

ОБЪЕДИНЕННЫЙ  
ИНСТИТУТ  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА

Ц 446

P19-87-563

А.И.Чепурной, Н.Михова-Ценова

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАНТОВ  
НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ

Направлено в журнал "Генетика"

1987

Оценка частот мутирования у микроорганизмов - задача, от решения которой во многом зависят успехи изучения их спонтанной мутабельности. Обычно применяемые для этой цели методики<sup>1,2/</sup> имеют, с нашей точки зрения, три недостатка: во-первых, они позволяют использовать для работы только среды, лимитирующие рост исходного штамма; во-вторых, пользуясь ими, можно учитывать частоты мутирования, лишь усредненные по всему периоду развития культуры - от лаг-фазы до стационарной фазы роста; в-третьих, учёт количества мутантов производится на день (обычно десятый), который экспериментально не обоснован, а выбран конвенционно. От этих недостатков свободна методика, основанная на использовании ядерных фильтров<sup>3/</sup>.

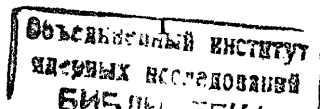
По методике<sup>3/</sup> клетки изучаемого штамма рассеивают шпательем или наносят специальным инокулятором (метод упорядоченного посева<sup>4/</sup>) на ядерные фильтры, покрывающие поверхность агаризованной питательной среды, инкубируют требуемое время при требуемых условиях, а затем выросшие колонии вместе с фильтрами переносят на поверхность селективной среды. На селективной среде клетки исходного штамма прекращают размножаться, а возникшие мутанты образуют видимые глазом колонии - "бородавки". Очевидно, что эта методика позволяет оценивать частоты мутирования в разные периоды роста культур, инкубируемых на средах самого разного состава (а не только лимитированных).

При работе по методике<sup>3/</sup>, однако, имеется трудность, которую отмечали и её авторы: после перенесения на селективную среду бородавki образуются как за счёт тех мутантов, которые возникли в предшествующий переносу период, так и за счёт тех, которые возникли уже в новых условиях культивирования, и поэтому они продолжают появляться в течение длительного срока. Для оценки частоты мутирования в период, предшествующий перенесению культур на селективные среды, авторы<sup>3/</sup> предлагают учитывать лишь "первую волну" появления мутантных колоний, но не приводят для этого должных обоснований.

Настоящая работа посвящена изучению и анализу закономерностей образования и выявления мутантов на селективных средах, знание которых совершенно необходимо для определения частот мутирования.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали гаплоидные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* NA3-24 (a leu2-1 lys1-1) и NA3-36 (a ade2-1), полученные при скрещи-



вании штаммов IL125-2B ( $\alpha$  his1) и X2104-4C (a gal1 mal his5-2 ade2-1 leu2-1 lys1-1 tyr) из коллекции Yeast Genetic Stock Center, Беркли, США (предоставлены Н.А.Колтовой, ОИЯИ, Дубна).

Суспензию дрожжей штамма NA3-24 методом упорядоченного посева рассеивали на агаризованную питательную среду  $M_3^{1/2}$  с добавками лейцина и лизина (30 мкг/мл), покрытую лавсановыми ядерными фильтрами (диаметр пор 0,2 мкм, пористость 8-10%)\*. На одну чашку наносился IZI инокулят. Варьируя концентрацию клеток в суспензии, из которой производится рассев, можно менять количество клеток в каждом инокуляте от 1 до  $10^6$ . В данной работе мы использовали концентрации, при которой в каждом инокуляте содержалось около  $2 \cdot 10^2$  клеток.

Инокулированные таким образом клетки выращивали при 30°C в течение двух суток. По истечении этого времени несколько десятков колоний ресуспендировали в воде для микроскопирования клеток в камере Горяева с целью определения количества клеток в одной колонии. Остальные колонии вместе с фильтрами переносили на селективную среду  $M_3$  с добавками лизина для учёта лейцин-независимых реверсов. На селективной среде ежедневно производили регистрацию появляющихся в форме белых бородавок лейцин-независимых реверсов, которые хорошо видны на фоне темнеющих колоний.

Особенности других приёмов, использованных в работе, приведены в экспериментальной части.

