Доклады Академии наук СССР
1955. Том 102, № 2

ЦИТОЛОГИЯ

В. Я. БРОДСКИЙ

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЩЕСТВ В СТРУКТУРАХ ЖИВОТНОЙ КЛЕТКИ (НА ПРИМЕРЕ ЦИТОФОТОМЕТРИИ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЯДРАХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ)

(Представлено академиком А. И. Опариным 17 II 1955)

Количественная гистохимия начала разрабатываться с 1932 г. ([1]) и достигла особенного развития за последние годы. Однако недавно появились сообщения ([2,3]) о возможности значительных ошибок при количественном гистохимическом определении веществ вследствие неравномерности распределения веществ в клетке. Определив величины этих ошибок, мы пришли к выводу, что применительно к химии клетки последовательная фотометрия с автоматической регистрацией является значительно более точным методом, чем фотометрия больших участков клетки одновременно. Так, если при фотоэлектрической или фотографической фотометрии целой клетки или целого ядра* ошибка в определении оптической плотности в среднем равна 50%, то при фотографической последовательной фотометрии с автоматической регистрацией почернений (узкая щель) ошибка из-за неравномерного распределения вещества не превышает 10%.

Целью настоящей работы было показать на примере количественного определения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в ядрах клеток печени возможности фотографической цитофотометрии. Кроме того, мы ставили себе задачу изложить общие принципы и порядок количественного определения вещества при помощи ультрафиолетовой микроскопии и фотографической цитофотометрии (те же принципы лежат в основе количественного определения веществ на окрашенном после гистохимической реакции препарате). Применяемый нами метод существенно отличается от фотографического метода Касперссона ([4]).

Количественная цитофотометрия исходит из основного закона абсорбционного анализа: оптическая плотность пропорциональна числу молекул поглощающего вещества (закон Ламберта — Беера)

$$D = kcd, \text{ откуда } c = \frac{D}{kd},$$

где D — оптическая плотность вещества, c — концентрация, d — толщина слоя, k — коэффициент поглощения (величина постоянная в пределах определенных концентраций вещества).

Для определения же количества вещества (Q) необходимо, кроме его концентрации, знать объем (V) исследуемой структуры:

$$Q = cV = \frac{D}{kd} V.$$

* Диафрагма фотоэлемента открыта соответственно границам увеличенного изображения клетки или ядра ([7,10–12]).

Рассмотрим порядок определения количества вещества на примере определения количества ДНК в ядрах клеток печени мыши (всего измерено 170 ядер клеток печени у 4 мышей самцов, весом от 17 до 20 г).

Измерение толщины среза. Кусочки печени фиксировались по Карнуа или 10% нейтральным формалином, заливались обычным способом в парафин и нарезались на срезы 3—5 μ. Срезы, приклеенные (без белка) на кварцевое предметное стекло, освобождались от парафина и помещались на столик микроскопа. Толщина препарата определялась при фокусировке объектива микроскопа на нижнюю и верхнюю поверхности среза. Фокусировка производится раздвижением тубуса микроскопа (раздвижение легче производить при помощи кремальеры, соединяющей части раздвижного тубуса). Цена деления тубуса равна 0,5 μ (при объективе 40 ×) или 0,2 μ (при объективе 90 ×). Так как измерялись неокрашенные срезы, для контраста изображения использовался фазовый контраст. Измерение необходимо производить в тех участках среза, которые затем будут изучаться. (Многие микротомы дают ровную ленту парафиновых срезов при установке микротома на 3—4 μ, но в действительности срезы этой ленты имеют толщину 5—7 μ. Кроме того, один и тот же срез имеет неодинаковую толщину в различных участках.) В нашей работе отбирались срезы не толще 5 μ.

