

**Московский ордена Трудового Красного Знамени
Физико-Технический Институт
(государственный университет)
Факультет Общей и Прикладной Физики
Кафедра физики взаимодействия частиц высоких энергий
Объединенный Институт Ядерных исследований**

Учебно-научный центр

**“Отработка методики детектикции делеционных
мутантов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*”**

**Выпускная квалификационная
работа на степень бакалавра
студентки 024 гр.
Любимовой Д. А.**

**Научный руководитель
к.б.н. Колтовая Н. А.**

**Работа выполнена в ОРПИ ОИЯИ
г. Дубна,
2004**

Оглавление

1. Постановка задачи

2. Материалы и методы

- Штаммы
- Плазмиды
- Среды
- Генетический анализ
- УФ-облучение
- Трансформация
- ЭФ
- Проверка устойчивости трансформантов
- Выделение ДНК

3. Результаты

4. Выводы

Введение

В Отделении радиационных и радиобиологических исследований ОИЯИ проводятся исследования действия на живые организмы ионизирующей радиации с различными физическими характеристиками на базе установок ОИЯИ. Ионизирующая радиация вызывает широкий спектр повреждений ДНК. Определение молекулярной природы этих повреждений в большинстве случаев затруднительно. В группе радиационной генетики дрожжей для тестирования мутаций различной природы (потеря хромосом, рекомбинация, замена пар оснований, выпадение нуклеотида) используют различные генетические системы. Для каждого типа повреждений своя генетическая система.

В данной работе отрабатывается методика тестирования небольших делеций (порядка нескольких тысяч пар оснований) на основе плазмидной системы.

Материалы и методы

Штаммы

Дрожжевые штаммы

Штамм	Генотип	Получение
CRY1	<i>MATα rad53 ade2-1 ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 can1-100</i>	предоставлен профессором W. Siede (Техасский университет, TX)
3D	<i>MATα ade2-G45 cyh2</i>	получен от Колтовой Н.А.
CRY1-2c CRY1-12c CRY1-5a CRY1-10b	<i>MATα RAD53 ade2-1 ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 can1-100 cyh2</i>	получены скрещиванием штаммов CRY1×3D
CRY1-3c CRY1-4c CRY1-8d CRY1-9a	<i>MATα rad53 ade2-1 ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 can1-100 cyh2</i>	получены скрещиванием штаммов CRY1×3D

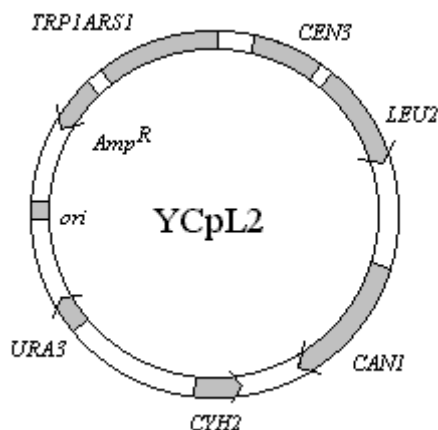
Бактериальные штаммы

Для хранения и наработки плазмиды YCrL2 использовался

бактериальный штамм *Escherichia coli* TG1 обладающий генотипом $F^+ tra$ $D36 LacI^q \Delta(lac Z) M15 pro A^+B^+/sup E \Delta(hdsM-mcrB)5 (r_k^-m_k^+McrB^-)thi \Delta(lac-proAB)$

Плазмиды

Использовалась плаزمида YCpL2, обладающая маркерами *URA3 TRP1 LEU2 CAN1 CYH2*



Среды

БС - 0.5% дрожжевого экстракта, 0.5% пептона, 2% глюкозы;

ММ₃₀₀ (на 1 л) – 5 г (NH₄)₂SO₄, 0.84 г CH₃COONa·3H₂O, 1 г KCl, 1.08 г MgCl₂·6H₂O, 300 мг NaH₂PO₄, 10 г глюкозы, 30 г CaCl₂, 1 мл р-ра витаминов, 0.5 мл р-ра микроэлементов.

