

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

С. В. Білоконь, Т. Г. Алексєєва

ПРОБЛЕМИ МУТАГЕНЕЗУ

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних занять з дисципліни «Проблеми мутагенезу» для студентів
біологічного факультету усіх форм навчання

ОДЕСА
ОНУ
2022

УДК 595.773.4:575.222.2.034 (075.8)

Рекомендовано вченою радою
біологічного факультету ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 4 від 28.12.2021 року.

Автори:

С. В. Білоконь – кандидат біологічних наук, доцент кафедри генетики і молекулярної біології;

Т. Г. Алексеєва – кандидат біологічних наук, доцент кафедри генетики і молекулярної біології.

Рецензенти:

С. Я. Підгорна – кандидат біологічних наук, доцент кафедри зоології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова;

Д. Б. Радіонов – кандидат біологічних наук, доцент кафедри гідробіології і загальної екології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

Білоконь С. В.

Проблеми мутагенезу : метод. вказівки до лабор. занять з дисципліни «Проблеми мутагенезу» для студентів біол. ф-ту усіх форм навчання / С. В. Білоконь, Т. Г. Алексеєва. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2022. – 49 с.

Методичні вказівки представляють собою адаптовані протоколи до лабораторних занять з дисципліни «Проблеми мутагенезу», присвячені виявленню генотоксичної дії препаратів/речовин на *Drosophila melanogaster* як тест-системі *in vivo*.

Наведений матеріал відповідає не лише програмі лабораторного практикуму з певних спеціальних дисциплін, а й може бути використаний для викладання загального курсу «Генетика» для студентів біологічних, сільськогосподарських та медичних спеціальностей.

УДК 595.773.4:575.222.2.034 (075.8)

© Білоконь С. В., Алексеєва Т. Г., 2022

© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2022

Зміст

| | |
|---|----|
| ВСТУП..... | 4 |
| Тема 1. Загальні відомості про дрозоділу | 5 |
| Тема 2. Принципи введення мутагенів та обробки піддослідних комаха..... | 13 |
| Тема 3. Метод обліку доміанантних летальних мутацій (ДЛМ) | 16 |
| Тема 4. Облік рецесивних, зчеплених зі статтю, летальних мутацій у дрозоділи..... | 19 |
| Тема 5. Облік соматичної рекомбінації (мозаїцизму) у дрозоділи . | 23 |
| Тема 6. SMART-тест на <i>D. melanogaster</i> | 27 |
| Тема 7. Вивчення частоти нерівного кросинговеру за мутаціями ознаки <i>Var</i> | 31 |
| Тестові завдання | 34 |
| Список рекомендованої літератури..... | 46 |
| Корисні ресурси..... | 47 |

Вступ

Метою викладання спеціального курсу «Проблеми мутагенезу» є поглиблене навчання студентів закономірностям мінливості організмів, основним механізмам фіксації мутацій, методам визначення останніх та їх ролі в еволюційному процесі.

Основні завдання курсу:

- 1) Довести до уваги студентів історичні аспекти вивчення мутаційного процесу;
- 2) Ознайомити студентів з головними мутаційними теоріями, класифікацією мутацій;
- 2) Викласти сучасні уявлення про індукований мутагенез, мутагенну дію фізичних та хімічних мутагенів;
- 3) Ознайомити студентів з механізмами спонтанного мутагенезу;
- 4) Довести до відома студентів основні методи вивчення мутагенності компонентів довкілля.

Завдання лабораторних занять до курсу «Проблеми мутагенезу» полягає в ознайомленні студентів з різними методами визначення генотоксичної дії речовин за допомогою тестів на *Drosophila melanogaster*. Корисність дрозофіли як тест-об'єкта є загальноновизнаною, вона часто використовується для визначення реальної та потенційної мутагенної активності різних факторів.

Дані методичні вказівки покликані ознайомити студентів біологічного факультету з класичними і сучасними методами оцінки мутагенності хімічних і фізичних агентів, які об'єднує тест-об'єкт *Drosophila melanogaster*. Методичні вказівки включають теоретичні відомості про дрозофілу, принципи введення мутагенів та обробки піддослідних комах і сім практичних робіт, зокрема які стосуються методів обліку мутацій, а також контрольні запитання для підготовки до роботи, тестові завдання та список рекомендованої літератури.

Зібрані авторами методичні підходи також можуть бути корисними не лише студентам, але й аспірантам та молодим науковцям при проведенні власних досліджень.

Тема 1. Загальні відомості про дрозозфілу як важливий об'єкт генетичних досліджень

Теоретичні відомості

Дрозозфіли (лат. *Drosophila* від грецького δρόσος – роса, волога і φίλέω – любити) – плодові мушки, рід дрібних комах родини *Drosophilidae* ряду *Diptera* (Двокрилі). Рід у його сучасному обсязі нараховує близько 1500 описаних видів.

Drosophila melanogaster (чорнобрюха дрозозфіла) – найважливіший для наукових досліджень вид дрозозфіл, який широко використовується, починаючи з робіт Томаса Ханта Моргана з генетики статі і хромосомної теорії спадковості (1910-1920 рр.). Сьогодні *Drosophila melanogaster* – один з найбільш вивчених видів живих організмів – застосовується для широкого спектра досліджень класичної і прикладної генетики. Так, наявність у ряді органів дрозозфіли (слинних залозах личинки та ін.) політенних хромосом використовують у дослідженнях з генетики розвитку, а перелічені нижче біологічні особливості роблять *Drosophila melanogaster* зручним об'єктом експериментальної генетики.

Дрозозфіли вирізняються високою швидкістю розмноження (нове покоління з'являється кожні 10 днів), численним потомством, а також зручністю розведення в лабораторних умовах.

Каріотип *Drosophila melanogaster* представлено чотирма парами хромосом, серед яких статеві хромосоми X/Y (1) і аутосоми (2, 3, 4). Хромосоми 1, 2 і 3 – досить великі і зручні для досліджень, на відміну від меншої за розміром і генетично не навантаженої хромосоми 4. Розмір геному мухи становить близько 165 мільйонів п. н. і містить, за приблизними підрахунками, 13 600 генів.

Для *Drosophila melanogaster* характерний статевий диморфізм, що значно полегшує визначення самців і самиць при постановці схрещувань і аналізі нащадків. Крім того, самці дрозозфіли вирізняються відсутністю кросинговеру через брак у них білка, необхідного для кон'югації гомологічних хромосом в профазі

мейозу I, що широко використовується при визначенні груп зчеплення і локалізації генів.

Нарешті, однією із головних переваг *Drosophila melanogaster*, як незамінного об'єкта генетичного аналізу, є наявність значної кількості мутантних форм, що різняться за морфологічними, біохімічними, фізіологічними, поведінковими та іншими фенотиповими ознаками.

D. melanogaster відноситься до комах з повним перетворенням. Тривалість життя дрозофіли залежить від температури навколишнього середовища: при зниженні температури комахи живуть довше, а при підвищенні – менше. Життєвий цикл при температурі 25 °C становить близько 14 днів.

Протягом життя кожна муха проходить ряд стадій розвитку (повний цикл) від яйця через три личинкові стадії і стадію лялечки, після чого вилуплюється доросла особина – імаго (рис. 1).

Запліднені самки відкладають на поверхню корму яйця. Яйце – близько 0,5 мм в довжину. На спинній стороні яйця (відповідній спинній стороні майбутнього зародка) є два відростки (філаменти), які не дозволяють яйцю занурюватися в рідке середовище. На передньому кінці яйця розташований отвір (мікропіле). Через нього проникає сперматозоїд. У нормальних умовах (при температурі + 25 °C) ембріональний розвиток триває 20-24 години.

Червоподібна личинка (1-го віку), що вийшла із яйця, активно харчується, проїдаючи в кормі ходи і занурюючись в нього. Вся личинкова стадія триває 4-5 діб. В процесі розвитку личинки зазнають дві линьки. Перед тим, як перетворитися на лялечку, вони виповзають на стінки стаканчика з кормом, перестають харчуватися, потім і рухатися. Лялечка покоїться на місці прикріплення пупарію до виходу імаго.

