

**СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

T 51

P19-87-813

**Б.Токарова, К.Г.Амиртаев, Е.А.Красавин,
С.Козубек**

**ВЫЯВЛЕНИЕ Iac^- МУТАНТОВ
БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*
МЕТОДОМ ГЛУБИННОГО ПОСЕВА**

1987

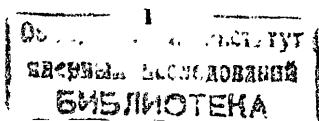
Мутагенное действие излучений с разной линейной передачей энергии (ЛПЭ) на микроорганизмы к настоящему времени мало изучено. Имеющиеся в литературе сведения о характере зависимости частоты образования мутантов (N_m) от дозы (D) излучений, различающихся по ЛПЭ, неоднозначны и противоречивы. Были выявлены не только линейные или квадратичные зависимости $N_m(D)/I^{-3/4}$, но также зависимости с максимумом $^{4,5/}$. В связи с этим установление характера зависимости частоты образования мутаций у клеток при действии плотнойонизирующих излучений является принципиальной задачей. Вследствие того, что низкоэнергетические тяжелые ионы имеют малые пробеги в веществе, постановка радиационно-генетических экспериментов с использованием таких излучений сопряжена с определенными методическими трудностями. Имеются технические трудности и при учете прямых мутаций у микроорганизмов. С учетом этого нами была поставлена задача разработать методику, позволяющую выявлять образование прямых мутаций у клеток *E. coli* в лактозном опероне, являющемся наиболее изученным в структурно-функциональном отношении гене, при действии излучений, различающихся по ЛПЭ в широком диапазоне.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали следующие штаммы бактерий *Escherichia coli*: Hfr H, W 3110, P 3478, JC 5547, GC 244.

Культуру клеток инкубировали в жидкой питательной среде (мясо-печеночный бульон производства института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалея) в течение 18 ч при 37°C до стационарной фазы (2-4 10^8 кл/мл). Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин (8000 g) и ресуспендировали в M9-буфере: 19,7 mM NH_4Cl , 43,7 mM Na_2HPO_4 , 23,2 mM KH_2PO_4 , 1 mM $MgSO_4$, 0,1 mM $CaCl_2$, 9 mM $NaCl$.

Облучение клеток проводили на установке с γ -источником ^{137}Cs , мощностью дозы облучения 35 Гр/мин, двумя способами: в суспензии, в стеклянных пробирках объемом 2-3 мл, и на поверхности лавсановых ядерных фильтров.



Для облучения клеток на поверхности фильтров, в специально изготовленные металлические чашки разливали "голодный агар" (3% агар-агар). После просушивания в течение 3 ч на поверхность агара накладывали стерильные лавсановые ядерные фильтры диаметром 15 мм (диаметр пор 0,53 мкм). Затем на поверхность фильтра микропипеткой наносили суспензию клеток объемом 0,02 мл. Облучение клеток проводили через 20-30 мин после подсыхания образцов.

После облучения клетки смывали с поверхности фильтров встряхиванием в 5 мл М9-буфера.

В дальнейшем использовали одинаковую методику работы с клетками, облученными разными способами.

Суспензию облученных клеток разводили в М9-буфере и рассеивали на чашки Петри с 15 мл питательной среды МПА (мясо-пептонный агар производства института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР). Перед автоклавированием в питательную среду добавляли тетразолий в концентрации 50 мг/л, а после автоклавирования - 50 мл 20% лактозы в 1 л среды.

Для равномерного распределения клеток по поверхности питательного агара, клетки растирали шпателью до полного впитывания жидкости. Затем чашки Петри заливали вторым слоем питательного агара в количестве 10 мл при температуре агара 42°C. Параллельно осуществляли посев клеток после стократного разведения на поверхность агара для определения выживаемости.

Чашки с клетками инкубировали при 37°C в течение 24 ч.

Выживаемость клеток определяли подсчетом образующихся колоний как на поверхности агара, так и в глубине питательной среды под микроскопом МБС-9 при 16-кратном увеличении. Для подсчета колоний под микроскопом использовали специально изготовленную сетку, разделенную на 287 клеток размером 5x5 мм. Для определения выживаемости при глубинном посеве просчитывали колонии в 20 клетках сетки, разбросанных по всей площади. Способ подсчета (глубинный или поверхностный) не влиял на результат определения выживаемости клеток.