Расчёт частоты мутирования производили по стандартной для флуктуационного теста формуле  $R = \frac{1}{n} \ln \frac{N}{N_0}$ , где  $n$  - число клеток в одной колонии,  $N$  - число колоний,  $N_0$  - число колоний без реверсов по лейцину.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.1 приведена кинетика выявления спонтанных лейцин-независимых ревертантов на селективной среде.

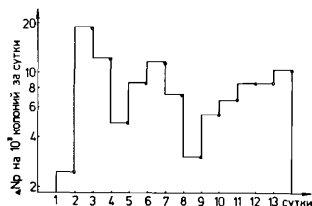


Рис.1. Кинетика выявления спонтанных реверсов по лейцину на селективной среде для  $n = 2 \cdot 10^6$  клеток в колонии. По оси абсцисс - дни после переноса клеток на селективную среду. По оси ординат - прирост за 1 сутки числа колоний с реверсами (на  $10^3$  колоний клеток исходного штамма NA3-24).

\* Фильтры изготовлены в Лаборатории ядерных реакций ОИЯИ, Дубна.

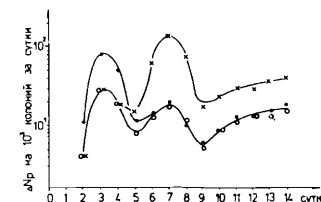
Выявление реверсов происходит в виде двух хорошо выделенных волн (на 2-5 и 5-9 сутки) и следующего за ними нарастающего фронта (начиная с 9-х суток).

Для удобства сравнения кинетик появления колоний реверсов мы в дальнейшем будем использовать не гистограммы, а кривые выявления, которые получаются при соединении плавной кривой правых верхних точек каждого столбца гистограммы.

Для определения срока окончания выявления ревертантов, существовавших до переноса, и начала выявления ревертантов, образовавшихся уже на селективной среде, использовали следующий прием. Все чашки с колониями дрожжей делили на три группы. Колонии дрожжей из первой группы чашек за сутки до переноса облучали прямо в чашках гамма-лучами в течение 1 мин (установка "Свет",  $R \sim 35$  Гр/мин). Колонии из второй группы чашек не облучали совсем. Из третьей - облучали в той же дозе, что и из первой, но уже через сутки после переноса фильтров.

Кривые выявления ревертантов в этих трёх группах показаны на рис.2.

Рис.2. Кривые выявления ревертантов на селективной среде для  $n = 2 \cdot 10^6$  клеток в колонии:  
 о - спонтанные;  
 ● - индуцированные гамма-лучами за 24 часа до переноса;  
 х - индуцированные гамма-лучами через 24 часа после переноса.



Сравнение кривых выявления ревертантов у колоний этих трёх групп позволяет определить, когда заканчивается выявление существовавших до переноса спонтанных и индуцированных гамма-лучами ревертантов и начинается выявление спонтанных и гамма-индуцированных мутантов, образовавшихся уже на селективной среде. Спонтанные и индуцированные ревертанты, существовавшие в колониях к моменту их переноса на селективную среду, выявляются в виде первой волны, а вторая волна и нарастающий фронт образованы ревертантами, возникшими уже на селективной среде.

Для определения природы реверсов, формирующих вторую волну, часть колоний из чашек второй группы перенесли на среду, содержащую небольшое количество лейцина (2 мкг/мл). На этой среде имеет место более сильный остаточный рост клеток и, следовательно, мы вправе ожидать изменение кривой выявления мутантов в той её части, где выявляются ревертанты, возникшие в период остаточного роста. На рис.3 приведены

результаты этого опыта. Как видно, при полном совпадении первых волн, вторые резко различаются, что служит основанием для следующего утверждения: ревертанты из второй волны образовались в результате мутирования клеток при остаточном росте на селективной среде.

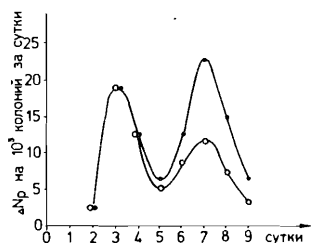
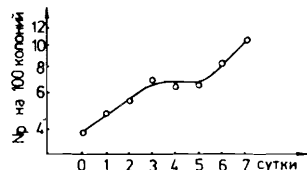


Рис. 3. Кривые выявления спонтанных лейцин-независимых реверсов на селективных средах без лейцина (o) и с добавками лейцина в количестве 2 мкг/мл (●) для  $n = 2 \cdot 10^6$  клеток в колонии.

