

И. А. Озеров, Н. А. Жинкина, Э. М. Мачс, А. В. Родионов

Анализ окрашивания ДНК-специфичными красителями содержимого желудочно-кишечного тракта позднеплейстоценового мамонта

I. A. Ozerov, N. A. Zhinkina, E. M. Machs, A. V. Rodionov

Analysis of DNA-specific staining of gastrointestinal tract contents of a Late Pleistocene mammoth

Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург
igorozzerov@mail.ru

Предметом настоящего исследования явилось содержимое желудочно-кишечного тракта позднеплейстоценового мамонта, обнаруженного в низовьях р. Индигирки. За основу приготовления постоянных препаратов взята широко известная цитоэмбриологическая методика. Препараты окрашивались тройной окраской — кислый фуксин по Фельгену — гематоксилин Эрлиха — алциановый синий. Результаты окрашивания ископаемых остатков показывают, что ядерный материал имеет неоднородную красную окраску, обусловленную наличием в хроматине ядер дезоксирибозных остатков. Окрашивание препаратов нуклеотид-специфичными флуорохромами Hoechst 33258 и DAPI вызывает свечение хроматина в ядрах клеток исследованного материала, поскольку красители специфически связываются с двуниевыми ДНК.

Ключевые слова: поздний плейстоцен, мамонт, растительные остатки, ядродержащие клетки, реакция Фельгена, ДНК-специфичные флуорохромы.

Сохранившиеся остатки растений и животных возрастом от десятков тысяч до десятков миллионов лет можно оценить на присутствие нуклеиновых кислот в ДНК-содержащих внутриклеточных структурах при помощи модифицированных гистохимических методов окраски, таких как Фельген, Hoechst 33258, DAPI. Наличие специфического окрашивания всех структурных особенностей клеток на препаратах тканей позволяет предполагать, что имеющийся материал пригоден для последующего молекулярно-генетического анализа. Цель анализа заключается в изучении филогенетического родства современных и ранее существовавших организмов.

В доступном нам содержимом желудочно-кишечного тракта мамонта присутствуют клетки эпителия и бактерии, но подавляющая часть состоит из тканей растений различных групп. Данный биологический материал стал объектом гистохимических исследований с целью выявления ДНК-содержащих структур в клетках преимущественно растительных остатков.

Скелет мамонта с хорошо сохранившимся под прикрытием ребер желудочно-кишечным трактом был обнаружен в 1971 г. А. М. Стрюковым близ уреза воды р. Шандрин (низовья р. Индигирка). О своей находке он сообщил П. А. Лазареву и Б. А. Русанову, сотрудникам Геологического института Якутского филиала СО

АН СССР, которые в дальнейшем и провели раскопки мамонта. Общий вес мерзлой растительной массы, содержащейся в желудочно-кишечном тракте, составил 290 кг. Ботаническому институту им. В. Л. Комарова АН СССР была передана для изучения часть этой массы весом около 15 кг. Исследуемый материал представлял плотно спрессованные слои, состоящие из кусочков растений разной длины (до 8–10 см) и диаметром до 0.5 см (рис., 1). Таксономические исследования микро- и макроостатков содержимого желудочно-кишечного тракта мамонта показали, что пищей ему служили злаки, осоки, пушицы, мхи, ветки кустарников и кустарничков, а иногда и ветки лиственницы. Вероятно, у мамонта, как и у современного слона, пережеванная пища со слюной попадала в простой однокамерный желудок, выстланный клетками эпителия, где протекали процессы брожения (рис., 2, 3). Преобладающая часть жидкой пищи у современных слонов находится в слепой и ободочной кишке, где преобладают процессы бактериального пищеварения. Слепая и ободочная кишка являются местом обитания анаэробных бактерий и простейших, которые у травоядных животных с многокамерным желудком находятся в рубце. В содержимом желудочно-кишечного тракта мамонта были обнаружены группы бактерий, возможно, как и у современных слонов, способствовавшие процессам пищеварения (рис., 4). Содержание ^{14}C в кормовой массе желудочно-кишечного тракта мамонта свидетельствует, что с момента его гибели прошло $41\,740 \pm 1290$ лет (Солоневич и др., 1977).

