

Е. Н. АНТРОПОВА, Т. Ф. ПЕТРОВА, Ю. Ф. БОГДАНОВ

ЦИТОФОТОМЕТРИЯ ГИСТОНА И ДНК В МИТОТИЧЕСКОМ ЦИКЛЕ
ЯДЕР ЭНДОСПЕРМА ТЮЛЬПАНА

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 19 I 1970)

Недавно, при участии двух авторов данной статьи, было показано (1, 2), что при переходе клеток от митоза к мейозу процесс удвоения гистона в ядрах задержан по сравнению с редупликацией ДНК. В то время как синтез ДНК заканчивается в предмейотический период, процесс удвоения количества гистона в ядрах продолжается в ранней профазе I вплоть до стадии пахины. В лептоне, зигоне и ранней пахине количество гистона в ядре увеличивается примерно на 30%. В противоположность этому, во время митотического цикла удвоение ядерного гистона и ДНК происходит одновременно и заканчивается в интерфазе: это установлено рядом авторов цитометрическими (5, 7, 8, 12, 14), автордиографическими (9) и биохимическими (10, 13) методами.

Для того чтобы уверенно утверждать, что задержка удвоения гистона до середины профазы специфична только для мейоза, необходим ряд специальных проверок. Одним из способов проверки может служить исследование количества гистона на протяжении ранней, средней и поздней профазы митоза. Таких данных в литературе нет: все цитометрические исследования удвоения гистона в митотическом цикле выполнены на интерфазных клетках (5, 7, 13). Учитывая сказанное, мы поставили задачу исследовать количество гистона и ДНК на разных фазах митоза, и главным образом в профазе, применяя метод, использованный нами ранее при количественном определении этих веществ в профазе I мейоза (1, 2).

Для выполнения этой задачи наиболее удобны объекты с синхронным митозом. Чрезвычайно удобным объектом для наших целей является эндосперм различных видов *Tulipa*, на ранних стадиях развития которого наблюдается градиент митозов, или так называемая волна митозов.

Для исследования использовали среднеазиатский вид тюльпана *Tulipa Fosteriana* Grv., имеющий крупный эндоспермальный ценоцит с диплоидными ядрами (рис. 1, А, Б).

Первые деления ядра эндосперма протекать синхронно, находясь в одной фазе митоза. Далее появляется сдвиг по фазе: в ценоците одновременно наблюдается не одна, а две, три фазы митоза, следующие друг за другом в правильной последовательности, и, наконец, полностью весь цикл, т. е. полоса последовательных фаз митоза, по обе стороны от которой находятся интерфазные ядра (рис. 1В). Делящиеся ядра образуют в эндосперме кольцевой пояс, поэтому, разделив эндосперм на две равные половины по вертикали, можно приготовить два идентичных препарата, что делает этот объект весьма удобным для сравнительных цитохимических исследований.

Материал для исследования собирали с растений из коллекции Ботанического сада Ботанического института АН СССР. Использовали завязи, собранные через 20—30 дней после опыления, извлекали из них семяпочки (рис. 1А) и фиксировали их в 10% нейтральном формалине в течение 24 час. Фиксированный материал промывали сутки в проточной воде. Далее из семяпочек вычленили эндосперм, разрезали его на две половинки, каждую из которых расправляли на альбуминизированных предметных стеклах и подсушивали.