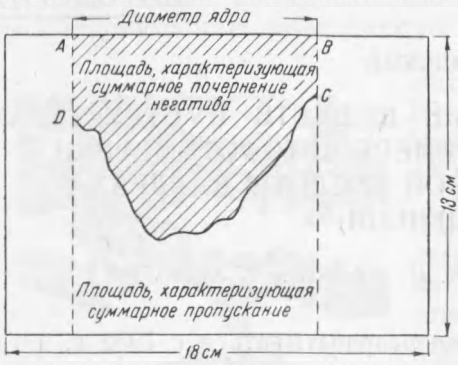


Рис. 1. Кривая почернения — пропускания

Оптическая плотность определялась по формуле

$$D = \frac{S_0 - S}{\gamma},$$

где S — почернение негатива клетки с исследуемым веществом; S_0 — неспецифическое почернение (фон) негатива той же клетки после удаления исследуемого вещества (почернение за счет других поглощающих веществ, преломления света в препарате, рассеяния и т. д.); γ — коэффициент контрастности эмульсии. Участки среза с известной толщиной фотографировались в ультрафиолетовых лучах с длиной волны 250—280 мμ, которые поглощаются нуклеиновыми кислотами и белками (микроскоп МУФ-2). Каждый участок фотографируется дважды: а) с исследуемым веществом и б) после удаления вещества. В нашей работе ДНК удалялась при гидролизе в 5% трихлоруксусной кислоте 90°, 20 мин. На ту же пластинку и с той же экспозицией снимались марки почернения — кварцевый ступенчатый ослабитель с известными величинами пропускания света. Так как все снимки делались на пластинках с одним номером эмульсии, экспонировались и проявлялись в одинаковых условиях, малейшие изменения почернения ступенек ослабителя на негативе характеризуют величину индивидуального отклонения данной пластинки, что позволяет получать сопоставимые результаты при съемке в разное время на различных пластинках ([5],[6]). Затем каждое ядро фотометрировалось при помощи регистрирующего микрофотометра МФ-4. Результатом фотометрии являлась кривая, автоматически вычерчиваемая зайчиком зеркального гальванометра (соединенного с фотоэлементом микрофотометра) на фотопластинке (см. рис. 1). Эта кривая характеризует суммарное почернение (и пропускание) исследуемой структуры.

Усреднение этого суммарного почернения проводилось так: 1) При помощи планиметра производилось интегрирование почернения, т. е. измерение площади *ABCD* (рис. 1). 2) Разделив площадь *ABCD* на ширину *AB*, мы получали среднюю высоту площади *ABCD*, характеризующую среднее почернение для данной кривой. 3) Для перевода полученной величины в обычные единицы поглощения мы пользовались полученной нами кривой (см. рис. 2), характеризующей зависимость между высотой площади *ABCD* (в сантиметрах) и почернением (в логарифмических единицах). Усредненное почернение для негатива ядра, снятого до удаления ДНК, и есть величина S, а среднее почернение негатива ядра после удаления ДНК — S_0. Для ядер каждого животного подсчитывались средние значения S и S_0. Разница между S и S_0 во всех случаях статистически достоверна (ошибка среднего арифметического $\pm 0{,}007$—$0{,}04$). Величина γ узнается после измерения почернений ступенек ослабителя и построения характеристической кривой ([5,6]).

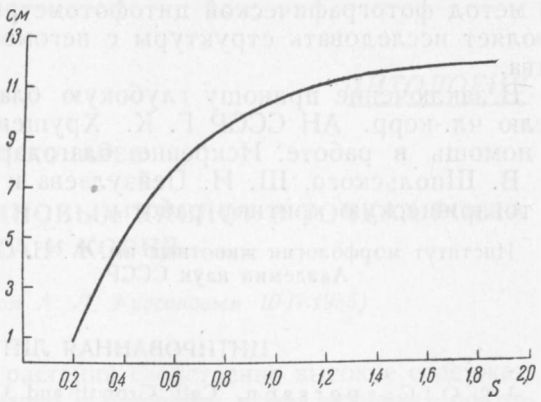


Рис. 2. Кривая зависимости между средней высотой площади *ABCD* (рис. 1), характеризующей суммарное почернение, и величиной почернения

Зная D, d и k*, можно определить концентрацию вещества. Для исследованных нами ядер печени средняя концентрация (у разных животных) оказалась $c = 0{,}023$—$0{,}026$ г / см³.