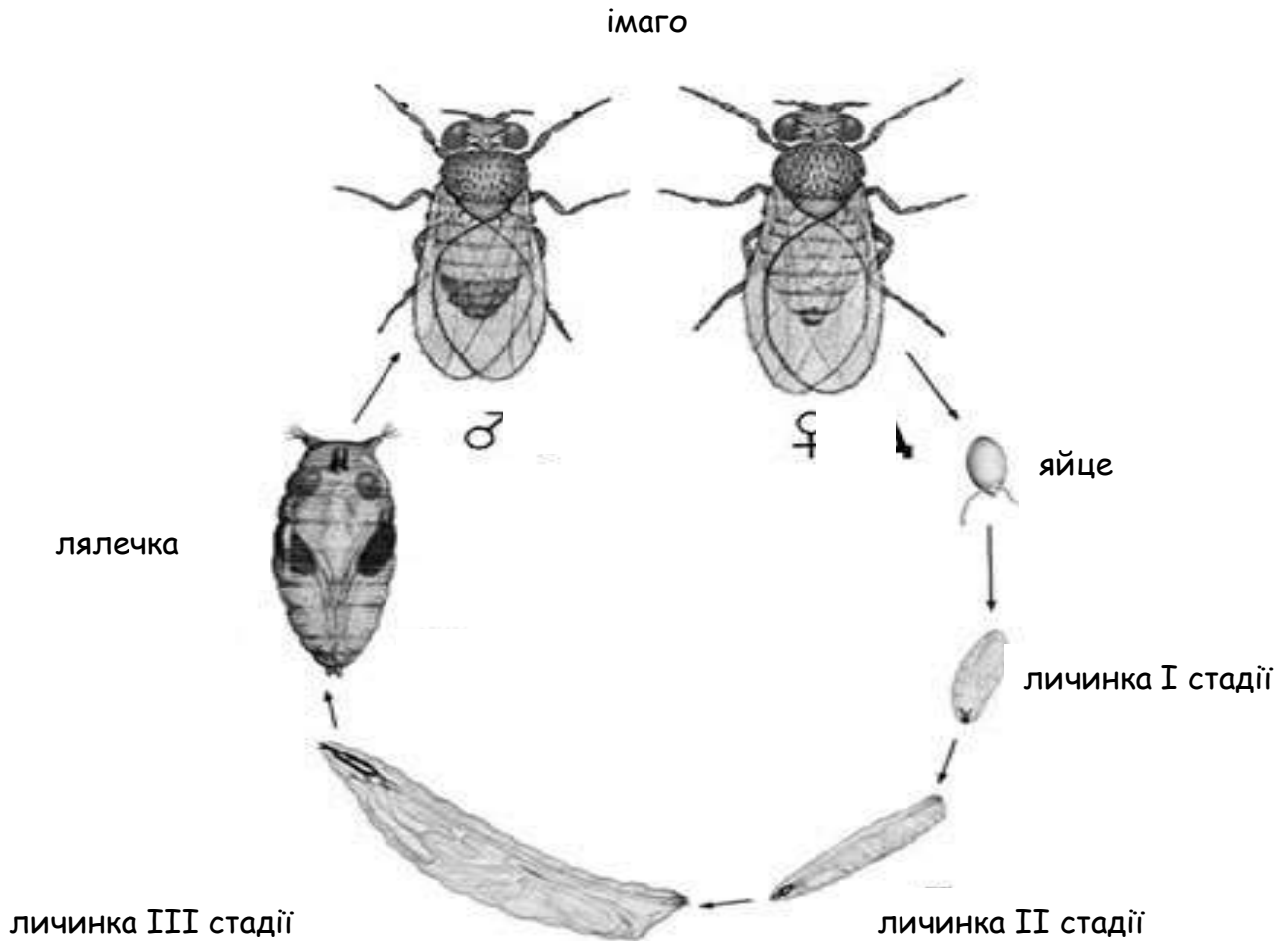


Рис. 1. Життєвий цикл *D. melanogaster*

На стадії лялечки відбувається перебудова органів дрозофіли. Всі личинкові органи (крім нервової системи і статевих залоз) замінюються імагінальними, що розвиваються з імагінальних дисків. Стадія лялечки триває приблизно 4 дні.

Протягом 8-10 годин після виходу з лялечки самки залишаються незайманими, віргінними. Для проведення експериментів зі схрещування слід брати саме віргінних самок. Для цього їх відсаджують від самців не пізніше як через 8 годин після вильоту імаго.

У природі *Drosophila melanogaster* харчуються соком рослин і гниючими рослинними залишками, а личинки можуть засвоювати також і мікроорганізми. В лабораторних умовах мух утримують на спеціальному живильному середовищі з додаванням дріжджів, необхідних для живлення дорослих особин.

Культуру мух рекомендується вести індивідуальним способом у плоскодонних пробірках розміром 25 x 100 мм.

За лабораторних умов мух розводять на поживних середовищах. Живильне середовище готують у такій послідовності: розчиняють агар-агар у дистильованій воді та доводять розчин до кипіння; додають попередньо розчинені у дистильованій воді хлібопекарні дріжджі та кип'ятять, помішуючи протягом 35-40 хвилин; додають цукор та манну крупу, кип'ятять ще 10-15 хвилин; гаряче середовище розливають у пробірки по 5 см³.

Після того, як середовище охолоне та затвердіє, його поверхню засівають дріжджами за допомогою пензлика. Для цього використовують густу водну суспензію дріжджів що містить 4 г дріжджів у 10 см³ дистильованої води. Пробірки з поживним середовищем закривають ватними пробками.

Усі компоненти середовища є поживним субстратом для личинок, що розвиваються. Дріжджі, які проростають на поверхні середовища, є головним елементом живлення імаго.

Відсаджувати мух краще через добу після приготування середовища. В кожному пробірці слід садити не більше 3-х самок. Кількість самців не впливає на щільність мух у культурі. Перевищення кількості самок не рекомендується, щоб уникнути перенаселення в культурі, яке тягне за собою значне здрібнювання мух і скорочення строку їх життя.

Кладка починається на другу добу після парування. Інтенсивність відкладення яєць з часом збільшується, досягає максимуму на 4-5 день і тримається на цьому рівні протягом тижня. За цей час самки відкладають у середньому 50-70 яєць на добу. Потім інтенсивність кладки зменшується. За сприятливих умов кладка триває 3 тижні і може продовжуватись до кінця життя. Після парування від однієї самки можна одержати до 600 нащадків.

Перший час після вилуплювання личинки залишаються на поверхні поживного середовища. Потім вони занурюються вглиб поживного середовища та залишаються там до моменту лялькування. Перед залялькуванням личинки припиняють живитися та виповзають

на стінки пробірки, де заляльковуюються. Приблизно на третю добу після утворення лялечки стають помітними обриси очей та крил. На четверту добу виходять імаго.

Усі маніпуляції з мухами треба проводити під наркозом, для чого використовують діетиловий ефір або пари CO₂. Вату в ефіризаторі злегка змочують ефіром та, постукуючи пальцями по стінкам пробірки, витрушують мух на білу керамічну плитку (молочно біле скло або аркуш), після чого переглядають. Наркоз слід проводити обережно, оскільки від великої дози ефіру мухи можуть загинути. Якщо ж в процесі аналізу мухи починають рухатися, їх можна повторно піддати наркотизації і продовжувати аналіз.

Мух під наркозом переглядають під бінокляром або лупою, використовуючи підрізане пір'я з махових крил птахів або тонкі пензлики. Після перегляду мух висаджують у пробірки із свіжим поживним середовищем. Мухи під наркозом можуть прилипати до свіжого середовища та гинути, тому після перегляду їх краще поміщати на стінки пробірок, а коли вони почнуть рухатись, пробірки поставити вертикально. Непотрібних для подальшої роботи мух викидають у посудину, що вміщує рідину, в якій мухи швидко тонуть (наприклад, спирт). Усі пробірки з мухами повинні бути позначені (марковані), щоб уникнути плутанини між різними лініями. Для цього необхідно використовувати загально прийняту генетичну символіку.

Фенотип та генотип ліній дикого типу прийнято вважати нормальним. Спадкове відхилення від норми – мутація. Назва мутацій може бути складена із одного чи декількох англійських слів, які відображають фенотиповий прояв цієї мутації. Ці слова можуть бути чи іменником (наприклад, *plexus* – сплетення) чи прикметником (*white* – білий), чи їх сполученням (*abnormal abdomen* – ненормальне черевце).

Назва мутації з домінантним проявом пишеться з великої літери (*Bar*), а з рецесивним проявом – з маленької (*ebony*). Символ мутації складається із однієї чи декількох літер повної назви мутації. Перша літера символу – це перша літера повної назви мутації. Друга

та наступні літери вибрані із повної назви довільно, але згідно з відповідністю до загальноприйнятої номенклатури з метою уникання однакового позначення мутацій. Наприклад, *b* – символ мутації *black* (фенотиповий прояв – чорний колір тіла), чи *bw* – символ мутації *brown* (фенотиповий прояв – коричневі очі).

Нормальні алелі позначаються або символом «+» або символом локусу з індексом «плюс», наприклад, ct^+ . Алелі одного локусу (серія множинних алелів) мають таку ж саму назву і символ та відрізняються один від одного лише індексами. Індексом може бути скорочення назви цієї мутації. Наприклад, w^a , де *white* – назва локусу, а *apricot* – назва мутації.

Хромосоми *Drosophila melanogaster* позначаються арабськими цифрами 1, 2, 3 та 4. Y-хромосома (статева хромосома самців) позначається літерою «Y» чи знаком — .

Коли описують лінії, які мають декілька мутацій в одній хромосомі, символи мутацій записують у порядку їхнього положення на генетичній карті та розділяють проміжками, Наприклад: у *ct* чи *cn vg*.

Символи мутацій, які локалізовані у гомологічних хромосомах, розділяються похилою лінією. Наприклад: *Sy/Pm*.

В описі ліній, у яких мутантні гени знаходяться у негомологічних хромосомах, символи розділяють комою з крапкою. Наприклад: *Sy/Pm; D/Sb; y; vg; st e*. Хромосоми записують у наступному порядку 1 (чи X); Y; 2; 3; 4.

Хромосомні мутації можливо позначати по мутантному фенотипу або за особистими правилами позначення структурних перебудов. Локалізація гена позначається так: спочатку вказують номер хромосоми, а потім відстань у морганідах від лівого плеча хромосоми, в якій локалізовано ген, з точністю до десятих часток. Наприклад, локалізація гену *vestigial (vg)* – позначається так: 2 – 76,0.

Для *Drosophila melanogaster* дикого типу характерний цегляно-червоний колір очей, жовто-коричневе з чорними кільцями черевце і довгі закруглені крила. Самки крупніші за самців (близько 2,5 мм довжиною), задня частина їх тіла темніша. Вага самки близька до

1 мг, вага самців дещо менша. Розмір і тих, і інших може коливатися залежно від умов харчування. У самки є вісім добре розвинених тергітів (верхні хітинові щитки грудей), а в самця – шість, оскільки шостий і сьомий тергіти злиті, а восьмий увійшов до складу статевого апарата. Черевце самки округле із загостреним кінцем, у самця воно циліндричне із притупленим кінцем і пігментованими останніми сегментами. Найбільш показовою ознакою самця може служити суцільно чорний кінчик черевця, а також група загострених щетинок, що оточують анус і геніталії.

У *Drosophila melanogaster* відомо більше 170 мутантних ліній, більшість із яких, за окремими винятками, є рецесивними, а їх наявність, зазвичай, сприяє зниженню життєздатності особин. Мутанти відрізняються від дикої раси (*Normal*) по ряду фенотипових ознак. Мухи, мутантні по генах, що визначають морфологічні ознаки, здебільшого мають чітко виражені зовнішні прояви, легко доступні для спостереження, такі як довжина крил, колір тіла, форма і колір очей. При дослідженні інших менш виражених морфологічних ознак (довжина, форма і густота щетинок, відтінки кольору очей та ін.) використовують бінокюляри і лупи.