Для выявления мутантных колоний просматривали по клеткам всю чашку.

Частоту мутирования определяли как отношение выявленных мутантных колоний на общее количество образующихся колоний (N) по 3-5 чашкам. Опыты проводили в 3-5 повторностях.

Полученные результаты подвергали статистической обработке на ЭВМ. Для характеристики типа кривых $N_m(D)$ рассчитывали тангенс угла наклона (k) прямых $\lg(N_m/N)/\lg D$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Как известно, Ледербергом^{6/} был предложен метод непрямого выявления мутантов с использованием тетразолия. Растущие на полной питательной среде (содержащей пептон) клетки *E. coli* восстанавливают бесцветный тетразолий до ярко-красного формазана. При низких значениях pH, при сбраживании лактозы, биологическое восстановление тетразолия подавляется. В результате на такой среде (в присутствии лактозы) колонии lac^+ имеют белый цвет, а колонии lac^- - ярко-красный. Таким образом, данный метод позволяет четко идентифицировать мутантные колонии. Недостатком этого метода является невозможность учета мутантных колоний при высокой плотности посева (более 1500 клеток на чашку), поскольку в этом случае не срабатывает индикаторная реакция.

В дальнейшем описанный метод был усовершенствован путем использования посева в слой мягкого агара^{7/}. В этом случае краситель добавлялся в верхний слой питательной среды. Клетки высевались вместе с верхним слоем среды и, следовательно, располагались по всему объему верхнего слоя. Образующиеся колонии оказывались на разной глубине агара, и это обстоятельство приводило к тому, что мутантные колонии имели окраску различной степени выраженности. Последняя связана с тем, что концентрация красителя оказывается различной на разной глубине питательного агара. Таким образом, данный метод затрудняет объективность подсчета мутантных колоний.

В отличие от изложенного выше, нами был использован метод "бутербродного посева". Посев клеток осуществляли на первый слой питательного агара, затем заливали вторым слоем, как описано в материалах и методах. В этом случае клетки располагаются на одинаковой глубине, и образующиеся колонии оказываются одинакового размера и одного цвета. При микроскопировании можно отчетливо отличать мутантные колонии от немутантных, причем можно выявлять мутантные секторы до 1/8 размера колонии.

Данная модификация метода позволяет определять наличие мутантных колоний при посеве до $5 \cdot 10^5$ клеток на чашку. Однако при проверке влияния концентрации клеток, высеваемых на чашку, на выход учитываемых мутаций было выявлено, что с ростом концентрации посева уменьшается количество индуцируемых мутаций (рис.1). Частота образования мутаций для всех доз облучения практически постоянна при концентрациях посева клеток на чашку до $2 \cdot 10^4$. При дальнейшем возрастании плотности посева клеток количество выявляемых мутаций падает.

На рис.2 представлены дозовые зависимости выхода lac^- -мутантов f -облученных клеток при разных концентрациях их посева на чашку. Видно, что с ростом плотности посева от $1,5 \cdot 10^4$ до $7 \cdot 10^4$ клеток

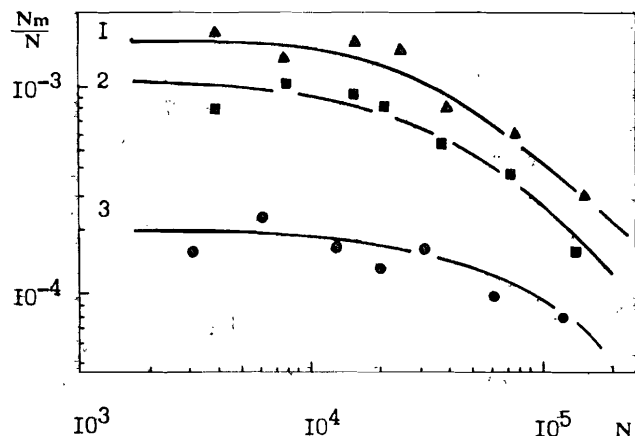


Рис.1. Зависимость выявляемой частоты мутирования от плотности посева клеток на чашку при разных дозах облучения (1 - 525 Гр, 2 - 350 Гр, 3 - 175 Гр). По оси ординат: частота мутирования;

по оси абсцисс: количество клеток, высеваемых на чашку.

