

Олег ТООМПУУ, Ави́гея ИВАНОВА, Виктор ЩЕРБАКОВ

ИЗУЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ У ФАГА Т4. V. ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ТЕОРИИ С УЧЕТОМ РАЗЛИЧНОЙ КОРРЕКТИРУЕМОСТИ МУТАЦИЙ

В предыдущей работе (Тоомпуу и др., 1976) обнаружено, что частота рекомбинаций между двумя очень тесно сцепленными мутациями rII чувствительна к присутствию в системе третьего, не проявляющегося фенотипически маркера, если последний вводится в непосредственной близости от изучаемых мутаций. Этот факт позволил предположить, что коррекция молекулярных гетерозигот у Т4 зависит от структуры репарируемого участка и, следовательно, должна быть аллель-специфической. Действительно, последующие исследования показали, что частота коррекции к дикому типу варьирует для разных мутантов от величин менее $1 \cdot 10^{-2}$ до $1 \cdot 10^{-1}$ (Тоомпуу, Щербаков, 1976а; Щербаков и др., 1977а; Щербаков и др., 1977б). В случае малых частот рекомбинации при сопоставлении теории (Тоомпуу, Щербаков, 1975) с экспериментом в тестах на аддитивность (Тоомпуу, Щербаков, 1976б) и на интерференцию (Тоомпуу, Щербаков, 1976в) разная корректируемость мутаций должна отражаться в увеличении разброса точек из-за непостоянства параметра корректируемости. К сожалению, имеющиеся в литературе данные по двух- и трехфакторным скрещиваниям мутантов rII фага Т4 (Chase, Doermann, 1958; Edgar и др., 1962; Fisher, Bernstein, 1965) относятся к маркерам с неизвестной корректируемостью. В этой связи в данном исследовании измерялись частоты рекомбинации между такими мутантами rII , о корректируемости которых мы имели представление по независимым экспериментам (Щербаков и др., 1977а; Щербаков и др., 1977б). Частоты группировали по мутантам с близкой корректируемостью, и на ЭВМ по критерию минимальной интерференции проводился поиск наилучших параметров теории, учитывая при этом распределение длины гибридной области, а также вклад двойных статистически независимых рекомбинационных событий в измеряемые частоты рекомбинации.

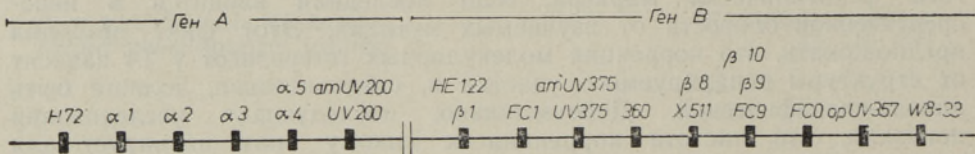
Материал и методика

Питательные среды, получение фаговых клонов, определение титра фагов и техника стандартных скрещиваний описаны ранее (Тоомпуу и др., 1976).

Бактерии. В работе использованы штаммы *Escherichia coli* ВВ, 594(λ), К233 (получены из коллекции ВНИИ-Генетика), СА244, СА265, СА180 (получены от Ф. Сталя, США). Штамм ВВ использовался в качестве хозяина во всех фаговых скрещиваниях, для приготовления фаговых клонов и определения титров в них, а также для измерения тотального выхода фага в скрещиваниях. Штамм 594(λ) непермиссивен

для всех мутантов *rII*. Штамм K223, лизогенный по λ , пермиссивен для мутантов *rII* типа опал (кодон УГА) и непермиссивен для прочих мутантов *rII*. Штаммы CA265 и CA180, также лизогенные по λ , являются пермиссивными для мутантов *rII* типа амбер (кодон УАГ) и непермиссивными для прочих мутантов *rII*. Штаммы CA265, CA180 и CA244 изогенны.

Бактериофаги. Использованные в работе мутанты *rII* фага T4 приведены на рисунке. Мутации α_4 , α_5 , β_1 , FC1, β_8 , FC9, β_9 , β_{10} и FC0 относятся к мутациям типа сдвига фазы. Маркеры H72 (амбер), UV200 (охра), *amUV200* (амбер), HE122 (амбер), UV375 (охра), *amUV375* (амбер), 360 (охра), X511 (охра), *opUV357* (опал) представляют собой мутации типа замены основания (нонсенс), а маркер W8-33 — делецию локализованную в дистальном участке гена *rIIB*. Мутации α_1 , α_2 и α_3 — это спонтанные точковые мутации неизвестной структуры. Мутация α_2 выделена как предположительный внутригенный супрессор α_1 (Чирков и др., 1976). Однако при прямой проверке потомства от скрещивания $\alpha_1 + \alpha_2$ среди рекомбинации с фенотипом *rII*⁺ двойной мутант $\alpha_1\alpha_2$ не обнаружен.



