

超敏感酵母HUG1-yEGFP生物传感器遗传毒性化合物检测方法优化*

刘玉倩^{1,2} 魏婷^{1,2} 张超^{1,2} 张晓华¹ 袁丽¹ 戴和平^{1**}

¹中国科学院水生生物研究所淡水生态和生物技术国家重点实验室 武汉 430072

²中国科学院大学 北京 100049

摘要 基于酵母DNA损伤响应机制,本实验室构建了超敏感型酵母HUG1-yEGFP生物传感器,检测方法主要依靠流式细胞仪。为了简化检测方法,实现高通量检测,本研究通过摸索和测试各种条件,建立了优化的、更适用于96孔板的荧光酶标仪的检测方法。结果显示:F1培养基可以作为一种本底荧光较低的培养基用于荧光酶标仪的检测,使用96孔透明底黑色细胞培养板的检测菌液体积为100 μ L,初始菌液浓度OD_{600 nm}值为0.05。在此优化检测条件下,超敏感酵母HUG1-yEGFP生物传感器与典型的遗传毒性化合物甲磺酸甲酯(MMS)可以建立良好的剂效和时效关系,说明该生物传感器已具备了实际应用的实验基础。图4 参16

关键词 生物传感器;超敏感型酵母;遗传毒性化合物;高通量检测

CLC Q3-3 : X82

An optimized genotoxin detection method based on super-sensitive yeast HUG1-yEGFP biosensor*

LIU Yuqian^{1,2}, WEI Ting^{1,2}, ZHANG Chao^{1,2}, ZHANG Xiaohua¹, YUAN Li¹ & DAI Heping^{1**}

¹Institute of Hydrobiology, State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract A super-sensitive yeast HUG1-yEGFP biosensor based on DNA damage response has been constructed in our laboratory. The biosensor was detected mainly by flow cytometer. This study aimed to simplify the detection by constructing a new detection assay with high throughput and optimize the detection conditions to adapt to 96-well microtiter plate. The super-sensitive yeast cells carrying genotoxic detecting biosensors were treated with MMS. The yEGFP-fluorescent intensity was measured by multifunctional fluorescent microplate reader. The result found F1 as the best yeast culture medium with low background of fluorescence for microplate fluorescent detection. For a high throughput genotoxin detection using 96-well microtiter plates with black walls and transparent bottoms, the best culture volume of yeast was 100 μ L, and initial optical density at 600nm was 0.05. The dose-effect and time-effect between super-sensitive yeast biosensor and MMS under the optimized detection conditions showed that this biosensor is promising for practical application.

Keywords biosensor; yeast; genotoxin; fluorescence; induction

分子生物标志物作为环境污染的早期预警信号,在基因、蛋白质和生物代谢等水平的响应与环境的相互作用,在环境污染风险评估中具有重要意义^[1-2]。遗传毒性化合物作用于机体时可致DNA损伤,会导致一系列的应答机制来响应DNA损伤。利用响应于DNA损伤修复基因的诱导表达,可建立生物传感器,即将这些基因的启动子与报告基因相融合,转入宿主细胞,在环境遗传毒性化合物的暴露下通过检测报告基因产物的表达水平来检测环境污染物的遗传毒性效应。

芽殖酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)属于一种单细胞真核生物,易于培养,操作简单,其响应于DNA损伤修复的基因调控机制非常类似于哺乳动物,因此酵母作为一种模式生物已被应用于遗传毒性化合物的检测中^[3]。

Walmsley等人基于DNA损伤响应生物标志物,以酵母作为宿主构建了RAD54-GFP遗传毒性生物传感器GreenScreenAssay(GSA)^[4]。该生物传感器利用荧光酶标仪进行96孔板的检测,已成为商业化产品。其他目前已报道的以GFP为报告基因的遗传毒性酵母生物传感器的有RNR2-GFP、RAD54-GFP、GADD45 α -GFP、RNR3-yEGFP和HUG1-yEGFP等^[5-7]。除了RAD54-GFP遗传毒性生物传感器实现了96孔板的荧光酶标仪检测,其他遗传毒性生物传感器的检测都是使用流式细胞仪,其中HUG1-yEGFP对DNA损伤的响应

收稿日期 Received: 2014-01-19 接受日期 Accepted: 2014-03-05

*国家自然科学基金重点项目(21037004)与淡水生态和生物技术国家重点实验室项目(2012FBZ10)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (21037004) and the State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology (2012FBZ10)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: hpdai@ihb.ac.cn)