Раствор витаминов (на 200 мл): 2 г инозита, 40 мг парааминобензойной кислоты, 40 мг тиамина, 40 мг рибофлавина, 40 мг пиридоксина, 40 мг никотиновой кислоты, 40 мг пантотената кальция, 400 мкг биотина.

Раствор микроэлементов (на 100 мл): 2 мг KJ, 2 мг H₃BO₃, 2 мг MnSO₄·5H₂O, 2 мг (NH₄)₂MgO₄, 10 мг FeSO₄·7H₂O.

Синтетические селективные среды получают добавлением соответствующих аминокислот в среду ММ₃₀₀.

Аминокислоты: аденин, аргинин, гистидин, метионин, триптофан, урацил – по 20 мг/л, тиразин, лейцин, лизин – по 30 мг/л канаванин – 60 мг/л, циглогексимид – 2 мг/л.

LB (на 1 л) – 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl.

Для получения селективной среды LB+Amp, к LB добавляют ампициллин в концентрации 100 мкг/мл.

Для получения твердых питательных сред добавляют 2% агара .

Методы

Генетический анализ

Для проведения генетического анализа использовался метод отпечатков.

В чашки Петри разливались селективные среды (см. Материалы и методы) - среды, содержащие все питательные вещества, необходимые для роста дрожжей, а именно витамины, микроэлементы и аминокислоты, за исключением одной или нескольких определенных аминокислот. Штаммы дрожжей, которые могут синтезировать аминокислоту, не добавленную в селективную среду, в состоянии размножатся на такой среде, а те штаммы, которые не могут синтезировать аминокислоту, гибнут. Например, на селективной среде без урацила (-ura) могут размножаться штаммы с генотипом URA, но гибнут штаммы ura.

С помощью репликатора на чашках с различными селективными средами делали отпечатки исследуемых штаммов. Чашки инкубировали при температуре 30°C в течение 2-3 дней. На полной среде получалась серия реплик, а на селективных средах некоторые реплики, соответствующие штаммам с мутацией по данному гену, были пропущены. Таким образом, становилось понятно, какие штаммы могут синтезировать аминокислоты, а какие нет, т.е. определялся генотип штамма. Отдельно проверялась радиочувствительность штамма.

Уф-облучение

Небольшое количество клеток дрожжей ($\sim 10^7$) разводят в нескольких миллилитрах жидкой питательной среды и инкубируют ночь в термостате при температуре 30°C. С помощью микроскопа подсчитывают титр культуры (количество клеток на миллилитр), разводят культуру до нужной концентрации и помещают требуемое количество клеток на чашку с питательной средой, рассчитывая, чтобы после облучения на чашке выживало около 100 клеток. Потом чашку облучают ультрафиолетом в течение нескольких секунд в темноте, во избежание фотореактивации. После этого чашку инкубируют 2-3 дня в термостате при температуре 30°C, причем первые несколько делений также проходят в темноте. После инкубации подсчитывают количество колоний на облученных чашках и на контрольной чашке. Таким образом, мы получаем зависимость процента выживших клеток от дозы облучения.

Трансформация

Трансформация плазмидной ДНК бактериального штамма

Получение компетентных клеток:

В 30 мл LB выращивается культура до концентрации $\sim 2 \cdot 10^8$ клеток/мл. Концентрация клеток оценивается по оптической плотности культуры. Для этой оценки была построена калибровочная кривая при двух длинах волн – 530 нм и 600 нм:

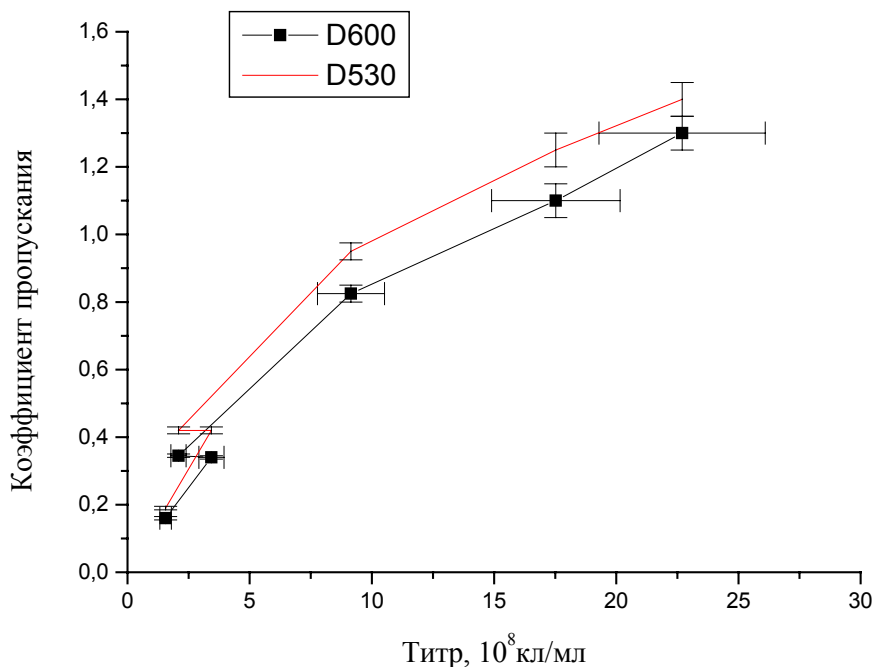


Рис. 1а. Калибровочная кривая для штамма TG1 бактерий *E. coli* зависимости оптической плотности от концентрации клеток в диапазоне оптической плотности 0 - 1.6

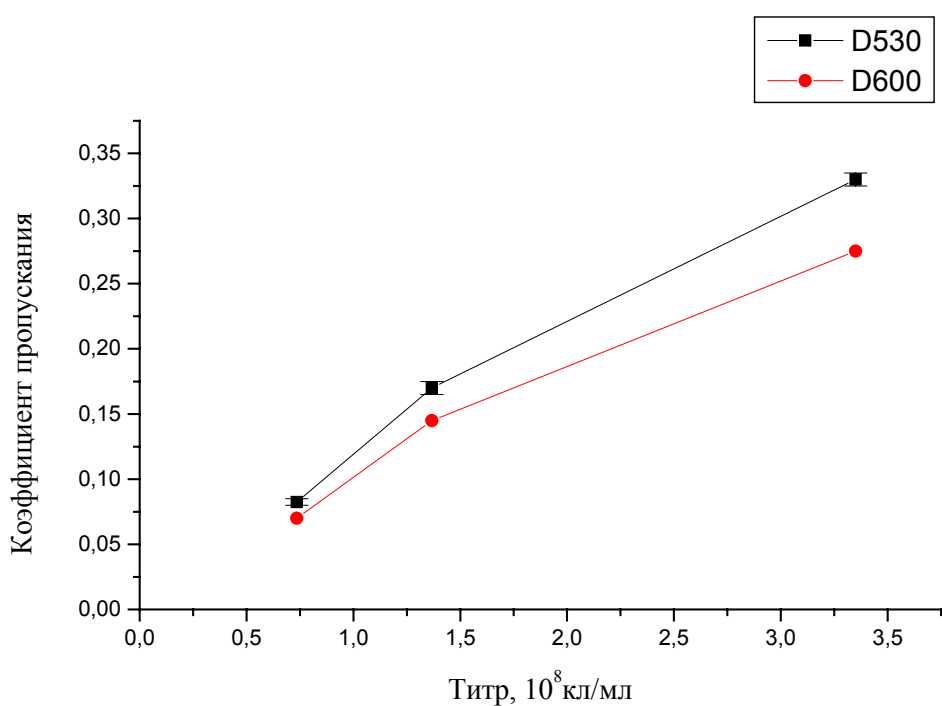


Рис. 1б. Калибровочная кривая для штамма TG1 бактерий *E. coli* зависимости оптической плотности от концентрации клеток в диапазоне оптической плотности 0 – 0.35

Культуру охлаждают во льду, центрифугируют при 4°C. Клетки ресуспендируют в 15 мл охлажденного стерильного 50mM раствора CaCl_2 .

