением модели, использующей глобальную оптимизацию в версии DIRECT (Jones et al., 1993) с определением ошибок параметров, рассчитанных в ходе оптимизации (Strokotov et al., 2009).

Результаты

Полученное нами экспериментальное распределение интенсивностей сигналов флуоресценции микросфер CaliBrite™3, как и ожидалось, хорошо соответствует нормальному распределению (не приводится, поскольку такие распределения можно также найти в паспортах цитометров). Это оправдывает теоретическое предположение, сделанное выше, для функции уширения. Нами были проведены измерения распределений по интенсивности флуоресценции клеток крылового и глазного имагинальных дисков личинок с целью апробации модели распределения ДНК в клетках, находящихся в фазе стационарного роста (в котором соотношение фаз цикла остается постоянным). Распределение интенсивности для клеток крылового диска представлено на рис. 1. Полученные распределения являются характерными для стационарной фазы. Аппроксимирующая функция распределения использовалась для определения характеристик клеточного цикла. Функция, обладающая максимальным правдоподобием по отношению к экспериментальному распределению, представлена на рис. 1. Параметры аппроксимирующей функции приведены в табл. 1. В первом столбце этой таблицы перечислены параметры оптимизации аппроксими-

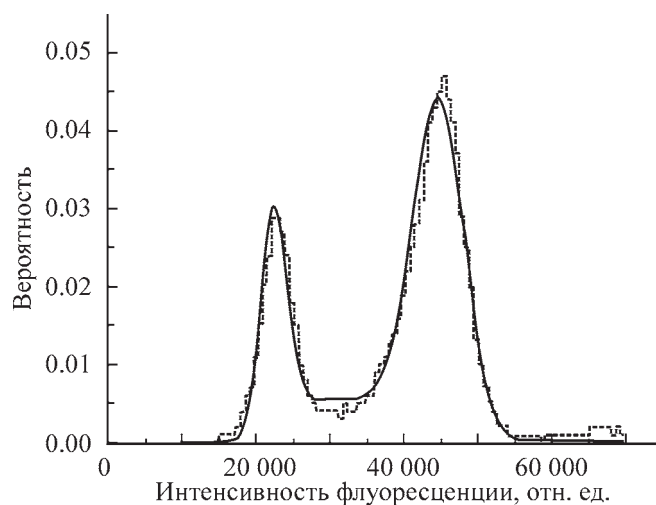


Рис. 1. Гистограммы содержания ДНК для клеток крылового имагинального диска (штриховая кривая) и ее теоретическая аппроксимация (сплошная кривая).

Таблица 1

Параметры модели клеточного цикла, полученные из обработки функции распределения по интенсивности флуоресценции для клеток крылового и глазного имагинальных дисков

Параметр	Крыловой диск			Глазной диск		
	значение	СКО ^a	СКО, отнесенное к значению параметра	значение	СКО ^a	СКО, отнесенное к значению параметра
Средняя интенсивность флуоресценции G_1 клеток, I_{G_1}	22 640	50	0.002	29 330	140	0.005
СКО функции уширения σ , отнесенное к средней интенсивности	0.0766	0.0015	0.019	0.096	0.002	0.021
T_{G_2}/T_{G_1}	3.0	0.1	0.03	0.73	0.03	0.035
T_S/T_{G_1}	1.0	0.1	0.10	0.25	0.05	0.18
Сдвиг нуля I_b	-540	60	0.11	760	30	0.04

Примечание. СКО — среднее квадратичное отклонение. СКО^a — среднее квадратичное отклонение величин параметров, указанных в первом столбце, получаемых по результатам работы программы DIRECT.

