

ИЗУЧЕНИЕ МУТАНТОВ ПО ЭКЗОГЕННОЙ ФОСФАТАЗЕ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

М. Н. Смирнов, Н. Г. Краснопевцева,
С. Г. Инге-Вечтомов, А. А. Янулайтис

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

Разработка мутационных систем или моделей ген—фермент стала традиционным методом молекулярной генетики, позволившим объединить методы генетики и биохимии в изучении структуры и функции генов и контролируемых ими ферментов. При этом идентификация, выделение и очистка белков — генных продуктов — сталкивается порой с большими трудностями. Следствием этого является некоторая односторонность в работе со многими мутационными системами. Классическим примером в этом отношении служит система *rII* фага Т4, для которой разработаны оригинальные методы генетического анализа большой разрешающей силы, построена подробнейшая рекомбинационная карта, на которой локализованы тысячи мутаций (Бензер, 1963). Лocus *rII* использован в работах по выяснению общей структуры генетического кода (Crick, e. a., 1961). Тем не менее белки, контролируемые генами *rII*, до сих пор не выделены и структура их остается загадкой.

Этими же недостатками страдают и многие мутационные системы у эукариотических микроорганизмов, в том числе и разрабатываемая в нашей лаборатории мутационная система *ade₁—ade₂* (Инге-Вечтомов, 1971a).

В настоящее время нами предпринята попытка создать новую мутационную систему. С этой целью начата работа по изучению кислой фосфатазы дрожжей *S. cerevisiae* и получению мутаций, затрагивающих активность этого фермента. С биохимической точки зрения эта модель является более перспективной по сравнению с первой, так как нам удалось показать, что кислая фосфатаза у дрожжей экскретируется в процессе роста клеток в культуральную среду и это значительно облегчает решение задачи по выделению и очистке фермента.

Материалы и методы. В работе были использованы следующие гаплоидные штаммы дрожжей Петергофской генетической коллекции: ПГ-П188 (α *his_xlys_{A12}*), 4П-219 (α *ade₁₋₁₄his_xlys_{A12}*) и 8-4-П219²⁰ (α *ade₁₋₁₄his_xlys_{A12}s₁₋₈*).

Дрожжи выращивали на средах: YEPD (дрожжевой экстракт 1%, пептон 2%, глюкоза 2%); ПЕП (пептон 2%, глюкоза 2%); ПЕПФo (пептон 2%, глюкоза 2%, KH_2PO_4 250 мг/л). При работе на чашках Петри в указанные среды добавляли 2% агара.

Для получения мутантов по кислой фосфатазе клетки дрожжей, посеянные газоном в чашки Петри на среду YEPD или ПЕПФo, облучали УФ-лучами (Инге-Вечтомов, Кожин, 1964). Через двое суток роста при комнатной температуре определяли активность кислой фосфатазы на колониях, кладя на них фильтровальную бумагу, смоченную раствором α -нафтилфосфата (5 мг/мл в 0,1 М цитратном буфере, pH = 3,4). Через 15 мин бумажки опрыскивали раствором синего прочного В (1 мг/мл в том же буфере). Появление темно-фиолетовой окраски в месте соприкосновения колонии с бумажкой свидетельствовало о наличии активности кислой фосфатазы у этой колонии. Колонии с отсутствием активности фермента отбирали и высевали на среду YEPD для повторной проверки.

Получение гибридов и тетрадный анализ проводили по методу, описанному ранее (Инге-Вечтомов, 19716). При определении активности кислой фосфатазы в жидкой среде в качестве субстрата использовали р-нитрофенилфосфат. К 1,6 мл пробы добавляли 0,4 мл р-нитрофенилфосфата 0,1 М в 5×10^{-2} М цитратном буфере рН 3,4. После 25 мин инкубации при температуре 30° к пробам добавляли по 1 мл 1 М NaOH. Интенсивность развивающейся окраски измеряли на спектрофотометре при длине волны 405 мкм. Фракционирование белков в полиакриламидном геле проводили по методу Орнштейна в незначительной модификации (Успенская и др., 1968).

Результаты. При выращивании клеток дикого типа (1Г-П188 и 4-П219) на всех типах жидких сред мы обнаружили активность кислой фосфатазы в культуральной жидкости. Фермент удается высадить из среды 50%-ным ацетоном без потери активности.

