

gator codons reading and the elongator codons sequence are analyzed. Such conditions correspond to the situation when one ribosome of polyribosomal complex catches up with another ribosome and stumbles upon it during the mRNA translation. A conclusion is drawn on great significance of the polyribosomal organization of translation apparatus in the regulation of rates and ratio of individual proteins biosynthesis.

1. Спириг А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома.— М. : Наука, 1971.—254 с.
2. Lengyel P. The process of translation: a bird's-eye view // Ribosomes.— New York: Cold Spring Harbor, 1974.— P. 13—52.
3. Шапиль Ф., Энни А.-Л. Биосинтез белка.— М. : Мир, 1977.—316 с.
4. Транспортные рибонуклеиновые кислоты / Г. Х. Мацука, А. В. Ельская, М. И. Коваленко, А. И. Корнелюк.— Киев : Наук. думка, 1976.—219 с.
5. Остерман Л. А. Регуляторная функция тРНК в биосинтезе белка // Успехи соврем. биологии.— 1977.—83, № 1.— С. 3—22.
6. Ochoa S. Regulation of protein synthesis // Eur. J. Cell. Biol.—1979.—19, N 2.— P. 91—101.
7. Chantrenne H. Regulation of protein synthesis at translation in eucaryotes // Hormones and cell regulation.— Amsterdam: Elsevier, 1978.— Vol. 2.— P. 1—13.
8. Потанов А. П., Ельская А. В. Трансляция природных мРНК. 1. Общий кинетический анализ процесса трансляции мРНК одного вида // Биополимеры и клетка.— 1986.—2, № 2.— С. 88—92.
9. Volkenstein M. V., Goldstein B. N. A new method for solving the problems of the stationary kinetics of enzymological reactions // Biochim. et biophys. acta.— 1966.— 115, N 2.— P. 471—477.
10. Ames B., Hartman P. The histidin operon // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.— 1963.—28.— P. 349—356.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 26.06.85

УДК 575.17.

АССОЦИАТИВНЫЙ ОТБОР КЛОНОВ КЛЕТОК КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА ПО КОМПЛЕКСУ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ

В. К. Савченко, Л. С. Михалевич, Л. М. Кукушкина

Введение. Большинство полиплоидных популяций клеток млекопитающих *in vitro* получены путем обработки исходных родительских диплоидных или околодиплоидных клеток колцеидом, реже — с использованием селективной среды [1—8]. Такой прием значительно увеличивает вероятность успешного выделения полиплоидного клона по сравнению с методом получения спонтанных полиплоидов. Однако колцеидный метод не безупречен, так как обработка клеток химическими веществами может вызывать появление мутаций. Выделение спонтанных полиплоидных клонов в достаточном количестве требует больших затрат труда.

Новым подходом представляется сочетание техники клонирования клеток млекопитающих *in vitro* (без предварительной обработки их химическими веществами) с применением специально разработанных методов отбора по комплексу признаков. Идея использования комплекса количественных признаков для отбора полиплоидных клеточных клонов заимствована из приемов организации отбора в популяциях диплоидных организмов [9, 10]. С помощью предложенной системы отбора мы пытались установить определенную корреляцию между изменением числа хромосомных наборов в клетке и соответствующими им морфологическими показателями. Такая система отбора позволяет выделить клоны с заданными характеристиками без применения химических обработок.

Ассоциативный отбор имеет большое значение для биотехнологии, поскольку он позволяет получить популяции соматических клеток с

генетической структурой, трансформированной в нужном направлении. Важным является тот факт, что отбор может осуществляться по целому набору признаков, определяющих технологические качества клонов.

Ниже приводится описание экспериментов, завершившихся выделением и изучением полиплоидных популяций спонтанного происхождения.

Материалы и методы. Культура клеток. Использовали перевиваемую культуру фибробластов китайского хомячка, клон М-15. Клетки выращивали во флаконах на среде Игла с добавлением 5 или 20 % инактивированной сыворотки эмбрионов коров и антибиотиков (50 ед./мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина). Важным моментом для отбора является наличие достаточной генетической изменчивости в исходном материале. В наших опытах из родительской гетерогенной популяции М-15 были выделены 20 клонов [11], которых в дальнейшем подвергали ассоциативному отбору.

Ассоциативный отбор клонов, выделенных из гиподиплоидной родительской популяции М-15 клеток китайского хомячка, осуществляли по пяти количественным признакам: эффективности клонирования клеток (ЭК) — основной признак; коэффициенту пролиферации (КП); плотности популяции (ПП); большему и меньшему диаметрам колоний (БДК и МДК).