рующей функции, использованные программой DIRECT. Во втором столбце приведены оптимальные значения параметров. В третьем столбце даны среднее квадратичные отклонения параметров, рассчитанные программой DIRECT, в четвертом — среднее квадратичное отклонение, отнесенное к значению параметра (коэффициент вариации CV). Аналогичная процедура была использована при обработке результатов измерения распределения по интенсивности флуоресценции для клеток глазного диска. Экспериментальное распределение и функция максимального правдоподобия для этих клеток представлены на рис. 2. Параметры аппроксимирующей функции приведены в табл. 1. Заметим, что координаты пиков флуоресценции, соответствующих фазам клеток G_1 и $G_2(M)$, на графиках рис. 1 и 2 различаются. Это связано с различиями используемых для глазного и крылового дисков концентраций красителя.

В качестве меры точности определения интенсивности флуоресценции (количества ДНК) одной клетки в проведенных экспериментах можно взять стандартное отклонение функции уширения, которая характеризует ширину обоих пиков. Для уровня достоверности 95 % относительный разброс будет вдвое больше среднего квадратичного отклонения σ функции уширения, отнесенного к среднему значению, т. е. $0.077 \cdot 2 = 0.154$ и $0.096 \cdot 2 = 0.192$ (табл. 1).

Внутренняя структура использованного нами для оптимизации алгоритма DIRECT (Strokotov et al., 2009) такова, что позволяет определять не только величину оптимизируемых параметров модели, но также и доверительные интервалы для этих величин. В качестве меры точности определения среднего значения параметров модели (интенсивности флуоресценции, количества ДНК) можно взять точность определения положения пика G_1 (среднее квадратичное отклонение, отнесенное к среднему значению) в функции распределения, определяемое алгоритмом DIRECT. Для клеток крылового и глазного имагинальных дисков эта величина оказывается равной $50/22640 = 0.002$ и $140/29330 = 0.005$ соответственно (табл. 1). Погрешность определения среднего значения некоторой величины в экспериментальной выборке обратно пропорциональна корню квадратному из объема выборки (который в проточной цитометрии велик), что и

обуславливает высокую точность определения среднего значения интенсивности флуоресценции.

Следует отметить существенную роль параметра «сдвиг нуля» I_b в определении погрешности среднего значения интенсивности флуоресценции. В то время как расчетная погрешность среднего значения составляет 50 единиц (табл. 1), сдвиг нуля имеет в 10 раз большее значение (540). Введение этого параметра позволило улучшить аппроксимацию экспериментальных данных с помощью функции $F(1)$. При этом среднее квадратичное отклонение величины I_b составило 0.02 %. Учет сдвига нуля (который был проведен в данной работе) способен обеспечить увеличение точности определения содержания ДНК в ядре на 2.4 % по сравнению со случаем, когда такой учет не проводится.

Погрешность определения средней интенсивности флуоресценции клеток в клеточном цикле, полученную в рамках модели, можно сравнить с точностью тестовых измерений на цитометрах Beckton Dickinson, приводимых в паспорте цитометра, где указаны коэффициенты вариации от 2 до 9 % в зависимости от тестовых образцов. Так,

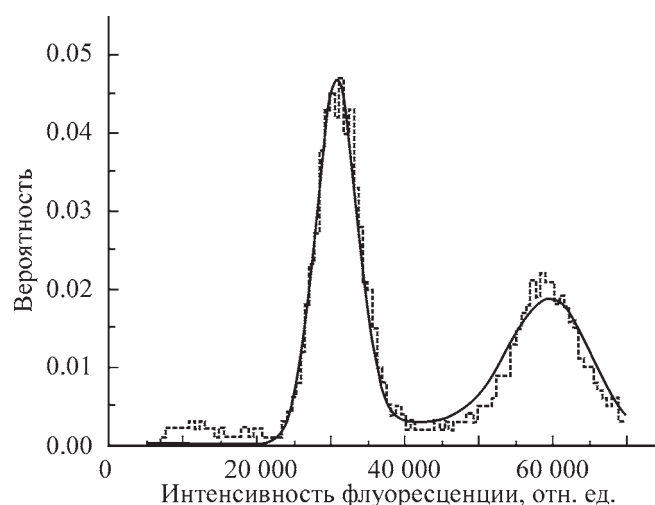


Рис. 2. Гистограммы содержания ДНК для клеток глазного имагинального диска (штриховая кривая) и ее теоретическая аппроксимация (сплошная кривая).