Как долго продолжается это мутирование? Для ответа на этот вопрос в колониях из второй группы чашек в течение 7 суток после перенесения их на селективную среду определяли количество реверсов. Для этого ежедневно по 1200 колоний переносили на свежую селективную среду и по количеству мутантных колоний в первой волне определяли искомую величину. Результаты представлены на рис. 4.

Рис. 4. Образование спонтанных лейцин-независимых реверсов на селективной среде вследствие остаточного роста при  $n = 2 \cdot 10^6$  клеток в колонии.



В течение первых трёх суток после переноса клеток с питательной среды на селективную вследствие остаточного роста идёт образование новых ревертантов. Число их совпадает с количеством таковых во второй волне кривой выявления, представленной на рис. 2. В течение следующих двух суток мутирования не наблюдалось. На шестые сутки начинают образовываться ревертанты, которые в виде видимых колоний выявляются лишь на 10-й день. На кривой выявления (рис. 2) они представлены нарастающим фронтом. Природа возникновения этих ревертантов не известна. По-видимому, их появление обусловлено мутированием клеток в стационарной фазе роста.

Все ли существовавшие к моменту переноса реверсы выявляются в первой волне? Для определения полноты выявления реверсов использовали

следующую схему опыта. Готовили суспензию дрожжей, содержащую клетки двух штаммов - NA3-24 и NA3-36. Концентрации подбирали таким образом, чтобы при посеве на фильтры в каждом инокуляте содержалось обычное (около  $2 \cdot 10^2$ ) количество клеток штамма NA3-24 и в среднем по I клетке штамма NA3-36. Приготовленную суспензию рассеивали методом упорядоченного посева на среды  $M_3$  и  $M_3$  с добавками лейцина и лизина. В соответствии с распределением Пуассона в  $0,37N$  инокулятов не попадет ни одной клетки штамма NA3-36, в остальные попадет по одной, две и более клеток. На среде  $M_3$  клетки обоих штаммов не растут; такие чашки использовались в качестве контроля. На  $M_3$  с добавками растут только клетки штамма NA3-24. Через двое суток культивирования при  $30^\circ C$  колонии переносили на среду  $M_3$  с добавками аденина. На  $M_3$  с аденином клетки штамма NA3-24 прекращают свой рост, зато начинают размножаться клетки штамма NA3-36, которые выявляются в виде красных бородавочек. Появление красных бородавочек регистрировали в течение первой волны выявления лейцин-независимых реверсов в колониях штамма NA3-24 на селективной среде без лейцина. Результаты приведены в табл. I.

Таблица I

Результаты опыта по определению полноты выявления мутантов.

- $N_{NA3-24}$  - количество колоний клеток штамма NA3-24;
- $N_{NA3-36}$  - количество колоний с клетками штамма NA3-36;
- $n_{NA3-24}$  - количество клеток штамма NA3-24 в I колонии;
- $n_{NA3-36}$  - количество клеток штамма NA3-36 в I колонии

Среда	$N_{NA3-24}$	$n_{NA3-24}$	$N_{NA3-36}$	$n_{NA3-36}$
$M_3$	1100	$2 \cdot 10^2$	493	$0,59 \pm 0,04$
$M_3$ + лейцин + лизин	1100	$2 \cdot 10^6$	478	$0,57 \pm 0,04$

Из числа колоний, у которых в эти сроки не образовались "бородавочки" из клеток штамма NA3-36, по 100 штук были ресуспендированы в воде и высеваны на  $M_3$  с аденином. Клеток штамма NA3-36 в этих выборках найдено не было. Следовательно, в первой волне происходит практически полное выявление мутантов, существовавших в колониях до их пере-

носа на селективную среду, даже если такие мутанты находятся в колониях в единственном числе среди или под толщей в  $2 \cdot 10^6$  исходных клеток.