ЭК определяли на 12-е сут после посева 100 клеток во флаконы на среду с 20 % сыворотки [12]. Каждое значение показателя ЭК является средней величиной пяти наблюдений. Ростовые характеристики выделенных клонов определяли в этих же флаконах после подсчета числа клеток в камере Горяева (на 20-е сут культивирования). КП вычисляли по формуле

$$КП = \frac{X}{X_0},$$

где X_0 — число клеток в момент посева, X — урожай клеток после определенного времени культивирования. Размножение клеток контролировали также количеством клеток на единицу поверхности через 4 сут после посева, используя окуляр-микрометр и инвертированный микроскоп МБИ-12. БДК и МДК определяли с помощью винтового окуляр-микрометра (об. $\times 3,2$; ок. $\times 15$, МБИ-12). Размеры колоний выражали в единицах делений прибора.

Для каждого из 20 клонов определяли результирующий параметр Y , по величине которого были отобраны по два клон для культивирования клеток популяций плюс- и минус-направлений.

$$Y = \bar{X}_0 + \sum_{i=1}^{i=n} b_i \bar{X}_i,$$

где \bar{X}_0 — величина основного признака ЭК; \bar{X}_i — величина ассоциированных признаков КП, ПП, БДК, МДК; b_i — коэффициент регрессии ассоциированного и основного признаков.

Анализ хромосом проводили на колхицинированных метафазных пластинках (200 экз.) на 10- и 20-м пассажах. Использовали несколько модифицированный метод Мурхеда и др. [13]. Окраску хромосом проводили азур-эозином.

В качестве меры кариотипической гетерогенности клеток экспериментальных популяций мы использовали показатель энтропии H [14]. Оценивали общую энтропию популяций клеток китайского хомячка по числу хромосом:

$$H_i = H(X_i) = - \sum_{i=m_{\min}}^{i=m_{\max}} p_i \cdot \lg p_i,$$

где p_i — частота клеток в популяции, имеющих i хромосом, $\lg p_i$ — десятичный логарифм p_i . Число хромосом в клетках варьировало от гиподиплоидного $m_{\min} = 12$ хромосом, до высокополиплоидного числа $m_{\max} \approx 54$ хромосомы.

Вероятность выживания клеток популяции находит выражение в показателе ЭК. Это важнейший элемент приспособленности. Поэтому показатель энтропии приспособленности H_w мы определяли по эффективности клонирования

$$H_w = - \sum w_i \cdot \lg w_i,$$

где w_i — показатель эффективности клонирования, $\lg w_i$ — десятичный логарифм w_i .

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены статистические параметры исходной родительской популяции М-15 на 10-ом пассаже по результатам клонального анализа. Как видно из таблицы, средняя эффективность клонирования клеток популяции составляет 52,5 %. Анализ распределения выделенных из популяции М-15 клонов

по показателю ЭК (всего 100 наблюдений) свидетельствует о значительном варьировании клонов по этому признаку в плюс- и минус-направлениях (рис. 1 и 4, а). Такой же широкий диапазон изменчивости значений наблюдали и для других количественных признаков. Индивидуальные отличия в размере колоний в пределах популяции достигали 30—50 %. Увеличение их размеров может быть обусловлено размножением клеток, полиплоидизацией, увеличением цитоплазмы у клеток с относительно стабильным геномом и другими причинами.

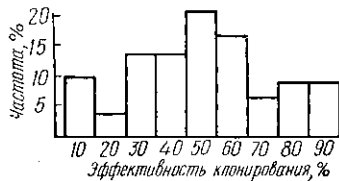


Рис. 1. Распределение клонов гиподиплоидной популяции клеток М-15 по эффективности клонирования.

Fig. 1. Clone distribution of the hypodiploid cell population M-15 for cloning efficiency.

Ростовые характеристики клонов, такие как КП и ПП, варьировали в широких пределах. Коэффициент вариации признаков составил 52,6 и 92,4 % соответственно. Изменение этих признаков слабо коррелировало с эффективностью клонирования клеток (табл. 1). Напротив, признаки БДК и МДК относительно стабильны (коэффициенты вариации 22,4 и 21,0 % соответственно) и имеют более высокий коэффициент корреляции с основным признаком.