Определение объема. Объем ядер у мышей №№ 1 и 2 определялся по формуле шара, где за радиус принималась половина линии *AB* (рис. 1), выраженная в микронах. Однако затем мы ознакомились с работой ([8]), где дается более правильный способ определения объема ядра. Объем ядер мышей №№ 3 и 4 определен по формуле эллипсоида $V_1 = \frac{\pi}{6} abh$ (где a, b и h — диаметры ядра, измеренные при увеличении негатива в 20 раз). Средний объем ядер клеток печени у мышей №№ 1—4 равен 239—$325 \cdot 10^{-12}$ см³.

Среднее количество ДНК в ядре клетки печени мыши № 1 равно $7{,}8 \cdot 10^{-12}$ г; для № 2—$5{,}5 \cdot 10^{-12}$ г; для № 3—$6{,}4 \cdot 10^{-12}$ г; для № 4—$6{,}9 \cdot 10^{-12}$ г. Среднее всех измерений—$6{,}6 \cdot 10^{-12}$ г ДНК в ядре клетки печени мыши.

Количество ДНК в ядре клетки печени мыши, крысы, морской свинки или кролика, измеренное 14 различными авторами биохимическим методом или фотометрией реакции Фельгена, колеблется в пределах $5 \div 11 \cdot 10$ г $^{-12}$ г. В частности, для мыши известны следующие величины количества ДНК в ядре: 5—7; 6,3; 8—10; $7 \cdot 10^{-12}$ г ([9–12]).

Следует отметить, что фотометрия гистохимических реакций ([7,10–12]) проводилась после искусственной гомогенизации ДНК в ядре (обработка кусочков ткани сахарозой или глицерином перед фиксацией). При неравномерном распределении вещества метод, применяемый цитированными авторами (фотоэлектрическая фотометрия целого ядра),

---

* Для нуклеиновых кислот Поллистер и Рис определили $k = 20\,000$ см² г$^{-1}$ ([7]). Однако мы пользовались другим прибором, что могло внести существенную ошибку из-за изменения величины k. Определенная нами величина коэффициента поглощения нуклеиновой кислоты равна 18 000 см² г$^{-1}$ и принята в расчетах настоящей работы.

дал бы большую ошибку ([2],[3]). Наши измерения проводились на негомогенных ядрах после обычной фиксации, но результаты, тем не менее, совпадают с данными биохимических и других методик. Это свидетельствует о том, что: 1) использованный нами метод достаточно точно определяет количества вещества в клетке (ошибка 5—10%) и 2) метод фотографической цитофотометрии в нашей модификации позволяет исследовать структуры с негомогенным распределением вещества.

В заключение приношу глубокую благодарность моему руководителю чл.-корр. АН СССР Г. К. Хрущеву за предоставленную тему и помощь в работе. Искренне благодарю также Е. М. Брумберга, Э. В. Шпольского, Ш. И. Пейзулаева и В. В. Бибикова за помощь и товарищескую критику работы.

Институт морфологии животных им. А. Н. Северцова
Академии наук СССР

Поступило
5 II 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] T. O. Caspersson, Cell Growth and Cell Function, 1950. [2] D. Glick, A. Engström, B. Malmström, Science, **114**, No. 2958, 253 (1951). [3] G. Gomori, Microscopic Histochemistry, 1952. [4] T. O. Caspersson. Skand. Archiv f. Physiol., **73**, suppl. 8, 3 (1936). [5] В. К. Прокофьев, Фотографические методы количественного спектрального анализа металлов и сплавов, 2, 1951. [6] В. М. Чулановский, Введение в молекулярный спектральный анализ, 1951. [7] A. W. Pollister, H. Ris, Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol., **12** (1947). [8] H. L. Micklewright, N. B. Kurnick, R. Hodes, Exp. Cell Res., **4**, No. 1, 152 (1953). [9] A. Boivin, R. Vendrely, C. Vendrely, C. R., **226**, 1061 (1948). [10] A. W. Pollister, C. Leuchtenberger, Proc. Nat. Acad. Sci., **35**, No. 2, 111 (1949). [11] H. Naora, Science, **114**, No. 2958, 279 (1951). [12] Kurnick, Exp. Cell. Res., **1**, No. 2, 151 (1950).