最为灵敏。HUG1基因所编码的蛋白会因细胞受到羟基脲诱导后大量表达,研究发现此基因参与MEC1介导的DNA损伤细胞周期检验点信号通路上的DNA损伤应答^[8-9],但是该基因的确切功能和作用机制还不清楚。

为了提高酵母生物传感器的检测灵敏度,Zhang等人通过敲除编码酵母细胞壁甘露糖蛋白的相关基因CWP1和CWP2,提高了细胞壁通透性,增加了对大分子DNA损伤剂的检测灵敏度^[10],通过敲除编码酵母细胞膜外排泵的相关基因PDR5和SNQ2,进一步提高了细胞对外源物质的通透性^[11],通过敲除酵母细胞氧化应激通路中最关键的转录激活因子YAP1基因,提高了酵母细胞对DNA氧化性损伤试剂的敏感性^[12]。本实验室进一步将DNA碱基切除修复和核苷酸切除修复关键性基因MAG1、RAD1敲除,在五个基因*cwp1cwp2snq2pdr5yap1*缺失突变的基础上,构建了七基因缺失的超敏感型酵母突变株,然后将响应于遗传毒性化合物的HUG1-yEGFP生物传感器元件转入七基因缺失超敏感型酵母突变株内,并将该元件同源重组在酵母基因组上,建立了稳定的超敏感酵母HUG1-yEGFP生物传感器,不仅提高了检测灵敏度,也扩大了遗传毒性化合物的检测种类范围^[5]。但是该生物传感器的检测方法还仅限于流式细胞仪,这需要昂贵的仪器和较复杂的操作流程,不利于对大量环境化学污染物进行筛查。

为了简化超敏感酵母HUG1-yEGFP生物传感器的操作方法,实现高通量检测,本研究使用典型的DNA烷化剂甲磺酸甲酯(Methy methanesulfonate, MMS)作为模式遗传毒性化合物,通过对各种条件的摸索和优化,建立更适合于96孔板的荧光酶标仪的检测方法,以期为该生物传感器的实际应用和推广奠定了实验基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

超敏感酵母WXY30095(*snq2Δ::KanMX*, *pdr5Δ::LEU2*, *cwp1Δ::hisG*, *cwp2Δ::HIS3*, *yap1Δ::hisG*, *rad1Δ::hisG*, *mag1Δ::hisG*),基因组上已整合有HUG1-yEGFP报告元件,由本实验室构建^[5]。

1.2 培养基和溶液

YPD培养基^[13]:1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%葡萄糖;固体培养基另加2%琼脂。

F1培养基(L⁻¹)^[14]:硫酸铵2 g,磷酸二氢钾3 g,七水合硫酸镁0.55 g,氯化钙0.06 g,氯化钠0.1 g,硼酸1 mg,五水合硫酸钙1 mg,碘化钾1 mg,六水合氯化铁5mg,七水合硫酸锌7 mg,组氨酸20 mg,甲硫氨酸20 mg,色氨酸20 mg,赖氨酸30 mg,亮氨酸30 mg,缬氨酸30 mg,肌糖62 μg,维生素B₁ 14 μg,维生素B₆ 4 μg,泛酸钙4 μg,生物素0.3 μg,葡萄糖20 g。

SD培养基(L⁻¹)^[13]:酵母胆碱(无氨基酸)1.7 g,硫酸铵5 g,葡萄糖20 g,腺嘌呤20 mg,尿嘧啶20 mg,甲硫氨酸20 mg,色氨酸20 mg,组氨酸20 mg,亮氨酸30 mg,赖氨酸30

mg,缬氨酸30 mg。

10 × PBS缓冲液:氯化钠80 g,氯化钾1 g,十二水合磷酸氢二钠36.8 g,磷酸二氢钾2.4 g,溶于双蒸水中,用NaOH调节pH值为7.4,定容至1 L。使用时用双蒸水稀释成1 × PBS。

1.3 化学试剂

MMS购自Sigma-Aldrich公司。

1.4 酵母菌株复苏和培养

取-70 °C保存的酵母菌株WXY30095-genome-HUG1-yEGFP接种在YPD固体培养基平皿上,于30 °C恒温培养箱中倒置培养2 d。

1.5 MMS暴露实验

过夜培养酵母细胞,用新鲜的酵母培养液稀释,用分光光度计测OD_{600 nm}值,调整细胞浓度,将稀释后的酵母菌液转移至96孔板透明底黑色孔板内。分别加入系列稀释的MMS,每个浓度3个平行,30 °C,200 r/min摇床培养,按指定的时间进行MMS暴露实验。实验重复至少3次。

