

СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

К 681

P19-88-835

В.Л.Корогодина, Н.А.Колтовая, К.А.Любимова,
В.И.Корогодин, Ч.Файси

**ОЦЕНКА ВКЛАДА ДВОЙНЫХ МУТАНТОВ
В РЕГИСТРИРУЕМЫЙ СПЕКТР РЕВЕРСОВ,
ВОЗНИКАЮЩИХ У АУКСОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ**

1988

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

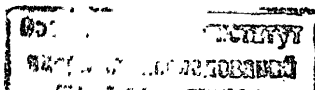
В работах ^{1,2} / описаны закономерности возникновения локусных и супрессорных мутаций при инкубации ауксотрофных по аденину и ауксотрофных по аденину и лизину штаммов дрожжей сахаромикетов на средах, содержащих разное количество аденина. Дифференцировку реверсов на локусные и супрессорные проводили по фенотипу: ростовым потребностям и окраске колоний. К "локусным" относили реверсы, имеющие фенотип Ade^+Lys^- , к "супрессорным" — реверсы с фенотипом Ade^+Lys^+ .

Очевидно, однако, что фенотип Ade^+Lys^+ может быть обусловлен не только мутацией в генах-супрессорах, но и вторичной мутацией в клетке реверса. И действительно, генетический анализ проб из старых культур Ade^+Lys^+ -реверсов, выполненный А.Б.Девиным и Н.А.Колтовой, показал, что к группе "супрессоров" относятся как реверсы, несущие одну супрессорную мутацию, так и двойные мутанты. Соотношение "локусных" и "супрессорных" реверсов может изменяться в процессе роста колоний первичных реверсов благодаря маскировке в некоторых из них исходной локусной мутации второй мутацией, придающей клону супрессорный фенотип (т.е. мутацией либо в гене $lys5$, либо в генах-супрессорах). Возникновение обратной мутации в гене $ade2$ в клетках, уже несущих супрессорную мутацию, не изменит их фенотипа и не будет искажать результатов.

Методика, использованная нами для изучения спектров мутирования, т.е. соотношения частот возникновения локусных и супрессорных мутаций, включает выращивание культур на средах с разным содержанием аденина. Это может создавать разные селективные условия для размножения первично возникающих и образующих колонии реверсов. Различия в размерах колоний первичных реверсов будут приводить к разной вероятности возникновения в них двойных мутантов и, тем самым, — к искажению регистрируемого мутационного спектра. Настоящая работа и посвящена оценке частот возникновения вторичных мутаций, дающих "ложные супрессорные реверсы", а также возможного вклада этого феномена в регистрируемый выход реверсов разных типов у клеток исходного ауксотрофного штамма.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКИ

В работе использованы следующие штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, с генотипом $a ade2-192 lys5-3$: петергофский штамм 769-p192-15В-П4, полученный от Д.А.Горденина, и штамм ДК769-176, специально



сконструированный А.Б.Девиным, путем ввода маркеров *ade2-192* и *lys5-3* в генофон линий из Центра генетических исследований, Беркли, США. Как показано в работе¹⁹, мутация *ade2-192* — миссенс.

Были использованы среды, описанные в работе¹³. Предварительно клетки выращивали на полной среде (ПС), затем рассеивали металлическим инокулятором в чашки Петри на ядерные фильтры, покрывающие агаризованную минимальную среду (МС) с разными добавками аденина и лизина, инкубировали требуемое время при 30°С, после чего фильтры с выросшими на них колониями переносили на поверхность селективной среды (СС), не содержащей либо аденина, либо аденина и лизина. Колонии перед переносом растирались, и на СС выявлялись "множественные" (возникшие на исходной среде культивирования и образующие группы реверсов на СС), а также "единичные" (возникшие за счет остаточного роста на СС) колонии реверсов. Инкубацию на СС проводили 10-14 суток, до полного выявления колоний реверсов¹⁴. Спустя требуемое время из таких колоний брали пробы ревертантов для определения их фенотипа (по окраске колоний и потребности в метаболитах). Следует отметить, что специальные опыты показали высокую корреляцию белой окраски колоний с лучшим размножением клеток. Эти данные согласуются с результатами, полученными при генетическом анализе реверсов штамма *p192*: окрашенные колонии все оказались колониями супрессорных реверсов¹⁶. Генотип клеток реверсов определяли по методике массового анализа аскоспоровых клонов, разработанной А.Б.Девиным¹⁵. Для генетического анализа использовали среды, описанные в¹⁵.