Практична робота № 1

Мета роботи: ознайомитися з колекцією мутантів *Drosophila melanogaster* кафедри генетики та молекулярної біології.

Матеріали та обладнання:

Drosophila melanogaster із колекції кафедри генетики та молекулярної біології.

Атлас *Drosophila melanogaster* (колекція кафедри генетики і молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова).

Бінокюлярні лупи.

Завдання:

Після ознайомлення з колекцією мутантів *Drosophila melanogaster* кафедри генетики та молекулярної біології скласти таблицю:

Характеристика мутантних ліній *Drosophila melanogaster*

| Лінія, ген | Локалізація гена | Фенотип |
|------------|------------------|---------|
| | | |
| | | |
| | | |

Контрольні запитання для підготовки до роботи

1. Різноманітність мутацій у популяціях.
2. Відмінність мутацій від модифікацій.
3. Частота мутацій у популяціях.
4. Класифікація мутацій.
5. Сучасні уявлення про генні, хромосомні та геномні мутації.
6. *Drosophila melanogaster* як модельний об'єкт.
7. Життєвий цикл дрозофіли.
8. Методичні особливості роботи з *Drosophila melanogaster*.
9. Поняття про чисту лінію.
10. Генетична номенклатура у формальній генетиці.

Тема 2. Принципи введення мутагенів та обробки піддослідних комах

Теоретичні відомості

Пероральне введення препарату, що досліджують, можна проводити двома способами:

1. Віргінних самиць розміщують у пробірки, в яких знаходиться фільтрувальний папір, змочений розчином препарату, який містить 5 % розчин глюкози.

Контрольну групу тварин розміщують у пробірки з фільтрувальним папером, змоченим 5 % розчином глюкози – негативний контроль. Для приготування 5 % глюкози використовувати дистильовану воду.

В якості позитивного контролю може бути використано будь-який супермутаген, наприклад, циклофосфамід в концентрації 0,2 мг/мл.

Кількість рідини досліджуваного препарату підбирають емпірично з розрахунку на ємність посуду та кількості мух. Експозиція обробки – 72 години. У разі високої токсичності препарату обробка скорочується до 48 годин.

2. Обробку мух проводять у плоскодонних пробірках, які рекомендуються для розведення дрозофіли. Дно пробірки заливають гарячим рідким середовищем в кількості 5 см³ у кожену пробірку. Коли середовище охолоне, його засівають дріжджовою суспензією, яку готують із розрахунку: 4 г дріжджів у 10 см³ рідини, що досліджується (препарат у досліді, дистильована вода у негативному контролі, та циклофосфамід в концентрації 0,2 мг/мл у позитивному контролі). Через добу у ці пробірки відсаджують віргінних мух (по 20 особин у кожену пробірку), самок і самців окремо. Експозиція обробки – 72 години.

Якщо препарат не розчиняється у воді, можливе (при обов'язковій постановці відповідних контролів) його розчинення в етиловому спирті так, щоб кінцева концентрація цих розчинників у дослідному розчині була не більше 2 %.

Інгаляційний спосіб введення використовується, як правило, для оцінки мутагенності наркотичних газів. Обробку мух роблять в ексикаторах, розраховуючи дозу газоподібної речовини на об'єм ексикатора.

Ін'єкції дослідного препарату імаго дрозофіли роблять скляним капіляром проміж 4 та 5 сегментами черевця.

Значної різниці у визначенні мутагенності в залежності від шляху введення препарату немає. Тому можна рекомендувати як основний спосіб обробки дрозофіли дослідним препаратом – пероральне введення (з кормом).

В залежності від токсичності препарату, тривалість обробки (експозиція) може коливатися від декількох годин до декількох днів (частіше 48-72 години). Токсичність препарату встановлюють за виживанням самок, яка повинна бути близько 50 %. Для цього в експерименті досліджують ефекти з щонайменше трьома різними концентраціями (при їх виборі треба враховувати рекомендації виробника препарату щодо його дозування), так встановлюють напівлетальну дозу (Lt_{50}). Саме ця доза буде використовуватися далі в експерименті. Її зниження можливе лише в тому випадку, коли досліджуваний препарат має сильно виражений стерилізуючий ефект.

Якщо при обробці максимальною дозою визначені статистично значущі ефекти, експерименти треба продовжувати на вдвічі менших дозах.

Після того, як встановлено токсичність дослідного препарату/речовини та визначено діапазон концентрацій, переходять до визначення мутагенності (генотоксичності). Оцінити генотоксичність тих чи інших препаратів/речовин на моделі *in vivo* *Drosophila melanogaster* можливо за допомогою чотирьох різних тест-методів, які наведено нижче. Ці методи повинні використовуватися паралельно та одночасно для дослідження одного препарату/речовини. Лише отримавши результати за всіма тестами, можливо зробити загальний висновок щодо генотоксичності досліджуваного препарату/речовини.

Практична робота № 2

Мета роботи: Навчитися основним прийомам роботи з дрозофілою, приготувати живільне середовище з заданою концентрацією потенційно-мутагенної речовини.

Матеріали та обладнання

Drosophila melanogaster із колекції кафедри генетики та молекулярної біології.

Бінокулярні лупи.

Агар-агар, хлібопекарні дріжджі, цукор, манна крупа.

Біологічно-активні речовини з потенційно шкідливою дією.

Завдання

Приготувати кормову суміш для дрозофіли для контролю та дослідних варіантів. У дослідних варіантах розрахувати кількість досліджуваних препаратів/речовин для отримання концентрацій: 0,1 %, 0,5 %, 1,0 % за перорального введення.

Контрольні запитання для підготовки до роботи

1. Розкажіть про способи обробки піддослідних комах.
2. Наведіть рецепти приготування поживного середовища для дрозофіли.
3. Поясніть, як приготувати розчини із заданими концентраціями досліджуваних препаратів/речовин.
4. Дайте поняття летальної та напівлетальної дози (Lt_{50}).
5. Охарактеризуйте промутагени і процеси біотрансформації.
6. Обґрунтуйте генетичну активність хімічних сполук та фізичних чинників, що забруднюють довкілля.
7. Що таке генетичний моніторинг мутагенності навколишнього середовища?
8. Для чого потрібен позитивний і негативний контроль при постановці досліду?

Тема 3. Метод обліку доміантних летальних мутацій (ДЛМ)

Теоретичні відомості

Сутність даного методу полягає у виявленні індукованих генетичних змін, які виникають у зародкових статевих клітинах (клітинах-попередниках) батьків і ведуть до загибелі нащадків на різних стадіях ембріонального розвитку. ДЛМ виникають внаслідок великих перебудов хромосом, анеуплоїдій, пошкоджень важливих цитоплазматичних структур, порушення реплікацій ДНК і, частково, генних мутацій. В експериментах використовують низькомутагенні лінії дикого типу дрозофіли *Canton-S*, *Oregon-R*, *Домодедівська-32* та інші.

Практична робота № 3

Мета роботи: застосувати метод доміантних летальних мутацій для визначення потенційного генотоксичного ефекту досліджуваної речовини.

Матеріали та обладнання:

Drosophila melanogaster, лінія *C-S*.

Бінокулярні лупи.

Досліджуваний препарат або речовина.

Плоскодонні пробірки.

Живильне середовище.

Чорні агарові пластинки.

Хід роботи

1. Імаго дрозофіли обробляють перорально. Використовують самців дикого типу *C-S*. На дно пробірки заливають гаряче живильне середовище, засівають його дріжджовою суспензією з досліджуваним препаратом/речовиною в досліді та дистильованою водою в контролі. Доміантні летальні мутації виявляють на початкових стадіях розвитку першого покоління дрозофіли.

2. Після 72 годин обробки досліджуваним препаратом/речовиною мух відсаджують у пробірки із живильним середовищем для схрещування (по 10 самців і самиць).

3. Підготовлюють «чорні агарові пластинки».

Для приготування 100 см³ середовища беруть 3 грами агар-агару та 3 грами цукру, розчиняють у 100 см³ дистильованої води та кип'ятять до повного припинення піноутворення.

Одну таблетку активованого вугілля розтирають у ступці в порошок і додають (перемішуючи) у середовище, що кипить. Після припинення піноутворення гаряче середовище розливають тонким шаром (3 мм) у чашки Петрі. Середовище охолоджують при кімнатній температурі. Коли середовище охолоне, його покривають тонкою плівкою дріжджової суспензії за допомогою пензлика. Чашки накривають і залишають на добу при температурі 22 ± 3 °С.

4. Через добу по 10 самиць відсаджують на агарові пластинки у чашках Петрі, які утримують в термостаті при температурі 22 ± 3 °С (фото 1).

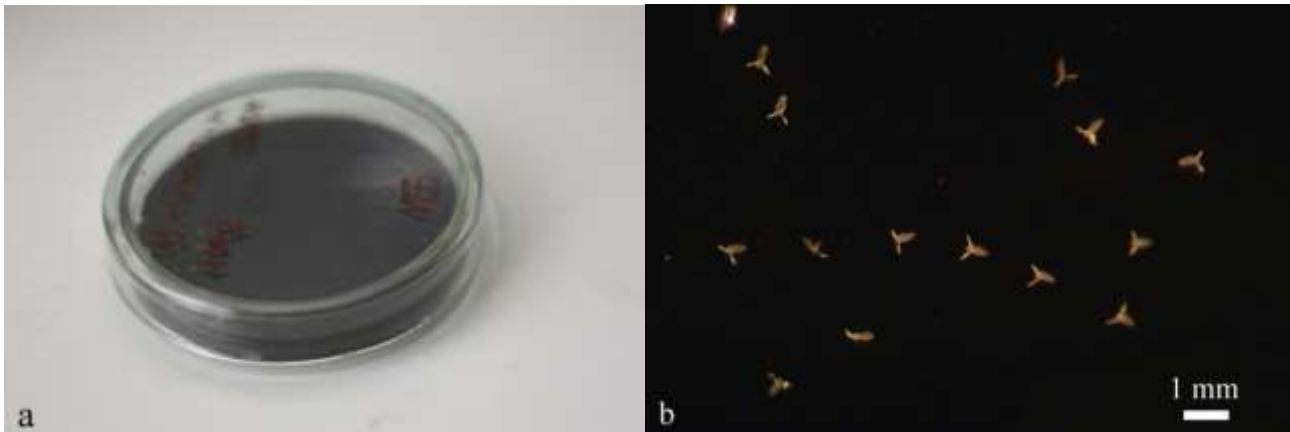


Фото 1. Метод ДЛМ: а – загальний вигляд чашки Петрі з «агаровою пластинкою», б – кладка яєць на агарі під бінокулярною лупою

5. Через вісім годин самиць видаляють. Облік домінантних летальних мутацій здійснюють через 48 та 72 години з моменту відсаджування самок на чашки Петрі (початок яйцекладки). До цього часу з яєць, що нормально розвинулися, виходять личинки. Личинки та нормальні яйця, які ще не розвинулися, враховують як норму. Аномальні яйця поділяють за кольором на три типи:

- прозорі – незапліднені;
- матові – рання ембріональна загибель (перші 9 годин ембріонального розвитку);
- забарвлені (від жовтих до коричневих) – пізня ембріональна загибель (фото 2).

