

МИКРОФЛУОРИМЕТРИЯ СОДЕРЖАНИЯ ДНК В ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ХРОМОСОМАХ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗАТОРА ИЗОБРАЖЕНИЙ

© Н. А. Агафонова, Г. А. Сакута, Ю. М. Розанов, Г. И. Штейн, Б. Н. Кудрявцев

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: bn_kudryavtsev@mail.ru*

Разработан микрофлуориметрический метод определения содержания ДНК в индивидуальных хромосомах человека. Метод основан на предварительной идентификации хромосом с помощью Hoechst 33258, последующем окрашивании хромосом по Фельгену с использованием реактива типа Шиффа бромистого этидия-SO₂ и измерении интенсивности флуоресценции хромосом с помощью анализатора изображений. Метод позволяет определять содержание ДНК в индивидуальных хромосомах с точностью до 4.5 фг. С помощью разработанного метода измерено содержание ДНК в индивидуальных хромосомах человека, в их p- и q-плечах, а также в гомологичных хромосомах. Показано, что содержание ДНК в хромосомах нормального кариотипа человека нестабильно и в некоторых хромосомах может колебаться в пределах 35—40 фг.

Ключевые слова: хромосомы человека, реакция Фельгена, реактив типа Шиффа бромистый этидий-SO₂, микрофлуориметрия ДНК, анализатор изображений.

Известно, что фенотипические проявления являются отражением структурно-функционального состояния генетического аппарата клеток, в частности хромосомной нестабильности, которая включает в себя анеуплоидию, различные структурные перестройки, а также полиморфизм по гетерохроматиновым сегментам. При этом считается, что нехватка генетического материала приводит к более тяжелым метаболическим и структурным нарушениям в организме, чем его избыток (Лазюк, 1991; Баранов, 2007). При оценке вклада различных генетических факторов в ту или иную патологию существенное значение, несомненно, имеют и методы (наряду с широко известными цитогенетическими и методами молекулярной биологии), позволяющие определять вариабельность содержания ДНК в отдельных метафазных хромосомах. Для измерения содержания ДНК в хромосомах в настоящее время используются как методы проточной цитометрии, так и методы статичной цитофлуориметрии и абсорбционной цитометрии. В случае измерения содержания ДНК в хромосомах они имеют свои преимущества и недостатки.

Методы проточной цитометрии позволяют с высокой точностью и скоростью анализировать содержание ДНК в изолированных хромосомах. Главный недостаток этих методов заключается в том, что при их использовании необходимо наличие большого количества изолированных метафазных хромосом, что возможно далеко не всегда. Проточная цитометрия неэффективна в тех случаях, когда у хромосом варьируют форма, размеры и дифференциальная окраска. С помощью проточной цитометрии невозможно также получить данные о специфических участках хромосом.

Многие из перечисленных недостатков проточной цитометрии при определении содержания ДНК в хромосомах устраняются с помощью методов абсорбционной или флуоресцентной микрофотометрии. В этих случаях анализ производят обычно в три этапа: вначале хромосомы, помещенные на предметное стекло, идентифицируют с помощью G- или Q-окрашивания; затем после удаления красителя, который использовался при дифференциальном окрашивании, отмеченные на препарате хромосомы обрабатывают по Фельгену; наконец, используя соответствующую аппаратуру, измеряют в них содержание ДНК. К сожалению, несмотря на целый ряд несомненных достоинств, все эти методы достаточно трудоемки и малопроизводительны, а методы абсорбционной микрофотометрии обладают к тому же более низкой чувствительностью, чем микрофлуориметрические методы. Поэтому разработка новых, более совершенных методов определения содержания ДНК в хромосомах является актуальной задачей.

В настоящей работе предложен метод определения содержания ДНК в индивидуальных хромосомах человека, который основан на анализе изображений и микрофлуориметрии препаратов, последовательно окрашенных сначала Hoechst 33258, а затем, после идентификации хромосом, по Фельгену с помощью реактива типа Шиффа бромистого этидия-SO₂. Бромистый этидий (EtBr) выбран потому, что большинство CCD-камер, которые применяются в качестве приемника света в анализаторах изображений, обладает более высокой чувствительностью в красной области видимого спектра.

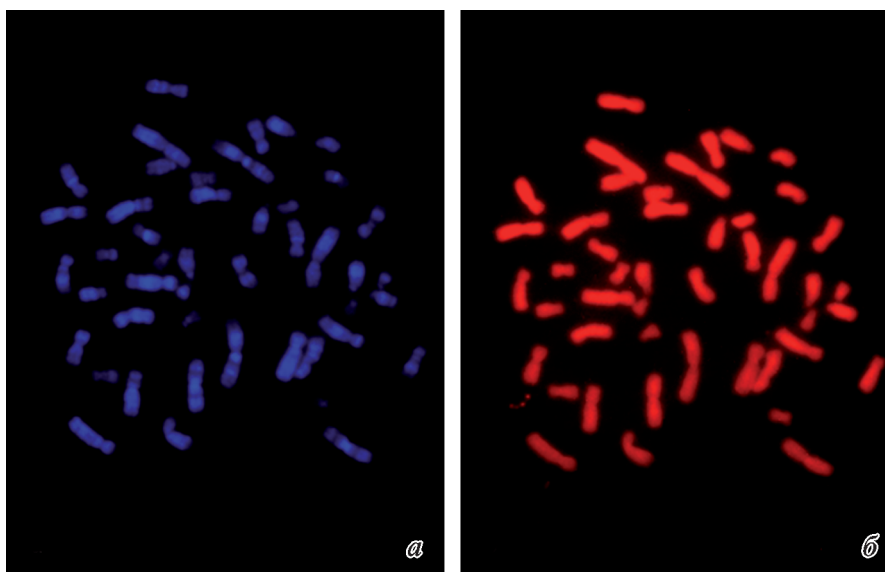


Рис. 1. Метафазная пластинка хромосом человека ($2n = 46$).

а — Q-окрашенная метафазная пластинка (окраска Hoechst 33258). Каждая хромосома имеет индивидуальный рисунок сегментации, позволяющий ее идентифицировать. *б* — та же пластинка, окрашенная бромистым этидием-SO₂ для определения содержания ДНК в индивидуальных хромосомах. Об. 100×/1.3.

Материал и методика

Исследования проведены на препаратах метафазных хромосом, полученных из первичной культуры лимфоцитов периферической крови 2 мужчин и 3 женщин. Препараты метафазных пластинок приготавливали по стандартной методике (Макгрегор, Варли, 1986).

Для идентификации хромосом использовали флуоресцентный краситель Hoechst 33258 для Q-окрашивания (Карпищенко, 1999), поскольку в этом случае влияние на структуру и содержание ДНК в хромосомах оказывается более щадящим, нежели при G-окрашивании (Сухих и др., 1985). Пластинки метафазных хромосом, окрашенные Hoechst 33258, исследовали на анализаторе изображений, который включал в себя микроскоп Axioskop (Carl Zeiss, Германия) с объективом Plan-Neofluar 100×/1.3Oil и блоком фильтров FilterSet02, монохромную CCD-камеру DFC 360FX и компьютер с программным обеспечением. Цифровые изображения сохраняли для последующего использования. Идентификацию Q-окрашенных хромосом производили в соответствии с банком образцов нормальных хромосом человека (Мамаева, 2002).