Для сопоставления результатов фенотипического анализа реверсов с генетическим анализом и для оценки вклада дополнительных мутаций в клетках первичных локусных мутаций в класс "супрессорных" нами были проведены опыты по методике, описанной выше. Клетки штамма ДК769-176 высевали инокулятором с 221 штырьком на ядерные фильтры, помещенные на МС, содержащую 10 мг/л аденина и 30 мг/л лизина, с таким расчетом, чтобы на каждый инокулюм приходилось по 20-30 клеток. Спустя двое суток инкубации урожайность на чашку Петри составляла $(1 \div 4) \cdot 10^8$ клеток (что соответствовало около 10^6 клеток в одной колонии), и культура достигала стационарной фазы роста. Затем каждую колонию растирали стеклянной палочкой, и фильтры переносили на СС без аденина, содержащую 30 мг/л лизина, где и культивировали еще 10 суток. Пробы из колоний реверсов брали по мере их появления на СС. Для каждой группы множественных реверсов брали пробы из нескольких колоний. Пробы суспендировали в лунках и высевали инокулятором на ПС и на СС, содержащие только 30 мг/л лизина (0/30), только 20 мг/л аденина (20/0), и лишенные обоих метаболитов (0/0). Через 7 дней регистрировали фенотип вырастающих колоний. Клетки случайно выбранных 40 колоний "локусного типа", т.е. белых и выросших только на ПС и на СС 0/30, отбирали с этой селективной среды. Были также случайно выбраны 40 колоний "супрессорного типа", образовав-

шие колонии на всех трех СС, причем для анализа использовали пробы как из колоний, выросших на СС 0/30, так и на СС 20/0. Клетки из таких проб рассеивали истощающим штрихом на ПС для получения моноклеточных культур. Таким образом было получено 120 культур, 40 для локусных реверсов и 80 (по 2 на реверс) — для супрессорных. Каждый клон суспендировали и вновь высевали на ПС и СС для определения окраски и потребности в аденине и лизине. Одновременно эти же культуры, 37 из группы локусных и 31 пару из группы супрессорных, подвергали гибридологическому анализу, методика которого описана в работе¹⁴. Выщепление красных сегрегантов в мейотическом потомстве гибридов *Ade⁺Lys⁺* реверсов с *ADE*-тестером свидетельствует о наличии супрессора *ade2* мутации у соответствующего реверса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В опытах по сопоставлению фенотипических и генотипических характеристик реверсов мы прежде всего определили окраску колоний, образуемых клетками реверсов, а также их способность расти на СС 0/30,

Таблица 1

Результаты фенотипического анализа множественных и единичных реверсов, возникших при 2-суточном культивировании клеток штамма ДК769-176 на среде 20/30, а затем перенесенных на среду 0/30. Общее число ауксотрофных колоний — 18700. Число клеток в колонии $\bar{n} = (1,06 \pm 0,28) \cdot 10^6$

Тип реверсов	Фенотип реверсов	Инкубация на СС, сутки		Всего*
		0 — 5	5 — 10	
Множественные	<i>Ade⁺Lys⁻</i>	43	9	52
	<i>Ade⁺Lys⁺</i>	27	19	46
	Смесь	4	4	8
	колониий**			
Единичные	<i>Ade⁺Lys⁻</i>	157	67	224
	<i>Ade⁺Lys⁺</i>	38	97	135
	Смесь	6	1	7
	клеток***			

* Частота возникновения множественных реверсов $\approx 5,4 \cdot 10^{-9}$, единичных — около $2 \cdot 10^{-8}$.