Окраска препаратов по Фельгену является специфической гистохимической реакцией на тимонуклеиновую кислоту и вместе с тем превосходным морфологическим методом окрашивания ядер (Ромейс, 1953; Пирс, 1962; Feulgen, Rossenbeck, 1924; Feulgen, Voit, 1924; Chieco, Derenzini, 1999). Указывает на присутствие ДНК в ядродержащих клетках. Протекает без дифференцирования, окрашивается только хроматин ядер, содержащий нуклеиновую кислоту. Оставляет неокрашенными истинные ядрышки и цитоплазматические структуры. Никогда не переокрашивается и не дает искусственных продуктов. Окраска ядер от красного до красно-фиолетового цвета. При окрашивании по Фельгену кроме альдегидных групп дезоксирибозы в красный цвет могут окрашиваться природные тканевые альдегиды и эластины, однако в природе в тканях

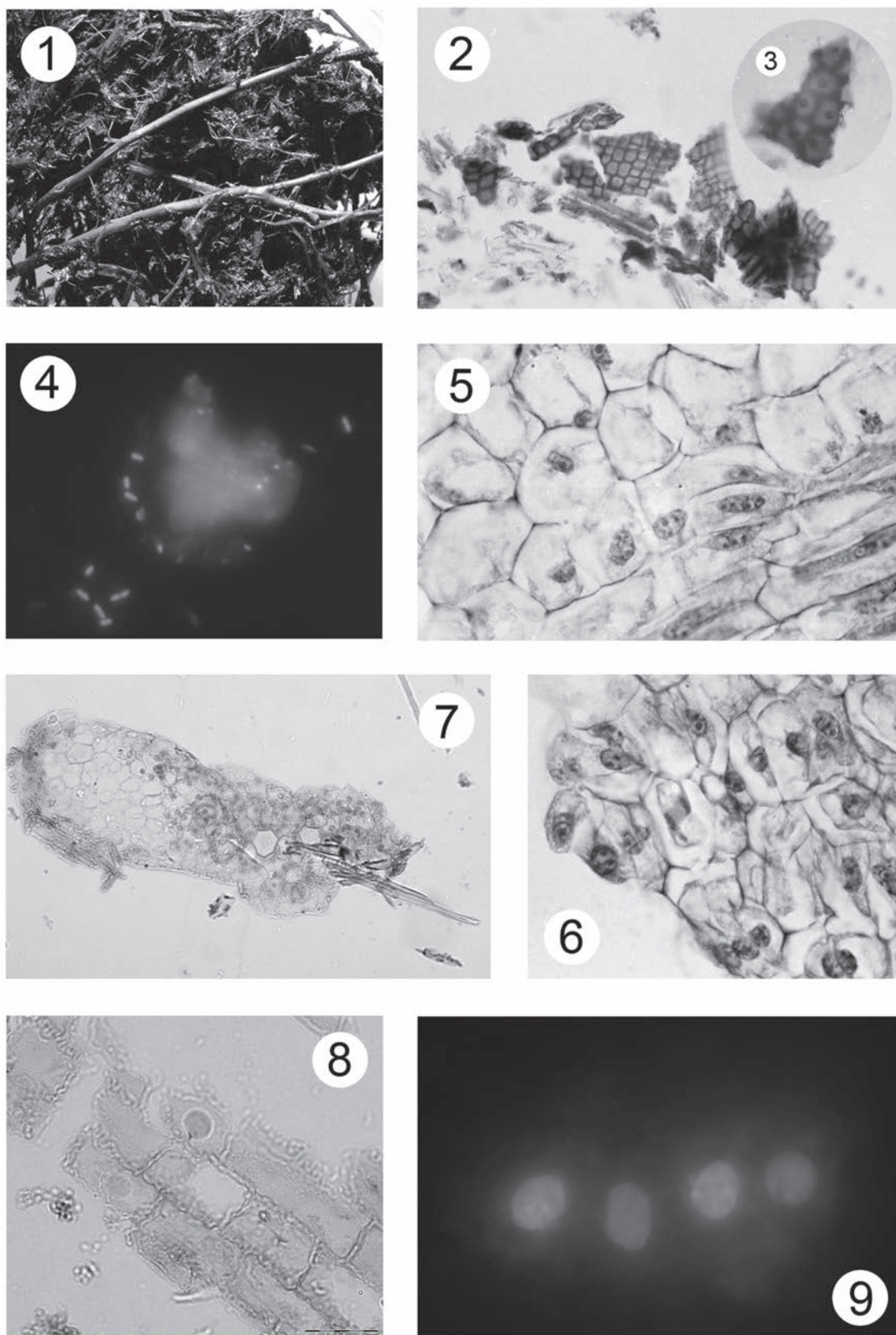


Рис. Содержимое желудочно-кишечного тракта позднеплейстоценового мамонта.

1 — фрагмент растительной массы из желудочно-кишечного тракта Шандринского мамонта; 2, 3 — клетки эпителия желудочно-кишечного тракта мамонта; 4 — группа бактерий, окрашенная ДНК-специфичными флуорохромами; 5 — основные эпидермальные клетки листа двудольного растения, включающие ядра с диффузным фельген-позитивным материалом с несколькими хромоцентрами; 6 — основная эпидермальная клетка листа в период анафазы или телофазы (окрашивание по Фельгену); 7 — генеративноподобная структура низшего растения с окрашенными клеточными стенками и прилегающим внутриклеточным материалом (подкраска алциановым синим и гематоксилином по Эрлиху); 8 — основные эпидермальные клетки листа *Carex* sp., контрольно окрашенные без проведения кислотного гидролиза (две клетки с округлыми неокрашенными ядроподобными структурами); 9 — округлые ядроподобные структуры, окрашенные ДНК-специфичными флуорохромами.

растений они отсутствуют или встречаются в минорных количествах и не влияют на рисунок окрашивания (Feulgen, Voit, 1924).