6. Частоту виникнення ДЛМ розраховують за формулою:

$$\text{Ч}_{\text{ДЛМ}} = \frac{N_{\text{ДЛМ}}}{N_0} \cdot 100\%,$$

де $\text{Ч}_{\text{ДЛМ}}$ – частота ДЛМ у відсотках;

$N_{\text{ДЛМ}}$ – кількість яєць з ДЛМ, екземпляри;

N_0 – кількість запліднених яєць, екземпляри.

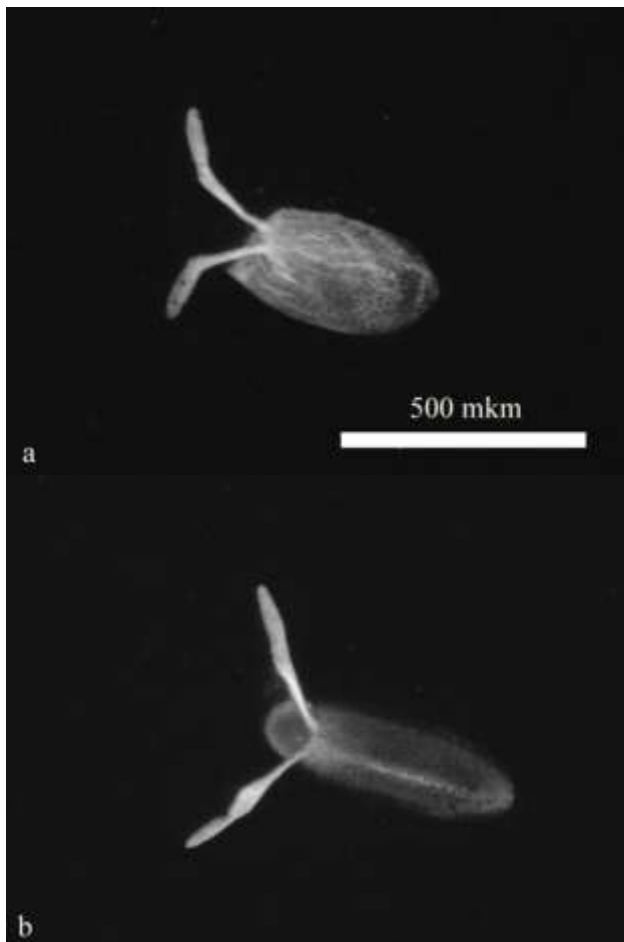


Фото 2. Яйця дрозофіл: а – матові запліднені, б – прозорі незапліднені.

7. Висновок про наявність або відсутність генотоксичності препаратів/речовин роблять на підставі встановлення вірогідності

підвищення частоти ДЛМ у досліді порівняно з контролем за критерієм Стьюдента.

Контрольні запитання для підготовки до роботи

1. Охарактеризуйте прояв домінантних та рецесивних мутацій.
2. Наведіть будову яйця дрозоді.
3. Розкажіть про ембріональний розвиток дрозоді від запліднення до вилуплення личинок.
4. Наведіть етапи приготування «чорних агарових пластинок».
5. Опишіть сутність методу обліку ДЛМ.
6. Які лінії дрозоді придатні для використання у методі ДЛМ?
7. Що таке індукований мутагенез?
8. Дайте поняття мутагени, комутагени і антимутагени.
9. Розкажіть історію відкриття хімічних та фізичних мутагенних чинників.
10. Які шляхи мутагенної дії основних класів хімічних мутагенів та супермутагенів?

Тема 4. Облік рецесивних, зчеплених зі статтю, летальних мутацій у дрозоді

Теоретичні відомості

Летальна мутація – зміна в геномі, яка призводить до смерті її носія. Рецесивна мутація – зміна в геномі, яка проявляється в умовах гомозиготності або гемізіготності (*). Зчеплені зі статтю гени присутні в статевих (X або Y) хромосомах.

*Обговорюваний метод визначає мутаційні події в X-хромосомі самців.

Існує декілька варіантів проведення оцінки здатності випробуваної речовини і продуктів її метаболізму індукувати генні мутації в зародкових клітинах дрозоді. Одна з таких методик, що названа Меллер-5 (за назвою однойменної лінії дрозоді, в свою чергу поійменованої на честь видатного генетика Германа Джозефа Меллера), заснована на індукції досліджуваними речовинами

рецесивних летальних мутацій в Х-хромосомі самців мух лінії дикого типу. Ці мутації передаються через самок F₁, самцям другого покоління, що не доживають до стадії імаго.

Ще один варіант методики обліку рецесивних, зчеплених зі статтю летальних мутацій (РЗСЛМ) потребує використання двох ліній *Drosophila melanogaster*. Перша лінія - мухи дикого типу з добре вивченим спонтанним фоном мутабільності, наприклад, *Canton-S*, *Oregon-R* або *D-32*; в якості тестерної лінії використовують лінію *BASC* (фото 3, 4).

У Х-хромосомі мух цієї лінії є 2 інверсії – *sc8* і *d49*, які повністю виключають можливість кросинговеру між статевими хромосомами, але при цьому не порушують життєздатності дрозофіли. Фенотиповими маркерами служать мутації *apricot* – абрикосові очі і *Bar* – щілиноподібні очі.



Фото 3. Самець лінії *Canton-S*, *C-S*



Фото 4. Мутанти *white^{apricot} Bar, w^a B*: щілиноподібні, абрикосові очі

Практична робота № 4

Мета роботи: застосувати метод обліку рецесивних зчеплених зі статтю мутацій дрозофіли (РЗСЛМ) для визначення потенційного генотоксичного ефекту досліджуваної речовини.

Матеріали та обладнання

Drosophila melanogaster, лінії *C-S*, *BASC*.

Біноккулярні лупи.

Досліджуваний препарат або речовина.

Плоскодонні пробірки.

Живильне середовище.

Хід експерименту

1. Відсаджують віргінних самок лінії *BASC* на поживне середовище.
2. Відсаджують самців лінії *C-S* на поживне середовище з додаванням досліджуваного препарату/речовини.
3. Через 48 годин після обробки досліджуваним препаратом чи речовиною самців лінії *C-S* схрещують з віргінними самками тестерної лінії *BASC* (5 самців на 10 самок).

4. Пробірки з відсадженими комахами розміщують у термостаті при температурі 22 ± 3 °C та витримують до вильоту першого покоління (F_1).
5. Після початку вильоту мух першого покоління (F_1) відбирають віргінних гетерозиготних самок (фенотип дикого типу) і індивідуально схрещують їх з самцями F_1 .
6. Через 3-4 дні батьків видаляють з пробірок.
7. Після вильоту другого покоління (F_2), кожна культура проглядається візуально з метою виявлення таких, в яких відсутні самці дикого фенотипу (з червоними очима).
8. Загальна кількість культуральних пробірок визначає число проаналізованих X-хромосом самців, які зазнали впливу досліджуваних сполук. Пробірки, в яких відсутні самці дикого типу, відзначають як "летали" (рис. 2). Постановка контролю обов'язкова.

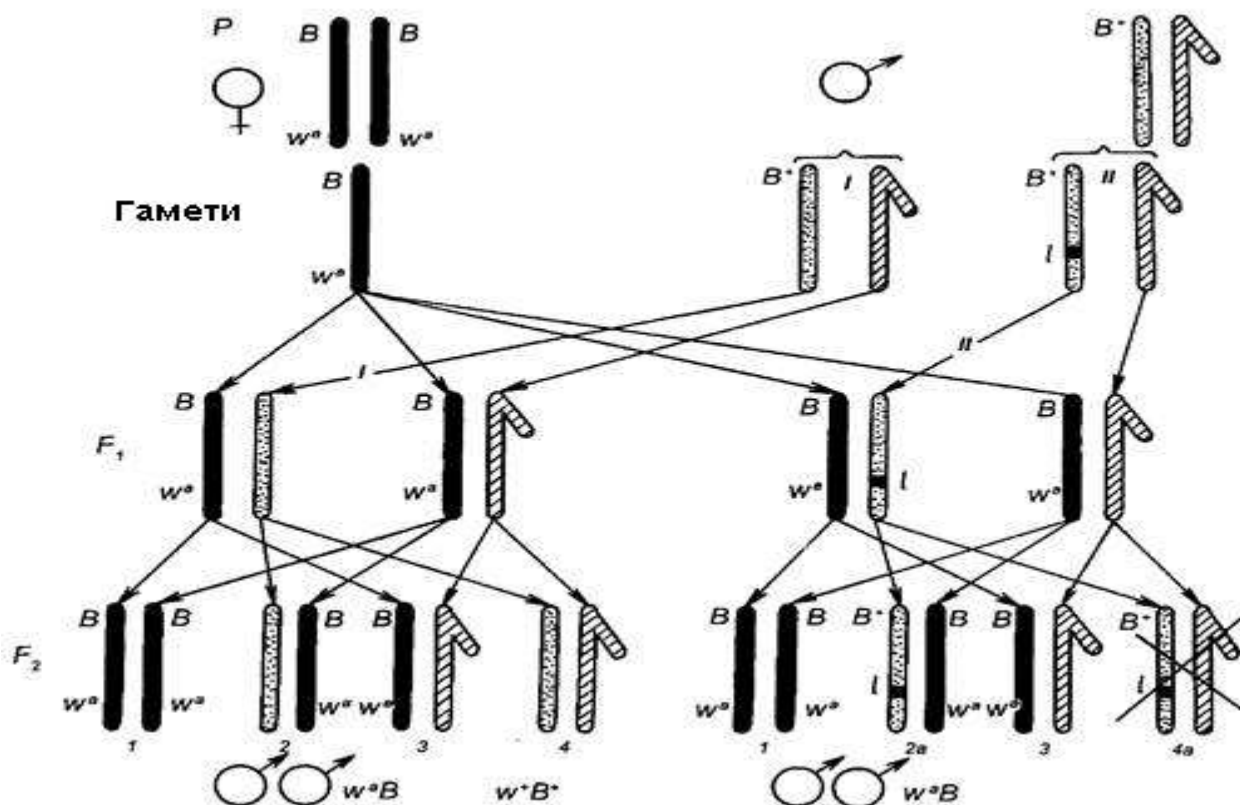


Рис. 2. Схема та результати схрещування: 1 – у випадку відсутності летальної мутації в X-хромосомі сперми самця, 2 – у випадку її наявності; B – щілиноподібні очі, w^a – абрикосові очі.