Последовательность маркеров в области *rII* фага T4. Расстояния между маркерами даны не в соответствии с масштабом.

Дикий штамм T4D получен от К. Эбисузаки (Канада). Мутанты UV200, HE122, FC1, UV375, 360, X511, FC9, FC0 получены от С. П. Чеймпа (США), мутант H72 — от Ю. П. Винецкого (Институт общей генетики АН СССР), мутант W8-33, первоначально выделенный С. Бензером (США), — от Н. И. Матвиенко (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР). Амбер-мутант *amUV200* получен нами

Частоты рекомбинации в двух- и трехфакторных скрещиваниях *rII*-мутантов фага T4

Группа	Маркеры			$M_{i/j} \cdot 10^2$	$M_{j/h} \cdot 10^2$	$M_{j/ih} \cdot 10^4$
	<i>i</i>	<i>j</i>	<i>k</i>			
1	2	3	4	5	6	7
	H72	UV375	<i>opUV357</i>	$36,90 \pm 0,84$	$30,272 \pm 0,014$	$39,86 \pm 0,74$
	H72	360	<i>opUV357</i>	$38,64 \pm 1,02$	$30,286 \pm 0,024$	$310,9 \pm 1,0$
	H72	X511	<i>opUV357</i>	$36,28 \pm 0,84$	$30,208 \pm 0,010$	$37,84 \pm 0,74$
	H72	FC9	<i>opUV357</i>	$37,12 \pm 0,64$	$30,162 \pm 0,010$	$35,10 \pm 0,52$
	H72	UV375	W8-33	$36,90 \pm 0,84^*$	$33,40 \pm 0,52$	3127 ± 28
	H72	360	W8-33	$38,64 \pm 1,02^*$	$33,38 \pm 0,14$	3127 ± 10
	H72	X511	W8-33	$36,28 \pm 0,84^*$	$33,02 \pm 0,04$	3128 ± 16
	H72	FC9	W8-33	$37,12 \pm 0,64^*$	$33,06 \pm 0,56$	3119 ± 1
I	<i>amUV200</i>	UV375	<i>opUV357</i>	$22,68 \pm 0,14$	$30,224 \pm 0,022$	$34,82 \pm 0,42$
	<i>amUV200</i>	360	<i>opUV357</i>	$23,30 \pm 0,18$	$30,226 \pm 0,012$	$35,18 \pm 0,50$
	<i>amUV200</i>	X511	<i>opUV357</i>	$23,20 \pm 0,20$	$30,198 \pm 0,006$	$34,06 \pm 0,22$
	<i>amUV200</i>	FC9	<i>opUV357</i>	$22,82 \pm 0,16$	$30,133 \pm 0,008$	$32,82 \pm 0,02$
	HE122	UV375	<i>opUV357</i>	$30,206 \pm 0,018$	$30,194 \pm 0,014$	$31,41 \pm 0,22$
	HE122	360	<i>opUV357</i>	$30,216 \pm 0,018$	$30,204 \pm 0,028$	$32,48 \pm 0,28$
	HE122	X511	<i>opUV357</i>	$30,270 \pm 0,010$	$30,0157 \pm 0,030$	$31,31 \pm 0,08$
	HE122	FC9	<i>opUV357</i>	$30,340 \pm 0,014$	$30,110 \pm 0,009$	$30,734 \pm 0,040$