Окрашивание препаратов ДНК-специфичными флуорохромами Hoechst 33258 и 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) вызывает флуоресценцию хроматина в ядрах. Флуоресценция обусловлена встраиванием флуорохромов в малую бороздку ДНК. При этом флуорохромы взаимодействуют с азотистыми основаниями (четырьмя и более рядом стоящими dA-dT-парами) и не взаимодействуют с одонитевой ДНК, а также двунитевой РНК (Kapusinski, Szer, 1979; Schweizer, 1981; Stokke, Steen, 1986; Sumner, 1990).

Материал и методика

В данной работе приводится методика окрашивания тканей растительных остатков из желудочно-кишечного тракта мамонта, разработанная на основе реакции Фёльгена (Пирс, 1962; Дженсен, 1965). Окрашивание препаратов тканей растений флуорохромами проводилось по методике Швайцера и Амброса (Schweizer, Ambros, 1994).

Постоянные препараты тканей растительных остатков были приготовлены по общепринятой цитозембриологической методике (Прозина, 1960). Учитывая специфику исследуемого материала, первые этапы данной методики были существенно изменены (Ozerov et al., 2006; Жинкина, Озеров, 2008). Материал не фиксировался перед проводкой до парафина. Растительные остатки помещали на часовое стекло в хлороформ и добавляли гистомикс (функциональный аналог парафина). Срезы тканей толщиной от 0.5 до 1.0 мкм были сделаны на микротоме Microm HM 325.

Окраска препаратов по Фёльгену

Постоянные препараты растительных остатков окрашивали тройной окраской: основной фуксин по Фёльгену (реактив Шиффа) — гематоксилин Эрлиха — алциановый синий (Камелина и др., 1992). Реактив Шиффа используется для окрашивания ядерных структур, содержащих хроматин, оставляя неокрашенными ядрышки и цитоплазму. Гематоксилин Эрлиха и алциановый синий применяются в качестве красителей для окрашивания клеточных стенок и цитоплазмы.

При подкраске препаратов после реактива Шиффа необходимо соблюдать определенную последовательность. Вначале препараты подкрашиваются алциановым синим, а затем гематоксилином. В противном случае происходит раскрашивание цитоплазмы, окрашенной гематоксилином.

Окрашивание препаратов осуществляется по следующей схеме:

1. Толуол — 3 смены по 15 мин (для удаления гистомикса со срезов).
2. Этанол 96 % — 3 смены по 15 мин (для удаления толуола).
3. Вода дистиллированная — 2 смены по 15 мин.