** На селективной среде появляются колонии различной окраски.

*** На селективных средах 0/30 и 20/0 вырастают колонии разной окраски.

0/0 и 20/0. Результаты такого анализа для проб, взятых из колоний множественных и единичных реверсов, приведены в табл.1. Все реверсы фенотипа Ade⁺Lys⁻ образовывали белые колонии, а фенотипа Ade⁺Lys⁺ — розовые. Кроме этих двух групп, выделилась группа множественных реверсов, содержащих колонии разной окраски ("смесь колоний"), и группа единичных реверсов, у которых после посева культур, взятых со сред 0/30 и 20/0 источающим штрихом, выявилась разная окраска колоний клеток с этих двух СС. Колонии из этой группы, названные "смесью клеток", строгой дифференцировке по окраске не поддавались.

Для генетического анализа отобрали из группы единичных реверсов, выявившихся на СС в течение первых 5 суток, случайную выборку из 37 локусных, 29 супрессорных и двух клонов, состоящих из смеси клеток. В последнем случае клетки, составляющие такие клоны, были разделены на две группы: клональные культуры, выделенные на СС 0/30, образовывали белые колонии и были прототрофными только по аденину, и культуры, выделенные на СС 20/0, образовывали розовые колонии и были прототрофными по обоим метаболитам. Результаты гибридологического анализа указанной выборки реверсов позволили провести сопоставление их фенотипа и генотипа (табл. 2).

Из табл. 2 следует, что белая окраска колоний и прототрофность только по аденину всегда соответствуют генотипу локусного реверса. Следовательно, вклад в этот класс мутаций генов-супрессоров, восстанавливающих только биосинтез аденина, очень мал, не более 2%, что хорошо согласуется с литературными данными^{7,8}. Розовые реверсы, прототрофные по аденину и лизину, выщепляли красные сегреганты при гибридологическом анализе, и, скорее всего, несли мутацию в генах-супрессорах. Можно предположить, что в случае реверсов, обозначенных нами как "смесь клеток", вначале произошло ревертирование по гену ade2, а затем возникла вторая мутация, обусловившая прототрофность по лизину и розовую окраску части сегрегантов (если бы первой была не локусная мутация в ade2-гене, обе культуры со сред 0/30 и 20/0 выщепили бы красные сегреганты). Следовательно, супрессорный фенотип, определяемый по розовой окраске колоний и по способности клеток расти на средах 0/30, 0/0 и 20/0, может в некоторых случаях маскировать первичную локусную мутацию. Как показано в табл.1, на 201 единичный реверс, образовавшийся за 5 суток инкубации ауксотрофных клеток на СС, приходится 6 реверсов, являющихся кандидатами в такие двойные мутанты, что составляет всего 3% от общего числа проанализированных клонов. Учитывая, что при взятии проб колонии первичных реверсов содержали в среднем по $(1,3 \pm 0,8) \cdot 10^6$ клеток (среднее для 10 колоний, взятых из 3 разных чашек Петри), можно подсчитать, что частота возникновения второй мутации не должна превышать величину $\Gamma_1 \approx 2,4 \cdot 10^{-8}$.

Чтобы точнее оценить возможный вклад двойных мутантов в группу фенотипических супрессоров, был поставлен специальный опыт, в котором определяли частоту возникновения второй мутации для случайной

Таблица 2

Результаты сопоставления фенотипического и генетического анализов реверсов по аденину. Указано число реверсов, имеющих данные характеристики

Фенотип первичного реверса	Среда * Цвет колоний на бедной среде		Рост на средах * красных сегрегантов		Выщепление		Генотип реверсов		
	Ade ⁺ Lys ⁻	Ade ⁺ Lys ⁺	Белые	Красные	0/30	20/0	Есть	Нет	Локусные Супрессорные
37	—	—	37	0	37	0	0	37	0
—	—	29	0	29	29	29	29	0	29
Смесь клеток**	2	—	0	29	29	29	29	0	29
			2	0	2	0	0	2	0
			0	2	2	2	2	0	2

* Числитель — содержание в среде аденина, знаменатель — лизина, в мг/л.