Точность денситометрических измерений для клеток крови, полученная с помощью различных приборов

Клетки	ДНК, пг	Коэффициент вариации		
		DIALUX+ Canon EOS 500D	Axiovert-200+ AxioCam MRc	DM-4000 Leica+ DFC420
Эритроциты <i>Gallus domesticus</i> (курица)	1.25	0.047	0.088	0.026
Эритроциты <i>Danio rerio</i> (рыба)	1.68—1.80	0.0475	0.14	0.06
Лейкоциты <i>Homo sapiens</i> (человек)	3.50	0.054	0.086	0.065
Эритроциты <i>Rana arvalis</i> (лягушка)	4.65—7.17	0.072	0.17	0.087

измерения связывания лимфоцитов с различными маркерами, выполненные на цитометрах FACSCanto и FACS-Calibur (см. Reference manual Table E-1), показывает различие между этими измерениями на величину 2 %. Эта величина является оценкой точности работы цитометра и, с нашей точки зрения, определяется такими факторами, как настройка нуля прибора и уровень автофлуоресценции клеток.

Обсуждение

Существует много способов приготовления образцов для проточной цитометрии. Известны подходы, в которых анализируемые клетки окрашиваются прижизненно, а также такие, в которых ткань разрушается до уровня клеток или до уровня ядер (De la Cruz, Edgar, 2008). Поскольку протеолитическая процедура разрушения ткани до уровня отдельных ядер (Vindelov et al., 1983) считается наиболее благоприятной с точки зрения стехиометричности связывания красителя с ДНК (Darzynkiewicz et al., 2010), она и была выбрана нами для модельных экспериментов по определению точности измерений, достигаемых в проточной цитометрии. Процедура приготовления препаратов клеток крови различных животных для денситометрии ядер, окрашенных по Фельгену, была отработана нами ранее (Омельянчук и др., 2010; Семешин и др., 2011). Критической фазой приготовления препаратов при данном подходе является гидролиз ДНК, который в наших экспериментах составлял 30 мин. К настоящему времени нами экспериментально проверена оптимальность этого выбора (рекомендуемого многими исследователями), показано, что максимум кривой гидролиза для использованных в настоящей работе типов клеток (как и для многих других) действительно достигается при этих условиях.

Для количественной интерпретации данных проточной цитометрии необходима аппроксимирующая функция, описывающая распределение клеток по фазам клеточного цикла и ее уширение, обусловленное особенностями регистрации сигналов флуоресценции от отдельных частиц (Dean, 1991). Известны подходы, в которых фаза S моделируется квадратичным сплайном или серией прямоугольников, «уширенных» с помощью гауссиана, параметры которого оптимизируются (Dean, 1991). Вместо этого мы моделировали фазу S моделью прямоугольника, которая хорошо зарекомендовала себя в медицинской практике (Stal, Baldetorp, 1998). Предложенная модель описывается формулой, приведенной в разделе «Материал и методика».

Аппроксимирующая функция $F(1)$ для экспериментальных данных, получаемых на цитометре, может быть интерпретирована двумя способами. Во-первых, она описывает предполагаемые местоположения максимумов значений выборки экспериментальных данных, высоту «полочки» между максимумами, форму кривых, описывающих спады. При этом нормальное распределение характеризует уширение, вносимое как прибором, так и процедурой подготовки образцов. Использованная математическая формулировка для аппроксимирующей функции в виде свертки с единой функцией уширения во всем диапазоне измерения соответствует теории линейных систем. Во-вторых, допустима трактовка слагаемых аппроксимирующей функции с позиций клеточного цикла: δ -функции указывают местоположение интенсивности флуоресценции клетки в фазах G_1 и $G_2(M)$; клетка фазы S располагается в пределах функции rect . Амплитудные коэффициенты T_{G_2}/T_{G_1} и T_S/T_{G_2} характеризуют длительности прохождения фаз цикла одной клеткой. В остальном вторая трактовка совпадает с первой.