1.6 荧光酶标仪检测绿色荧光蛋白GFP的表达

用SpectraMax M5多功能酶标仪检测酵母细胞浓度OD_{600 nm}值和相对荧光强度值(激发光波长488 nm、发射波长520 nm)。

1.7 数据统计和分析

(1)利用Microsoft Excel 2007软件,通过荧光强度平均值来定量yEGFP的表达,最后取3次平行实验的平均值和标准差。

(2)相对荧光强度AU为任意单位(Arbitrary Unit)。AU/OD_{600 nm}为每单位酵母细胞的平均相对荧光强度。

(3)荧光诱导倍数(Fold induction) = 暴露组单位酵母细胞相对荧光强度平均值/对照组相对荧光强度平均值,设定遗传毒性阈值为1.3倍(细胞的平均荧光强度增加了30%),即当检测系统暴露于某一浓度的遗传毒性化合物中时,产生的yEGFP单位酵母细胞平均荧光强度值与对照组结果相比,荧光诱导倍数>1.3则可认为是阳性遗传毒性效应。利用Sigmaplot10.0软件作图。

2 结果与分析

2.1 酵母培养基的优化

本研究中所选用的3种培养基,YPD、SD和F1,都能很好地使整合有HUG1-yEGFP报告元件的超敏感酵母WXY3009生长,并能被DNA损伤试剂MMS诱导yEGFP表达产生荧光,可以很好地用于流式细胞仪的检测。但是在用荧光酶标仪进行检测时,发现YPD和SD培养基本身具有较强的荧光,导致本底荧光太强,极大地干扰了受试化合物的检测,只有F1培养基本身基本无荧光(图1),因此F1培养基可以作为一种本底荧光较低的培养基用于荧光酶标仪的检测。

2.2 高通量96孔板检测条件的优化

为了在荧光酶标仪上实现高通量检测,简化操作程序,本研究尝试利用96孔透明底黑色细胞培养板,使酵母菌的培

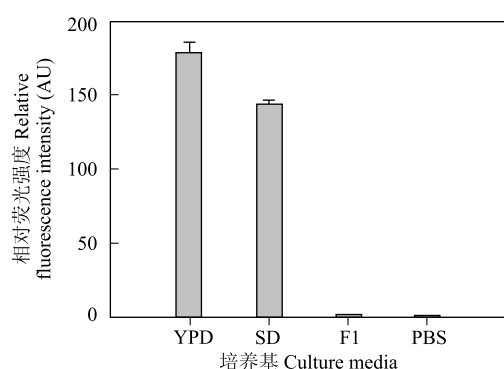


图1 各种培养基本身的相对荧光强度值(激发波波长488 nm, 发射波波长520 nm)。

Fig. 1 Background fluorescence of different culture media (excitation 488 nm, emission 520 nm).

养和细胞浓度及荧光强度的测定都在一块孔板上完成。但由于96孔板的孔体积较小会影响酵母细胞的有氧生长,为了使酵母菌液具有充分有氧的条件,必须对该酵母菌的菌液体积和初始浓度条件进行优化。

菌液体积越小,酵母细胞在96孔板中接触的空气就越充分,yEGFP的诱导表达量最好。本研究所用的96孔透明底黑色细胞培养板每小孔的最大体积是400 μL 。图2A显示,随着菌液体积的增大,直到每孔100 μL 时,细胞生长并没有受到明显的抑制,而高浓度的MMS暴露则会明显抑制酵母细胞的生长。图2B显示,不论是暴露组还是对照组,所检测到的相对荧光强度都随着菌液体积的提高而增高。当荧光强度除以细胞生长量时,所显示出的是单位细胞的平均荧光强度,图2C表明,菌液体积为每孔50 μL 时,所诱导的暴露组的单位细胞平均荧光强度最强,但对照组的单位细胞平均荧光强度也最高。图2D表示的是荧光诱导倍数,它可以更明显地反映出所测化合物的遗传毒性效应,结果显示菌液体积为75 μL 和100 μL 时,荧光诱导倍数相当,且都高于菌液体积为50 μL 的诱导倍数,考虑到操作的便利性,选用每孔100 μL 为较佳检测菌液体积。

酵母细胞受检测试剂暴露前要进行适当的稀释,实现细胞的同步性,必须选择较合适的初始菌液浓度。结果显示:MMS暴露8 h后,随着初始菌液浓度的增加,细胞的总生长量(图3A)、相对荧光强度(图3B)、单位细胞相对荧光强