** — то же, что и в табл. 1.

выборки из 10 реверсов, имевших локусный генотип. Двухдневные культуры каждого из этих реверсов суспендировали и рассеивали инокулятором на фильтры на среду 2/30, примерно по 170 клеток на инокулюм, где и культивировали в течение 2 суток. За это время колонии достигали размеров $(2-9) \cdot 10^7$ клеток, что заведомо превышало размеры колоний реверсов, обычно использовавшихся нами для фенотипического анализа. Каждую такую колонию растирали и около 20-25% содержащихся в ней клеток переносили инокулятором в лунки с водой. Затем, также с помощью инокулятора, пробы клеток из каждой лунки переносили на среду 0/0. По числу отпечатков с колониями реверсов супрессорного фенотипа, выросших на среде 0/0, можно было оценить частоту перехода исходных локусных реверсов в разряд фенотипических супрессоров за счет возникновения второй мутации. Результаты этого опыта приведены в табл.3.

Мы видим, что усредненная оценка частоты возникновения двойных мутантов, приводящего к имитации супрессорных реверсов, равна $r_2 \approx 0,7 \cdot 10^{-8}$, что достаточно близко к полученному ранее другим методом значению $r_1 \approx 2,4 \cdot 10^{-8}$ (особенно если принимать во внимание, что r_1 отражает не только те события, когда сначала мутирует ген *ade2*, но и те, когда такая мутация происходит в клетках с уже промутировавшим лизиновым или супрессорным геном). Это позволяет нам принять величину $r \approx 10^{-8}$ как весьма правдоподобную оценку частоты возникновения второй мутации в клетках локусных реверсов, что, кстати ска-

зать, близко к усредненным значениям частот спонтанного мутирования дрожжевых клеток наших штаммов^{1,2}. Можно полагать, следовательно, что частота мутирования генов у этих клеток не зависит от того, возникла ли у них ранее какая-либо мутация, или нет.

Доля Р клонов, несущих первичную обратную мутацию, в клетках которых произошла хотя бы одна вторичная мутация, зависит от числа п клеток в колонии. Зависимость P(n) можно описать распределением Пуассона: $P = 1 - e^{-rn}$, где r — частота возникновения второй мутации. Такая зависимость, построенная для $r = 10^{-8}$, приведена на рисунке. Стрелка 1 показывает, что для колоний, содержащих примерно $(3 \div 5) \cdot 10^6$ клеток (обычные размеры колоний реверсов, используемых нами для фенотипического анализа), частота таких событий равна примерно 0,05, т.е. ошибки за этот счет в идентификации природы реверсов лежат в пределах статистических погрешностей измерений.

В статьях^{1,2} был описан феномен изменения соотношения локусных и супрессорных реверсов от 0,05 : 1 до 0,35 : 1 при разных условиях культивирования клеток (данные для штамма p192 приведены в табл.4).

Пользуясь рисунком, можно найти минимальные размеры колоний первичных локусных реверсов, при которых этот феномен полностью сводится к вторичному мутированию реверсов локусного типа, т.е. является артефактом. Допустим, что локусных реверсов среди всех,

Таблица 4

Частота возникновения локусных (L) и супрессорных (S) реверсов при разных условиях культивирования ауксотрофных дрожжей. Штамм p192 (по данным работы^{1,2})