ДНК в хромосомах выявляли с помощью флуоресцентного варианта реакции Фельгена (рис. 1). С этой целью после идентификации хромосом краситель Hoechst 33258 удаляли путем обработки препаратов 96%-ным этанолом в течение 30 мин. Затем препараты дополнительно фиксировали метанолом и высушивали на воздухе. Гидролиз препаратов проводили в 6 N HCl в течение 8 мин при комнатной температуре. После гидролиза препараты отмывали от кислоты в трех сменах дистиллированной воды и окрашивали в течение 90 мин при 4 °C в реактиве типа Шиффа EtBr-SO₂ (Кудрявцев и др., 1974б). По окончании окрашивания препараты последовательно отмывали от несвязавшегося красителя в трех сменах охлажденной дистиллированной воды (по 5 мин), в трех сменах охлажденных сернистых вод (по 3 мин), в проточной воде (20 мин) и, наконец, в этиловом спирте возрас-

тающей концентрации (70, 96 и 100 % по 10 мин). После 100%-ного этанола препараты высушивали на воздухе и хранили в темноте.

Интенсивность флуоресценции хромосом, окрашенных EtBr-SO₂ и предварительно идентифицированных на основе Q-окрашивания, измеряли с помощью анализатора изображений, описанного выше. Для этого использовали блок фильтров FilterSet15 и программу Видео-Тест-Морфо 3.2 фирмы ВидеоТест (Санкт-Петербург) (Штейн и др., 1998; Агафонова и др., 2002). Измеряли интегральную яркость целых хромосом, которая соответствовала содержанию в них ДНК, а также их короткого (р) и длинного (q) плеч.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Excel. Определяли среднее содержание ДНК в хромосоме (\bar{x}), ошибку среднего (s_x) и коэффициент вариации (Cv). Достоверность различий оценивали с помощью критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $P < 0.05$. Содержание ДНК в индивидуальных хромосомах кариотипа человека относили к содержанию ДНК в хромосоме 2, которое считали равным единице. При расчетах абсолютного содержания ДНК в хромосомах использовали значение размера генома человека, равное 7.00 пг (<http://www.genomesize.com>).

Результаты

Точность измерения содержания ДНК в хромосомах, окрашенных флуоресцирующим красителем, зависит от ряда факторов: 1) стабильности используемой аппаратуры, прежде всего источника света; 2) уровня сигнала от объекта; 3) скорости выцветания объекта под действием возбуждающего света; 4) нестабильности фона, связанного с неспецифической флуоресценцией объекта и окружающей среды; 5) частичным попаданием возбуждающего света в канал регистрации флуоресценции; 6) эффектом внутреннего фильтра и от других факторов. Влияние некоторых из этих факторов на точность определения со-

Т а б л и ц а 1

Влияние продолжительности облучения на относительное содержание ДНК и точность ее измерения в хромосомах 1 и 3, обработанных EtBr-SO₂ после предварительной окраски Hoechst 33258

Продолжительность облучения, с	Хромосома 1		Хромосома 3	
	содержание ДНК, отн. ед., $\bar{x} \pm s_x$	Cv, %	содержание ДНК, отн. ед., $\bar{x} \pm s_x$	Cv, %
30	1.051 ± 0.010	3.80	0.846 ± 0.009	4.25
60	1.037 ± 0.008	3.56	0.843 ± 0.009	4.10
120	1.043 ± 0.010	3.64	0.841 ± 0.014	4.99

Примечание. Содержание ДНК в хромосомах 1 и 3 отнесено к содержанию ДНК в хромосоме 2, принятому за единицу.

держания ДНК в хромосомах исследовано в настоящей работе.

Влияние продолжительности воздействия возбуждающего света на интенсивность флуоресценции хромосом, окрашенных реактивом типа Шиффа. Фотохимическая деструкция флуорофора под действием света, возбуждающего флуоресценцию красителя, и кислорода, присутствующего в препарате, является важным источником погрешностей при измерении интенсивности флуоресценции микрообъектов. Суть вредного действия фотохимического повреждения заключается в том, что объекты во время их поиска, фокусировки и измерения выцветают, причем выцветание различно для разных объектов. Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что, несмотря на 4-кратное увеличение продолжительности действия возбуждающего света на окрашенные EtBr-SO₂ хромосомы, относительное содержание ДНК в хромосомах 1 и 3 не изменяется. Исходя из этих данных можно заключить, что, если освещение поля зрения микроскопа в различных его участках одинаково, действие возбуждающего света приводит к равному снижению интенсивности флуоресценции хромосом в данной метафазной пластинке.

Влияние способа бинаризации изображения хромосом на точность измерения в них содержания ДНК. Важным фактором при микрофлуориметрических измерениях содержания ДНК в хромосомах с использованием анализатора изображений является метод выделения объекта на изображении (бинаризация). Для этой цели обычно применяют два способа — путем обводки изображения объекта вручную по контуру с помощью компьютерной мыши или по пороговому значению яркости. Определение содержания ДНК в хромосо-

мах 2, окрашенных EtBr-SO₂, показало, что оба метода бинаризации объектов дают схожие значения коэффициента вариации: при обводке хромосом вручную Cv = 4.9 %, а по порогу — 4.6 %. Возможно, однако, что фактическое отсутствие различий между двумя методами выделения изображения объекта связано с высокой контрастностью изображений изучаемого объекта.

Влияние степени спирализации хромосом. Поскольку плотность упаковки ДНК в эу- и гетерохроматиновых участках хромосом различна, а доля этих участков в индивидуальных хромосомах кариотипа может различаться, то в принципе вариабельность спирализации хромосом может сказаться на точности измерения в них содержания ДНК. Чтобы проверить влияние этого фактора на точность измерений содержания ДНК в хромосомах, метафазные пластинки разделили на две группы — с низкой и с высокой степенью спирализации хромосом. Длина слабоспирализованных хромосом в нашей работе превышала длину хромосом с высокой степенью спирализации в 2—2.25 раза. Измерения проведены на 1, 2 и 3-й хромосомах.

Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что степень спирализации хромосом не влияет на относительное содержание в них ДНК. Однако точность измерений содержания ДНК была несколько выше при использовании хромосом с низкой степенью спирализации.