Из данных общей генетики и геномики можно заключить, что размер генома с высокой степенью точности является постоянной величиной, и варьирование содержания ДНК от клетки к клетке может быть исключено из числа рассматриваемых факторов уширения функции распределения. В отличие от окраски по Фельгену окрашивание ДНК флуорохромами не является стехиометрическим, поэтому вполне вероятно, что источником уширения распределения клеток по уровню содержания ДНК в этом случае является то, что на разных стадиях клеточного цикла имеется разный спектр состояний хроматина, который различается по уровню связывания флуорохрома. Проведенные нами измерения для калибровочных микросфер показали среднее квадратичное отклонение функции уширения, отнесенное к среднему распределению микросфер по интенсивности флуоресценции $\sigma_1 = 0.05 \pm 0.001$. Известно, что если статистический разброс показаний прибора является результатом действия двух случайных факторов со среднее квадратичными отклонениями σ_1 и σ_2 , то среднее квадратичное отклонение результата может быть вычислено как $\sigma = (\sigma_1^2 + \sigma_2^2)^{1/2}$ (Агроскин, Папаян, 1977, формула II. 7). В предположении, что использованные микросферы не имеют существенного разброса по уровню флуоресцентного красителя, а их распределение по уровню флуоресценции характеризует только ошибку прибора, на основе данных табл. 1 можно рассчитать дисперсию σ_2 , связанную с нестехиометричностью в наших экспериментах. Для крылового имагинального диска $\sigma = 0.058$ и для глазного $\sigma = 0.081$. Таким образом, уширение, вероятно связанное с нестехио-

метричностью связывания красителя с ДНК, может превышать величину ошибки собственно прибора. Нельзя исключить также, что нестехиометричность связывания флуорохрома с ДНК может также отразиться и на получаемом с помощью флуоресцентных методов соотношении содержания ДНК в клетках G_1 и $G_2(M)$ (Darzynkiewicz et al., 2010).

Ранее в наших работах (Омельянчук и др., 2010; Семешин и др., 2011) с помощью денситометрического метода были выполнены измерения количества ДНК в ядрах неделящихся клеток крови различных организмов (эритроциты *Gallus domesticus*, *Danio rerio*, *Rana arvalis* и лимфоциты *Homo sapiens*; табл. 2). Можно видеть, что коэффициент вариации в измерениях содержания ДНК в этих опытах достаточно хорошо характеризует точность работы различных цифровых камер и позволяет выбрать оборудование, обеспечивающее достаточную точность ($CV < 6\%$) (Darzynkiewicz et al., 2010). Минимальный экспериментальный разброс был получен для *G. domesticus* при использовании микроскопа DM-4000 (Leica) и цифровой камеры DFC420 и составляет 0.026.

Общепринятым методом определения содержания ДНК являются денситометрические измерения в ядрах, окрашенных красителем Фёльгена, проводимые на сканирующем денситометре Vickers M8 (Rasch, Wyngaard, 2001; Rasch et al., 2004, 2008). В качестве меры, отражающей варьирование содержания ДНК в клетках одного вида, авторы используют стандартную ошибку среднего (SEM — Standard Error of Mean), отнесенную к величине содержания ДНК. Согласно этому критерию, наиболее точные измерения на этом приборе (значения критерия 0.07) были получены для ядер взрослых особей *Mesocyclops edax* (табл. 1; Rasch et al., 2008), где содержание ДНК, SEM и количество измерений N составили 28.6, 0.219 и 25 соответственно. Поскольку варьирование в наших опытах оценивалось как среднеквадратичное отклонение от среднего:

$$ST = \sqrt{\frac{\sum (x - x_0)^2}{n - 1}},$$

используемое нами среднеквадратичное отклонение в рассматриваемом опыте этих авторов равно SEM_n , т. е. $0.219 \cdot 5 = 1.095$, а относительная ошибка, следовательно, — $1.095/28.6 = 0.038$ (3.8 %). Таким образом, использование сканера Vickers M8 не дает существенных преимуществ в отношении точности измерений, поскольку в наших опытах иногда достигалась и более высокая точность (2.6 %).