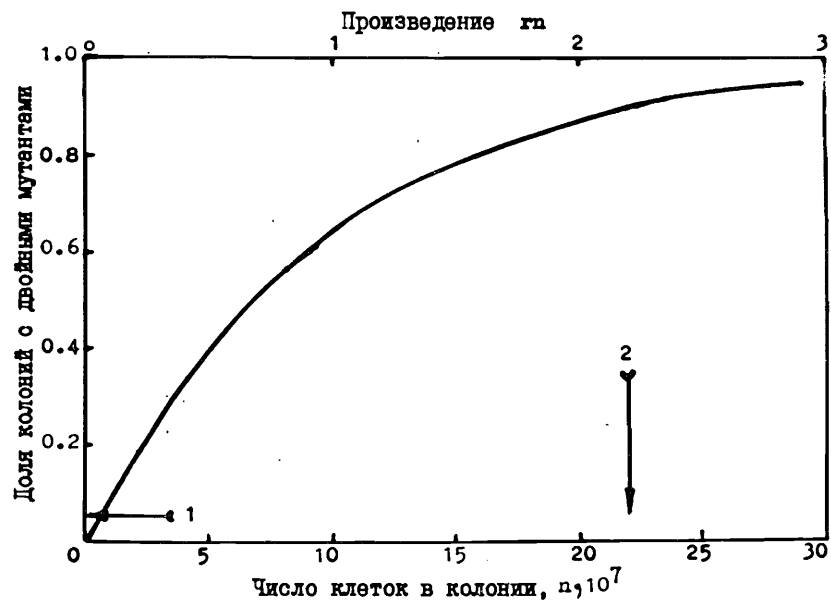
Группа	Содержание аденина, мг/л	Частота, 10^{-8}		L
		L	S	L + S
Логарифмическая фаза роста	1	0,055	1,1	0,048
	10	0,035	0,39	0,082
	100	0,019	0,46	0,040
Стационарная фаза роста	1	0,44	1,6	0,22
	10	0,19	0,44	0,30
	100	0,009	0,19	0,045
Селективная среда (без аденина)*	1	0,73	1,4	0,34
	10	1,3	2,0	0,39
	100	0,69	2,1	0,25

*Данные для мутирования на селективной среде после перенесения на нее колоний клеток из группы "логарифмическая фаза роста".

Таблица 3

Результаты опытов по оценке частоты возникновения второй мутации в клетках локусных реверсов

Реверс N	Число клеток в исходной колонии, 10^7	Число колоний с мутантами (на 405 колоний)	Частота r_2 , 10^{-9}
1	6,3	27	5,5
2	7,0	22	4,0
3	8,1	20	3,1
4	4,1	21	6,5
5	5,8	34	7,6
6	8,6	20	2,9
7	5,7	27	6,1
8	2,3	41	23,2
9	5,6	16	3,6
10	6,8	34	6,4
$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$6,0 \pm 1,8$	$26,2 \pm 7,9$	$6,9 \pm 5,9$



Зависимость доли P клонов локусных реверсов, содержащих хотя бы одну клетку с двумя мутациями, имитирующими супрессорный фенотип, от числа содержащихся в этих клонах клеток.

возникающих на средах с повышенным содержанием аденина, не 4-10%, а 30-40%; как и на $CC^{1/2}$, низкий же их выход в эксперименте был обусловлен переходом части из них в разряд "супрессоров". Для этого вторичные мутации должны возникнуть примерно у 90% колоний первичных локусных реверсов. Стрелка 2 на рисунке показывает, что это возможно лишь в случае размеров колоний первичных реверсов не менее чем $2 \cdot 10^8$ клеток. Но чтобы такую колонию идентифицировать как супрессорную, содержание в ней одной клетки с двумя мутациями явно недостаточно — их должно быть хотя бы на порядок больше. Следовательно, такой артефакт может быть значим лишь при работе с колониями, содержащими не менее 10^9 клеток, чего никогда не бывает в наших экспериментах.

Более того, если предположить, что исходное соотношение локусных и супрессорных реверсов (т.е. величина $L/(L+S)$) не зависит от условий культивирования, и феномен изменения этого соотношения целиком обусловлен возникновением двойных мутантов и поэтому связан с различиями в размерах первичных колоний реверсов в разных группах опыта, то на основании наблюдаемых размеров колоний первичных реверсов можно было бы ожидать эффектов противоположного направления.

Для реверсов, возникающих в логарифмической фазе роста дрожжей на средах с аденином, и для реверсов, возникающих на CC за счет остаточного роста ауксотрофных клеток, сроки выявления и размеры колоний основной массы множественных и единичных реверсов близки ¹⁴, а пробы для тестирования тех и других брались одновременно. Поэтому можно ожидать, что соотношение $L/(L+S)$ должно быть одним и тем же. В действительности, однако, величина $L/(L+S)$ для логарифмической фазы роста значительно меньше, чем для селективной среды.