Влияние флуоресценции фона, окружающего измеряемый объект. Еще один важный источник ошибок микрофлуориметрии окрашенных хромосом связан с существованием свечения вокруг измеряемого объекта. Сигнал от объекта (N) складывается из собственно флуоресценции объекта (n_о) и флуоресценции фона (n_ф): N = n_о + n_ф. Отношение сигнала к фону равно (N - n_ф)/n_ф. Величина фотометрической ошибки δ_ф свя-

Т а б л и ц а 2

Влияние спирализации хромосом на точность измерений в них содержания ДНК

Степень спирализации	Хромосома 1		Хромосома 3	
	содержание ДНК, отн. ед., $\bar{x} \pm s_x$	Cv, %	содержание ДНК, отн. ед., $\bar{x} \pm s_x$	Cv, %
Высокая	1.033 ± 0.009	3.78	0.848 ± 0.009	4.55
Низкая	1.044 ± 0.008	3.65	0.854 ± 0.007	3.51

Примечание. Содержание ДНК в хромосомах 1 и 3 отнесено к содержанию ДНК в хромосоме 2, принятому за единицу.

Таблица 3

Содержание ДНК в индивидуальных хромосомах человека, измеренное с помощью анализатора изображений

Номер хромосомы	n	Относительное содержание ДНК ^а						Содержание ДНК в целой хромосоме, ^б фг, $\bar{x} \pm s_x$	Пары оснований ДНК, ^в $\times 10^6$
		целая хромосома, $\bar{x} \pm s_x$	Cv	p-плечо, $\bar{x} \pm s_x$	Cv	q-плечо, $\bar{x} \pm s_x$	Cv		
1	90	1.043 ± 0.005	4.6	0.492 ± 0.006	6.5	0.549 ± 0.004	4.5	295.9 ± 2.1	289.4
2	85	1.000 ± 0.004	3.6	0.373 ± 0.004	6.4	0.627 ± 0.004	3.8	284.6 ± 1.8	278.3
3	90	0.840 ± 0.004	4.5	0.383 ± 0.004	6.5	0.445 ± 0.004	5.8	235.6 ± 2.2	230.4
4	85	0.781 ± 0.004	4.6	0.212 ± 0.003	8.6	0.576 ± 0.006	5.5	224.5 ± 2.1	219.6
5	90	0.742 ± 0.004	5.4	0.193 ± 0.004	10.9	0.555 ± 0.007	7.5	213.2 ± 2.4	208.5
6	90	0.710 ± 0.004	5.9	0.254 ± 0.005	10.6	0.449 ± 0.005	6.4	200.0 ± 2.4	195.6
7	93	0.657 ± 0.004	6.1	0.240 ± 0.003	8.3	0.420 ± 0.005	7.2	187.8 ± 1.8	183.7
X	65	0.635 ± 0.005	6.3	0.227 ± 0.005	11.5	0.414 ± 0.007	8.5	182.7 ± 2.4	178.7
8	77	0.620 ± 0.004	6.3	0.185 ± 0.003	10.2	0.429 ± 0.006	7.4	174.7 ± 2.1	170.9
9	88	0.575 ± 0.004	6.6	0.199 ± 0.003	10.3	0.381 ± 0.005	9.1	165.3 ± 1.8	161.7
10	90	0.557 ± 0.004	6.5	0.170 ± 0.002	9.0	0.394 ± 0.005	8.1	160.4 ± 1.8	156.9
11	87	0.546 ± 0.004	6.2	0.209 ± 0.004	9.9	0.337 ± 0.004	6.5	155.7 ± 1.8	152.3
12	80	0.532 ± 0.004	7.1	0.147 ± 0.002	8.6	0.383 ± 0.005	8.1	150.8 ± 1.8	147.5
13	94	0.448 ± 0.003	7.1	0.051 ± 0.002	22.1	0.391 ± 0.006	8.1	126.1 ± 1.8	123.3
14	95	0.415 ± 0.003	8.2	0.056 ± 0.002	23.8	0.365 ± 0.004	7.7	119.7 ± 1.5	117.1
15	87	0.396 ± 0.003	7.8	0.058 ± 0.002	21.2	0.334 ± 0.005	8.6	111.8 ± 1.5	109.3
16	95	0.375 ± 0.003	8.3	0.155 ± 0.003	12.2	0.222 ± 0.003	7.9	107.2 ± 1.5	104.8
17	96	0.348 ± 0.003	8.3	0.105 ± 0.002	13.1	0.239 ± 0.004	9.6	98.2 ± 1.5	96.0
18	102	0.324 ± 0.003	8.0	0.077 ± 0.001	11.7	0.253 ± 0.003	8.6	94.2 ± 1.2	92.1
20	96	0.278 ± 0.003	9.7	0.119 ± 0.002	12.7	0.165 ± 0.003	11.9	81.1 ± 1.2	79.3
19	92	0.260 ± 0.003	10.4	0.114 ± 0.003	14.8	0.148 ± 0.003	13.8	74.6 ± 1.5	73.0
Y	21	0.219 ± 0.005	11.0	0.050 ± 0.002	12.2	0.170 ± 0.009	18.5	62.6 ± 2.7	61.2
22	99	0.211 ± 0.002	11.8	0.046 ± 0.001	17.9	0.171 ± 0.004	12.7	61.8 ± 1.2	60.4
21	101	0.186 ± 0.002	12.4	0.042 ± 0.001	20.5	0.149 ± 0.003	12.3	54.3 ± 0.9	53.1

Примечание. ^аСодержание ДНК в хромосоме 2 принято за единицу (выделено жирным шрифтом). ^бАбсолютное содержание ДНК в хромосомах человека рассчитывали исходя из размера диплоидного генома человека, равного 7.0 пг (www.genomesize.com). ^вЧисло пар оснований ДНК определяли с учетом того, что 1 фг содержит $0.978 \cdot 10^6$ пар оснований (Gregory, 2001).

занный с колебаниями фона, будет зависеть от коэффициента вариации фона на препарате (Cv_{ϕ}) и отношения n_{ϕ}/n_{ϕ_0} :

$$\delta_{\phi} = (Cv_{\phi} \cdot n_{\phi}/n_{\phi_0}) \cdot 100 \%,$$

где $Cv_{\phi} = \sigma_{\phi}/\bar{n}_{\phi}$, σ_{ϕ} — стандартное отклонение, \bar{n}_{ϕ} — среднее значение фона. Влияние колебаний флуоресценции фона на точность измерения содержания ДНК в хромосомах в значительной степени зависит от условий приготовления препарата и поэтому в каждом конкретном случае может быть различным.

Влияние поглощения возбуждающего света на интенсивность флуоресценции хромосом, окрашенных EtBr-SO₂ (эффект внутреннего фильтра), очень мало: во-первых, из-за того что оптическая плотность хромосом человека составляет менее 0.01, а во-вторых, вариабельность концентрации ДНК в различных хромосомах невелика.

Результаты определения содержания ДНК в хромосомах человека, окрашенных EtBr-SO₂, представлены в табл. 3. Коэффициент вариации содержания ДНК в хромосомах возрастал с уменьшением их размера: от 4.6 %

для хромосомы 1 до 12.4 % для хромосомы 21. Средний коэффициент вариации при измерении содержания ДНК в хромосомах нашим методом составил 7.3 %.