1	2	3	4	5	6	7
	H72	FC1	opUV357	$38,24 \pm 1,24$	$30,628 \pm 0,062$	$327,6 \pm 2,4$
	H72	$\beta 8$	opUV357	$37,54 \pm 0,20$	$30,720 \pm 0,084$	$326,4 \pm 3,2$
	H72	FC1	W8-33	$38,24 \pm 1,24^*$	$33,24 \pm 0,22$	$3133 \pm 15,2$
	H72	$\beta 8$	W8-33	$37,54 \pm 0,20^*$	$33,32 \pm 0,20$	$3108 \pm 4,0$
II	H72	$\beta 9$	W8-33	$37,40 \pm 1,40^*$	$33,48 \pm 0,54$	3112 ± 19
	amUV200	FC1	opUV357	$33,10 \pm 0,14$	$30,528 \pm 0,072$	$318,2 \pm 2,4$
	amUV200	$\beta 8$	opUV357	$32,72 \pm 0,16$	$30,524 \pm 0,060$	$320,8 \pm 2,2$
	HE122	FC1	opUV357	$30,580 \pm 0,012$	$30,418 \pm 0,008$	$322,4 \pm 2,6$
	HE122	$\beta 8$	opUV357	$30,600 \pm 0,064$	$30,460 \pm 0,024$	$326,2 \pm 4,0$
	H72	UV200	opUV357	$24,96 \pm 0,30$	$22,90 \pm 0,34$	$253,0 \pm 8,6$
	H72	UV200	W8-33	$24,96 \pm 0,30^*$	$24,32 \pm 0,30$	3115 ± 15
III	$\alpha 1$	UV200	amUV375	$22,98 \pm 0,26$	$22,68 \pm 0,10^{**}$	$452,8 \pm 3,6$
	$\alpha 2$	UV200	amUV375	$22,38 \pm 0,14$	$22,68 \pm 0,10^{**}$	$443,6 \pm 2,4$
	$\alpha 3$	UV200	amUV375	$22,50 \pm 0,18$	$22,68 \pm 0,10^{**}$	$447,2 \pm 3,8$
	$\alpha 4$	UV200	amUV375	$21,25 \pm 0,11$	$22,68 \pm 0,10^{**}$	$428,2 \pm 2,8$
	$\alpha 5$	UV200	amUV375	$21,27 \pm 0,09$	$22,68 \pm 0,10^{**}$	$432,4 \pm 0,0$
	H72	$\alpha 2$	opUV357	$22,20 \pm 0,12$	$24,18 \pm 0,18$	$244,8 \pm 5,6$
	H72	$\alpha 3$	opUV357	$23,40 \pm 0,06$	$25,04 \pm 0,20$	$265,4 \pm 8,6$
IV	H72	$\alpha 2$	W8-33	$22,20 \pm 0,12^*$	$26,24 \pm 0,50$	$381,8 \pm 8,4$
	H72	$\alpha 3$	W8-33	$23,40 \pm 0,06^*$	$25,96 \pm 0,44$	$390,0 \pm 4,8$
	$\alpha 1$	$\alpha 2$	amUV375	$30,618 \pm 0,046$	$25,76 \pm 0,54^{**}$	$321,6 \pm 0,0$
	$\alpha 1$	$\alpha 3$	amUV375	$31,13 \pm 0,64$	$26,04 \pm 0,50^{**}$	$332,0 \pm 1,2$
	$\alpha 2$	$\alpha 3$	amUV375	$70,520 \pm 0,20$	$26,04 \pm 0,50^{**}$	$717,2 \pm 0,7$
	H72	$\alpha 1$	opUV357	$22,46 \pm 0,14$	$25,04 \pm 0,26$	$247,8 \pm 1,4$
	H72	$\alpha 4$	opUV357	$24,20 \pm 0,40$	$23,40 \pm 0,20$	$252,6 \pm 8,0$
	H72	$\alpha 5$	opUV357	$24,22 \pm 0,02$	$23,66 \pm 0,14$	$252,2 \pm 7,6$
	H72	$\beta 1$	opUV357	$27,16 \pm 0,60$	$20,536 \pm 0,020$	$320,6 \pm 1,0$
	H72	$\alpha 1$	W8-33	$22,46 \pm 0,14^*$	$25,36 \pm 0,24$	$377,6 \pm 6,4$
	H72	$\alpha 4$	W8-33	$24,20 \pm 0,40^*$	$25,58 \pm 0,26$	$3109 \pm 6,2$
	H72	$\alpha 5$	W8-33	$24,22 \pm 0,02^*$	$24,90 \pm 0,38$	$398,4 \pm 11,8$
	H72	$\beta 1$	W8-33	$27,16 \pm 0,60^*$	$22,84 \pm 0,12$	$3114 \pm 16,8$
	H72	$\beta 10$	W8-33	$26,84 \pm 0,86^*$	$23,06 \pm 0,20$	$3108 \pm 9,0$
	H72	FC0	W8-33	$27,08 \pm 0,44^*$	$23,04 \pm 0,10$	$3116 \pm 10,2$
	$\alpha 1$	$\alpha 4$	amUV375	$23,08 \pm 0,10$	$24,30 \pm 0,28^{**}$	$771,0 \pm 3,2$
	$\alpha 1$	$\alpha 5$	amUV375	$23,02 \pm 0,16$	$24,36 \pm 0,22^{**}$	$557,8 \pm 4,6$
	$\alpha 1$	$\beta 1$	amUV375	$25,06 \pm 0,38$	$20,334 \pm 0,052^{**}$	$38,84 \pm 0,84$
V	$\alpha 1$	HE122	amUV375	$27,08 \pm 0,42^{**}$	$100,282 \pm 0,016^{**}$	$310,5 \pm 0,6$
	$\alpha 2$	$\alpha 4$	amUV375	$22,74 \pm 0,10$	$24,30 \pm 0,28^{**}$	$61,6 \pm 2,2$
	$\alpha 2$	$\alpha 5$	amUV375	$22,44 \pm 0,10$	$24,36 \pm 0,22^{**}$	$49,0 \pm 2,2$
	$\alpha 2$	$\beta 1$	amUV375	$24,46 \pm 0,06$	$20,334 \pm 0,052^{**}$	$38,54 \pm 0,58$
	$\alpha 2$	HE122	amUV375	$25,50 \pm 0,40^{**}$	$100,282 \pm 0,016^{**}$	$610,8 \pm 0,7$
	$\alpha 3$	$\alpha 4$	amUV375	$22,98 \pm 0,18$	$24,30 \pm 0,28^{**}$	$472,2 \pm 2,8$
	$\alpha 3$	$\alpha 5$	amUV375	$22,62 \pm 0,34$	$24,36 \pm 0,22^{**}$	$555,4 \pm 3,4$
	$\alpha 3$	$\beta 1$	amUV375	$24,50 \pm 0,20$	$20,334 \pm 0,052^{**}$	$39,16 \pm 0,60$
	$\alpha 3$	HE122	amUV375	$25,90 \pm 0,36^{**}$	$100,282 \pm 0,016^{**}$	$311,4 \pm 1,4$
	$\alpha 4$	$\beta 1$	amUV375	$23,30 \pm 0,14$	$20,334 \pm 0,052^{**}$	$37,24 \pm 0,40$
	$\alpha 4$	HE122	amUV375	$24,96 \pm 0,32^{**}$	$100,282 \pm 0,016^{**}$	$38,00 \pm 0,38$
	$\alpha 5$	$\beta 1$	amUV375	$23,56 \pm 0,42$	$20,334 \pm 0,052^{**}$	$37,62 \pm 0,84$
	$\alpha 5$	HE122	amUV375	$24,60 \pm 0,20^{**}$	$100,282 \pm 0,016^{**}$	$28,14 \pm 0,54$
	amUV200	$\beta 1$	opUV357	$22,44 \pm 0,16$	$20,452 \pm 0,030$	$39,54 \pm 0,78$