Частоту рецесивних леталей оцінюють як відношення числа культур другого покоління без самців дикого фенотипу до загальної кількості культур. Всього необхідно поставити щонайменше 100 культур F_2 на одну експериментальну концентрацію.

Для оцінки значущості перевищення частоти рецесивних леталей в досліді над контролем слід застосовувати F-критерій Фішера.

Різниця між дослідом і контролем вважається значущою при $p < 0,01$.

Контрольні запитання для підготовки до роботи

1. Охарактеризуйте лінії *Drosophila melanogaster*, придатні до використання у визначенні рецесивних зчеплених зі статтю мутацій.
2. Охарактеризуйте механізми виникнення хромосомних аберацій.
3. Наведіть принципи хромосомного визначення статі у *Drosophila melanogaster*.
4. Обґрунтуйте доведення вірогідності отриманих даних за допомогою методів біологічної статистики.
5. Наведіть генетичний сенс методів визначення мутацій в хромосомах дрозофіли: ClB, Меллер-5 (хромосома X), *Cy L /Pm* (аутосома 2) та інші.
6. Доведіть внесок Германа Джозефа Меллера у дослідження явища мутагенезу.

Тема 5. Облік соматичної рекомбінації (мозаїцизму) у дрозофіли

Теоретичні відомості

Під соматичною рекомбінацією розуміють обмін генетичним матеріалом між гомологічними хромосомами соматичних клітин в мітозі, що призводить до утворення мозаїчних особин. При використанні в якості маркерів рецесивних генів можливе виявлення генних мутацій, мітотичної рекомбінації і генних конверсій.

На прикладі успадкування мозаїчного забарвлення у мух (гени u^+/u^- визначають сіре і жовте забарвлення тіла, гени sn^+/sn^- – нормальні і «обпалені» щетинки) (фото 5, 6). Тоді у гетерозиготних

самок ysn^+/y^+sn^- буде нормальний фенотип. Мозаїчне забарвлення могло виникнути тільки в разі кросинговеру на стадії 4-х хроматид – соматичного кросинговеру (явище, що відбувається рідше мейотичного на 2-3 порядки). Тоді отримані при розподілі клітини мають генотипи ysn^+/ysn^+ і y^+sn/y^+sn і фенотипи – жовте тіло з нормальними щетинками і сіре тіло з обпаленими щетинками.

Метою даного методу є інтегральне виявлення рекомбінаційних та інших мутаційних подій, індукованих досліджуваною речовиною або її метаболітами в соматичних клітинах личинок дрозофіли. В основі методу лежить облік мозаїчних плям, що виникають у мух тестерної ліній в результаті комплексного порушення генотипу: мітотичної рекомбінації, втрати хромосом і / або їх фрагментів, транслокацій, делецій і генних мутацій. В якості маркерів можливе використання генів "y" і "sn" в транс-положенні.



Фото 5. Мутанти *yellow*, *y* – /жовтий колір тіла



Фото 6. Мутанти *white singed*, *w sn* – білі очі, обпалені щетинки

Мух *Drosophila melanogaster* утримують при температурі 24 С в пробірках, куди додають по 5 мл живильного середовища (4,5 г агару, 40 г сирих дріжджів, 13 г манної крупи, 13 г цукру). Корм готують перед експериментом.

В експерименті використовують тестерні лінії дрозофіл:

лінія 1 – *yellow* – генотип y/y : y – рецесивний ген, що обумовлює розвиток жовтого забарвлення тіла і щетинок;

лінія 2 – *w sn* – генотип $w sn / Y$: w (*white*) білий колір очей, sn (*singed*) – скручена форма щетинок, обидва гени рецесивні.

Практична робота № 5

Мета роботи: застосувати метод обліку соматичної рекомбінації для визначення потенційного генотоксичного ефекту досліджуваної речовини.

Матеріали та обладнання

Drosophila melanogaster, лінія *C-S*, лінії мух *w sn*, y

Біноккулярні лупи

Досліджуваний препарат або речовина

Плоскодонні пробірки

Живильне середовище

Хід експерименту

1. Віргінних самок лінії *yellow* в кількості п'яти особин поміщають разом з двома самцями лінії *w sn* у флакони, що містять живильне середовище.
2. Через 48-72 години батьків пересаджують у пробірки зі свіжим живильним середовищем, а в пробірки, де мухи знаходилися і відклали яйця, вносять розчини досліджуваних препаратів/речовин. В контролі на поверхню живильного середовища капають фізіологічний розчин – 0,2 мл на 5 мл середовища.
3. Перегляд особин, що вилетіли починають з 9-10 дня після початку експерименту і продовжують до початку вильоту наступного покоління. Перегляд проводять під бінокюлярним стереоскопічним мікроскопом у відбитому світлі.
4. У гетерозиготних самок першого покоління реєструють мутантні щетинки (макрохети на голові, тораксі і скутеллюмі) фенотипу *singed* і появу плям і щетинок на тілі фенотипу *yellow*. Підраховують загальну кількість переглянутих самок, число самок з поодинокими і подвійними плямами.
5. Значимість відмінностей для показника частоти появи самок з мутаціями при статистичній обробці даних оцінюють за критерієм χ^2 з поправкою Йетса, яка застосовується тільки для таблиць 2×2. Для 5 % рівня значущості критичне значення χ^2 становить 3,84.

Контрольні запитання для підготовки до роботи

1. Розкажіть про соматичну рекомбінацію та її наслідки
2. Дайте пояснення явищу мозаїцизму
3. Охарактеризуйте лінії *Drosophila melanogaster*, придатні до використання у визначенні рецесивних зчеплених зі статтю мутацій.
4. Охарактеризуйте фенотиповий прояв мутацій *singed* і *yellow* у гомозиготних особин та у мозаїків
5. Доведіть доцільність використання критерію χ^2 для доведення вірогідності відмінностей у частоті появи мутантних фенотипів

Тема 6. SMART-тест *D. melanogaster*

Теоретичні відомості

Соматичний мутаційний і рекомбінаційний тест (Somatic Mutation and Recombination Test, SMART) на *Drosophila melanogaster* може бути використаний для оцінки впливу на геном різних факторів: фізичних (температура, різні типи радіоактивного випромінювання, електромагнітні поля), біогенних (генетичні, фізіологічні, інфекційні) і широкого спектру хімічних сполук. Тест на репарацію ДНК може виявити ушкоджуючу ДНК активність речовини завдяки оцінці смертності чутливих дефектних по репарації мух порівняно з мухами, які мають зкомпенсований генотип. Криловий тест може визначити втрату гетерозиготності, викликану різними причинами, серед яких можуть бути соматичні мутації, хромосомні рекомбінації чи делеції, за визначенням частоти мутантних плям крила.

Коротка характеристика лінії 109611¹

X-хромосоми генотипів мух лінії 109611 представлені двома типами. Перший тип – X-хромосома, дефектна по генам ДНК-репарацій (*sc z* [1] *w* [+ (TE)] *mei-9* [a] *mei-41* [D5]), другий тип – X-хромосома – балансер (*In* (1) *FM7* у [31D] *sc* [8] *dm B* / (далі позначається як (FM7 / *mei-9* *mei-41*)). Гени X-хромосоми, *mei-9* [a] і *mei-41* [D5], є мутаціями, що спричиняють дефектність по ексцизійній репарації і пост-реплікативній репарації відповідно. Третя хромосома несе мутацію *multiple wing hair* (*mwh* [*]), маркер кутикули крила, результатом якої є наявність декількох щетинок в одній клітині крила.

Для забезпечення можливості репараційного відновлення ДНК лінія має наступні чотири генотипи мух:

Самки *mei-9* *mei-41* / *mei-9* *mei-41*, дефектні по ДНК-репарації

Самки *FM7* / *mei-9* *mei-41*, здатні до ДНК-репарації

Самці *mei-9* *mei-41* / Y, дефектні по ДНК-репарації

¹ Лінія 109611 була люб'язно надана д. б. н. Козерецькою І. А і к. б. н. Проценко О. В. із колекції Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Самці *FM7 / Y*, здатні до ДНК-репарації

У комбінованому дослідженні самок *FM7 / mei-9 mei-41; mwh / mwh* спаровують з самцями дикого типу (*mei-9⁺ mei-41⁺; mwh⁺ / mwh⁺*). Личинки F₁ обробляють сполукою, яку тестують. З метою підвищення чутливості тесту до мутагенів / канцерогенів, які потребують метаболічної активації, необхідно використовувати як джерело самців лінії дикого типу з високою інсектицидною стійкістю (лінії *Oregon R* або *Canton S*).

Практична робота № 6

Мета роботи: провести SMART-test для визначення потенційного генотоксичного ефекту досліджуваної речовини.