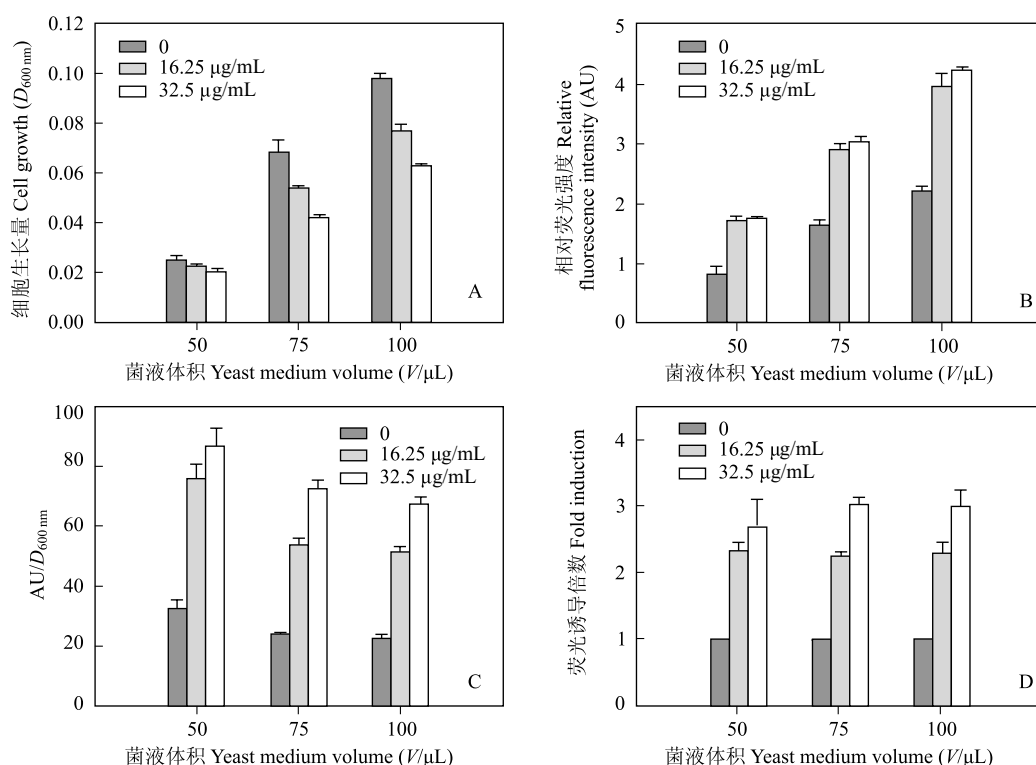


图2 超敏感酵母HUG1-yEGFP生物传感器在不同检测体积下的诱导表达。黑色柱为0 $\mu\text{g/mL}$ MMS暴露组,设为空白对照组;灰色柱为16.25 $\mu\text{g/mL}$ MMS暴露组;空白柱为32.5 $\mu\text{g/mL}$ MMS暴露组。A: 检测诱导荧光强度时的酵母细胞生长量;B: yEGFP诱导表达的相对荧光强度;C: yEGFP诱导表达的每单位细胞平均相对荧光强度;D: 诱导荧光倍数为MMS暴露组的荧光强度除以空白对照组的荧光强度。

Fig. 2 Induction expression of the super-sensitive yeast HUG1-yEGFP biosensor under different culture volumes. Black column: 0 $\mu\text{g/mL}$ MMS as blank control; Light grey column: treated with 16.25 $\mu\text{g/mL}$ MMS; Dark grey column: treated with 32.5 $\mu\text{g/mL}$ MMS. A: Cell growth at the time of detecting induced fluorescence intensity; B: Fluorescence intensity of the yEGFP induction expression; C: Relative fluorescence intensity of the yEGFP induction expression per unit cell; D: Fold induction (fluorescence intensity of the treatments divided by fluorescence intensity of the blank control).