В табл. 3 представлены также результаты измерения содержания ДНК в коротком (p) и длинном (q) плечах каждой хромосомы кариотипа человека. Наибольшая вариабельность значений содержания ДНК ($Cv = 21.2$ — 23.8 %) наблюдалась в р-плечах ядрышкообразующих хромосом 13—15, 21 и 22, в которых, как известно, локализируются гены рибосомной ДНК. Содержание ДНК в р-плечах хромосом 13—15 похожее, но выше, чем в р-плечах хромосом 21 и 22 ($P < 0.05$). Что касается q-плеч, то наиболее высокая вариабельность содержания ДНК отмечена в Y-хромосоме ($Cv = 18.5$ %). Значительная вариабельность содержания ДНК (13.8—14.8 %) зарегистрирована также в хромосоме 19.

Считается, что гомологи в одной и той же метафазной пластинке имеют очень близкие размеры. Однако данные литературы по этому вопросу весьма скудны. Чтобы оценить, насколько близко содержание ДНК в гомологичных хромосомах, мы исследовали несколько метафазных пластинок у одного человека. Данные, представленные в табл. 4, свидетельствуют о том, что разли-

Таблица 4

Различия по содержанию ДНК в гомологичных хромосомах женщины

Номер хромосомы	Число исследованных пластинок	Разность D в содержании ДНК, %, $\bar{x} \pm s_x$	Размах вариации, %	Размах вариации, фг
1	6	5.9 ± 1.6	1.8—11.8	5.3—32.6
2	7	6.9 ± 1.4	0.2—11.1	0.6—31.5
3	7	5.2 ± 1.6	1.1—11.5	2.5—26.3
4	6	4.2 ± 1.6	0.5—9.3	1.2—21.2
5	7	6.3 ± 1.3	2.9—10.8	6.6—23.0
6	6	6.2 ± 1.7	1.1—12.3	2.0—24.5
7	7	6.9 ± 1.6	1.6—12.0	2.9—22.9
X	3	9.5 ± 3.0	3.8—13.9	6.6—25.6
8	7	8.7 ± 1.9	1.0—16.0	2.6—26.4
9	5	10.2 ± 2.4	6.2—19.3	12.0—30.4
10	6	4.9 ± 2.0	0.5—12.9	2.0—24.5
11	5	6.4 ± 1.0	3.5—8.5	5.1—13.7
12	6	8.5 ± 2.7	2.5—20.4	3.4—31.8
13	5	6.9 ± 4.2	0.2—22.9	0.3—28.2
14	6	12.0 ± 3.2	1.1—24.4	1.1—28.5
15	6	9.0 ± 2.1	1.9—16.4	2.0—17.5
16	5	7.1 ± 1.8	1.6—10.9	1.7—11.4
17	8	10.7 ± 2.4	2.5—22.2	2.6—21.7
18	7	6.8 ± 1.8	0.6—9.9	0.6—14.2
20	6	11.9 ± 3.2	3.2—24.4	2.4—18.1
19	7	13.0 ± 2.8	2.6—22.2	2.0—16.0
22	6	16.9 ± 4.2	3.8—30.2	2.4—17.2
21	6	14.8 ± 4.6	1.8—28.6	0.9—15.8

Примечание. Разницу (D) в содержании ДНК между гомологами рассчитывали по формуле $D = 2(Q_1 - Q_2)/Q_1 + Q_2$, где Q_1 и Q_2 — содержание ДНК в одном и другом гомологах соответственно.

чия между гомологами весьма значительны. В некоторых случаях, особенно для небольших по размеру хромосом, они достигают примерно 25 %.

Обсуждение

Размер генома, выражаемый обычно содержанием ДНК в пг (10^{-12} г), является важной видовой характеристикой. У разных видов позвоночных он может различаться в сотни раз (Gregory, 2001). В отличие от межвидовой вариабельности размера генома его внутривидовые колебания, как правило, не превышают 3—5 % (Литвинчук и др., 2006, 2008). Индивидуальная вариабельность размера генома еще примерно на порядок ниже и составляет величину около 0.3 % при исследовании объектов с размером генома около 3 пг (Розанов, Виноградов, 1998).

Вариабельность размера генома 0.3 % при исследовании его индивидуальных колебаний представляет, по-видимому, верхнюю границу точного измерения содержания ДНК в клетках позвоночных с помощью проточной цитометрии. Величина 0.3 % означает также, что минимальные различия в содержании ДНК, которые можно зарегистрировать на целых ядрах с помощью цитометрического метода, составляют около 9 фг (10^{-15} г), или 10^7 пар оснований.

В настоящее время измерения содержания ДНК в клетках производятся либо с помощью методов проточной цитометрии, либо с использованием методов статичной абсорбционной или флуоресцентной цитофотометрии. В отличие от красителей, используемых в проточной цитометрии, краситель, прочно связанный с ДНК в результате реакции Фельгена, не извлекается из ядер даже после многочасовой обработки препаратов этанолом (Кудрявцев и др., 1974а).

Различные исследования в зависимости от их задач требуют разной точности определения содержания ДНК в геноме. В целом ряде случаев высокая точность определения содержания ДНК необязательна. Например, при исследовании функции избыточной ДНК важно лишь наличие достаточного числа исследуемых видов, размер генома которых варьирует в широких пределах (Vinogradov, 1998). В измерениях подобного рода погрешность при определении содержания ДНК в ядрах клеток может составлять 20—30 % или более.

Коэффициенты вариации при измерении содержания ДНК в лимфоцитах человека с помощью лучших методов абсорбционной и флуоресцентной цитофотометрии колеблются в пределах 3—5 % (Агроскин, Папаян, 1977). Эта величина означает, что предельные различия в содержании ДНК, которые можно зарегистрировать в ядрах с помощью этих методов, соответствуют значительной ча-

сти, а в некоторых случаях даже всей ДНК одной хромосомы. Между тем при исследовании микроэволюции, онкогенеза и других биологических процессов требуется точная регистрация гораздо более тонких вариаций размера генома.

Считается, что чувствительность лучших методов абсорбционной цитофотометрии составляет величину порядка 10^{-14} г/мкм² (Бенеке, 1969; Бродский, 1969), а чувствительность цитофлуориметрических методов примерно в 10 000 раз выше чувствительности абсорбционных методов (Ornstein et al., 1957). Другими важными достоинствами цитофлуориметрических методов являются независимость результата измерения от характера распределения вещества в объекте и возможность исследовать содержание вещества в объектах, размеры которых могут находиться за пределами разрешающей способности микроскопа. Вышесказанное означает, что в принципе с помощью микрофлуориметрии можно измерить содержание ДНК в лежащем отдельно объекте порядка 10^{-18} г/мкм². Эта величина соответствует среднему размеру гена, который составляет 900—1500 пар оснований (Уотсон, 1978). Следует, однако, отметить, что регистрация столь малого количества ДНК зависит не только от чувствительности метода, но и его точности (Розанов и др., 1976). Поэтому достичь подобного результата на практике из-за нестабильности измерительной аппаратуры, нестабильности связывания флуоресцентных красителей с ДНК в ядрах клеток и варибельности фонового свечения вокруг измеряемого объекта, по-видимому, невозможно. Хотя стремиться к этому, конечно, нужно.