Выдерживают во льду 15 минут, после чего центрифугируют и осадок опять ресуспендируют в 0.3 мл CaCl_2 .

Трансформация:

К 100 мкл компетентной культуры добавляют 10 мкл ДНК (0.3 мкг), выдерживают 30 мин во льду. После теплового шока (3 мин при температуре 42°C) добавляют 500 мкл LB, выдерживают 30 мин при температуре 37°C , после чего высевают по 50 мкл на чашки с селективной средой LB+Amp. Инкубируем при 37°C в течение суток.

Трансформация плазмидной ДНК дрожжевого штамма

Для проведения трансформации вначале надо получить компетентную культуру клеток. Для этого вначале клетки выращивают до нужной концентрации (оптическая плотность ~ 0.2) в объеме 150 мл, потом несколько раз отмывают в TE-буфере, т.е. центрифугируют, удаляют надосадочную жидкость, а осадок ресуспендируют в 75 мл свежего раствора. В последний раз клетки ресуспендируют в 75 мл 0.1M раствора LiCl в TE-буфере, и инкубируют в течение 1 часа в условиях интенсивной аэрации на качалке, далее центрифугируют и ресуспендируют осадок в 1 мл LiCl. Раствор LiCl делает возможным проведение трансформации. После чего к 0.3 мл компетентной культуры добавляют 5 мкг ДНК и 100-200 мкг ДНК-носителя, инкубируют при 28°C 30 мин, добавляют 0.7 мл 40% ПЭГ, инкубируют в течение часа и дают тепловой шок – выдерживают при температуре 42°C 15 минут. После этого клетки опять дважды отмывают в 0.5 мл TE-буфера, ресуспендируют в 1 мл TE-буфера, и рассеивают по 0.1 мл на чашки с селективной средой. Инкубируют при 28°C до появления трансформантов. Те клетки, которые не трансформированы, не несут гена, позволяющего им выжить на селективной среде, т. е. на чашке вырастают только трансформанты.

Электрофорез

Для проведения ЭФ использовали TBE-буфер. Поскольку плазида имела размер порядка 13 тпн мы использовали 0.7% агарозу. На одном крае агарозы находятся небольшие лунки. В эти лунки осторожно помещают 10 мкл ДНК, подкрашенной 5 мкл бромфенолового синего и ксилолцианола, после чего подают поле, напряженностью около 4 В/см. Молекулы ДНК заряжены отрицательно, поэтому при поданном напряжении молекула стремится двигаться в сторону анода. Скорость движения молекул ДНК в агарозе зависит от формы и размера молекул. Примерно через пять часов, когда краситель, которым подкрашена ДНК, доходит до края агарозной пластинки, установку выключают, агарозу достают и опускают в раствор EtBr (1 мкг/мл) на 30 минут. Молекула этого вещества содержит плоскую группу которая интеркалирует между соседними основаниями ДНК. В результате интеркаляции в непосредственной близости от оснований краситель связывается с ДНК, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции. УФ-

излучение, поглощаемое ДНК в области 260 нм и передаваемое на краситель (или же излучение, поглощаемое самим красителем при длинах волн 300 и 360 нм), испускается затем в красно-оранжевой области видимого спектра (590 нм).

Потом агарозную пластину промывают и смотрят в проходящем ультрафиолетовом свете. EtBr светится под ультрафиолетом и по месту нахождения светящихся полос можно определить положение молекул ДНК в агарозе, а имея калибровочную кривую зависимости скорости ДНК от размеров можно оценить длину молекул ДНК.