Следовательно, анализ статистических параметров клонов показал, что наиболее устойчивыми признаками являются показатели размеров колоний и эффективности клонирования клеток. Между этими признаками обнаружена определенная корреляция.

Все 20 выделенных клонов поддерживали в течение 3—4 недель, после измерений и отбора объем коллекции уменьшили до четырех субпопуляций. Цитогенетическую структуру полученных экспериментальных популяций изучали на 10- и 20-м пассажах. Отобранные четыре клона оказались гетерогенными по своему кариотипическому составу и по всем изученным количественным признакам. Прежде всего эти клоны различались по уровню пloidности: два клона были гипотетраплоидными (ПМ-16С и ПМ-2С) и два — гиподиплоидными.

Показано, что разобщение клеток при клонировании способствует небольшому возрастанию частоты полиплоидных клеток [15]. В наших опытах сочетание клонирования с отбором в разных направлениях по комплексу количественных признаков привело к выделению полиплоидных клонов с частотой 50 %.

На рис. 2 представлены данные по распределению клеток по общему количеству хромосом в двух полученных полиплоидных популяциях спонтанного происхождения ПМ-2С и ПМ-16С на 10- и 20-м пассажах. На 10-м пассаже популяция ПМ-2С (рис. 2, б) в основном состояла из клеток, содержащих 30 и 36 хромосом, к 20-му пассажу увеличилось содержание клеток с 36 хромосомами и выше. Популяция

Таблица 1

Статистические параметры родительской гиподиплоидной популяции М-15
Statistical parameters of parental hypodiploid cell population M-15

Признак	Средняя величина (\bar{X})	Среднее квадратическое отклонение (σ)	Коэффициент вариации (с. в.)	Коэффициент фенотипической корреляции с признаком ЭК (r_p)
ЭК	52,5 ± 5,1	9,8 ± 3,6	42,8	—
КП	6,1 ± 0,7	3,2 ± 0,5	52,6	0,03
ПП	6,0 ± 0,9	5,6 ± 0,9	92,4	0,08
БДК	4,4 ± 0,2	1,0 ± 0,2	22,4	0,43
МДК	4,3 ± 0,2	0,9 ± 0,2	21,0	0,44

ПМ-16С оказалась значительно стабильнее: на обоих изученных пассажах модальный класс клеток содержал 36 хромосом (рис. 2, в, г).

С помощью показателя энтропии, суммировав данные по 10- и 20-му пассажам, также показано, что средний кариотип клона ПМ-16С более устойчив, чем клон ПМ-2С ($H_i=1,48$ и $1,86$ десятичных единиц соответственно). Интересно отметить, что повышение устойчивости популяции соматических клеток (снижение энтропии) коррелирует с по-

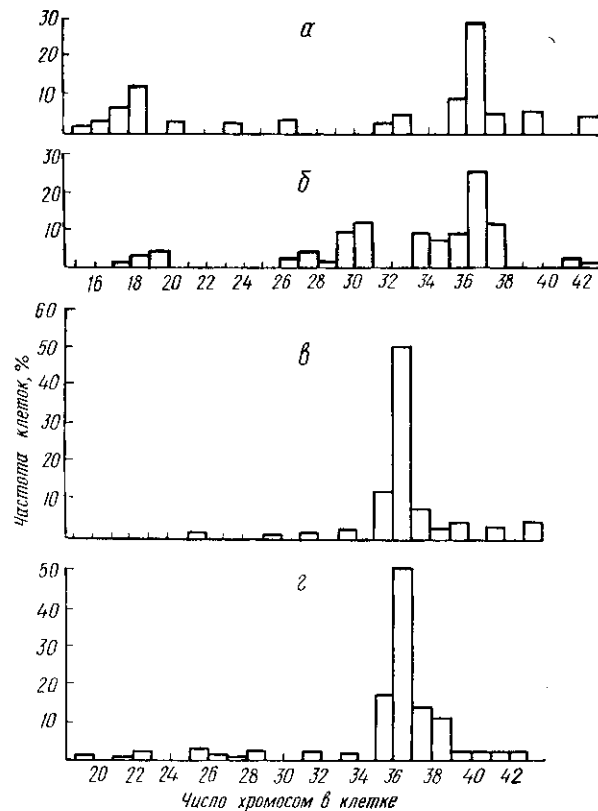


Рис. 2. Динамика кариотипической структуры гипотетраплоидных популяций клеток китайского хомячка: а, б — ПМ-2С; в, г — ПМ-16С; а, в — 20-й; б, г — 10-й пассажи.
Fig. 2. Caryotypic structure dynamics of hypotetraploid cell populations of Chinese hamster; а, б — PM-2S; в, г — PM-16S; а, в — the 20th; б, г — the 10th passages.