Матеріали та обладнання

Drosophila melanogaster, лінія *C-S*, лінія *109611*

Бінокулярні лупи

Досліджуваний препарат або речовина

Плоскодонні пробірки

Живильне середовище

Хід експерименту

Для постановки експерименту необхідно підготувати два набори мух – самців і самок.

1. Мухи з генотипом *mei-9a mei-41 / FM7c; mwh*. Гени *mei-9a* та *mei-41* розташовані в X-хромосомі, мутації в них призводять до дефектів в ексцизійній та постреплікативній репарації відповідно. Ген *mwh* міститься в третій хромосомі, мутації в ньому спричиняють формування множинних волосків у клітинах міжжилкового простору крила. Фенотипово ці мухи – самки.
2. Мухи дикого типу (з лінії *Canton-S*), у якої відсутні порушення репарації ДНК та морфології крила. Для досліду відбирають самців.
3. Можливий токсичний ефект досліджують у тесті на репарацію ДНК. Для цього схрещують віргінних самок лінії 1 з самцями

лінії 2. Схрещування проводять в пробірках з дослідним середовищем, отже, весь життєвий цикл отриманих у схрещуваннях нащадків проходить на досліджуваному середовищі. Імаго отриманого F_1 використовують для проведення двох тестів.

Репараційний тест

Аналіз імаго F_1 проводять, розділяючи мух на такі фенотипові класи:

- 1) самки, які мають червоні очі округлої форми або з проявом мутації *Bar* (зменшена кількість фасеток ока) – (f – female);
- 2) самці, які характеризуються порушенням системи репарації ДНК, а також мають жовті очі (m – male 1);
- 3) самці з непорушеною системою репарації, білі очі *Bar* (m – male 2).

Вживання кожного класу мух оцінюється як відносне число мух у дослідній культурі до показників, отриманих у контрольній культурі. Досліджувана речовина оцінюється як така, якій притаманні мутагенні властивості (позитивний результат тесту), коли відношення виживання особин вказаних класів $m1/f$ і $m1/m2$ становить менше 0,1 і 1 відповідно.

Криловий тест

Як вже зазначалось, крило *Drosophila melanogaster* містить 24400 клітин, розташованих в два шари, і в нормі кожна клітина крила має одну трихому. Рекомбінаційна або мутаційна подія у клітинах під час розвитку крилового зачатка призводить до утворення мутантних плям / клонів, видимих при мікроскопічному аналізі поверхні крилової пластинки. Зрозуміло, що чим раніше протягом онтогенезу тварини відбулися такі події, тим більшу кількість клітин з мутантними щетинками буде мати крило імаго.

Зразки крил беруть у F_1 *mwh/+* самок з червоними щілиноподібними очима (гетерозиготи за геном *mwh*). Крила

необхідно оглянути під мікроскопом у пошуку мутантних *mwh*-плям – множинних щетинок-трихом замість одиночної у нормі (рис. 3).

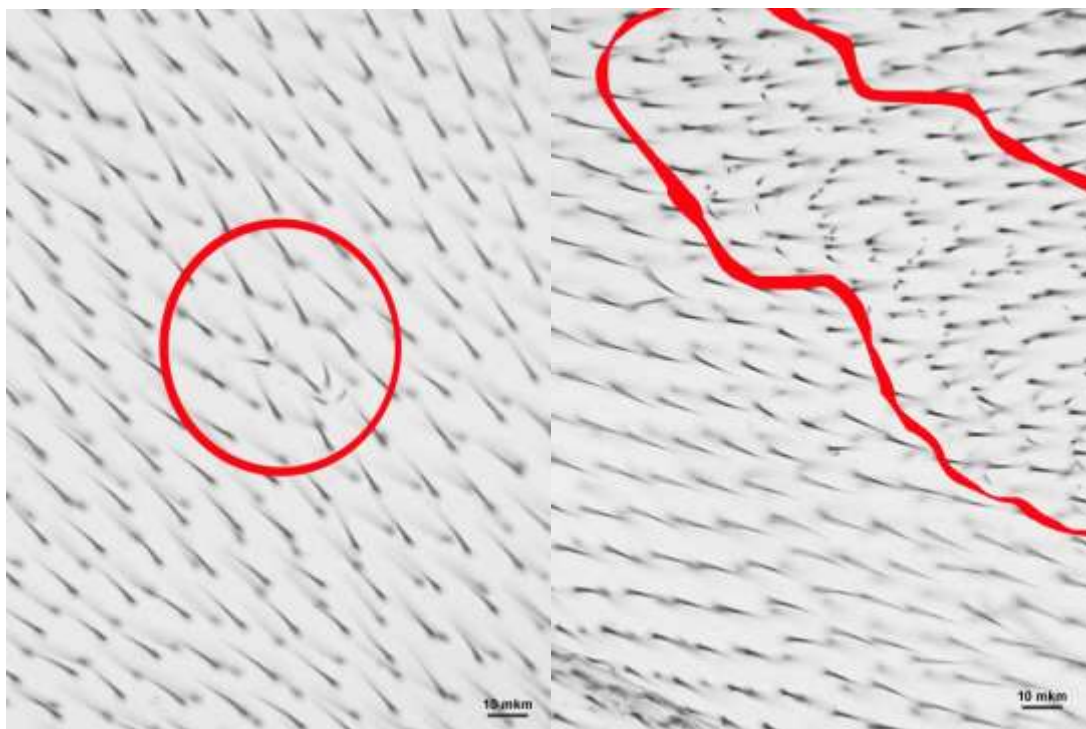


Рис. 3. Мутації *mwh* у клітинах крил самиць класу F₁ *Drosophila melanogaster*: одиночна пляма з двох мутантних клітин, множинна пляма у верхньому правому куті

Слід вивчити 100 крил у негативній контрольній групі, 50 крил для кожної концентрації в групі тестованої речовини і 10 крил в позитивній контрольній групі. Мутантна пляма *mwh* вважається "малою плямою", якщо складається з однієї або двох мутантних клітин і "великою плямою", якщо складається з 3-х або більше мутантних клітин.

Контрольні запитання для підготовки до роботи

1. Наведіть переваги SMART-test у визначенні потенційного генотоксичного ефекту досліджуваної речовини.
2. Охарактеризуйте лінії *Drosophila melanogaster*, придатні до використання у SMART-test.
3. Дайте пояснення системам репарації генетичного матеріалу у клітині та розкажіть про їх роль у появі мутацій.
4. Розкрийте біологічний принцип рекомбінаційного тесту.

5. Наведіть біологічний принцип крилового тесту.

Тема 7. Вивчення частоти нерівного кросинговеру за мутаціями ознаки *Var*

Даний спосіб визначення генотоксичної дії хімічного або фізичного чинника передбачає дослідження частоти виникнення мутацій у *Drosophila melanogaster* Meig; як лінію-тестер використовують генетично нестабільну лінію *Var* (смужковидні очі). Дія фізичного чи хімічного чинника може застосовуватися на різних стадіях онтогенезу дрозофіли: у ембріональній період, на стадії личинки, лялечки чи імаго. Хімічна речовина може додаватися у живильне середовище для личинок або (для жиророзчинних речовин) застосовуватися шляхом аплікації. Після дії на самок зазначеної лінії хімічного або фізичного чинника у наступному поколінні досліджують частоту нерівного кросинговеру за мутаціями ознаки *Var*.

Генотоксична дія зовнішнього хімічного або фізичного чинника призводить до порушення взаємодії гомологічних хромосом під час мейозу, внаслідок чого збільшується частота нереципрокнутої гомологічної рекомбінації у локусі *Var*, що, у свою чергу, призводить до збільшення частоти мутацій ознаки *Var*.

Як відомо, у дрозофіли близько 80 % так званих спонтанних мутацій виникає під впливом нестабільних елементів геному. Мутація *Var* (*B*) (локалізація 1-57.0) – тандемна дуплікація локусу 16A1-16A7, фенотипово проявляється в редукції очей до вузької вертикальної смужки з кількістю фасеток біля 90 у самців та 70 у самок, на відміну від нормальної кількості біля 740 і 780 фасеток для самців і самок, відповідно. Внаслідок рекомбінації між неправильно спарованими копіями генів в межах дуплікації *Var* утворюються нереципрокні рекомбінантні хромосоми з трьома (*Double Bar* (*BD*), або *Ultrabar* (*BB*)) і однією (реверсія до нормального фенотипу) копіями гену відповідно. Особини з нереципрокними рекомбінантними хромосомами мають мутантний (*B/+*, *BB/Y*, *BB/B*) і

нормальний (+Y) фенотип. Самки *B/+* мають біля 350 фасеток і виїмку на передньому краї ока. У мутантів *Double Bar (BB)* кількість очних фасеток зменшена приблизно до 45 у гетерозигот *BB/B* і до 25 у гемізігот *BB/Y*. Даний спосіб дозволяє визначити генотоксичну або можливу генопротекторну дію хімічного чи фізичного фактору, порівняти дію різних доз того чи іншого фактору, сумісну дію двох чи декількох факторів.

Практична робота № 7

Мета роботи: визначити частоту нерівного кросинговеру за мутаціями ознаки *Bar* під впливом потенційно генотоксичної речовини.

Матеріали та обладнання

Drosophila melanogaster, лінія *Bar*.

Бінокулярні лупи.

Досліджуваний препарат або речовина.

Плоскодонні пробірки.

Живильне середовище.

Хід експерименту

1. Віргінних самок лінії *Bar* 3-денного віку в кількості десяти-двадцяти особин поміщають у флакони, що містять живильне середовище з додаванням досліджуваної речовини.
2. Через 48 годин самок переносять до стандартного поживного середовища, де вони схрещуються з 3-5-денними самцями.
3. У наступному поколінні (F_1), що розвивалося у стандартних умовах, досліджують частоту мутацій за нестабільною фенотиповою ознакою *Bar*. Частоту мутацій за локусом *Bar* визначають за відношенням кількості мутантів +Y (самці дикого типу), *B/+* (самки з «серцевидними» очима, які мають біля 350 фасеток і виїмку на передньому краї ока), *Double Bar (BB)* (зі зменшеною кількістю очних фасеток по відношенню до *Bar*) до загальної кількості проаналізованих мух.