Фотографии гелей делали в проходящем УФ-свете трансиллюминатора (Vilber Lourmat серия ТСР 20.М, длина волны 312 нм) через красный светофильтр с помощью цифровой фотокамеры или фотоаппарата «Зенит-ЕМ». В последнем случае использовали аэрофотопленку (250-350 ед.) обладающую достаточной чувствительностью для получения изображения полос, содержащих 10-100 нг ДНК, при экспозиции пленки в течение нескольких секунд (1'' - 15''). Для проявления фотопленки использовали проявитель АГФА (выдержка 6 минут) и кислый фиксаж (5 минут). Фотографии печатала в фотолаборатории ЛЯП Г. В. Горбунова.

Наработку плазмиды в бактериальном штамме осуществляли стандартным методом.

Выделение плазмидной ДНК из бактериального штамма осуществляли стандартным методом.

Хранение культур

Хранение дрожжевых культур

На длительное время штаммы закладывают в глицероле при -80°C .

В небольшой флакон наливают 2 мл 30%-го глицерола, автоклавируют 20 мин, охлаждают и плотно закрывают. В среде YEPD (1% дрожж. экстр., 2% бактопептона).

Хранение бактериальных культур

Бактериальные культуры хранят аналогично дрожжевым.

Хранение ДНК

Препарат ДНК хранят при температуре -80°C в этаноле.

Проверка стабильности плазмид у дрожжевых трансформантов

Устойчивость плазмид у трансформантов проверяли следующим образом: Исходную культуру для рассева брали с селективной среды. 5 суточные колонии, выросшие на среде БС в неселективных условиях, ресуспендировали в 5 мл воды и рассеяли в соответствующем разведении на чашки со средой БС чтобы дать им возможность образовать колонии. Через 3 дня около 200 колоний выросших на чашках БС методом реплик перенесли на чашки БС (контроль) и чашки с селективной средой

ММ₃₀₀-ura. Клетки, которые в процессе деления потеряли плазмиду, дают колонии, состоящие из клеток, не способных размножаться на среде без урацила. Доля реплик, которые выросли на БС, но не выросли на селективной среде, соответствует частоте потери плазмидной ДНК клетками дрожжей в процессе деления в неселективных условиях.

Результаты

1. Получение донорных дрожжевых штаммов

В нашем распоряжении был штамм дрожжей CRY1, обладающий генотипом *MAT α rad53 ade2-1 ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 can1-100*. Для получения донорного штамма было необходимо ввести в этот штамм маркеры *cyh2* и избавиться от мутации радиочувствительности, т.е. получить штамм с генотипом *MAT α RAD53 ade2-1 ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 can1-100 cyh2*, т.к. плазида YCpL2 несет маркеры *URA3 TRP1 LEU2 CAN1 CYH2*. В ИМГ РАН Девиным А.Б. были получены зиготы и с помощью микроманипулятора отсажены моноспорные клоны гибрида CRY1x3D(*α SRM ade2-G45 cyh2*). Был проведен генетический анализ полученных 9 тетрад и отобран штамм 2с (*MAT α RAD53 ura leu his can cyh2 ade2*). Этот штамм был скрещен с CRY1, в результате было получено 11 тетрад, из которых отобрали штамм 2d (*MAT α RAD53 ura trp leu his can cyh2 ade*). 2d скрестили с CRY1, получив в результате 12 тетрад. В результате генетического анализа этих тетрад были отобраны 4 штамма с генотипом *RAD53*, обозначенные 2с, 12с, 5а и 10b, и 4 штамма с генотипом *rad53*, обозначенные 3с, 4с, 8d и 9а. Таким образом, в результате нескольких бэккроссов в генотип штамма CRY1 ввели соответствующие маркеры. Полученные штаммы обладали нужным генотипом для поддержания и проверки наличия плазмиды.