ложительным направлением ассоциативного отбора, а с отрицательным направлением связано увеличение энтропии (т. е. снижение кариотипической устойчивости (рис. 3, а)).

Повторное тестирование популяций на 20-м пассаже показало, что уровень их энтропии относительно стабилизирован (ПМ-16С) и даже снижается (ПМ-2С, рис. 3, б). Таким образом, с помощью показателя энтропии установлено, что существует различный уровень стабильности кариотипических вариантов в популяции клеток М-15. Клетки гиподиплоидной родительской популяции по уровню устойчивости выделенных клонов колебались как в сторону снижения (минус-направление отбора), так и в сторону повышения (плюс-направление). Причем клоны, отнесенные к различным уровням стабильности по критерию энтропии H_i , различались и по величине результирующего параметра Y (табл. 2). Родительская популяция, судя по анализу варьирования признака количества хромосом в клетке у потомков, состояла из клеток с высоким и низким уровнями изменчивости по этому признаку в клонках различных направлений. Такие клетки дали, по-видимому, начало клонам различной ploidy, обусловили кариотипическую гетерогенность и изменчивость по ряду количественных признаков.

На рис. 4 показаны результаты расхождения двух гипотетраплоидных популяций ПМ-2С и ПМ-16С по ряду изученных признаков в сравнении с исходной популяцией М-15. На рис. 4, б представлены величины энтропии приспособленности трех популяций: родительской — гиподиплоидной и двух выделенных из нее гипотетраплоидных популяций различных направлений отбора. Как видно из рисунка, показатель энтропии приспособленности родительской популяции оказался несколько выше, чем у выделенных гипотетраплоидных популя-

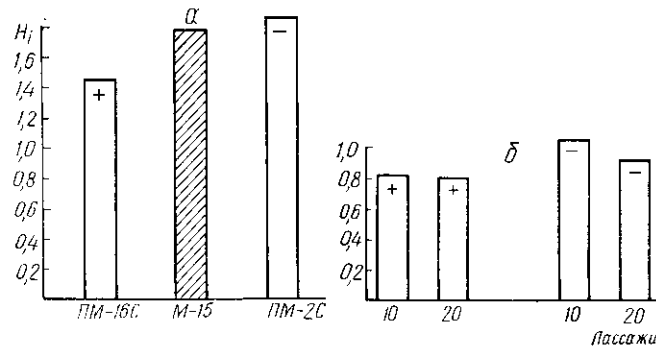


Рис. 3. Энтропия кариотипов гипотетраплоидных популяций клеток плюс- и минус-направлений отбора: а — суммарная энтропия; б — динамика энтропии. Родительская популяция заштрихована.

Fig. 3. Caryotypic entropy of hypotetraploid cell populations of plus- and minus-direction of selection: а — summary entropy; б — entropy dynamics; parental population is hatched.

ций. Отметим, что отбор приводит к некоторому снижению гетерогенности популяций по приспособленности.

Принято считать, что у клеток растений, гепатоцитов и некоторых других клеток уменьшение способности к пролиферации при увеличении уровня пloidности связано со снижением поверхностно-объемных отношений в полиплоидных клетках [7]. Однако в ряде работ отмечается, что скорость роста клеток полиплоидных популяций не отличается от диплоидных [1, 2, 6, 16]. В наших других опытах полиплоидные популяции клеток китайского хомячка, полученные с помощью коллемеида, также показали кинетику роста, сходную с гиподиплоидными популяциями. Выделение же клонов полиплоидных клеток при ассоциативном отборе выявило их гетерогенность по пролиферативным показателям (рис. 4, в).

Таблица 2

Статистические параметры родительской гиподиплоидной популяции клеток М-15 и выделенных из нее гипотетраплоидных популяций плюс- и минус-направлений
Statistical parameters of parental hypodiploid cell population М-15 and selected hypotetraploid populations of plus and minus direction

Параметры	Популяция плюс-направления ПМ-16С	Исходная популяция М-15	Популяция минус-направления ПМ-2С
Результирующий параметр, Y	11,18	2,66	5,39
Энтропия кариотида, H_i	1,48	0,71	1,86
Энтропия приспособленности, H_e	0,70	0,84	0,82

Таким образом, в работе получены данные о значительном влиянии кариотипических изменений на скорость размножения клеток и другие количественные признаки. Это не совсем согласуется с данными ряда авторов, установивших, что скорость роста клеток в клонах не зависела от пloidности клеток и изменчивости клонов по этому показателю [17].