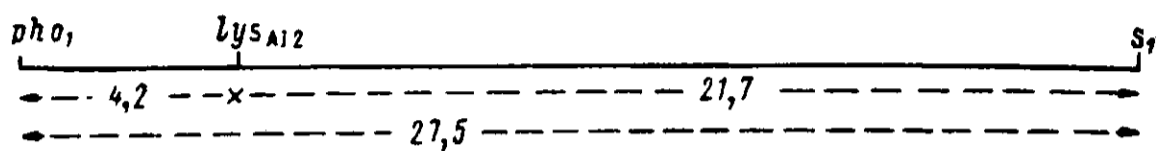


Рис. 1. Карта для трех исследованных мутаций.

Цифры — частота рекомбинаций в процентах, полученная на основании анализа суммарной выборки сегрегантов из полных и неполных тетрад.

В настоящее время мы располагаем коллекцией в 14 мутантов, лишенных активности кислой фосфатазы на среде YEPD и ПЕПФо. 7 мутантов получены в результате облучения гаплоида 1Г-П188 и 7 при облучении гаплоида 4-П219. При проведении тетрадного анализа гибридов, полученных после скрещивания 7 мутантов со штаммом 4-П219, было продемонстрировано моногенное расщепление по фосфатазной активности ($2 \rho_{ho} : 2+$) на среде ПЕПФо. Гаплоиды ρ_{ho} , полученные при тетрадном анализе, были использованы для проведения функционального теста на аллелизм со всеми остальными мутантами ρ_{ho} . Результат функционального теста на аллелизм указывает на аллельность всех полученных мутаций. Вывод этот подтверждается и тем фактом, что все 7 мутаций, подвергнутых тетрадному анализу, обнаружили сцепление с мутацией lys_{A12} , которая, по нашим данным, аллельна мутации lys_2 . Эта последняя мутация, по данным Мортимера и Хотторна (Mortimer a. Hawthorne, 1966), сцеплена с центромерой II. Это указывает на возможную локализацию гена, который мы обозначили ρ_{ho_1} , в правом плече II хромосомы *S. cerevisiae*.

Ранее мы указывали на сцепление с мутацией lys_{A12} одного из двух исследованных нами рецессивных супрессоров s_1 (Инге-Вечтомов, 19716). Это позволило нам локализовать ген ρ_{ho_1} по отношению к мутациям lys_{A12} и s_1 . Для этого был проведен тетрадный анализ гибрида П735, полученного от скрещивания мутанта 99-1Г-П188 ($a \rho_{ho_1-99} his_x lys_9$) и 8-4-П219²⁰ ($\alpha ade_{1-14} his_x lys_{A12} s_{1-9}^s$). Соотношения типов тетрад по парам маркеров: $\rho_{ho_1}-lys_{A12}$; $\rho_{ho_1}-s_1$; $lys_{A12}-s_1$, представленные в таблице, а также анализ суммарной выборки аскоспор, включая сегреганты неполных тетрад, позволяют установить линейное расположение трех исследованных маркеров (рис. 1). Ориентация группы сцепления по отношению к центромере в этих экспериментах не была установлена.

Для изучения изозимного состава кислой фосфатазы исследуемых штаммов дрожжей был проведен электрофорез в полиакриламидном

геле белка, полученного после осаждения 50%-ным ацетоном из среды штаммов 1Г-П188 и 99-1Г-П188, выращенных на среде ПЕП и ПЕПФo. Результаты электрофореза приведены на рис. 2.

Результаты тетрадного анализа гибрида П735

Пары маркеров	Типы тетрад			$f(T)$
	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>T</i>	
$pho_1 - lys_{A12}$	26	—	4	$0,13 \pm 0,06$
$pho_1 - s_1$	14	1	15	$0,50 \pm 0,09$
$lys_{A12} - s_1$	19	—	11	$0,37 \pm 0,09$

Примечание. *P* — родительский дитип, *N* — неродительский дитип, *T* — тетратип, $f(T)$ — частота тетратипа.

Из рис. 2 видно, что при выращивании клеток дикого типа на среде ПЕП в ней можно обнаружить два изоэнома кислой фосфатазы: быстро движущаяся фосфатаза-I и медленно движущаяся фосфатаза-II. У клеток мутантного штамма в этих условиях можно обнаружить только фосфатазу-II. Фосфатаза-II исчезает из среды при добавлении неорганического фосфата. Однако даже двадцатикратное увеличение содержания неорганического фосфора в среде не влияет на синтез фосфатазы-I.