Знание кинетики выявления мутантов позволяет определять количество не только обратных, но и прямых мутантов в культуре, если есть возможность использовать соответствующие селективные среды. Так, нами было произведено количественное определение содержания прямых мутантов среди клеток штамма S288C<sup>5/</sup>, устойчивых к канаванину и нистатину, а также мутантов по гену LYS2 при культивировании на твердой питательной среде M<sub>3</sub>. Выявление канаваин-устойчивых мутантов производили на минимальной среде с добавкой канаваина в количестве 60 мкг/мл; нистатин-устойчивых – на минимальной среде с добавкой нистатина в количестве 150 мкг/мл; мутантов по гену LYS2 – на селективной среде с альфа-аминоадипиновой кислотой в качестве источника азота<sup>6/</sup>. Данные по частотам возникновения прямых и обратных мутаций представлены в табл.2. Результаты, получаемые таким способом, характеризуются удивительным постоянством при повторении опытов.

Таблица 2

Данные по определению частот мутирования по количеству колоний с мутантами в первой волне выявления мутантов на селективных средах.

N – количество колоний;

n – количество клеток в I колонии;

N<sub>M</sub> – количество колоний с мутантами;

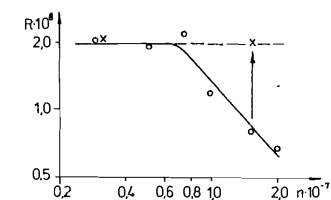
R – частота мутирования (количество мутантов на клетку на деление)

Мутации	Штамм	n	N	N <sub>M</sub>	R, 10 <sup>-8</sup>
leu2 → Leu2	NA3-24	2 · 10 <sup>6</sup>	1610	63	2,0 ± 0,3
LYS2 → lys2	S288C	4,1 · 10 <sup>6</sup>	240	158	24 ± 3
CAN <sup>S</sup> → Can <sup>R</sup>	S288C	4,1 · 10 <sup>6</sup>	240	48	5,4 ± 0,5
NYS <sup>S</sup> → Nys <sup>R</sup>	S288C	4,1 · 10 <sup>6</sup>	240	18	1,9 ± 0,4

Использование кинетики выявления для количественной оценки содержания мутантов в культуре может иметь одно ограничение при работе

с колониями, а именно: неполное выявление предсуществовавших мутантов в первой волне при больших размерах колоний. Учёт зависимости полноты выявления реверсов от количества клеток в колонии производили путём растирания части колоний клеток штамма NA3-24 сразу после переноса на селективную среду до тонкоклеточного слоя оплавленным концом стеклянной палочки, смоченной в воде; число выявленных при этом в первой волне реверсов сравнивали с тем, что получается, если колонии не растирать. Для получения колоний разных размеров (с разным n) в одинаковых физиологических условиях в чашки Петри помещали разное количество питательной среды – по 6, 10, 15, 20, 30 и 40 мл среды на одну чашку. Колонии переносили на селективную среду на 5-е сутки культивирования. Согласно полученным данным для колоний размером n = 8 · 10<sup>6</sup> клеток и более наблюдается неполное выявление реверсов во время первой волны (рис.5).

Рис.5. Зависимость частоты спонтанного ревертирования к лейцин-прото-трофности, рассчитанной по количеству реверсов в первой волне мутантных колоний после переноса на селективную среду, от количества клеток в колониях штамма NA3-24. x – данные, полученные при растирании колоний до тонкоклеточного слоя.



Неполнота выявления мутантов в первой волне из-за больших размеров колоний обнаруживается и при выявлении прямых мутаций. Однако это обстоятельство не имеет всеобщего характера. Так, при определении частот прямых мутаций к канаваин-устойчивости и мутаций в гене LYS2 у клеток штамма S288C мы также наблюдали зависимость выявления от n, в то же время полнота выявления нистатин-устойчивых мутантов не зависела от размеров колоний (рис.6). Селективные среды, использованные в этих опытах, приведены выше.

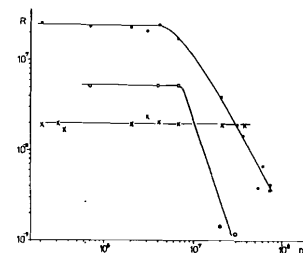


Рис.6. Зависимость частоты мутирования клеток штамма S288C при культивировании на M<sub>3</sub>, определенной по первой волне выявления мутантов на селективных средах, от размера колоний. o – прямые мутации в гене LYS2; ● – мутации канаваин-устойчивости; x – мутации нистатин-устойчивости.