Существенные различия у гипотетраплоидных популяций при плюс- и минус-направлениях отбора обнаружены также и по таким

показателям, как БДК и МДК (рис. 4, з, д). Как видно из рисунка, в гипотетраплоидной популяции ПМ-2С, полученной при минус-направлении отбора, показатели размеров колоний изменены мало, а в популяции ПМ-16С (плюс-направление отбора) размеры колоний значительно увеличены. Можно считать, что количественные признаки размеров колоний у популяции ПМ-16С изменялись пропорционально увеличению количества хромосом в клетках, а в популяции ПМ-2С сохранялись на том же уровне.

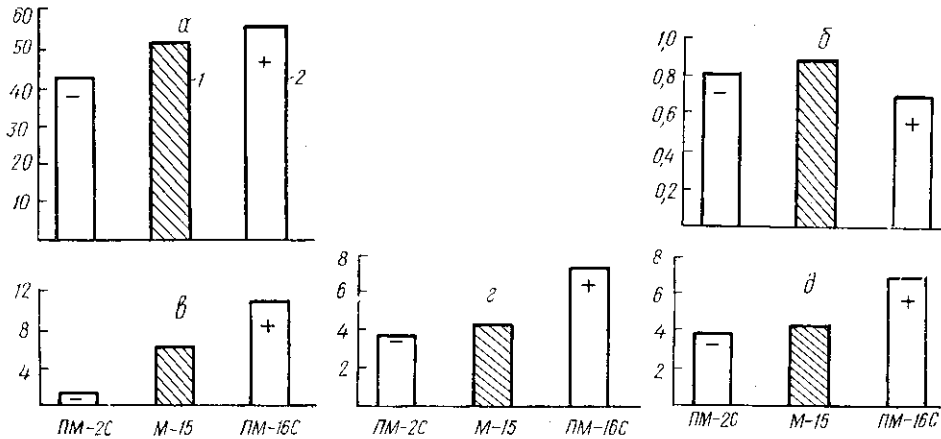


Рис. 4. Характеристика родительской гиподиплоидной популяции М-15 и гипотетраплоидных популяций плюс-направления (ПМ-16С) и минус-направления (ПМ-2С) отбора по признакам: а — эффективность клонирования; б — энтропия приспособленности; в — коэффициент пролиферации; з — больший диаметр колоний; д — меньший диаметр колоний. Родительская популяция заштрихована.

Fig. 4. Characteristic of parental hypodiploid population M-15 and hypotetraploid populations in plus-(PM-16S) and minus-direction of selection (PM-2S) for characters: а — cloning efficiency; б — fitness entropy; в — proliferation coefficient; з — the greater diameter of colony; д — the lesser diameter of colony; parental population is hatched.

Таким образом, в наших опытах показана возможность сохранения относительно стабильной структуры популяций полиплоидных клеток спонтанного происхождения в течение 20 клеточных пассажей. Показатель энтропии H_i у них находился на уровне исходной гиподиплоидной популяции. Сравнительное изучение свойств гиподиплоидных и гипотетраплоидных клеточных популяций показало, что размеры колоний, связанные с размером клеток и их пролиферативными свойствами, могут изменяться в зависимости от направления отбора. Различное поведение изученных нами полиплоидных популяций позволяет предположить, что процесс ассоциативного отбора может сопровождаться повышением или снижением их генетической гетерогенности.

Отбор по комплексу количественных признаков приводит к значительному изменению цитогенетической структуры отобранного материала. Наблюдалась определенная корреляция между увеличением числа геномов в клетке и изменением набора количественных признаков.

ASSOCIATIVE CLONE SELECTION OF CHINESE HAMSTER CELLS FOR A COMPLEX OF QUANTITATIVE CHARACTERS

V. K. Savchenko, L. S. Mikhalevich, L. M. Kukushkina

Institute of Genetics and Cytology,
Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Summary

Associative clone selection for a complex of quantitative characters was carried out in populations of cultivated cells. Two hypotetraploid cell populations of Chinese hamster of plus- and minus-direction of selection were studied. The possibility of preserving

relatively stable karyotypic structure of polyploid cell populations of spontaneous origin during 20 cell passages. An entropy index was used as a measure of karyotypic heterogeneity and general structure indefiniteness of genetic systems — cell populations. A definite correlation between an increase in the genome number in a cell and a change in a set of quantitative characters was determined.