При выращивании клеток на среде с 1 мг/л аденина до стационарной фазы роста, благодаря быстрому исчерпанию этого метаболита, культура рано достигает стационарной фазы, а реверсы быстро выявляются и образуют довольно крупные колонии. На среде с 100 мг/л аденина рост реверсов подавлен из-за большого размера колоний, образованных ауксотрофными клетками ¹⁴. При последующей инкубации на CC различие в размерах колоний реверсов, возникших на средах с разным содержанием аденина, сохраняется. Можно было бы ожидать, что из-за большей вероятности возникновения вторичных мутаций в более крупных колониях соотношение $L/(L+S)$ для среды с 1 мг/л аденина должно быть меньшим, чем для среды с 100 мг/л аденина (стационарная фаза), — однако в действительности оно равно соответственно 0,22 и 0,045, т.е. прямо противоположно ожидаемому.

Все это хорошо согласуется с выводом, что вклад двойных мутантов в регистрируемый эффект невелик и не искажает истинного соотношения частот возникновения локусных и супрессорных мутаций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные выше материалы позволяют сделать два основных вывода: 1. Результаты генетического анализа показали хорошее соответствие генотипических и фенотипических характеристик локусных и супрессорных реверсов ауксотрофных по аденину штаммов дрожжей: для клонов, содержащих около 10^6 клеток, расхождение не превышало 2-3%, т.е. лежит в пределах точности эксперимента. 2. Частоты возникновения вторичных мутаций, придающих клеткам локусных реверсов супрессорный фенотип, равны примерно 10^{-8} . Основным следствием из этих двух выводов, хорошо согласующимся с результатами экспериментов, является то, что для колоний реверсов, содержащих не более 10^7 клеток, опасность возникновения "ложных супрессоров" невелика и не может существенно исказить получаемые в экспериментах оценки частот локусных и супрессорных мутаций у ауксотрофных по аденину дрожжей при разных условиях их культивирования. Фенотипическая дифференциация таких реверсов на локусные и супрессорные (в том числе по окраске колоний) также дает вполне надежные результаты.

Авторы благодарят А.Б.Девина за полезные обсуждения и советы, а Нгуен Тхи Нго — за помощь в проведении экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ильина В.Л., Корогодин В.И., Файси Ч. – *Генетика*, 1987, 23, № 4, с. 637.
2. Корогодин В.И. и др. – *Препринт ОИЯИ Р19-88-351*, Дубна, 1988.
3. Захаров И.А. и др. – *Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов*. Л.: Наука, 1984.
4. Корогодина В.Л., Корогодин В.И., Файси Ч. – *Сообщение ОИЯИ Р19-88-766*, Дубна, 1988.
5. Девин А.Б. – *Докл. АН СССР*, 1975, 223, № 4, с. 992.
6. Арман И.П., Дутова Т.А. – *Генетика*, 1978, 14, № 2, с. 2128.
7. Инге-Вечтомов С.Г. – *Вестник Ленинградского ун-та, серия биологическая*, 1964, № 9, вып. 2, Л., с. 112.
8. Schuller R.C., von Borstel R.C. – *Mutation Res.*, 1974, 24, p. 17.
9. Сойдла Т.Р., Инге-Вечтомов С.Г., Симаров Б.В. – *В сб.: Исследования по генетике*. Л.: Изд. ЛГУ, 1967, № 3, с. 148.

Рукопись поступила в издательский отдел
2 декабря 1988 года.

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

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

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.
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.
Д4-87-692	Труды Международного совещания по теории малочастичных и кварк-адронных систем. Дубна, 1987.	4 р. 30 к.
Д2-87-798	Труды VIII Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1987.	3 р. 55 к.
Д14-87-799	Труды II Международного симпозиума по проблемам взаимодействия мюонов и пионов с веществом. Дубна, 1987	4 р. 20 к.
Д17-88-95	Труды IV Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1987.	5 р. 20 к.

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