$M_{j/ih}$ — удвоенная частота рекомбинантов дикого типа в трехфакторном скрещивании; $M_{i/j}$, $M_{j/h}$ — частоты рекомбинации, определяемые как удвоенные частоты рекомбинантов одного реципрокного класса. Эти частоты, за исключением отмеченных звездочками, определялись в тех же трехфакторных скрещиваниях, что и $M_{j/ih}$, посевом на соответствующие супрессорные штаммы *E. coli* (см. текст). Верхний левый индекс при частотах обозначает число определений.

* Частота рекомбинации определена в скрещивании данного маркера j с двойным мутантом H72opUV357.

** Частота рекомбинации определена в двухфакторном скрещивании.

из UV200 за счет спонтанной транзиции АТТ → АТЦ. Происхождение остальных маркеров описано ранее (Чирков и др., 1976; Щербаков и др., 1977а). Все двойные мутанты rII (таблица) получены нами.

Анализ данных на ЭВМ. Применялся усовершенствованный вариант нашей рекомбинационной модели (Щербаков, Тоомпуу, 1977). Задавались функции

$$R_{i/j} = B + \left\{ A \operatorname{erf} \left(\frac{D_{ij}}{\sqrt{\pi}} \right) + (A+B-C) \left[1 - \operatorname{erf} \left(\frac{D_{ij}}{\sqrt{\pi}} \right) \right] \right\} D_{ij} - (B-C) e^{-\frac{(D_{ij})^2}{\pi}}, \quad (1)$$

$$R_{j/h} = B + \left\{ A \operatorname{erf} \left(\frac{D_{jh}}{\sqrt{\pi}} \right) + (A+B-C) \left[1 - \operatorname{erf} \left(\frac{D_{jh}}{\sqrt{\pi}} \right) \right] \right\} D_{jh} - (B-C) e^{-\frac{(D_{jh})^2}{\pi}}, \quad (2)$$

$$2R_{j/ih} = B + (B-C) \left\{ \left[\operatorname{erf} \left(\frac{D_{ij} + D_{jh}}{\sqrt{\pi}} \right) - \operatorname{erf} \left(\frac{D_{ij}}{\sqrt{\pi}} \right) \right] D_{ij} + \right. \\ \left. + \left[\operatorname{erf} \left(\frac{D_{ij} + D_{jh}}{\sqrt{\pi}} \right) - \operatorname{erf} \left(\frac{D_{jh}}{\sqrt{\pi}} \right) \right] D_{jh} - e^{-\frac{(D_{ij})^2}{\pi}} - e^{-\frac{(D_{jh})^2}{\pi}} + e^{-\frac{(D_{ij} + D_{jh})^2}{\pi}} \right\}, \quad (3)$$

где $R_{i/j}$ и $R_{j/h}$ — частоты рекомбинации в скрещиваниях $i^+j^- \times i^-j^+$ и $j^+k^- \times j^-k^+$ соответственно; $R_{j/ih}$ — частота рекомбинации по центральному маркеру j в скрещивании $i^-j^+k^- \times i^+j^-k^+$; D_{ij} и D_{jh} — генетические расстояния $i-j$ и $j-k$, выраженные в единицах длины гибридной области (средняя генетическая длина гибридной области нормирована на единицу); $\operatorname{erf}(z) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^z e^{-t^2} dt$ — табулированная функция