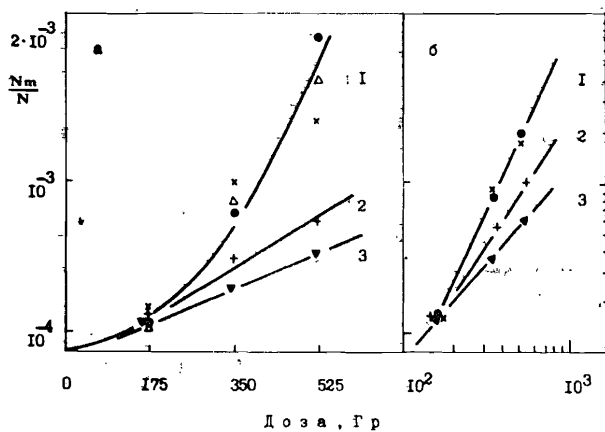


Рис.2. Зависимость частоты мутирования клеток от дозы облучения при различных плотностях посева (● - 4000 кл/чашку, x - 7000 кл/чашку, Δ - 15000 кл/чашку, + - 35000 кл/чашку, ▽ - 70000 кл/чашку).

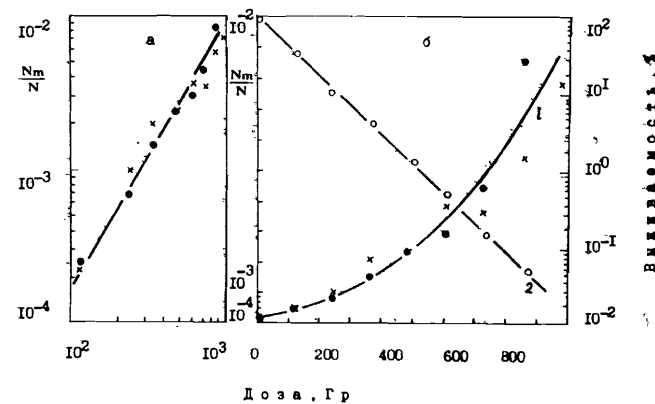
а - линейный масштаб; б - логарифмический масштаб. По оси ординат: частота мутирования; по оси абсцисс: доза облучения, Гр.

на чашку, кривые зависимости частоты мутирования от дозы облучения имеют различия, что связано с невыявлением части образующихся мутантных колоний при высоких плотностях посева.

Из представленных выше данных следует, что для выявления прямых мутаций $lac^+ \rightarrow lac^-$ у бактерий *E. coli* с использованием тетразолия оптимальной является концентрация посева не более $2 \cdot 10^4$ клеток на чашку.

Учитывая, что пробеги ускоренных тяжелых ионов с энергией до 10 МэВ/нуклон в биологической среде составляют, как указывалось выше, лишь сотни микрон, облучение микроорганизмов частицами с высокой ЛПЭ возможно только в виде монослоя клеток. Поэтому для сопоставления мутагенного действия на клетки излучений с разной ЛПЭ, необходимо изучить влияние способа облучения клеток (в суспензии или в монослое) на частоту мутирования. Результаты таких опытов при действии γ -лучей представлены на рис.3. Как видно из рисунка, дозовые кривые выхода мутаций описываются при γ -облучении квадратичными функциями ($k=1,93$), и способ облучения не сказывается на характере дозовой кривой.

Рис.3. Зависимость частоты мутирования клеток (I) от дозы при различных способах облучения (x - облучение клеток в суспензии; ● - облучение клеток на поверхности фильтров).



2 - выживаемость клеток. По оси ординат: частота мутирования (слева), выживаемость, % (справа). а - логарифмический масштаб, б - линейный масштаб.

Таким образом, нами модифицирована классическая методика выявления прямых $lac^+ \rightarrow lac^-$ мутаций, основанная на использовании тетразолия. С применением этого метода можно определять выход мутаций при концентрациях посева до $2 \cdot 10^4$ клеток на чашку. Способ γ -облучения бактерий (в суспензии или на поверхности лавсановых ядерных

фильтров) не влияет на частоту образования мутаций. Это обстоятельство позволяет сопоставлять результаты мутагенного действия излучений с разными физическими характеристиками при разных способах облучения клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bridges B.A., et al., Mol Gen. Genet., 1968, v.103, n3, p.266.
2. Bridges B.A., Mottershead R.P., Mol. Gen. Genet., 1978, v. 162, n. 1, p. 35-41.
3. Бреслер С.Е. и др. Генетика, 1985, 21, №3, с. 384-390.
4. Кривиский А.С., Вестник рентгенол. радиол., 1938, т.20, с. 375.
5. S.E.Bresler et al., Mutation Res., 1975, v.29, n. 1, p. 1-20.
6. Lederberg J., J.Bacteriol., 1948, v. 56, p. 695.
7. Дж. Миллер. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976, с. 52.