2. Проверка радиочувствительности донорных штаммов

У полученных донорных штаммов была исследована чувствительность к УФ-свету. Проводилось облучение экспоненциально растущих культур на чашках с питательной средой БС лампой мощностью 0.28 Дж/м²·с

На рис. 2 приведены результаты одного эксперимента: кривые выживания для штаммов CRY1-12с, CRY1-5а, CRY1-10b и CRY1-2с, обладающих генотипом *RAD53*, и штамма CRY1, несущего мутацию *rad53*. Видно, что кривая радиочувствительности штамма CRY1 ледит ниже, чем кривые выживания штаммов дикого типа. Чувствительность штамма CRY1-12с отличается от чувствительности остальных штаммов дикого типа, но, к сожалению, эксперимент был пока проделан только один раз, поэтому мы

не можем быть уверены, что данный штамм действительно более радиочувствителен, в будущем эксперимент будет повторен.

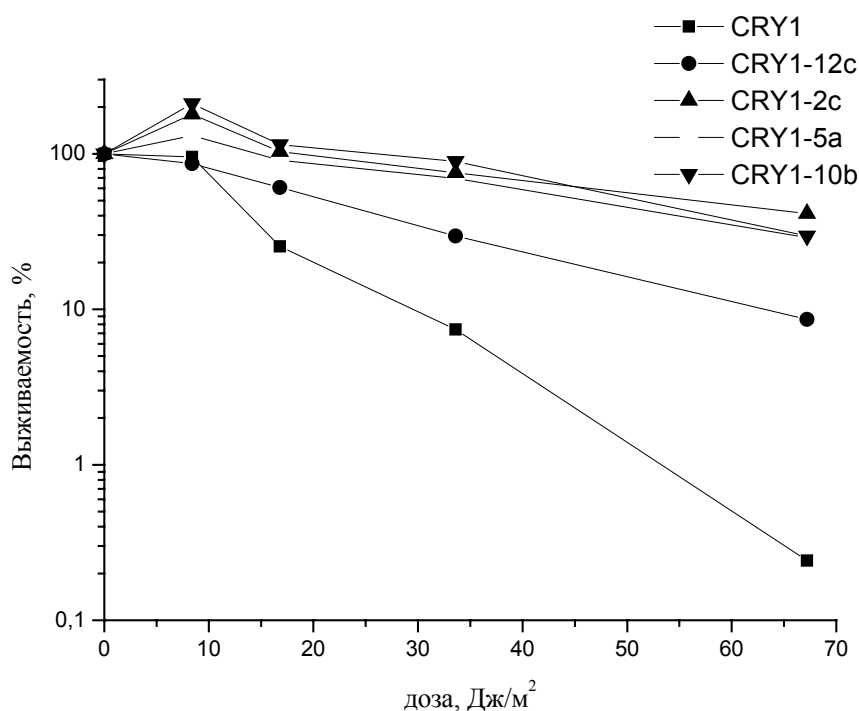


Рис. 2 Кривые выживания для штаммов CRY1, CRY1-12c, CRY1-2c, CRY1-5a, CRY1-10b

На рис. 3 приведены кривые радиочувствительности для штаммов CRY1, CRY1-4c, CRY1-8d, CRY1-9a, обладающих генотипом *rad53*. К сожалению, эксперимент с четвертым клоном CRY1-3c прошел неудачно, поэтому для этого штамма результаты не получены. Видно, что чувствительность к излучению у полученных штаммов близка и соответствует чувствительности исходного штамма CRY1.