ошибок; $A = \frac{1}{2} F \bar{m} \xi \alpha$, $B = \frac{1}{2} F \bar{m} \xi \beta$ и $C = \frac{1}{2} F \bar{m} \xi \mu \left(1 - \frac{\mu}{2} \right)$ — параметры модели; F — поправочный коэффициент Леннокса; m — среднее число элементарных актов рекомбинации на одну фаговую частицу в клетке; ξ — математическое ожидание усеченного по центру нормального распределения, которому согласно модели подчиняется длина гибридной области; α и β — вероятности распада конфигурации с перекрестной связью на свободные гибридные молекулы ДНК с рекомбинантными и родительскими флангами соответственно ($\alpha + \beta = 1$); μ — средняя вероятность коррекции участка неспаривания в молекулярной гетерозиготе.

На ЭВМ обрабатывались частоты рекомбинации R , характеризующие вероятность сегрегации маркеров при условии, что каждый рекомбинант в лизате является результатом одного элементарного рекомбинационного события. Для того, чтобы иметь экспериментальные значения R , в измеряемые частоты M вводились поправки Δ на случайное совпадение независимых рекомбинационных событий. Поправки вычислялись по формулам (Щербаков, Тоомпуу, 1977) $R_{i/j} = M_{i/j} + \Delta_{i/j}$,

$$R_{j/h} = M_{j/h} + \Delta_{j/h}, \quad R_{j/ih} = M_{j/ih} - \Delta_{j/ih}, \quad \text{где } \Delta_{i/j} = 1,11 (M_{i/j})^2, \quad \Delta_{j/h} = \\ = 1,11 (M_{j/h})^2, \quad \Delta_{j/ih} = 1,11 M_{i/j} M_{j/h} - 2,22 M_{j/ih} (M_{i/j} + M_{j/h} - M_{j/ih}).$$

Машина вела поиск наилучших параметров функций, решая задачи двух типов: тест на аддитивность и тест на интерференцию.

В тесте на аддитивность для всех экспериментально изученных комбинаций $i-j-k$ по функциям (1) и (2) вычислялись расстояния D_{ij} и

D_{jk} . Оптимальными считались такие параметры, которые приводили к минимальному значению функции

$$\Phi_{\text{адд.}}(A, B, C) = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_i \sum_j \sum_k \left[\left(1 - \frac{D_{ij} + D_{jk}}{D_{ik}} \right)^2 + \left(1 - \frac{D_{ik}}{D_{ij} + D_{jk}} \right)^2 \right]},$$

где n — число комбинаций $i-j-k$.

В тесте на интерференцию для всех исследованных комбинаций $i-j-k$ исходя из экспериментальных значений R_{ij} и R_{jk} по функциям (1) и (2) находили расстояния D_{ij} и D_{jk} , которые затем вставлялись в функцию (3). Вычисленные по последней функции значения $(R_{j/ik})_{\text{теор.}}$ сравнивали с экспериментальными значениями $(R_{j/ik})_{\text{эксп.}}$, полученными в соответствующих трехфакторных скрещиваниях. Оптимальными принимались такие параметры, которые приводили к минимальному значению функции

$$\Phi_{\text{инт.}}(A, B, C) = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_i \sum_j \sum_k \left[\left(1 - \frac{(R_{j/ik})_{\text{теор.}}}{(R_{j/ik})_{\text{эксп.}}} \right)^2 + \left(1 - \frac{(R_{j/ik})_{\text{эксп.}}}{(R_{j/ik})_{\text{теор.}}} \right)^2 \right]}.$$

Минимизация функций $\Phi_{\text{адд.}}$ и $\Phi_{\text{инт.}}$ проводилась на БЭСМ-6 в Институте химической физики АН СССР. Использовалась программа, реализующая некоторый вариант комбинации метода градиентного спуска с методом конфигураций, составленная З. Андриановой.

Результаты и обсуждение

На ЭВМ были обработаны рассмотренные нами ранее данные (Тоомпуу, Щербаков, 1976б) по двухфакторным скрещиваниям, выполненным Р. С. Эдгаром с сотрудниками (Edgar и др., 1962) и К. М. Фишер и Г. Бернштейном (Fisher, Bernstein, 1965) на генах rII . В тесте на аддитивность параметры, соответствующие минимальному значению функции $\Phi_{\text{адд.}}(A, B, C)$, однозначно найти нельзя, так как минимум вырожденный. Например, при изменении параметра A от $1 \cdot 10^{-2}$ до $1 \cdot 10^6$ значение $\Phi_{\text{адд.}}$ практически не менялось, оставаясь около 0,23. С аналогичными затруднениями, связанными с нечувствительностью минимизируемой функции к изменению параметров, столкнулись Ф. Сталь и соавторы при попытке выбрать наилучшую рекомбинационную модель по тесту на аддитивность (Stahl и др., 1964). Следовательно, данные двухфакторных скрещиваний не дают возможности различать модели и определять их параметры, по крайней мере, по критерию аддитивности.