Результат любого измерения имеет небольшую ценность, если не указана погрешность, с которой он получен. При измерениях содержания ДНК в хромосомах это особенно важно, поскольку в данном случае точность измерений определяет количество генетического материала, которое может быть уверенно зарегистрировано с помощью используемого метода, а также достоверность различий в содержании ДНК между объектами исследования. Варибельность результата цитофотометрического метода, основанного на применении цитохимической реакции, определяется аппаратурными (см. выше) и цитохимическими (недостаточной селективностью и (или) стехиометричностью реакции) погрешностями, а также реальной биологической варибельностью исследуемого вещества. Аппаратурные ошибки цитофотометрии, как правило, невелики и легко идентифицируются. Однако оценить источники и величину ошибок, связанных с влиянием на исследуемое вещество различных процедур, которые используются в ходе окрашивания препарата, и отделить их от биологической варибельности, присущей изучаемому объекту, практически невозможно. Поэтому суммарная (аппаратурная, цитохимическая и биологическая) варибельность результата измерения содержания ДНК в хромосоме при использовании данного метода может быть выражена величиной коэффициента вариации S_v .

Исследование продолжительности действия возбуждающего света на хромосомы, окрашенные EtBr-SO₂, и степени спирализации хромосом на результаты определения содержания ДНК в них показало, что эти факторы не оказывают существенного влияния на конечный результат измерений. Эти данные подтверждают результаты, полученные нами ранее (Сухих и др., 1989).

Данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что коэффициент вариации при измерении содержа-

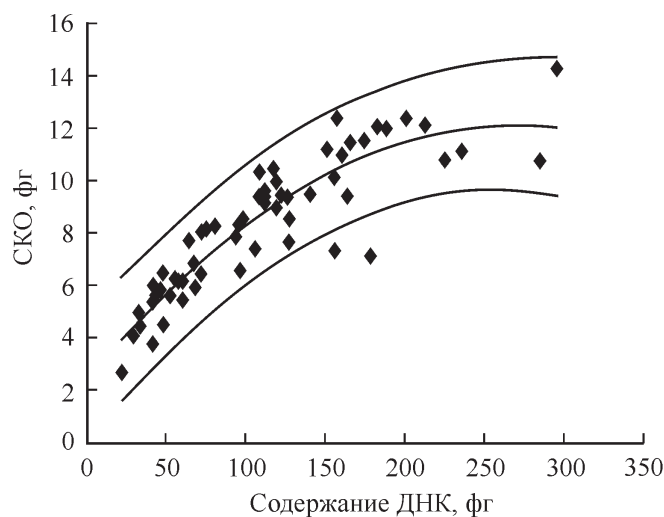


Рис. 2. Зависимость среднеквадратичного отклонения (СКО) измерений содержания ДНК в целых хромосомах и их плечах от среднего содержания ДНК.

Средняя линия — линия квадратичной регрессии $y = 2.46 + 0.072x + 0.0001x^2$, верхняя и нижняя линии — 95%-ный доверительный интервал.

ния ДНК в хромосомах возрастает с уменьшением их размера. Поскольку относительная ошибка при измерении площади объектов, как известно, увеличивается с уменьшением их размера, значительная часть этой варибельности, по-видимому, связана с неточностью бинаризации изображений хромосом. Вместе с тем нельзя исключить, что варибельность содержания ДНК в хромосомах действительно усиливается при уменьшении их размера, т. е. имеет биологическую природу. При исследовании индивидуальной варибельности размера генома у различных видов амфибий было показано, что коэффициент вариации пика ДНК-гистограммы, являющийся мерой варибельности количества ДНК в клетках непролиферирующей популяции, возрастает с уменьшением размера генома (Розанов и др., 2007).

На рис. 2 представлена зависимость среднеквадратичного отклонения (СКО) измерений содержания ДНК в целых хромосомах и в их плечах от среднего содержания ДНК в этих объектах, которую можно аппроксимировать уравнением регрессии $y = 2.46 + 0.072x + 0.0001x^2$. С другой стороны, из одного из свойств нормального распределения, а именно 5 % измерений будут ≤ 0 , когда отношение среднего к СКО будет равно 1.6, получим $x/y = 1.6$. Решая систему из двух уравнений, получим, что предельное значение среднего содержания ДНК, которое можно определить предлагаемым методом, составляет 4.45 фг.

Сравнение наших данных с результатами, полученными другими авторами с помощью различных методов, обнаружило высокую степень их соответствия (табл. 5). В табл. 3 представлены величины абсолютного содержания ДНК в индивидуальных хромосомах человека, полученные нами. Абсолютный размер генома составил для мужчин 7.00 пг, а для женщин 7.12 пг, т. е. размер женского генома больше мужского генома на 1.71 %. Это значение хорошо совпадает с данными, полученными другими авторами (см. табл. 5).

Значения абсолютного размера генома человека, имеющиеся в литературе, варьируют от 6.00 до 7.33 пг (Сухих и др., 1989; Фогель, Мотульски, 1989; Doležel et al., 2003). Тем не менее в настоящее время принято, что раз-

Содержание ДНК (отн. ед.) в индивидуальных хромосомах человека, измеренное различными методами

Номер хромосомы	Методы										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1.043	1.122	1.024	1.021	1.04	1.051	1.071	1.042	1.026	1.046	1.025
2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.00	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
3	0.840	0.887	0.827	0.833	0.83	0.827	0.855	0.444	0.839	0.843	0.814
4	0.781	0.776	0.791	0.790	0.78	0.771	0.778	0.812	0.798	0.775	0.786
5	0.742	0.776	0.758	0.759	0.76	0.768	0.739	0.771	0.762	0.752	0.744
6	0.710	0.655	0.716	0.709	0.70	0.711	0.704	0.729	0.719	0.710	0.704
7	0.657	0.655	0.656	0.659	0.65	0.645	0.661	0.677	0.675	0.646	0.654
X	0.635	0.655	0.640	0.630	0.64	0.636	0.637	0.667	0.647	0.630	0.638
8	0.620	0.655	0.604	0.601	0.60	0.609	0.625	0.625	0.611	0.617	0.602
9	0.575	0.655	0.562	0.568	0.58	0.581	0.591	0.594	0.577	0.565	0.581
10	0.557	0.655	0.552	0.561	0.56	0.576	0.544	0.573	0.575	0.557	0.557
11	0.546	0.655	0.564	0.558	0.56	0.566	0.531	0.573	0.575	0.551	0.555
12	0.532	0.655	0.557	0.551	0.55	0.554	0.511	0.572	0.575	0.543	0.550
13	0.448	0.478	0.441	0.449	0.44	0.443	0.428	0.458	0.454	0.448	0.474
14	0.415	0.478	0.426	0.425	0.41	0.421	0.395	0.448	0.435	0.417	0.441
15	0.396	0.478	0.400	0.413	0.40	0.420	0.384	0.427	0.413	0.393	0.422
16	0.375	0.372	0.367	0.384	0.38	0.391	0.366	0.396	0.387	0.365	0.372
17	0.348	0.385	0.353	0.351	0.36	0.361	0.342	0.364	0.353	0.349	0.334
18	0.324	0.385	0.332	0.334	0.33	0.329	0.333	0.354	0.337	0.328	0.321
20	0.278	0.298	0.284	0.274	0.28	0.283	0.282	0.292	0.279	0.273	0.259
19	0.260	0.298	0.256	0.260	0.27	0.274	0.277	0.271	0.260	0.252	0.243
Y	0.219	—	0.218	0.232	0.22	0.224	—	0.219	0.231	0.218	0.244
22	0.211	0.219	0.204	0.215	0.22	0.217	0.220	0.208	0.214	0.206	0.211
21	0.186	0.219	0.194	0.196	0.20	0.202	0.211	0.187	0.185	0.176	0.198