4. Холодный гидролиз: 1 N HCl — 5 мин, 5 N HCl — 30 мин, 1 N HCl — 5 мин.

5. Реактив Шиффа — от 2 до 12 час.

6. Сернистые воды — 3 смены по 5 мин (для удаления фуксинсернистой кислоты).

7. Вода проточная или часто сменяемая.

8. Вода дистиллированная — 5 мин.

9. Уксусная кислота 3 % — 5 мин.

10. Алциановый синий — 10–20 мин.

11. Уксусная кислота 3 % — 5 мин.

12. Вода дистиллированная — 2 смены по 10 мин.

13. Гематоксилин по Эрлиху — 10 мин.

14. Вода проточная или часто сменяемая — 20 мин (для полного проявления темно-фиолетового тона).

15. Вода дистиллированная — 5 мин.

16. Мовиол.

В препаратах, окрашенных по предложенной схеме, выявляются следующие структурные особенности клеток: оболочки клеток (ярко-голубые); каллоза в оболочках (от светло-голубого до темно-голубого); цитоплазма клеток (серовато-сиреневая разной интенсивности); оболочка ядер (темно-фиолетовая); хроматин в ядрах (от красного до красно-фиолетового). Для контроля окраски по предложенной схеме был исключен этап гидролиза. Препараты растительных остатков окрашивались реактивом Шиффа (фуксинсернистая кислота) без гидролиза, с последующим промыванием исследуемого образца сернистыми водами в течение 5 мин. В результате не происходит окрашивания хроматина ядер в красный цвет, ядра клеток остаются бесцветными.

Окраска препаратов по Швайцеру и Амбросу

Hoechst 33258 стоковый раствор 50 мкг/мл в фосфатном буферном растворе (PBS) — 0.15 M NaCl, 0.03 M KCl, 0.01 M Na₂HPO₄, 0.01 M NaH₂PO₄, pH 7.0; DAPI (4',6-диамидино-2'-фенилиндол, дигидрохлорид) раствор: 1 мг/мл в воде.

Процедура окраски. Растворить Hoechst 33258 и DAPI в концентрации 0.5 мкг/мл в PBS. Инкубировать препарат в PBS в течение 10 мин, добавить на стекло около 100 мкл красящего раствора DAPI или Hoechst 33258, накрыть покровным стеклом, инкубировать 30 мин, затем промыть препарат в PBS в течение 15 мин и заключить в PBS с реагентом, замедляющим выгорание препарата при ультрафиолетовом освещении.

Результаты

В препаратах тканей растительных остатков, окрашенных по Фёльгену, в результате мягкого кислого гидролиза происходит отщепление пуриновых оснований, содержащихся в молекуле ДНК. Таким образом, обнажаются альдегидные группы дезоксирибозы. Свободные альдегидные группы дают с реактивом Шиффа кислотостойкий краситель, в результате чего видны основные эпидермальные клетки листьев двудольных растений с диффузным фёльген-позитивным

материалом в ядрах. Некоторые ядра имеют несколько более интенсивно краснокрашенных хромоцентров (рис., 5). Мы наблюдали картину, которая может быть интерпретирована как анафаза или телофаза (рис., 6). Подкраска препаратов алциановым синим и гематоксилином по Эрлиху выявляет клеточные стенки и прилегающий к ним внутриклеточный материал, которые имеют цвет от голубого до темно-синего (рис., 7).

Контрольное окрашивание основных эпидермальных клеток листьев *Carex* sp. без кислотного гидролиза не приводит к окрашиванию альдегидных групп дезоксирибозы, содержащихся в ядрах. В некоторых клетках видны округлые бесцветные структуры, напоминающие ядра (рис., 8).