При обработке экспериментальных данных по трехфакторным скрещиваниям, полученных М. Чейс и А. Х. Дерманом (Chase, Doermann, 1958), минимальное значение функции $\Phi_{\text{инт.}}(A, B, C)$, равное 0,21, найдено при $A = 4,9 \cdot 10^{-2}$, $B = 9,2 \cdot 10^{-2}$, $C = 8,1 \cdot 10^{-4}$. В отличие от $\Phi_{\text{адд.}}(A, B, C)$ $\Phi_{\text{инт.}}(A, B, C)$ оказалась вблизи минимума чувствительной к изменению параметров. Например, при смещении параметров к вышеупомянутым величинам $A = 1,1 \cdot 10^{-2}$, $B = 1,2 \cdot 10^{-2}$, $C = 1,0 \cdot 10^{-3}$ получена $\Phi_{\text{инт.}}(A, B, C)$, равная $2,5 \cdot 10^5$. Это является убедительным доказательством глубины минимума. Однако найденное различие между A и B оказалось недостоверным. Так, при соответствующем минимуму $C = 8,1 \cdot 10^{-4}$ и со смещенными $A = B = 7,0 \cdot 10^{-2}$ функция имела значение 0,23, что весьма близко к минимальному.

В надежде, что с учетом различий в корректируемости маркеров удастся улучшить минимум функции мы провели серию трехфакторных скрещиваний типа $i-j+k^- \times i+j-k^+$, в которых имелись сведения о корректируемости центрального маркера. В таблице приведены результаты двух- и трехфакторных скрещиваний по всем изученным нами комби-

нациям $i-j-k$. Поскольку во многих случаях маркеры двойного мутанта $i-j+k$ являются чувствительными к нонсенс-супрессии, имеется возможность определять частоты $M_{i/j}$ или $M_{j/k}$ в том же трехфакторном скрещивании, в котором определяется частота $M_{j/ik}$, если потомство от скрещивания высеять на соответствующем супрессорном штамме *E. coli*. Например, двойной мутант *H72opUV357* может рассматриваться как одиночный мутант *H72* при посеве на *K223* (супрессор опаловых мутаций) и как одиночный мутант *opUV357* при посеве на *CA265* или *CA180* (супрессоры амбер-мутаций). В тех случаях, когда один из маркеров двойного мутанта был несупрессируемым на индикаторных штаммах *E. coli* (точковая мутация типа сдвига фазы или делеция), соответствующую частоту $M_{i/j}$ или $M_{j/k}$ определяли в двухфакторном скрещивании.

При подборе изучаемых комбинаций $i-j-k$ имелись в виду требования независимой корреляции маркеров. Наша модель (Тоомпуу, Щербаков, 1975; Щербаков, Тоомпуу, 1977) рассчитана на достаточно отдаленные маркеры, возможность одновременного захвата которых в один и тот же корректируемый участок исключается. При сближении маркеров на расстояние меньше длины корректируемого участка становится возможной совместная коррекция, что приводит к снижению вклада коррекции в рекомбинацию, не учитываемому моделью. По этой причине в таблицу включались лишь скрещивания между такими маркерами, о которых мы заведомо знали, что они не могут быть захвачены в общий корректируемый участок (Щербаков и др., 1977а).

Когда данные таблицы были подвергнуты обработке на ЭВМ без учета разной корректируемости мутаций, значение $\Phi_{\text{инт.}}(A, B, C)$ не удавалось получить ниже 0,7. Это объясняется, с одной стороны, большими различиями в корректируемости использованных мутаций, а с другой, большим удельным весом коррекции в скрещивании с тесно сцепленными маркерами.

Затем данные по трехфакторным скрещиваниям были разделены на пять групп, как показано в таблице. В каждую группу объединялись скрещивания с близкой корректируемостью центрального маркера, поскольку частота $M_{j/ik}$ зависит от корректируемости именно центрального маркера *j*. В группу I были включены маркеры *j*, корректируемость которых \times ($- \rightarrow +$), определенная ранее по эффекту сужения карты (Щербаков и др., 1977б), находилась в пределах от нуля до $2,2 \cdot 10^{-4}$. В группу II были включены маркеры с высокой корректируемостью (от $14,3 \cdot 10^{-4}$ до $17,4 \cdot 10^{-4}$). Для остальных центральных маркеров мы не имели данных по корректируемости. Группа III составлена из скрещиваний, в которых участвовал один и тот же центральный маркер *UV200*. В группу IV объединены скрещивания с участием в качестве центральных маркеров мутантов $\alpha 2$ и $\alpha 3$. Эти мутации локализованы близко друг к другу и дают приблизительно одинаковые частоты рекомбинации в трехфакторных скрещиваниях, что говорит об отсутствии существенных различий в корректируемости. На том же основании включены в одну группу (группа V) маркеры *HE122* и $\beta 1$. В эту последнюю группу включены также скрещивания, в которых оба расстояния ($i-j$ и $j-k$) велики, и следовательно, относительный вклад коррекции в частоту $M_{j/ik}$ незначителен.