Примечание. Содержание ДНК в хромосоме 2 принято за единицу. 1 — данные настоящей работы; 2 — фотографическая абсорбционная УФ-микротонометрия (Rudkin, 1965); 3, 4 — абсорбционная микротонометрия хромосом, окрашенных галлоцианин-хромовыми квасцами (Gaillard et al., 1968; Mendelsohn et al., 1973); 5, 6 — фотографическая абсорбционная микротонометрия хромосом, окрашенных по Фельгену (Bosman et al., 1977; Groen, van der Ploeg, 1979); 7 — микрофлуориметрия хромосом, окрашенных по Фельгену (аурамин-SO₂) (Сухих, 1985); 8 — проточная цитометрия хромосом, окрашенных иодистым пропидием (Matsson, Rydberg, 1981); 9 — проточная цитометрия хромосом, окрашенных бромистым этидием (Harris et al., 1986); 10 — фотографическая микрофлуориметрия хромосом, окрашенных по Фельгену (аурамин-SO₂) (Сухих и др., 1989); 11 — http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Genome.

мер генома человека составляет 7.0 пг (Gregory, 2001; Krishan et al., 2005). Эта величина получена путем измерения содержания ДНК в лимфоцитах периферической крови человека, окрашенных иодистым пропидием или DAPI, с помощью проточной цитометрии. Существенным моментом в пользу применения проточной цитометрии для этой цели является возможность измерения во много раз большего количества клеток, нежели при использовании статических цитотометрических методов. Кроме того, считается, что обычные цитотометрические методы, основанные на применении реакции Фельгена, дают менее надежные результаты из-за вариабельности, возникающей в ходе фиксации, кислотного гидролиза и окрашивания препаратов.

При расчетах абсолютного содержания ДНК в геноме человека, равно как и других видов животных, в качестве стандартов используются различные типы клеток, для которых эта величина установлена с высокой точностью (Shapiro, 1976; Tiersh et al., 1989; Hardie et al., 2002; Krishan et al., 2005, и т. д.). Следует, однако, заметить, что исходными «стандартами» при определении размера ге-

нома человека, служили тем не менее значения содержания ДНК в эритроцитах домашней курицы или спермиях плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, окрашенных по Фельгену и измеренных с помощью классической сканирующей микроденситометрии (Rasch et al., 1971, 1985). В свою очередь абсолютные величины содержания ДНК в эритроцитах курицы были рассчитаны на основании биохимических данных, полученных при измерении содержания ДНК в эритроцитах курицы 50—60 лет назад (Mirsky, Ris, 1951; Leslie, 1955; Vendrely, Vendrely, 1956). Несмотря на сходство результатов биохимических исследований, полученных в различных лабораториях, размах вариации содержания ДНК (интервал значений) в эритроцитах курицы был значительным и составил 2.34—2.61 пг (2.50 ± 0.04 , $n = 7$). Таким образом, величина размера генома человека 7.0 пг, принятая в настоящее время, основана на косвенных довольно старых данных и, на наш взгляд, требует коррекции на основе дополнительных исследований.

Результаты, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что наибольшая вариабельность содержания

ДНК наблюдается в р-плечах хромосом 13—15, 21 и 22, q-плече Y-хромосомы, а также в обоих плечах хромосомы 19. Как известно, р-плечи акроцентрических ядрышкообразующих хромосом 13—15, 21 и 22 человека являются местом локализации ДНК, на которой образуется рРНК, играющая ключевую роль в синтезе белков. Рибосомная РНК составляет до 85 % общего количества клеточной РНК, и для синтеза такого ее количества необходимо большое число копий соответствующих генов. Во многих работах показано, что в основе полиморфизма ядрышкообразующих районов лежат как их функциональная активность, так и количество рибосомных генов, варибельность которых доказана биохимически и методом гибридизации РНК-ДНК *in situ* (Захаров и др., 1982; Ляпунова и др., 1988; Lysckegaard, Clark, 1989; Вейко и др., 2007; Stults et al., 2008).

Вариация длины Y-хромосомы и размера ее гетерохроматинового района, составляющего от 1/3 до 1/2 q-плеча, является одним из наиболее известных примеров полиморфизма хромосомного набора человека (Gripenberg, 1964; Unnerus et al., 1967; McKenzie et al., 1972; Chakraborty, Chakraborty, 1984; Прокофьева-Бельговская, 1986; de Carvalho, Santos, 2005). Полагают, что вариация длины Y-хромосомы у человека может быть связана с изменением содержания сателлитной ДНК в этой хромосоме (McKay et al., 1978).

Хромосома 19 содержит около 2 % ДНК генома человека (табл. 3), и, как известно, концентрация генов в этой хромосоме особенно высока. Результаты, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что варибельность содержания ДНК в обоих плечах этой хромосомы достаточно велика. Причины значительной варибельности содержания ДНК в хромосоме 19 неясны. Ранее высокая варибельность содержания ДНК в хромосоме 19, а также хромосомах 1, 13—16, 21, 22 и Y, достигающая 10—40 %, была обнаружена при исследовании содержания ДНК в хромосомах человека из 7 различных популяций с помощью проточной цитометрии (Mefford et al., 1997).

Результаты, представленные в табл. 5, указывают на достаточно высокую варибельность содержания ДНК в гомологичных хромосомах из метафазных пластинок одного и того же человека. Варибельность содержания ДНК в гомологичных хромосомах достигала в некоторых случаях 25—30 фг. Безусловно, часть этой варибельности обусловлена тем, что гомологи представляют геномы родителей, которые могли приобрести различия в ряду предшествующих поколений. Вместе с тем нужно отметить, что различия в содержании ДНК между гомологами в различных метафазных пластинках по большей части представляют собой непрерывный ряд значений. Поэтому нельзя исключить, что эти различия могут объясняться и другими механизмами.