Ранее мы развили метод определения количества ДНК в ядрах клеток, основанный на суммировании сигнала флуоресценции окрашенных флуорохромом ядер по оптическим срезам, получаемым с помощью конфокальной микроскопии (Лебедева и др., 2010). Результаты измерений количества ДНК в метафазных и анафазных группах хромосом в клетках имагинального диска приведены в цитируемой работе (Лебедева и др., 2010, рис. 1), где показано, что коэффициент вариации как для метафаз, так и для анафаз не превышает 10 % от величины содержания ДНК. В другой работе (Лебедева и др., 2011) мы также провели измерения количества ДНК в метафазных и анафазных группах клеток имагинального диска дроз-

филы с помощью конфокального сканирования. В этом опыте проводился специальный отбор измеряемых анафазных и метафазных групп на предмет малости фоновой засветки участка изображения, лежащего рядом с группой хромосом (в нашем методе величина засветки фона вычитается из уровней сигнала хромосом). Это позволило получить коэффициенты вариации содержания ДНК в метафазных группах, составляющие 4 %, а в анафазных — 2 %.

Точность определения уровня флуоресценции окрашенных тем или иным способом клеток на проточном цитометре, согласно паспортным данным таких приборов, составляет около 2 %. Наилучшая точность, достигнутая в наших денситометрических экспериментах, составила 2.6 %. Это хорошо соответствует общемировой практике. Минимальная полученная нами ошибка содержания ДНК в ядрах клеток имагинального диска дрозифилы также составляет величину около 2 %. Таким образом, величины ошибок определения содержания ДНК различными стандартными методами близки.

В то же время представленные в настоящей работе данные показывают, что в оптимальных условиях ошибка измерений среднего содержания ДНК в ядрах клеток, находящихся в фазе стационарного роста, с помощью метода флуоресцентной проточной цитометрии может составлять доли процента, что существенно меньше, чем ошибки других методов. Такая точность проточной цитометрии связана с большим количеством клеток, которые могут быть использованы для измерений, а также с новым способом учета аппаратного нуля, предложенным в настоящей работе. В то же время метод проточной цитометрии не является оптимальным в случаях, когда количество клеточного материала невелико (биопсия или исследование животных малого размера), а также в случаях, когда идентификация исследуемых клеток легче достигается с помощью цитологического просмотра, чем с помощью специфических антител (клетки зародышевой линии или полиплоидные клетки слюнных желез двукрылых).

Проведенный нами анализ показал, что наибольший вклад в погрешность определения содержания ДНК в клетках с помощью проточной цитометрии вносится детектируемым в наших экспериментах «сдвигом нуля». Применение введенного нами метода учета этого вклада на величину среднего содержания ДНК способно значительно уменьшить погрешности базы данных (<http://www.genomesize.com>), которая используется в качестве биологических стандартов при измерениях размера геномов. Как следует из представленных данных, наиболее точное определение содержания ДНК может быть достигнуто при использовании делящихся клеток, т. е. в тех случаях, когда имеются два пика на распределении клеток по уровню флуоресценции, которые позволяют определить величину «сдвига нуля».

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционных проектов СО РАН (проекты 37 и 7), Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-08-00651-а), Федеральной целевой программы Министерства образования и науки (проекты Р422, Р2497, Р1039 и 14.740.11.0729), президиума РАН (проект 2009-27-15) и президента Российской Федерации («Научные школы», проект 5387.2010.4).