В программе для ЭВМ поставлено условие общих *A* и *B* для всей совокупности данных и независимых параметров коррекции C_1 , C_2 , C_{III} , C_{IV} и C_V для каждой отдельной группы скрещиваний соответственно. При этом наблюдалось следующее.

При независимых спусках с разных начальных точек достигается

минимальное значение $\Phi_{\text{инт.}} = 0,13-0,14$. Параметры C определяются надежно и значения их в независимых спусках различаются не более, чем во втором знаке. Значения параметров A и B находятся в большинстве случаев около $6 \cdot 10^{-2}$. Однако в ряде случаев наблюдались отклонения от этой величины в 2—3 раза при значении $\Phi_{\text{инт.}}$ около 0,14. Попытка определить сумму параметров $A+B$ не привела к увеличению надежности определения. В то же время, задание условия $A=B$ не препятствовало снижению $\Phi_{\text{инт.}}$ до 0,13.

В одном из спусков с независимыми A и B получены следующие значения параметров: $A=6,6 \cdot 10^{-2}$, $B=5,4 \cdot 10^{-2}$, $C_I=2,6 \cdot 10^{-4}$, $C_{II}=4,1 \cdot 10^{-3}$, $C_{III}=4,6 \cdot 10^{-3}$, $C_{IV}=2,1 \cdot 10^{-3}$, $C_V=8,3 \cdot 10^{-4}$; $\Phi_{\text{инт.}}=0,14$. В другом спуске при условии $A=B$ получены следующие значения параметров: $A=B=6,7 \cdot 10^{-2}$, $C_I=2,6 \cdot 10^{-4}$, $C_{II}=4,1 \cdot 10^{-3}$, $C_{III}=4,6 \cdot 10^{-3}$, $C_{IV}=2,1 \cdot 10^{-3}$, $C_V=8,2 \cdot 10^{-4}$; $\Phi_{\text{инт.}}=0,13$.

В целом результаты проведенного анализа трехфакторных скрещиваний не противоречат модели с перекрестным обменом нитей и коррекцией молекулярных гетерозигот. Сильное снижение минимума $\Phi_{\text{инт.}}(A, B, C)$ после разделения скрещиваний на группы и достоверные различия между параметрами C для разных групп показывают, что параметр C действительно характеризует коррекционный механизм рекомбинации. Более того, значения $C_I=2,6 \cdot 10^{-4}$ и $C_{II}=4,1 \cdot 10^{-3}$ согласуются со значениями корректируемости $\kappa(- \rightarrow +)$, определенными для соответствующих маркеров независимым способом по эффекту сужения карты в двухфакторных скрещиваниях на индикаторных расстояниях (Щербаков и др., 19776).

Выводы

В скрещиваниях типа $i-j+k \times i^+j^-k^+$ измерены частоты рекомбинации между rII -мутантами фага T4. Данные подразделялись на группы с близкой корректируемостью центрального маркера и с независимыми параметрами корректируемости. С учетом распределения длины гибридной области в молекулярных гетерозиготах, а также вклада двойных статистически независимых событий в частоту рекомбинации, по критерию минимальной интерференции на ЭВМ методом минимизации соответствующей функции найдены наилучшие значения параметра C и показана зависимость величины C от маркера.

ЛИТЕРАТУРА

- Тоомпуу О., Щербаков В., 1975. Изучение количественных закономерностей генетической рекомбинации у фага T4. I. Теория молекулярных моделей типа разрыва-воссоединения для популяционных фаговых скрещиваний с тесно сцепленными маркерами. Изв. АН ЭССР. Биол. 24 : 263—274.
- Тоомпуу О., Сизова С., Ефремова О., Личина М., Плугина Л., Кудряшова Е., Чирков Г., Щербаков В., 1976. Изучение количественных закономерностей генетической рекомбинации у фага T4. IV. Эффект маркера в трехфакторных скрещиваниях. Изв. АН ЭССР. Биол. 25 : 201—207.
- Тоомпуу О. Г., Щербаков В. П., 1976а. Вклад коррекции молекулярных гетерозигот в генетическую рекомбинацию у фага T4. Тезисы II съезда генетиков и селекционеров Эстонии, стр. 52—53. Таллин—Харку.
- Тоомпуу О., Щербаков В., 1976б. Изучение количественных закономерностей генетической рекомбинации у фага T4. II. Анализ данных по стандартным двухфакторным скрещиваниям. Изв. АН ЭССР. Биол. 25 : 106—116.
- Тоомпуу О., Щербаков В., 1976в. Изучение количественных закономерностей генетической рекомбинации у фага T4. III. Анализ данных по трехфакторным скрещиваниям. Изв. АН ЭССР. Биол. 25 : 154—156.
- Чирков Г. П., Сизова С. Т., Ефремова О. И., Гутникова М. Н., Кудряшова Е. А., Волкодав Л. П., Щербаков В. П., 1976. Супрессия недо-