При окрашивании препаратов ДНК-специфичными флуорохромами DAPI и Hoechst 33258 наблюдается флуоресценция небольшого количества округлых структур, которые по морфологии похожи на клеточные ядра (рис., 9). По-видимому, это ядра эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта. Большинство площадей, ограниченных ядерными оболочками, DAPI- и Hoechst 33258-негативны. Окрашивание препаратов ДНК-специфичными флуорохромами, как правило, не выявляет или выявляет лишь слабое свечение «ископаемого» хроматина в ядрах клеток. Наблюдениям может сильно мешать автофлуоресценция клеточных стенок. Известно, что красители DAPI и Hoechst 33258 специфически связываются с двунитевыми ДНК, встраиваясь в малую бороздку, взаимодействуют с азотистыми основаниями. В нашем случае наблюдается ничтожно мало цитологически регистрируемых количеств сайтов связывания красителей DAPI и Hoechst 33258 с двунитевыми ДНК. Результаты наших наблюдений согласуются с исследованиями ДНК, выделенными из семян растений, возраст которых составляет несколько тысяч лет. Было показано, что с этими древними образцами антитела ds-DNA не взаимодействуют (Rollo et al., 1998).

В результате проведенных нами исследований показано, что в исследуемом материале сохраняется часть дезоксирибозного остова ДНК, являющейся мишенью для реактива Шиффа при проведении реакции Фельгена. В материале также обнаружено незначительное количество DAPI- и Hoechst 33258-позитивных структур, однако их связь с дезоксирибозными остатками хроматина ядер остается неясной. Это, тем не менее, не исключает, что изученный материал может быть пригоден для последующего молекулярно-генетического анализа.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Н. В. Ловелиусу и В. В. Украинцевой за любезно предоставленный материал для исследований.

Список литературы

- Дженсен У. Ботаническая гистохимия. М., 1965. 377 с.
- Жинкина Н. А., Озеров И. А. Методика окрашивания тканей ископаемых растений по Фельгену // Ботан. журн. 2008. Т. 93, № 6. С. 951–953.
- Камелина О. П., Проскурина О. Б., Жинкина Н. А. К методике окраски эмбриологических препаратов // Ботан. журн. 1992. Т. 77, № 4. С. 93–96.
- Прозина М. Н. Ботаническая микротехника. М., 1960. 206 с.
- Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М., 1962. 962 с.
- Ромейс Б. Микроскопическая техника. М., 1953. 718 с.
- Солоневич Н. Г., Тихомиров Б. А., Украинцева В. В. Предварительные результаты исследования растительных остатков из желудочно-кишечного тракта Шандринского мамонта (Якутия) // Фауна и флора антропогена Северо-Востока Сибири. Л., 1977. С. 277–280 (Тр. Зоол. ин-та АН СССР. Т. 63).
- Chiaco P., M. Derenzini M. The Feulgen reaction 75 years on // Histochem. Cell Biol. 1999. Vol. 111. P. 345–358.
- Feulgen R., Rossenbeck H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure von Typus der Thymonucleinsäure und auf die darauf beruhende elective Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten // Z. Physiol. Chem. 1924. Bd 135. S. 203–248.
- Feulgen R., Voit K. Über den Mechanismus der Nuclealfärbung // Z. Physiol. Chem. 1924. Bd 135. S. 249–252.
- Kapuscinski J., Szer W. Interactions of 4',6-diamidino-2-phenylindole with synthetic polynucleotides // Nucl. Acids Res. 1979. Vol. 6. P. 1534–3519.
- Ozerov I. A., Zhinkina N. A., Efimov A. M., Machs E. M., Rodionov A. V. Feulgen-positive staining of the cell nuclei in fossilized leaf and fruit tissues of the Lower Eocene *Myrtaceae* // Bot. J. Linn. Soc. 2006. Vol. 150, № 3. P. 315–321.
- Rollo F., Venanzi F. M., A. Amici A. DNA and RNA from ancient plant seeds // B. Herrmann, S. Hummel (eds.). Ancient DNA. New York etc., 1998. P. 218–236.
- Schweizer D. Counterstain-enhanced chromosome banding // Hum. Genet. 1981. Vol. 57. P. 1–14.
- Stokke T., Steen H. B. Binding of Hoechst 33258 to chromatin *in situ* // Cytometry. 1986. Vol. 7. P. 227–234.
- Sumner A. T. Chromosome Banding. London, 1990. 434 p.
- Schweizer D., Ambros P. F. Chromosome banding // J. R. Gosden, N. Y. Totowa (eds.). Methods in molecular biology. London, 1994. P. 97–112.