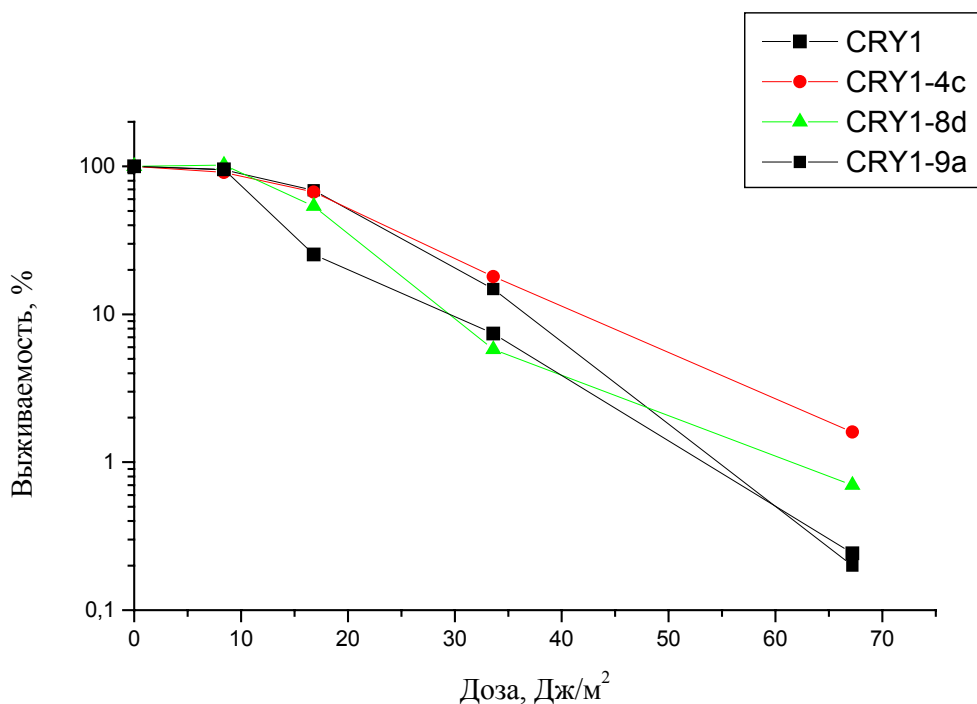


Рис. 3 Кривые выживания для штаммов CRY1, CRY1-4c, CRY1-8d, CRY1-9a

3. Анализ плазмидной ДНК YCpL2

Поскольку в нашем распоряжении было малое количество плазмидной ДНК, мы наработали плазмиду YCpL2 в бактериальном штамме TG1. Для этого провели трансформацию бактериального штамма согласно стандартной методике (см. Методы и материалы). Эффективность трансформации составила $3 \cdot 10^4$ трансформантов на мкг ДНК.

Согласно стандартной методике отобранные трансформанты были помещены на хранение в кельвинатор.

Из полученных бактериальных трансформантов выделили препаративное количество плазмидной ДНК. Анализ плазмидной ДНК с помощью ЭФ показал, что длина выделенных молекул ДНК 13 тпн соответствует длине плазмиды YCpL2, а, следовательно, плазида не была нарушена в процессе пересылки, хранения и выделения и пригодна для дальнейших исследований.

Анализ электрофореграмм проводился с помощью программы GelAnalyser, разработанной медицинским центром «Авиценна». На рис. 4 приведена калибровочная кривая, полученная с помощью этой программы, и позволяющая определить длину плазмидной ДНК по ее подвижности.