- статочности по ДНК-лигазе и селективный отбор мутантов и рекомбинантов с фенотипом rII у фага T4. Генетика 12 (6) : 95—102.
- Щербаков В. П., Чирков Г. П., Плу́гина Л. А., Кудряшова Е. А., Сизова С. Т., Ефремова О. И., Тоомпуу О. Г., 1977б. Вклад коррекции молекулярных гетерозигот в генетическую рекомбинацию у фага T4, измеряемый по эффекту сужения карты. Генетика (в печати).
- Щербаков В. П., Тоомпуу О. Г., 1977. Количественные аспекты образования полухроматидной хиазмы в качестве промежуточного продукта генетической рекомбинации у бактериофагов. Генетика 13 (8) : 1409—1424.
- Щербаков В. П., Чирков Г. П., Сизова С. Т., Ефремова О. И., Плу́гина Л. А., Кудряшова Е. А., Личина М. В., Гутникова М. Н., Кононова С. Д., Тоомпуу О. Г., 1977а. Исследование аллель-специфичности генетической рекомбинации у фага T4 методом индикаторных скрещиваний. Генетика (в печати).
- Chase, M., Doermann, A. H., 1958. High negative interference over short segments of the genetic structure of bacteriophage T4. Genetics 43 : 352—353.
- Edgar, R. S., Feynman, R. P., Klein, S., Lielausis, I., Steinberg, C. M., 1962. Mapping experiments with r-mutants of bacteriophage T4D. Genetics 47 : 179—186.
- Stahl, F. W., Edgar, R. S., Steinberg, J., 1964. The linkage map of bacteriophage T4. Genetics 50 : 539—552.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР
Институт химической физики
Академии наук СССР

Поступила в редакцию
21/I 1977

Oleg TOOMPUU, Avigeja IVANOVA, Viktor STSERBAKOV

GENEETILISE REKOMBINATSIOONI KVANTITATIIVSETE SEADUSPÄRASUSTE
UURIMINE BAKTERIOFAAGIL T4. V. TEOORIA PARAMEETRITE
OPTIMEERIMINE MUTATSIOONIDE REPAAREERUMISVÕIME ERINEVUSTE ALUSEL

Resümee

Määrati faagi T4 rII mutatsioonide vahelised rekombinatsioonisagedused $i^{-}j^{+}k^{-} \times i^{+}j^{-}k^{+}$ tüüpi ristamistes. Andmed rühmitati tsentraalse markeri repaareerumisvõime järgi, kusjuures igale rühmale anti sõltumatu repaareerumisparameeter C . Arvestades hübriidse piirkonna pikkuse tõenäosusjaotust molekulaarsetes heterosügootides ning statistiliselt sõltumatute rekombinatsioonisündmuste juhuslikku koosinemist, leiti elektronarvutitlga rühma parameetri C väärtus, mis rahuldab minimaalse interferentsi kriteeriumi.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia Instituut
NSV Liidu Teaduste Akadeemia
Keemilise Füüsika Instituut

Toimetusse saabunud
21. I 1977

Oleg TOOMPUU, Avigeja IVANOVA, Victor SHCHERBAKOV

THE STUDY OF QUANTITATIVE ASPECTS OF GENETIC RECOMBINATION
IN T4 PHAGE. V. A SEARCH FOR BEST PARAMETERS OF THE THEORY
TAKING INTO CONSIDERATION DIFFERENT REPAIRABILITY OF MUTATIONS

Summary

Recombination frequencies between rII mutants of phage T4 were estimated in $i^{-}j^{+}k^{-} \times i^{+}j^{-}k^{+}$ type crosses. The data were divided into classes according to repairabilities of the central markers, each class having been endowed with independent repairability parameter C . Taking into account the distribution of the length of hybrid region in molecular heterozygotes as well as the contribution of a chance coincidence of statistically independent acts into recombination frequencies, a computer analysis of the data was performed. As a result, for each class a best C value giving minimum interference was found.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology
Academy of Sciences of the USSR,
Institute of Chemical Physics

Received
Jan. 21, 1977