Рукопись поступила в издательский отдел
13 ноября 1987 года.

ТЕМАТИЧЕСКИЕ КАТЕГОРИИ ПУБЛИКАЦИЙ ОБЪЕДИНЕННОГО ИНСТИТУТА ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Индекс	Тематика
1.	Экспериментальная физика высоких энергий
2.	Теоретическая физика высоких энергий
3.	Экспериментальная нейтронная физика
4.	Теоретическая физика низких энергий
5.	Математика
6.	Ядерная спектроскопия и радиохимия
7.	Физика тяжелых ионов
8.	Криогеника
9.	Ускорители
10.	Автоматизация обработки экспериментальных данных
11.	Вычислительная математика и техника
12.	Химия
13.	Техника физического эксперимента
14.	Исследования твердых тел и жидкостей ядерными методами
15.	Экспериментальная физика ядерных реакций при низких энергиях
16.	Дозиметрия и физика защиты
17.	Теория конденсированного состояния
18.	Использование результатов и методов фундаментальных физических исследований в смежных областях науки и техники
19.	Биофизика

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

Вы можете получить по почте перечисленные ниже книги, если они не были заказаны ранее.

Д7-83-644	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Алушта, 1983.	6 р.55 к.
Д2,13-83-689	Труды рабочего совещания по проблемам излучения и детектирования гравитационных волн. Дубна, 1983.	2 р.00 к.
Д13-84-63	Труды XI Международного симпозиума по ядерной электронике. Братислава, Чехословакия, 1983.	4 р.50 к.
Д2-84-366	Труды 7 Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1984.	4 р.30 к.
Д1,2-84-599	Труды VII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1984.	5 р.50 к.
Д10,11-84-818	Труды V Международного совещания по проблемам математического моделирования, программирования и математическим методам решения физических задач. Дубна, 1983.	3 р.50 к.
Д17-84-850	Труды III Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1984. /2 тома/	7 р.75 к.
Д11-85-791	Труды Международного совещания по аналитическим вычислениям на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1985.	4 р.00 к.
Д13-85-793	Труды XII Международного симпозиума по ядерной электронике. Дубна, 1985.	4 р.80 к.
Д4-85-851	Труды Международной школы по структуре ядра. Алушта, 1985.	3 р.75 к.
Д3,4,17-86-747	Труды V Международной школы по нейтронной физике. Алушта, 1986.	4 р.50 к.
-	Труды IX Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1984. /2 тома/	13 р.50 к.
Д1,2-86-668	Труды VIII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1986. /2 тома/	7 р.35 к.
Д9-87-105	Труды X Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1986. /2 тома/	13 р.45 к.
Д7-87-68	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Дубна, 1986.	7 р.10 к.
Д2-87-123	Труды Совещания "Ренормгруппа-86". Дубна, 1986.	4 р.45 к.

Заказы на упомянутые книги могут быть направлены по адресу: 101000 Москва, Главпочтамт, п/я 79. Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований.

Токарова Б. и др.

P19-87-813

Выявление lac^- мутантов бактерий
Escherichia coli методом глубинного посева

Предлагается модификация классического метода выявления прямых lac^- -мутаций у бактерий *Escherichia coli* с использованием тетразолия, позволяющая выявлять мутантные колонии при плотности посева до $2 \cdot 10^4$ клеток на чашку. Показано, что способ облучения клеток /в суспензии или в виде монослоя/ не влияет на частоту образования мутаций.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1987

Перевод авторов

Tokarova B. et al.

P19-87-813

The Detection of lac^- *Escherichia coli*
Mutants Using the Method of Deep-Laid
Cells

The detection of direct lac^- mutations in bacterial *Escherichia coli* cells using tetrazolium chloride has been modified. It enable us to detect mutant colonies with cell densities up to $2 \cdot 10^4$ cells per plate. It has been shown that the mutation rate for cells irradiated both in cell suspension and as a layer does not differ.

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

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1987