Нестабильность целого генома и хромосом может быть обусловлена разными причинами. Среди возможных механизмов варибельности содержания ДНК в хромосомах обычно называют мейотический и соматический кроссинговер, амплификацию некоторых генов и тандемную дупликацию определенных последовательностей ДНК, неравный кроссинговер, подвижные генетические элементы типа транспозона или вируса и т. д. (Arnheim et al., 1980; Donehower et al., 1980; Хесин, 1985; Graham et al., 1985; Гринчук и др., 1986, 2007; Tusie-Luna, White, 1995; Antonarakis, 2010). Независимо от причин очевидно, что нестабильность генетического материала в хромо-

сомах высока. С увеличением точности измерения содержания ДНК в хромосомах и особенно в их специфических участках эта нестабильность будет проявляться с еще большей отчетливостью.

Таким образом, разработан микрофлуориметрический метод, позволяющий определять содержание ДНК в хромосомах с точностью до 4.5 фг. С помощью разработанного метода измерено содержание ДНК в индивидуальных хромосомах человека и их р- и q-плечах, а также гомологичных хромосомах. Показано, что содержание ДНК в хромосомах нормального кариотипа человека нестабильно. Варибельность содержания ДНК в некоторых хромосомах может достигать от 35 до 40 фг.

Список литературы

- Агафонова Н. А., Ушал И. Э., Кудрявцев Б. Н. 2002. Метод телевизионной флуориметрии ДНК в индивидуальных хромосомах человека. Цитология. 44 (9) : 858.
- Агроскин Л. С., Папаян Г. В. 1977. Цитофотометрия. Л.: Наука. 295 с.
- Баранов В. С. 2007. Цитогенетика эмбрионального развития человека: Научно-практические аспекты. СПб.: М.—Л. 640 с.
- Бенеке Г. 1969. Применение интерференционной микроскопии для исследования биологических объектов. В кн.: Введение в количественную цитохимию. М.: Мир. 70—92.
- Бродский В. Я. 1969. Итоги и перспективы количественных цитохимических исследований. В кн.: Введение в количественную цитохимию. М.: Мир. 11—20.
- Вейко Н. Н., Шубаева Н. О., Малащенко А. М., Бескова Т. Б., Агапова Р. К., Ляпунова Н. А. 2007. Рибосомные гены в инбредных линиях мышей: межлинейная и внутрелинейная варибельность числа копий и степени метилирования. Генетика. 43(9) : 1226—1238.
- Гринчук Т. М., Сухих Т. Р., Сорокина Е. А., Арцыбашева И. В., Паньшина Ю. Т., Розанов Ю. М., Кудрявцев Б. Н., Игнатова Т. Н. 1986. Микрофлуориметрическая оценка содержания ДНК в индивидуальных хромосомах подтверждает цитогенетически обнаружимые амплификации ДНК в структурных вариантах хромосомы 1 клеток китайского хомячка со стабильной множественной лекарственной устойчивостью. ДАН СССР. 286 (3) : 712—717.
- Гринчук Т. М., Ушал И. Э., Арцыбашева И. В., Павленко М. А., Кудрявцев Б. Н. 2007. Микрофлуориметрический анализ динамики геномных изменений фибробластов китайского хомячка CHL V-79 RJK с множественной лекарственной устойчивостью. Цитология. 49 (12) : 1011—1015.
- Захаров А. Ф., Бенюш В. А., Кулешов Н. П., Барановская Л. И. 1982. Хромосомы человека. М.: Медицина. 264 с.
- Карпищенко А. И. 1999. Медицинские лабораторные технологии. СПб.: Наука. 656 с.
- Кудрявцев Б. Н., Кудрявцева М. В., Розанов Ю. М. 1974а. Определение оптимальных условий цитохимической реакции для микрофлуориметрического исследования ДНК в клетках. IV. Этап дифференцирования в реакции Фельгена с аурамин- SO_2 . Цитология. 16(2) : 256—261.
- Кудрявцев Б. Н., Кудрявцева М. В., Фаддеева М. Д. 1974б. Цитофлуориметрия ДНК с этидиумбромидом — SO_2 . Цитология. 16 (1) : 107—111.
- Лазюк Г. И. 1991. Тератология человека. М.: Медицина. 315 с.
- Литвинчук С. Н., Розанов Ю. М., Боркин Л. Я., Скоринков Д. В. 2008. Молекулярно-биохимические и цитогенетические аспекты микроэволюции у бесхвостых амфибий фауны России и сопредельных стран. В кн.: Материалы III съезда Герпетологического общества им. А. М. Никольского. Пушкино. 247—257.
- Литвинчук С. Н., Розанов Ю. М., Усманова Н. М., Боркин Л. Я., Мазанова Л. Ф., Казаков В. И. 2006. Изменчивость

микросателлитов *VM224* и *Vca17* в популяции зеленых жаб (*Bufo viridis* complex), различающихся по размеру генома и плоидности. Цитология. 48 (4): 332—345.

Ляпунова Н. А., Еголина Н. А., Мхитарова Е. В. 1988. Межиндивидуальные и межклеточные различия суммарной активности рибосомных генов, выявляемые Ag-окраской ядрышкообразующих районов акроцентрических хромосом человека. Генетика. 24(7): 1282—1288.

Макгрегор Г., Варли Дж. 1986. Методы работы с хромосомами животных. М.: Мир. 272 с.

Мамаева С. Е. 2002. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. Москва. Научный мир. 234 с.

Прокофьева-Бельговская А. А. 1986. Гетерохроматические районы хромосом. М.: Наука. 131 с.

Розанов Ю. М., Виноградов А. Е. 1998. Прецизионная ДНК-цитометрия: исследование индивидуальной вариабельности размера генома животных. Цитология. 40 (8/9): 792—799.

Розанов Ю. М., Кудрявцев Б. Н., Кудрявцева М. В. 1976. О точности и чувствительности цитофлуориметрического метода. В кн.: Всесоюзный симпозиум «Цитохимические аспекты развития и функционирования нервной системы». Тбилиси. 69—71.

Розанов Ю. М., Литвинчук С. Н., Боркин Л. Я., Чагин В. О. 2007. Исследование изменчивости размера генома животных: данные о существовании 1 М. п.н. эпидомена хроматина. Цитология. 49(9): 788.

Сухих Т. П. 1985. Микрофлуориметрия ДНК в индивидуальных хромосомах млекопитающих: Автореф. канд. дис. Л. 21 с.

Сухих Т. П., Калимагамбетов А. М., Барский И. Я., Хоменкова С. А., Виноградов А. Е., Розанов Ю. М., Кудрявцев Б. Н. 1989. Фотографический микрофлуориметрический метод определения содержания ДНК в индивидуальных хромосомах человека. Цитология. 31(11): 1329—1337.

Уотсон Д. 1978. Молекулярная биология гена. М.: Мир. 720 с.

Фогель Ф., Мотульски А. 1989. Генетика человека. М.: Мир. 1: 312 с.

Хесин Р. Б. 1985. Непостоянство генома. М.: Наука. 472 с.