4. Висновок про наявність чи відсутність мутагенної дії досліджуваного хімічного або фізичного чинника роблять на основі порівняння частоти мутацій у досліді з контролем, у якому подібного впливу не застосовували.

Контрольні запитання для підготовки до роботи

1. Охарактеризуйте лінії *Drosophila melanogaster*, придатні до визначення частоти нерівного кросинговеру
2. Розкажіть про будову ока *Drosophila melanogaster*
3. Охарактеризуйте кросинговер та доведіть його біологічне значення
4. Що таке нерівний кросинговер?
5. Поясніть виникнення мутації *Bar* та її варіантів (*Double Bar (BD)*, *Ultrabar (BB)*.)
6. Охарактеризуйте явище реверсії мутації до дикого типу.

Тестові завдання

1. Що таке мутація?

1. Зміна фенотипу у межах норми реакції.
2. Незначна модифікація
3. Значна модифікація
4. Раптова зміна матеріалу спадковості
5. Раптова зміна фенотипу

2. Що таке комбінативна мінливість?

1. Утворення нових комбінацій генів у хромосомі
2. Тривалі модифікації
3. Результати спонтанного мутагенезу
4. Результат індукованого мутагенезу
5. Результат хромосомних аберацій

3. Вкажіть, які бувають мутації за походженням:

- | | |
|------------------|---------------|
| 1. Спонтанні | 4. Індуковані |
| 2. Спадкові | 5. Масові |
| 3. Індивідуальні | 6. Групові |

4. Вкажіть, як називаються мутації, з якими пов'язані зміни нуклеотидів у молекулі ДНК:

1. Соматичні
2. Хромосомні
3. Генні
4. Генетичні

5. Вкажіть джерело комбінативної мінливості?

1. Геномні мутації
2. Хромосомні аберації
3. Незалежне розходження хромосом під час мейозу
4. Індукований мутагенез
5. Точкові мутації

6. Які мутації мають назву генеративних?

1. Ті, що відбуваються у гаметах
2. Які змінюють структуру хромосом
3. Ті, що відбуваються у соматичних клітинах

4. Які змінюють структуру гена
5. Ті, що відбуваються внаслідок спонтанного мутагенезу

7. Що таке геномні мутації?

1. Зміна структури хромосом
2. Фенокопії
3. Порушення нормальної кількості хромосом
4. Генокопії
5. Зміна структури гена

8. За поліплоїдії змінюється:

1. Кількість геномів
2. Структура хромосом
3. Структура генів
4. Положення генів

9. Що таке хромосомні аберації?

1. Незалежне розходження хромосом
2. Зміна структури хромосом
3. Мутації на молекулярному рівні
4. Порушення нормальної кількості хромосом
5. Виникнення нових комбінацій генів у хромосомі

10. Що таке анеуплоїдія?

1. Зміна структури хромосом
2. Інверсія
3. Явище, коли кількість хромосом стає некратною гаплоїдному набору
4. Незалежне розходження хромосом
5. Явище, коли кількість хромосом збільшується у декілька разів

11. Хромосомні мутації включають:

1. Інверсії
2. Транзиції
3. Трансверсії
4. Нонсенс-мутації

12. Що таке спонтанні мутації?

1. Ті, що виникають під впливом невідомих чинників

2. Ті, що призводять до зміни геному
3. Ті, що відбуваються на молекулярному рівні
4. Ті, що мають назву хромосомних аберацій
5. Ті, що викликані спрямованою дією певних чинників

13. Що таке нестачі як один з типів хромосомних аберацій?

1. Результат втрати геном пари нуклеотидів
2. Результат розриву хромосоми
3. Результат втрати хромосомою тієї чи іншої ділянки
4. Моносомія
5. Нулісомія

14. Що таке дуплікація як один з типів хромосомних аберацій?

1. Результат втрати хромосомою тієї чи іншої ділянки
2. Нулісомія
3. Результат транслокації
4. Зміна структури гена
5. Включення зайвого, дублюючого, відрізка хромосоми

15. Хромосомні мутації включають:

1. Делеції
2. Місенс-мутації
3. Нонсенс-мутації
4. Транзиції

16. Точкова мутація призводить до змін:

1. Гену
2. Геному
3. Кількості хромосом
4. Структури хромосом

17. Зміна числа окремих хромосом або плоїдності структури незмінених хромосом, це:

1. Генні мутації
2. Мутації в структурі РНК
3. Хромосомні мутації
4. Геномні мутації

18. Випадіння ділянок генетичного матеріалу від декількох нуклеотидів до ділянок хромосом, називається:

1. Дуплікація
2. Реплікація
3. Делеція
4. Термінація

19. Зміна числа хромосом, кратна гаплоїдному набору, це:

1. Аберация
2. Поліплоїдія
3. Репарация
4. Делеція

20. До хромосомних перебудов відносять:

1. Делеції
2. Дефішенсі
3. Трансляцію
4. Поліплоїдію

21. Транслокації бувають:

1. Реципрокні
2. Нерципрокні
3. Робертсонівські
4. Випадкові

22. Транспозони - це:

1. Мігруючі генетичні елементи
2. Тип хромосомних мутацій
3. Структурний елемент оперону
4. Різновид гена - регулятора

23. Молекулярні невидимі в світловому мікроскопі зміни структури ДНК являють собою:

1. Хромосомні мутації
2. Геномні мутації;
3. Генні мутації
4. Хромосомні аберации

24. Зміна кодонів, яка призводить до зупинки зчитування інформації називається:

1. Місенс-мутація
2. Зсув рамки зчитування
3. Нонсенс - мутація

25. Що таке транслокація?

1. Включення дублюючої ділянки хромосоми
2. Нестача пари гомологічних хромосом
3. Перехід ділянки хромосоми на негомологічну хромосому
4. Нестача хромосомної ділянки
5. Зміна структури гена

26. Мутації по відношенню до дикого типу можуть бути:

1. Прямі
2. Зворотні
3. Нейтральні

27. Зміни мутантного гена, що призводять до відновлення функцій дикого типу називаються:

1. Генеративними мутаціями
2. Соматичними мутаціями
3. Зворотніми мутаціями
4. Нейтральними мутаціями

28. З усіх основ ДНК, що є найбільш вразливим, за дії активних форм кисню:

1. Гуанін
2. Тімін
3. Цитозін
4. Аденін

29. Що відносять до фізичних мутагенів:

1. Пестициди
2. Лікарські препарати
3. Віруси
4. Іонізуюче випромінювання

30. З перерахованого є хімічним мутагеном:

1. УФ випромінювання
2. Іприт
3. Вірус грипу
4. Пестициди

31. Маркером генетичної нестабільності соматичних клітин і окисної активності на рівні ДНК клітини є:

1. N-метил-N'-нітро-N'-нітрозогуанидин
2. 8-гідрокси- 2-дезоксигуанозин
3. Брометилурацил
4. Нітрузоалкілсечовина

32. Хімічний мутагенез був вперше відкритий на прикладі:

1. Азотистого іприту
2. Перекису водню
3. Бензолу
4. Сахарози

33. Порогова доза це ...

1. Концентрація речовини, яка може індукувати мутації.
2. Максимальна доза випромінювання, що викликає даний біологічний ефект
3. Доза речовини, що виходить за межі нормальних фізіологічних реакцій

34. Стійкість генетичного матеріалу забезпечується:

1. Диплоїдним набором хромосом
2. Виродженням генетичного коду
3. Репарацією ДНК
4. Повторами деяких генів

35. Заміну GC пари на AT можна отримати за допомогою:

1. Азотної кислоти
2. Азотистої кислоти
3. Сірчаної кислоти

36. Вперше шкідливу дію рентгенівського випромінювання на дрозофілі виявив:

1. Коренберг

2. Стадлер
3. Меллер
4. Серебровський

37. Хто є автором Нейтральної теорії мутагенезу?

1. Де Фриз
2. Бидл і Тейтон
3. Мотто Кімура
4. Уотсон і Крік

38. Фермент цитохром P450:

1. Активує дію деяких промутагенів
2. Контролює сперматогенез у самців дрозофіл
3. Інактивує чужорідні сполуки, які надходять в організм

39. Афлатоксин - це ...

1. Мутаген, біологічного походження, продукт життєдіяльності цвілевих (плісневих) грибів
2. Токсин, що виробляється грибами роду *Aspergillus*
3. Токсин гемолітичного стрептококу, що підвищує частоту мутацій

40. Одним з найбільш розроблених методів оцінки мутагенного ефекту різних хімічних чинників у людини є:

1. Цитогенетичний аналіз лімфоцитів периферичної крові
2. Каріотипування
3. Метод Меллер-5
4. Кластерний аналіз

41. Для чого використовується метод «Меллер-5»?

1. Даний метод дозволяє проводити кількісний облік рецесивних летальних мутацій, виникаючих в X-хромосомі зрілих сперматозоїдів самців дрозофіли
2. Даний метод визначає здатність підвищувати частоту мутацій у бактерій (наприклад, роду *Salmonella*)
3. Даний метод використовують для виявлення та ізоляції мутантів в бактеріальних популяціях, зростаючих в неселективних середовищах

42. Мікроядерний тест проводять на клітинах:

1. Букального епітелію
2. Печінки
3. Сечового міхура
4. Нирок

43. Який метод використовується для дослідження мутацій у мікроорганізмів:

1. Метод ключа і замка
2. Метод відбиток або реплік
3. Метод рукавички

44. Виберіть засіб введення потенційного мутагену, який найчастіше застосовують до дрозофіли

1. Ін'єкційний
2. Інгаляційний
3. Пероральний

45. Від чого залежить тривалість експозиції дрозофіли у експериментах з перевірки на мутагенність

1. Клас хімічної сполуки
2. Фізичні властивості сполуки (газоподібний, рідкий, твердий стан)
3. Токсичність препарату

46. Виберіть варіант, у якому перераховані усі складові методично вірного дослідження з біотестування

1. Декілька дослідних варіантів
2. Дослідний варіант, контроль
3. Контроль позитивний, контроль негативний, дослідні варіанти
4. Дослідні варіанти, контроль

47. Що означає напівлетальна доза (Lt_{50})?