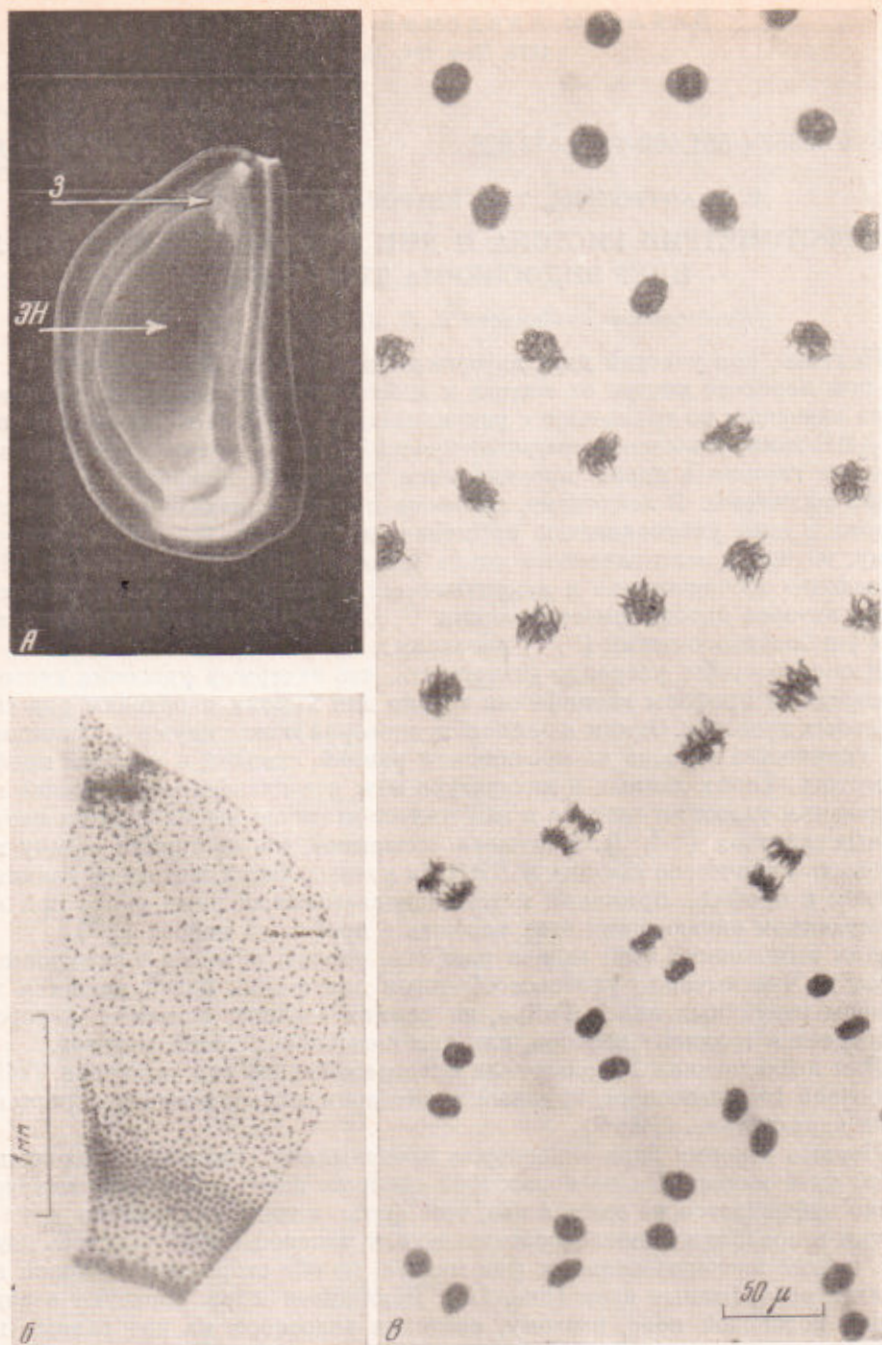


Рис. 1. А — просветленная в ксилоле семечка *Tulipa Fosteriana* (эн — эндосперм, з — зародыш); Б — выделенный эндосперм на стадии свободных ядер (фиксация формалином, окраска по Фельгену); В — «митотическая волна» в эндосперме *T. Fosteriana* (фиксация формалином, окраска прочным зеленым при pH 8,2)

Одну половинку эндосперма окрашивали по Фельгену на ДНК, а вторую, для выявления гистона, по Олферту и Гешвинду (⁶). Оригинальная методика Олферта и Гешвинда была несколько модифицирована: 0,1% раствор прочного зеленого FCF (Michrom Stains, London) готовили на