Список литературы

- Агроскин Л. С., Папаян Т. В. 1977. Цитофотометрия. Л.: Наука. 295 с.
- Лебедева Л. И., Ахметьяева Е. М., Омелянчук Л. В. 2010. Динамика пространственной организации хромосомного набора в клетках имагинальных дисков *Drosophila melanogaster* в норме и при действии опухолеродной мутации Merlin. Генетика. 46 (2) : 180—186.
- Лебедева Л. И., Дубатолова Т. Д., Омелянчук Л. В. 2011. Флуориметрические измерения позволяют выявить уровень упаковки хроматина, лежащий за пределами разрешения световой микроскопии. Цитология. 53 (1) : 44—48.
- 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 микрофотографии. Цитология. 52 (4) : 349—353.
- Семешин В. Ф., Омелянчук Л. В., Алексеева А. Л., Иванкина Е. А., Шевелева Н. Г., Жимулев И. Ф. 2011. Содержание ДНК в ядрах *Cyclops kolensis* и *Cyclops insignis* (Crustacea, Copepoda). Цитология. 53 (3) : 77—81.
- Darzynkiewicz Z., Halicka H. D., Zhao H. 2010. Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. Adv. Exp. Med. Biol. 676 : 137—147.
- Dean P. N. 1991. Data processing. In: Flow cytometry and sorting. New York: Wiley-Liss. 415—444.
- De la Cruz A. F., Edgar B. A. 2008. Flow cytometric analysis of *Drosophila* cells. Methods Mol. Biol. 420 : 373—389.
- Jones D. R., Pertunnen C. D., Stuckman B. E. 1993. Lipschitzian optimization without the Lipschitz constant. J. Optimiz. Theor. Applic. 79 : 157—181.
- Puech M., Giroud F. 1999. Standardization of DNA quantitation by image analysis: quality control of instrumentation. Cytometry. 36 : 11—17.
- Rasch E. M., Lee C. E., Wyngaard G. A. 2004. DNA-Feulgen cytophotometric determination of genome size for the freshwater-invading copepod *Eurytemora affinis*. Genome. 47 : 559—564.
- Rasch E. M., Wyngaard G. A. 2001. Evidence for endoreduplication: germ cell DNA levels prior to chromatin diminution in *Mesocyclops edax*. J. Histochem. Cytochem. 49 : 795—796.
- 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.
- Stal O., Baldetorp B. 1998. S-phase fraction assessed by a variant of the rectangular model adapted to the flow-cytometric DNA histogram profile. Cytometry. 33 : 487—491.
- Strokotov D. I., Yurkin M. A., Gilev K. V., van Bockstaele D. R., Hoekstra A. G., Rubtsov N. B., Maltsev V. P. 2009. Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? J. Biomed. Opt. 14 : 064036.
- Vindelov L. L., Christensen I. J., Nissen N. I. 1983. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for for cytometric DNA analysis. Cytometry. 3 : 323—327.

Поступила 27 V 2011

NUCLEUS DNA CONTENT MEASUREMENT METHODS FEATURES

J. G. Pichugin,^{2,3} K. A. Semianov,⁴ A. V. Chernyshev,^{2,3} I. G. Palchikova,^{3,5}
L. V. Omelyanchuk,^{1,3} * V. P. Maltsev^{2,3}

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,

² Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS, Novosibirsk,

³ Novosibirsk State University, ⁴ Institute of Cytology and Genetics SB RAS and

⁵ Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering SB RAS, Novosibirsk;

* e-mail: ome@mcb.nsc.ru

We suggest a new theoretical method of the flow cytometry DNA histograms and apply it for *Drosophila melanogaster* imaginal discs cells. The model gives a possibility to determine the proportions of cells in G₁, G₂ (M) and S cell cycle phases. We show that the precision of G₁ and G₂ (M) DNA content measurements is limited by the precision of device zero signal arrangement. The usage of calculated device zero and dividing cells as the DNA content standards may improve the precision of DNA content measurements. We also compared the precisions of different DNA content methods and draw the conclusion that the current precisions of different methods are similar and lie within 2—6 % interval.

Key words: fluorescent flow cytometry, DNA content, cell cycle.