1. Доза речовини, що викликає загибель половини членів досліджуваної групи протягом певного терміну
2. Доза речовини, що викликає загибель половини самок досліджуваної групи
3. Доза речовини, що викликає загибель половини самців досліджуваної групи

4. Середня доза речовини, що викликає загибель половини самок досліджуваної групи
5. Доза речовини, що викликає загибель половини членів досліджуваної групи протягом усього терміну життя

48. Метод домінантних летальних мутацій на дрозофілі полягає

1. У виявленні генетичних змін, що виникають у статевих клітинах батьків і призводять до ранньої ембріональної загибелі нащадків
2. У виявленні мутаційних подій у Х-хромосомі (експозиції піддаються самці певної лінії)
3. У виявленні мутаційних подій у Х-хромосомі (експозиції піддаються самки певної лінії)
4. У визначенні обміну генетичним матеріалом між гомологічними хромосомами соматичних клітин в мітозі – це призводить до утворення мозаїків
5. У перевірці проходження рекомбінаційних/мутаційних подій у клітинах крила під час розвитку крилового зачатка дрозофіли.

49. Криловий тест як складова SMART-тесту полягає:

1. У виявленні генетичних змін, що виникають у статевих клітинах батьків і призводять до ранньої ембріональної загибелі нащадків
2. У виявленні мутаційних подій у Х-хромосомі (експозиції піддаються самці певної лінії)
3. У виявленні мутаційних подій у Х-хромосомі (експозиції піддаються самки певної лінії)
4. У визначенні обміну генетичним матеріалом між гомологічними хромосомами соматичних клітин в мітозі – це призводить до утворення мозаїків
5. У перевірці проходження рекомбінаційних/мутаційних подій у клітинах крила під час розвитку крилового зачатка дрозофіли.

50. При визначенні потенційного генотоксичного ефекту речовини у репараційному тесті SMART використовують такі лінії *Drosophila*

1. 109611; *Canton S*
2. *yellow*; *w,sn*
3. *Canton S*; *BASC*
4. Дикий тип – наприклад *Canton S* або *Oregon-R*
5. *Bar*

51. Облік соматичної рекомбінації у дрозофіли проводять завдяки:

1. Виявленню генетичних змін, що виникають у статевих клітинах батьків і призводять до ранньої ембріональної загибелі нащадків
2. Виявленню мутаційних подій у Х-хромосомі (експозиції піддаються самці певної лінії)
3. Виявленню мутаційних подій у Х-хромосомі (експозиції піддаються самки певної лінії)
4. Визначенню обміну генетичним матеріалом між гомологічними хромосомами соматичних клітин в мітозі – це призводить до утворення мозаїків
5. Перевірці проходження рекомбінаційних/мутаційних подій у клітинах крила під час розвитку крилового зачатка дрозофіли

51. Метод Меллер-5 полягає:

1. У виявленні генетичних змін, що виникають у статевих клітинах батьків і призводять до ранньої ембріональної загибелі нащадків
2. У виявленні мутаційних подій у Х-хромосомі (експозиції піддаються самці певної лінії)
3. У виявленні мутаційних подій у Х-хромосомі (експозиції піддаються самки певної лінії)
4. У визначенні обміну генетичним матеріалом між гомологічними хромосомами соматичних клітин в мітозі – це призводить до утворення мозаїків
5. У перевірці проходження рекомбінаційних/мутаційних подій у клітинах крила під час розвитку крилового зачатка дрозофіли

52. При проведенні досліду за методом ДЛМ:

1. Враховують фенотиповий вигляд яєць дрозофіли, з яких повинні вилупитися мухи першого покоління
2. Готують «чорні агарові пластинки»
3. Аналізують фенотиповий вигляд самців другого покоління
4. Аналізують трихоми клітин крила самиць першого покоління
5. Підраховують співвідношення фенотипових класів мух за статтю, кольором та формою очей у першому поколінні

53. При визначенні потенційного генотоксичного ефекту речовини за методом соматичної рекомбінації використовують такі лінії *Drosophila melanogaster*:

1. 109611; *Canton S*
2. *yellow; w, sn*
3. *Canton S; BASC*
4. *Canton S*
5. *Bar*

54. При визначенні потенційного генотоксичного ефекту речовини методом ДЛМ використовують такі лінії *Drosophila melanogaster*:

1. 109611; *Canton S*
2. *yellow; w, sn*
3. *Canton S; BASC*
4. Дикий тип – наприклад *Canton S* або *Oregon-R*
5. *Bar*

55. При визначенні потенційного генотоксичного ефекту речовини за допомогою SMART-тесту використовують такі лінії *Drosophila melanogaster*:

1. 109611; *Oregon-R*
2. *yellow; w, sn*
3. *Canton S; BASC*
4. Дикий тип – наприклад *Canton S* або *Oregon-R*
5. *Bar*

56. Виберіть компоненти SMART-тесту

1. Облік ДЛМ-мутацій
2. Криловий тест
3. Репараційний тест
4. Тест на соматичну рекомбінацію
5. Аналіз генетичних подій у X-хромосомі

57. Які фенотипові прояви мутацій властиві лінії *w, sn*?

1. Білий колір очей, скручена форма щетинок
2. Жовтий колір очей, нормальна форма щетинок
3. Жовтий колір тіла і щетинок
4. Смушкоподібна форма очей
5. Абрикосовий колір очей, смушкоподібна форма очей

57. Скільки фасеток має око самки дрозофіли дикого типу?

1. 350
2. 780
3. 70
4. 45

58. Мух *Drosophila melanogaster* лінії *Var* використовують для дослідження мутаген-індукованого(ої)

1. Ембріональної загибелі
2. Прояву дефектів репарації
3. Нерівного кросинговеру
4. Мозаїцизму

59. Які фенотипові прояви мутацій властиві мухам лінії *BASC*?

1. Білий колір очей, скручена форма щетинок
2. Жовтий колір очей, нормальна форма щетинок
3. Жовтий колір тіла і щетинок
4. Смушкоподібна форма очей
5. Абрикосовий колір очей, смушкоподібна форма очей

60. У чому полягає особливість людини як об'єкта генетичних досліджень?

1. У повільній зміні поколінь
2. В ефекті генних мутацій
3. В ефекті модифікацій
4. У наявності менделюючих ознак
5. У відсутності спонтанного мутагенезу

Список рекомендованої літератури

1. Білоконь С. В., Алексеева Т. Г. *Drosophila melanogaster* як тест-система *in vivo* для виявлення генотоксичної дії потенційно-небезпечних препаратів та речовин: методичні вказівки до розділу великого спеціального практикуму. – Одеса: Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2020. – 34 с.
2. Пат. 90336 Україна, G01N 33/554 (2006.01) на корисну модель. Спосіб визначення генотоксичної дії хімічного або фізичного чинника / Страшнюк В. Ю., Шакіна Л. О., Скоробогатько Д. О.; заявл. 02.12.2013 ; опубл. 26.05.2014, Бюл. № 10. – 5 с.
3. Проценко О. В., Дудка О. А., Козерецька І. А., Фалалєєва Т. М., Берегова Т. В., Остапченко Л. І. Оцінка токсичності та генотоксичності меланіну на тест-системі *Drosophila melanogaster* // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 18. – С.137-139.
4. Хаустова Н.Д. Атлас *Drosophila melanogaster* (колекція кафедри генетики і молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова : атлас / Н. Д. Хаустова, Н. А. Стрельцова, О. М. Благодарова, С. В. Білоконь, С. В. Чеботар // Одеса: ОНУ імені І. І. Мечникова, 2016. – 47 с.
5. Furlanetto M., Sinigaglia M., do Amaral V., Dihl R., de Andrade H. Effect of Vanillin on Toxicant – Induced Lethality in the *Drosophila melanogaster* DNA Repair Test // Environmental and Molecular Mutagenesis. – 2007. – 48. – P. 67–70.
6. Fujikawa K. Genotoxic potency in *Drosophila melanogaster* of selected aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons as assayed in the DNA repair test // Mutation Research. – 1993. – № 290. – P. 175–182.
7. Wurgler F.E., Graf U. Mutagenicity testing with *Drosophila melanogaster* // Basic and applied mutagenesis. – 1985. – V. 5. – P. 343-377.
8. Wurgler F.E., Frei H., Graf U. Mutagen-Sensitive Mutants and Chemical Mutagenesis in *Drosophila* // Chemical Mutagens/ Ed. De Serres F. J. – N. Y.: Plenum Press, 1986. – V. 10. – P. 381-416.

Корисні ресурси

1. Bloomington Drosophila Stock Center. – Електрон. дан. – Режим доступу: – <https://bdsc.indiana.edu/index.html>
2. Fly Base Homepage // FlyBase: a database for drosophila genetics and molecular biology. – Електр. дан. – Режим доступу: <http://flybase.org/>
3. Martin-Luther-Universitat Halle-Wittenberg // Drosophila – Mutanten – Електрон. дан. – Режим доступу: <https://www.biologie.uni-halle.de/entwicklungsgenetik/lehre/studenten/drosophila/mutanten/>
4. The Interactive Fly. A cyberspace guide to *Drosophila* development and metazoan evolution. – Електрон. дан. – Режим доступу: <https://www.sdbonline.org/sites/fly/aimain/1aahome.htm>
5. Pub.med.Homepage – Електрон. дан. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Навчальне видання

Білоконь Світлана Василівна
Алексєєва Тетяна Григорівна

ПРОБЛЕМИ МУТАГЕНЕЗУ

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних занять з дисципліни «Проблеми мутагенезу» для студентів
біологічного факультету усіх форм навчання

В авторській редакції

Підп. до друку 09.05.2022. Формат 60x84/16.

Ум.-друк. арк. 2,77. Тираж 10.

Зам. № 2484.

Видавець і виготовлювач
Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова

Україна, 65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12

Тел.: (048) 723 28 39. E-mail: druk@onu.edu.ua

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р