Результаты фитофотометрии ДНК и гистона

№№ п. п.	Стадия митотического цикла	Число исследованных ядер	Ср. колич. веществ, усл. ед.	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %	Колич. вещ. в классах плоидности
ДНК						
1	Интерфаза					
	Постмитотическая	43	30,9±0,4	2,6	8	2C
	Премитотическая	29	70,4±1,0	5,6	8	4C
2	Ранняя профаза	29	71,9±0,9	4,7	6	4C
3	Средняя профаза	29	69,7±0,8	4,3	6	4C
4	Поздняя профаза	25	69,8±1,0	5,4	8	4C
5	Метафаза	32	70,3±0,6	3,4	5	4C
6	Телофазная группа хромосом	36	33,4±0,4	2,5	8	2C
Гистон						
1	Интерфаза					
	Постмитотическая	52	35,8±0,5	3,3	9	2C
	Премитотическая	30	70,2±1,0	5,5	8	4C
2	Ранняя профаза	26	74,0±1,1	5,4	7	4C
3	Средняя профаза	26	73,0±1,3	6,8	9	4C
4	Поздняя профаза	26	75,1±1,1	5,5	7	4C
5	Метафаза	25	76,0±0,7	3,8	5	4C
6	Анафазная группа хромосом	22	33,6±0,5	2,3	7	2C
7	Телофазная группа хромосом	20	41,1±0,8	3,6	9	2C

0,0035 M боратном буфере pH 8,1—8,2. После окраски препараты отмывали в 0,0035 M боратном буфере с тем же pH в течение 3 мин. Другие детали метода описаны ранее (¹, ²).

Количество связанного красителя в ядрах определяли двуволновым методом при помощи цитофотометра конструкции А. И. Шерудило (см. (¹, ²)). Для измерения количества гистона были выбраны длины волн λ_1 607 и λ_2 578 мμ, а ДНК — λ_1' 540 и λ_2' 514 мμ. Количество поглощающего свет вещества рассчитывали по методу Шерудило (⁴). Результаты измерений выражали в условных единицах. Случайную относительную ошибку метода определяли как коэффициент вариации (CV) количества поглощающего свет вещества в метафазах. Для окраски прочным зеленым и по Фельгену ошибка метода составляла 50%.

Рис. 1 В демонстрирует препарат, на котором проводили цитофотометрию. Хорошо видно продвижение ядер по митотическому циклу от премитотической интерфазы через митоз к постмитотической интерфазе.

Раннюю, среднюю и позднюю профазы идентифицировали по морфологическим признакам и топографии ядер на препарате, которая в данном случае является надежным вспомогательным критерием. Результаты цитофотометрии ДНК и гистона приведены в табл. 1. Из нее видно, что среднее количество как ДНК, так и гистона на протяжении ранней, средней и поздней профазы и метафазы практически не изменяется. Для гистона этот ряд составляет (в условных единицах) $74,0 \pm 1,1$; $73,0 \pm 1,3$; $75,1 \pm 1,1$ и $76,0 \pm 0,7$. Среднее количество гистона в анафазных ($34,0 \pm 0,5$) и телофазных ($41,1 \pm 0,8$) группах хромосом колеблется вокруг теоретически ожидаемой величины $37,3 \pm 0,4$, причём эти отклонения статистически достоверны. Скорее всего, они связаны с различиями в типах негомогенного распределения окрашенного вещества по площади оптического зонда цитофотометра и по глубине препарата на этих двух стадиях митоза, что должно привести к систематическим ошибкам цитофотометрии и расчета количества вещества по методу Шерудило (⁴).

Среднее количество гистона и ДНК в постмитотических интерфазных ядрах примерно вдвое ниже, чем в профазе и метафазах (см. табл. 1).

Очевидно, это ядра, находящиеся в G_1 -периоде митотического цикла. Среднее количество гистона и ДНК в премитотических интерфазных ядрах не отличается достоверно от соответствующих величин для профазы. Очевидно, эти ядра находились в G_2 -периоде интерфазы и удвоение гистона и ДНК завершилось к началу этого периода. Таким образом, удвоение как ДНК, так и гистона должно было произойти в промежуточной категории ядер (т. е. в S-периоде интерфазы). К сожалению, интерфазные ядра, относящиеся к S-периоду, на наших препаратах отсутствовали.