1. *Harris M.* Mutation rates in cells at different ploidy level // *J. Cell Physiol.*—1971.—78, N 2.— P. 177—184.
2. *Harris M.* Polyploid series mammalian cells // *Exp. Cell Res.*—1977.—66, N 2.— P. 329—336.
3. *Mc Burney M. W., Whitmore G. E.* Selection for temperature-sensitive mutants of diploid and tetraploid mammalian cells // *J. Cell Physiol.*—1974.—83, N 1.— P. 69—74.
4. *Петрова О. Н., Мануилова Е. С., Шаниро Н. И.* Гибридизация клеток китайского хомячка, чувствительных к ультрафиолетовому облучению // *Генетика.*—1977.—13, № 4.— С. 637—645.
5. *Morrow J., Stocco D., Barron E.* Spontaneous mutation rate to thioguanine resistance is decreased in polyploid Hamster cells // *J. Cell Physiol.*—1978.—96, N 1.— P. 81—85.
6. *Tompson K. V. A., Holliday R.* The longevity of diploid and polyploid human fibroblasts: Evidence against the somatic mutation theory of cellular ageing // *Exp. Cell Res.*—1978.—112, N 2.— P. 281—287.
7. *Бродский В. Я., Урываева И. В.* Клеточная полиплоидия: Пролиферация и дифференцировка.— М.: Наука, 1981.—260 с.
8. *Иашивили Г. Д., Черников В. Г., Пичугина Е. М.* Изучение активности ядрышкообразующих районов хромосом китайского хомячка в клонах различной ploidy // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.*—1983.—95, № 3.— С. 79—81.
9. *Савченко В. К.* Ассоциативный отбор и его роль в эволюции и селекции // *Журн. общ. биологии.*—1980.—41, № 3.— С. 406—417.
10. *Савченко В. К.* Генетический анализ в сетевых пробных скрещиваниях.— Минск: Наука и техника, 1984.—224 с.
11. *Адамс Р.* Методы культуры клеток для биохимиков.— М.: Мир, 1983.—264 с.
12. *Puck T. T., Marcus P. F.* Action of X-rays on mammalian cells // *J. Exp. Med.*—1956.—103, N 5.— P. 653—657.
13. *Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood / P. S. Moorhead, P. C. Nowell, W. J. Mellmann et al.* // *Exp. Cell Res.*—1960.—20, N 3.— P. 613—616.
14. *Вентцель Е. С.* Теория вероятностей.— М.: Наука, 1969.—358 с.
15. *Интенсивность отбора и частота резких кариотипических изменений в популяциях соматических клеток при клонировании / Ю. Б. Вахтин, Т. Н. Игнатова, И. И. Фридлянская, И. Н. Швембергер* // *Цитология.*—1965.—7, № 2.— С. 258—259.
16. *Вахтин Ю. Б.* Генетическая теория клеточных популяций.— Л.: Наука, 1980.—168 с.
17. *Глебов О. К., Абрамян Д. С.* Природа фенотипической изменчивости соматических клеток в культуре: нестабильные фенотипические изменения // *Цитология.*—1984.—26, № 3.— С. 235—251.

Ин-т генетики и цитологии АН БССР, Минск

Получено 17.06.85

УДК 575.224.232

ОСОБЕННОСТИ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ γ-ЛУЧЕЙ И N-НИТРОЗОМЕТИЛМОЧЕВИНЫ В РАЗЛИЧНЫХ ОТРЕЗКАХ ФАЗЫ СИНТЕЗА ДНК

Х. А. Хакимов, А.-К. Э. Эргашев, Г. П. Македонов, А. П. Акифьев

Введение. В исследованиях по генетической и клеточной инженерии у эукариотических организмов немаловажное значение имеют данные о той или иной реакции отдельных фаз клеточного цикла на внешние воздействия. Особенный интерес при этом представляют работы, связанные с изучением чувствительности различных отрезков самой фазы синтеза ДНК к действию мутагенов. Известно, что различные структурные гены и повторяющиеся последовательности, не кодирующие белки, но, возможно, играющие регуляторную роль, могут реплицироваться в различных периодах фазы S [1—4].