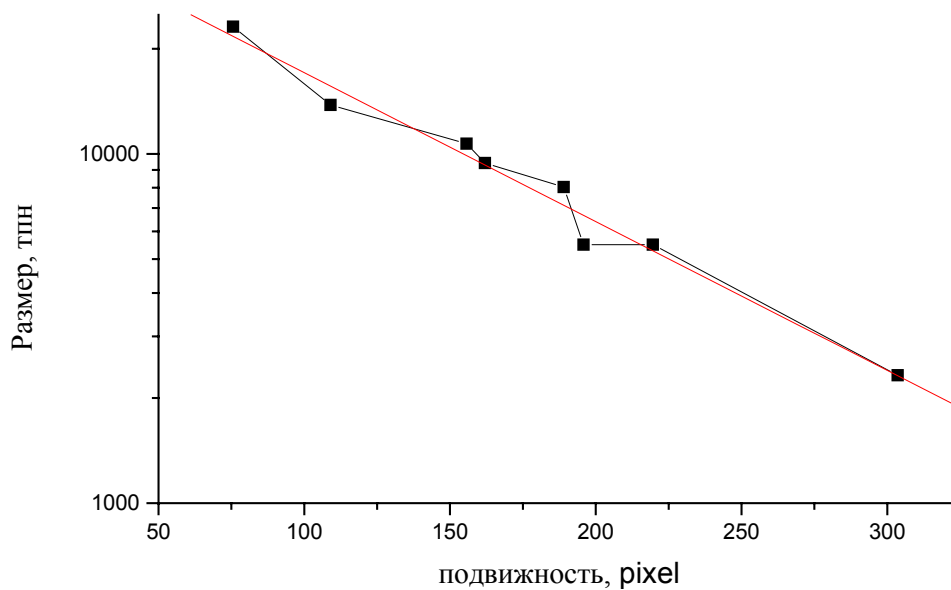


Рис. 4 Калибровочная кривая зависимости длины ДНК от длины пробега ДНК в агарозном геле.

Parameter	Value	Error
A	4,65864	0,05095
B	-0,00426	2,71138E-4

R	SD	N	P
-0,98807	0,04994	8	<0.0001

4. Получение дрожжевых штаммов, несущих плазмиду YCpL2

Была проведена трансформация трех донорных штаммов дрожжей (CRY1-2с (*RAD+*), CRY1-3с (*rad53*) и CRY1-5а (*RAD+*)) плазмидной ДНК, эффективность трансформации составила приблизительно 200 трансформантов на мкг ДНК. Было отобрано 20 трансформантов и проведен их генетический анализ. Генетический анализ подтвердил наличие и функциональность всех маркеров в плазмиде. Исходный штамм дрожжей несет генотип *ade2-1 ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 can1-100 suh2*, т.е. может расти на среде +*can* и +*suh*, но не может расти на среде -*ura*, -*trp*, -*his* и -*leu*. Плазмида несет маркеры *URA3 TRP1 LEU2 CAN1 SUH2*. Поэтому трансформант проявляет генотип *ade URA TRP his LEU CAN SUH*, т.е. в отличие от исходного штамма не способен размножаться на селективных средах, содержащих *can* или *suh*, но размножается на средах -*ura*, -*trp* и -*leu*.

Проверка устойчивости плазмид у дрожжевых трансформантов дала, что за одно деление вероятность потери плазмиды составляет приблизительно 3%.

5. Облучение УФ-светом штаммов дрожжей, несущих плазмиду.

УФ-свет индуцирует широкий спектр повреждений ДНК. Плазмидная система позволяет тестировать возникновение делеционных мутантов. Полученные штаммы, несущие плазмиду, облучали УФ-светом. Облучали экспоненциально растущие культуры на поверхности чашек с питательной средой - БС и селективной средой (ММ₃₀₀-ura, -arg, +can, +cuh). Клетки, посеянные на чашки БС, облучали в течение 6 мин для расчета выживаемости и чашки с селективной средой для выявления делеционных мутантов. Клетки, в которых произошла делеционная мутация, в результате которой теряются гены CAN1 и CYN2, могут размножаться на чашках с селективной средой +can+cuh. Селекция -ura вводится для того, чтобы отбирать клетки, имеющие плазмидную ДНК.

В результате было получено, что при выживаемости около 3.8% индуцируется 1 делеционный мутант на 10⁵ выживших клеток (т.е. на 10⁷ облученных). К сожалению, пока получена очень приблизительная оценка, полученное число позволяет оценить только порядок эффекта.

Заключение

Было проведено исследование частоты возникновения делеционных мутаций при воздействии на культуру дрожжей УФ-излучением. При этом было отработано большое количество микробиологических, генетических и молекулярно-биологических методик, а именно: генетический анализ дрожжевых штаммов, трансформация дрожжевых и бактериальных культур плазмидной ДНК, выделение ДНК из бактериальных и дрожжевых штаммов, электрофоретический анализ молекул ДНК, облучение культуры дрожжей УФ-светом. В дальнейшем предполагается исследовать влияние других типов излучения на частоту возникновения делеционных мутантов.