Таким образом, из описанных опытов следует, что в выявлении мутантов на селективных средах есть закономерности, которые необходимо учитывать при количественном анализе содержания мутантов в культуре. Кинетика выявления мутантов представлена в виде двух волн и следующего за ними нарастающего фронта. Первая волна представлена мутантами, возникшими в культуре до её переноса или посева на селективную среду. Выявление этих мутантов наблюдается в течение 3 - 6 суток, что зависит от различных факторов: скорости роста мутантов на селективной среде, размера колоний, температуры и других. Выявление мутантов в первой волне достаточно полное, если используются колонии с  $n < 8 \cdot 10^6$ .

Вторая волна образована мутантами, возникающими в культуре клеток уже на селективной среде, вследствие остаточного роста, который наблюдается в течение нескольких первых суток. Число таких мутантов зависит от величины остаточного роста. Следует отметить, что не все штаммы и не на всех селективных средах дают вторую волну. Например, селективная среда с нистатином блокирует остаточный рост клеток и волны вторичных мутантов не наблюдается. В этом случае выявление предсуществовавших мутантов не зависит от размеров колоний.

Нарастающий фронт образован мутантами, возникающими в культуре уже после окончания остаточного роста клеток. Природа их появления не выявлена.

Авторы благодарят профессора В.И.Корогодина, В.Л.Корогодину и Ч.Файси за активное обсуждение и интерес к работе, а также Д.А.Горденина и Л.И.Бойко за предоставление необходимых реактивов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. R.C.Von Borstel. In: "Methods in Cell Biology", 1978, v. XX, 1-24. Academic press. New York-San-Francisco-London.
2. И.А.Захаров и др. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука, 1984.
3. В.Л.Ильина, В.И.Корогодина. - Генетика, 1987, т. 23, № 4, с. 630.
4. Н.Н.Хромов-Борисов. - В сб.: Конференция по генетике промышленных микроорганизмов: 10 - 14 декабря 1973г. Цахкадзор. АН СССР, Главное управление микробиологической промышленности при Совете Министров СССР, М., 1973, с.35.
5. M.Wolfner e.a. - J.Mol.Biol., 1975, 96, p. 273.
6. B.B.Chattoo e.a. - Genetics, 1979, v. 93, p. 51.

Рукопись поступила в издательский отдел  
20 июля 1987 года.

Чепурной А.И., Михова-Ценова Н.

P19-87-563

Закономерности выявления мутантов на селективных средах

Анализируются закономерности образования и выявления мутантов после переноса или посева клеток дрожжей на селективные среды. Знание таких закономерностей необходимо для количественной оценки содержания мутантов в культуре. Мутанты, возникшие в культуре клеток до ее переноса или посева на селективную среду, выявляются на селективной среде в виде колоний и образуют во времени волну, наблюдающуюся в течение нескольких дней. Вследствие остаточного роста клеток образуются новые мутанты, которые выявляются в виде второй волны. За двумя волнами может следовать нарастающий фронт, образованный мутантами неизвестного происхождения. Для оценки содержания мутантов в культуре до ее переноса на селективную среду следует учитывать только "первую волну" появления мутантных колоний.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1987

Перевод О.С.Виноградовой

Chepurnoy A.I., Mikhova-Tsenova N.

P19-87-563

The Law-Governed Natures of Mutants Revealing onto Selective Media

The law-governed natures of formation and revealing of mutants after carrying or plating of yeast cells on selective media are analysed. The knowledge of these law-governed natures are necessary for quantitative evaluation of mutants content in culture. Mutants formed in a cell culture before its carrying onto selective medium are revealed onto selective medium as colonies and form in time a wave, that is observed during a few days. Due to residual growth of cells the new mutants are formed and revealed as the second wave. After two waves the increasing front may come. This front is formed from unknown nature mutants. For evaluation of mutant contents in culture before its carry onto selective medium it is necessary count up only "first wave" of mutant colony appearance.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Physics, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1987