Штейн Г. И., Пантелеев В. Г., Поваркова А. В., Кудрявцев Б. Н. 1998. Возможности анализатора изображений «ВидеоТест» для проведения микрофотометрических исследований в цитологии. Цитология. 40 (10): 913—916.

Antonarakis S. E. 2010. Human genome sequence and variation. In: Human genetics: problems and approaches. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 2: 31—53.

Arnheim N., Krystal M., Schmickel R., Wilson G., Ryder O., Zimmer E. 1980. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nonhomologous chromosomes in man and apes (restriction maps/concerted evolution/unequal crossing-over/natural selection/chromosome abnormalities). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 77: 7323—7327.

Bosman F., Van Der Ploeg M., Geraedts J. P. M. 1977. Influence of Q and G-banding on the Feulgen-stainability of human metaphase chromosomes. Histochem. J. 9: 31—33.

Carvalho C. M. B., de Santos F. R. 2005. Human Y-chromosome variation and male dysfunction. J. Mol. Genet. Med. 1: 63—75.

Chakraborty B. M., Chakraborty R. 1984. Variations in the length of human Y chromosome: a statistical study. Acta anthropogenet. 8 (3—4): 269—275.

Doležel J., Bartos J., Voglmayr H., Greihsberger J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Cytometry. A. 51A: 127—128.

Donehower L., Furlongs C., Gillespie D., Kurnit D. 1980. DNA sequence of baboon highly repeated DNA: evidence for evolution by nonrandom unequal crossovers (satellite DNA/nucleosome/heterochromatin/primates). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 77: 2129—2133.

Gaillard J. L. I., Van Duijn, Schaberg A. 1968. Photometric determination of DNA in human chromosomes. Exp. Cell Res. 53: 417—431.

Graham K. A., Richardson C. L., Minden M. D., Trent J. M., Buick R. N. 1985. Varying degrees of amplification of the N. ras oncogene in the human breast cancer cell line MCF-7. Cancer Rec. 45: 2201—2205.

Gregory T. R. 2001. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 76: 65—101.

Gripenberg U. 1964. Size variation and orientation of the human Y chromosome. Chromosoma. 15: 618—629.

Groen F. C. A., van der Ploeg M. 1979. DNA cytophotometry of human chromosomes. J. Histochem. Cytochem. 27: 436—440.

Hardie D. C., Gregory T. R., Hebert P. D. 2002. From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. J. Histochem. Cytochem. 50: 735—749.

Harris P., Boyd E., Young B. D., Ferguson-Smith M. A. 1986. Determination of the DNA content of human chromosomes by flow cytometry. Cytogenet. Cell Genet. 41: 14—21.

Krishan A., Dandekar P., Nathan N., Hamelik R., Miller C., Shaw J. 2005. DNA index, genome size, and electronic nuclear volume of Vertebrates from the Miami metro zoo. Cytometry. A. 65A: 26—34.

Leslie I. 1955. The nucleic acid content of tissues and cells. In: The nucleic acids. New York: AP Inc. 2: 1—44.

Lyckegaard E. M., Clark A. G. 1989. Ribosomal DNA and stellate gene copy number variation on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 86: 1944—1948.

Mattson P., Rydberg B. 1981. Analysis of chromosomes from human peripheral lymphocytes by flow cytometry. Cytometry. 1: 369—372.

McKay R. D. G., Bobrow M., Cooke H. J. 1978. The identification of a repeated DNA sequence involved in the karyotype polymorphism of the human Y chromosome. Cytogenet. Cell Genet. 21: 19—32.

McKenzie W. H., Hostetter T. L., Lubs H. A. 1972. Y family study: heritable variation in the length of the human Y chromosome. Amer. J. Hum. Genet. 24: 686—693.

Mefford H., van den Engh G., Friedman C., Trask B. J. 1997. Analysis of the variation in chromosome size among diverse human populations by bivariate flow karyotyping. Hum. Genet. 100: 138—144.

Mendelsohn M. L., Mayall B. H., Bogart E., Moore D. H., Perry B. H. 1973. DNA content and DNA-based centromeric index of the 24 human chromosomes. Science. 179: 1126—1129.

Mirsky E., Ris H. 1951. The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. J. Gen. Physiol. 34: 451—462.

Ornstein L., Maunter W., Davis B. J., Tamura R. 1957. New horizons in fluorescence microscopy. J. Maunt. Sinai Hospt. 24: 1066—1078.

Rasch E. M. 1985. DNA «standards» and the range of accurate DNA estimates by Feulgen absorption. Prog. Clin. Biol. Res. 196: 137—166.

Rasch E. M., Barr H. J., Rasch R. W. 1971. The DNA content of sperm of *Drosophila melanogaster*. Chromosoma. 33: 1—18.

Rudkin G. T. 1965. Photometric measurements of individual metaphase chromosomes. In vitro. 1: 12—20.

Shapiro H. S. 1976. Deoxyribonucleic acid content per cell of various organisms. In: Handbook of biochemistry and molecular biology. Cleveland: CRC Press. 2: 284—306.

Stults D. M., Killen M. W., Pierce H. H., Pierce A. J. 2008. Genomic architecture and inheritance of human ribosomal RNA gene clusters. Genome Res. 18: 13—18.

Tiersch T. R., Chandler R. W., Wachtel S. S., Elias S. 1989. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. Cytometry. 10: 706—710.

Tusie-Luna M.-T., White P. C. 1995. Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms (recombination/polymerase chain reaction/spermatozoa). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92: 10 796—10 800.

Unnérus V., Fellman J., de la Chapelle A. 1967. The length of the human Y chromosome. *Cytogenetics*. 6 : 213—227.

Vendrely R., Vendrely C. 1956. The results of cytophotometry in the study of the deoxyribonucleic acid (DNA) content of the nucleus. *Int. Rev. Cytol.* 5 : 171—194.

Vinogradov A. E. 1998. Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship. *Cytometry*. 31 : 100—109.

Поступила 4 XII 2012

DNA IMAGE-FLUORIMETRY OF INDIVIDUAL HUMAN CHROMOSOMES

N. A. Agafonova, G. A. Sakuta, Yu. M. Rozanov, G. I. Shtein, B. N. Kudryavtsev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: bn_kudryavtsev@mail.ru

Microfluorimetric method for the determination of DNA content in individual human chromosomes has been developed. The method is based on a preliminary identification of chromosomes with Hoechst 33258, followed by staining of the chromosomes with Feulgen reaction using Schiff's reagent type ethidium bromide-SO₂, then measuring the fluorescence intensity of the chromosomes using an image analyzer. The method allows to determine the DNA content of individual chromosomes with accuracy up to 4.5 fg. DNA content of individual human chromosomes, their p- and q-arms as well as homologous chromosomes were measured using the developed method. It has been shown that the DNA content in the chromosomes of normal human karyotype is unstable. Fluctuations in the DNA content in some chromosomes can vary 35—40 fg.

Key words: human chromosomes, Feulgen reaction, Schiff's reagent type ethidium bromide-SO₂, DNA microfluorimetry, image analyzer.