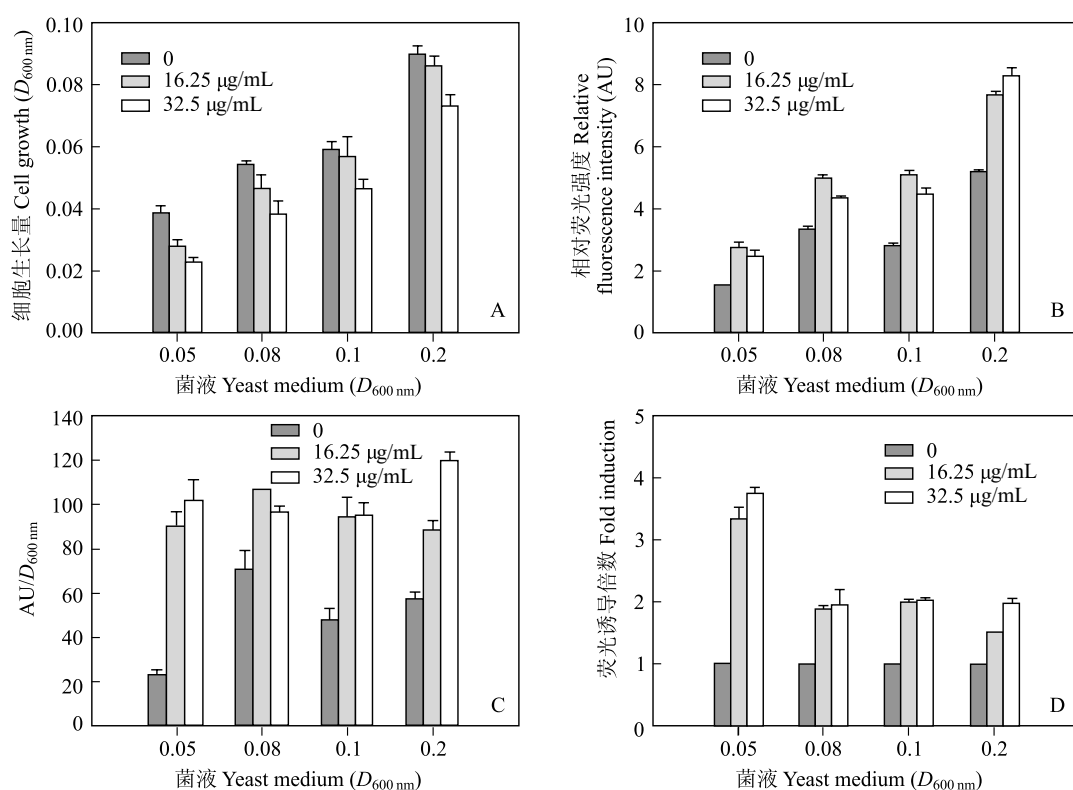


图3 超敏感酵母HUG1-yEGFP生物传感器在不同检测初始菌液浓度下的诱导表达。黑色柱为0 µg/mL MMS暴露组, 设为空白对照组; 灰色柱为16.25 µg/mL MMS暴露组; 空白柱为32.5 µg/mL MMS暴露组。A: 当检测诱导荧光强度时的酵母细胞生长量; B: yEGFP诱导表达的相对荧光强度; C: yEGFP诱导表达的每单位细胞平均相对荧光强度; D: 诱导荧光倍数为MMS暴露组的荧光强度除以对照组的荧光强度。

Fig. 3 Induction expression of the super-sensitive yeast HUG1-yEGFP biosensor under different initial yeast concentrations. Black column: 0 µg/mL MMS as blank control; Light grey column: treated with 16.25 µg/mL MMS; Dark grey column: treated with 32.5 µg/mL MMS; A: Cell growth at the time of detecting induced fluorescence intensity; B: Fluorescence intensity of the yEGFP induction expression; C: Relative fluorescence intensity of the yEGFP induction expression per unit cell; D: Fold induction (fluorescence intensity of the treatments divided by fluorescence intensity of the blank control).

度(图3C)都在增加,但是,酵母细胞的荧光诱导倍数在初始菌液浓度OD_{600 nm}值为0.05时最高(图3D),并且在此浓度下酵母细胞的本底荧光强度最低(图3C),因此,选择酵母细胞的菌液初始浓度OD_{600 nm}值为0.05。

2.3 超敏感酵母HUG1-yEGFP生物传感器暴露于MMS的时效与剂效关系

通过对MMS的暴露,建立超敏感酵母HUG1-yEGFP生物传感器与受试药物、受试时间之间的剂效、时效关系,确定最佳药物受试时间及最优表达剂量,为建立高通量和简便的96孔板及荧光酶标仪检测方法提供实验基础。检测结果(图4A)显示:该生物传感器暴露于MMS后,yEGFP的诱导表达与MMS的暴露浓度呈良好的线性剂效关系;随着MMS暴露浓度的增加,yEGFP的诱导表达荧光强度也随之增加,在4个梯度时间的暴露下,yEGFP的诱导表达的峰值均出现在MMS浓度为32.5 µg/mL处,随着MMS剂量进一步增加,酵母细胞受毒致死率升高(图4B),yEGFP的诱导表达量随之下降。yEGFP的表达与暴露时间之间也有时效分析,随着时间的延长,各暴露剂量下的yEGFP的诱导表达量均有提高;