Таким образом, наши результаты согласуются с данными авторов, показавших при помощи цитофотометрии (⁵, ⁷, ⁸, ¹⁴) и автордиографии (⁶) на асинхронной популяции клеток, что синтез ДНК и гистона в митотическом цикле происходит одновременно и заканчивается в интерфазе.

Мы обращаем внимание на два обстоятельства: 1) если выразить количество гистона, красящегося прочным зеленым по Олферту и Гешвинду, и количество ДНК, окрашенной по Фельгену, в классах плоидности (4C в метафазе и 2C в телофазной группе хромосом), то отношение этих компонентов ядра (хромосом) на всех стадиях митотического цикла оказывается постоянным (см. табл. 1); 2) Прескотом и Голдстейном (¹¹) на амебе обнаружен выход ядерных белков в цитоплазму в конце профазы митоза и возвращение их в ядро после телофазы. Эти авторы распространяют свой вывод и на часть ядерных гистонов. Результаты, полученные нами, показывают, что в митозе у тюльпана гистон, красящийся по методу Олферта и Гешвинда, сохраняется в хромосомах на протяжении всего митоза. Таким образом, вывод Прескота и Голдстейна нельзя распространять на гистон, выявляемый указанным методом. Все данные, имеющиеся в литературе (¹²), равно как и настоящее исследование, показывают, что количество гистона этого типа весьма постоянно в расчете на единицу количества ДНК и что, вероятно, этот гистон весьма прочно связан с ДНК.

На основе изложенного материала мы приходим к следующим выводам.

1. Удвоение гистона, выявляемого методом Олферта и Гешвинда (⁶), в ядрах эндосперма тюльпана заканчивается в интерфазе. Его количество не изменяется на протяжении всей профазы и метафазы митоза и делится поровну между дочерними ядрами в анафазе — телофазе.

2. Эндосперм тюльпанов, благодаря наблюдающемуся в нем градиенту фаз митоза, является чрезвычайно удобным и перспективным объектом для цитохимического изучения последовательности событий в ядрах во время митотического цикла и собственно митоза.

Авторы выражают искреннюю благодарность З. М. Силиной за любезно предоставленные растения тюльпана и А. Б. Иорданскому за помощь в организации исследования.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
20 XII 1969

Всесоюзный институт растениеводства
им. Н. И. Вавилова
Ленинград

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. Н. Антропова, Ю. Ф. Богданов, Цитология, 12, 3, 289 (1970). ² Ю. Ф. Богданов, Н. А. Ляпунова и др., Цитология, 9, 8, 987 (1967). ³ Т. Ф. Петрова, В кн. Рефераты докл. Всесоюз. межвузовск. конфер. по морфологии растений, М., 1968. ⁴ А. И. Шерудило, Биофизика, 13, 4, 741 (1968). ⁵ M. Alfert, Exp. Cell. Res., Suppl. 6, 227 (1959). ⁶ M. Alfert, J. Geschwind, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 39, 10, 991 (1953). ⁷ D. P. Bloch, G. C. Goodman, J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1, 1, 17 (1955). ⁸ D. P. Bloch, G. C. Goodman, J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1, 1, 531 (1955). ⁹ D. P. Bloch, R. A. Maquigg et al., J. Cell. Biol., 33, 3, 451 (1967). ¹⁰ I. M. Littlefield, P. S. Jacobs, Biochim. et biophys. acta, 108, 4, 652 (1965). ¹¹ D. Prescott, L. Goldstein, J. Cell. Biol., 39, 2, Part 1, 404 (1968). ¹² H. Swift, In: The Nucleohistone, San Francisco, 1964. ¹³ S. Takai, T. W. Borun et al., Nature, 219, 88 850, 860 (1968). ¹⁴ J. Woodard, E. Rash, H. Swift, J. Biophys. and Biochem. Cytol., 9, 3, 445 (1961).