Обсуждение. Таким образом, нам удалось обнаружить, что изучаемые нами дрожжи *S. cerevisiae* имеют две кислые фосфатазы, экскретируемые в культуральную жидкость в процессе роста на жидкой среде, содержащей пептон и глюкозу. Кислая фосфатаза в культуральной жидкости была обнаружена и у ряда других микроорганизмов (Калашникова, Родзевич, 1971). Состав среды играет важную роль в регуляции синтеза этого фермента (Schugg a. Yagil, 1971). Добавление неорганического фосфора в среду ПЕП приводит к ингибированию синтеза фосфатазы-II. Синтез фосфатазы-I не прекращается даже при двадцатикратном увеличении содержания неорганического фосфора в среде. Среда ПЕПФo (а также YEPD, содержащая значительные количества неорганического фосфата) оказалась подходящей для отбора мутантов по фосфатазе-I. Все полученные мутанты по фосфатазе-I сохраняли способность синтезировать фосфатазу-II при посеве на среду, бедную неорганическим фосфатом. Вопрос о том, является ли фосфатаза-I конститутивным ферментом, остается пока открытым.

Гибридологический анализ полученных мутантов по фосфатазе-I показал, что все 14 мутаций локализируются в одном гене, сцепленном с геном lys_{A12} и находящимся предположительно в правом плече II хромосомы.

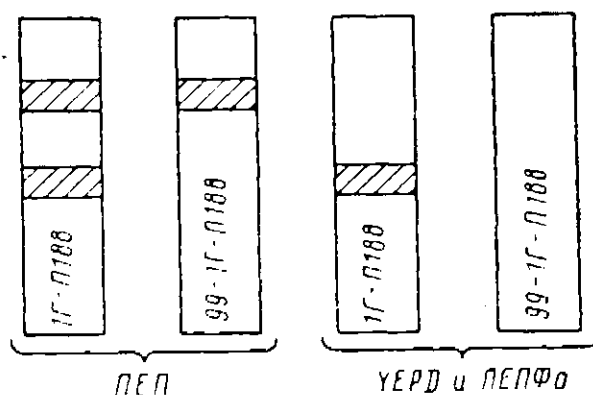


Рис. 2. Изозимный состав экзогенной кислой фосфатазы в различных средах после выращивания клеток дикого типа (1Г-П188) и pho мутанта (99-1Г-П188).

Экскреция кислой фосфатазы в культуральную жидкость в процессе роста клеток дрожжей значительно облегчает решение одного из важных вопросов в создании мутационной системы — вопроса выделения и очистки фермента. В настоящее время в нашей лаборатории разрабатывается метод очистки фосфатазы-I из среды ПЕПФо.

Summary

Acid phosphatase activity was found in the cultural medium after growing of yeast *S. cerevisiae* on the peptone plus glucose (PEP), peptone plus glucose plus inorganic phosphate (PEPPho) and yeast extract plus peptone plus glucose (YEPD) medium.

14 mutants were isolated on PEPPho medium: 7 after UV irradiation of strain IG-P188 (*a his_X lys_{A12}*) and 7 after irradiation of strain P4-219 (*a ad₁₋₁₄ his_X lys_{A12}*). Allelism test show that all mutants studied are in one gene.

Analysis of an isoenzyme composition of exogenous acid phosphatase of yeast *S. cerevisiae* show that on the PEP medium there are two isoenzymes (I and II). After growing of yeast cells on the PEPPho medium there is only I in the cultural medium. Regulation of synthesis of these two enzymes is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

- Бензер С. Тонкая структура гена. — В кн.: Молекулярная генетика. М., 1963, с. 11—32.
- Инге-Вечтомов С. Г., Кожин С. А. Сравнение специфичности действия ультрафиолетовых и рентгеновских лучей на мутабельность дрожжей. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1964, вып. 2, с. 77—85.
- Инге-Вечтомов С. Г. Структура, функция и взаимодействие генов у дрожжей. Автореф. докт. дис. Л., 1971а. 46 с.
- Инге-Вечтомов С. Г. Идентификация некоторых групп сцепления у Петергофских генетических линий дрожжей. — «Генетика», 1971б, т. 7, № 9, с. 113—124.
- Калашникова Н. А., Родзевич В. И. Активность фосфатаз различных культур плесневых грибов. — «Прикладная биохимия и микробиология», 1971, т. 7, № 4, с. 446—450.
- Успенская В. Д., Николаев В. А., Смирнов М. Н. Электрофорез белков в крахмальном и полиакриламидном гелях. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1968, с. 262—300.
- Crick F. H. C., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R. G. The general nature of genetic code for proteins. — *Nature*, 1961, No 192, p. 4809, 1227—1232.
- Mortimer R. K., Hawthorne D. C. Genetic mapping in yeast. — *Ann. rev. microbiol.*, 1966, No 20, p. 151—168.
- Schurr A. a. Yagil E. Regulation and characterization of acid and alkaline phosphatase in yeast. — *J. gen. microbiol.*, 1971, No 65, p. 291—303.