在所检测的4个暴露时间下,8 h的诱导表达量最高;所以选定8 h的药物暴露时间为该检测系统的最佳暴露时间。

图4C所显示的是在暴露8 h的条件下,超敏感酵母HUG1-yEGFP生物传感器所能检测到的最低MMS的浓度,即检测灵敏度。结果显示:当MMS浓度为2.03 µg/mL时,荧光诱导倍数为1.27 ≈ 1.3,即达到所设定的遗传毒性阈值的最低效应浓度值。

3 讨论与结论

本实验室基于酵母DNA损伤转录应答所构建的超敏感酵母HUG1-yEGFP生物传感器,在流式细胞仪的检测方法中显示出对多种遗传毒性化合物的检测有较高的灵敏度^[5]。但是,流式细胞仪作为一种检测工具耗资大,费时,且操作复杂。因此,为了建立高通量和更加简便的检测方法,本研究使用96孔板和荧光酶标仪,对培养基、菌液的初始体积和浓度,以及受试化合物的剂效和时效关系等检测条件进行了优化。试验所使用的模式遗传毒性化合物MMS是一种单功能烷化剂,主要使DNA腺嘌呤上的O、N甲基化,造成DNA碱基

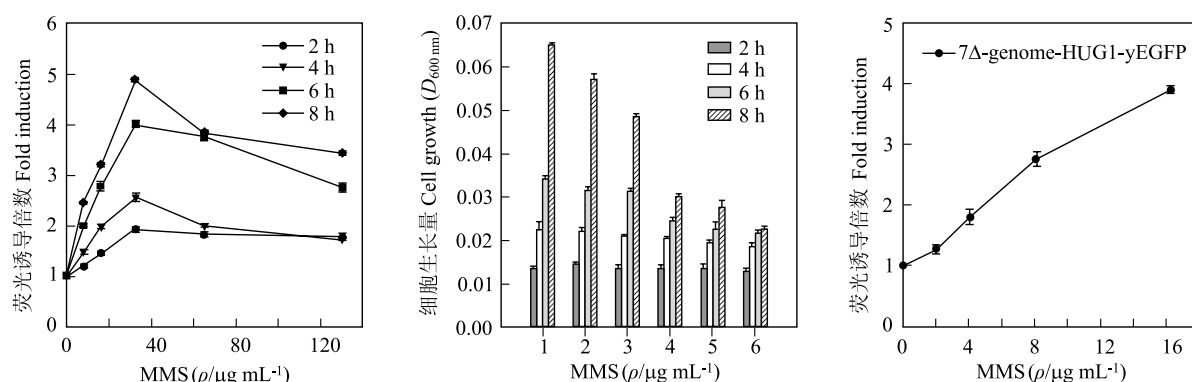


图4 超敏感酵母HUG1-yEGFP生物传感器的时效与剂效关系及其检测灵敏度分析. A: MMS暴露后的时效与剂效关系; B: MMS暴露后的细胞毒性效应; C: 最低MMS浓度检测灵敏度分析. A和B的MMS暴露浓度梯度为0 μg/mL, 8.125 μg/mL, 16.25 μg/mL, 32.5 μg/mL, 65 μg/mL, 130 μg/mL; C的MMS暴露浓度梯度为0 μg/mL, 2.03125 μg/mL, 4.0625 μg/mL, 8.125 μg/mL, 16.25 μg/mL.

Fig. 4 Dose-effect, time-effect, and detection sensitivity for the super-sensitive yeast HUG1-yEGFP biosensor. A: Dose-effect and time-effect after MMS exposure; B: MMS induced cytotoxicity; C: Detection sensitivity of minimum concentration of MMS. MMS concentrations of A and B: 0 μg/mL, 8.125 μg/mL, 16.25 μg/mL, 32.5 μg/mL, 65 μg/mL, and 130 μg/mL; MMS concentrations of C: 0 μg/mL, 2.03125 μg/mL, 4.0625 μg/mL, 8.125 μg/mL and 16.25 μg/mL.

错配、复制受阻等损伤^[15-16]. 因此, MMS常被用作潜在致突变剂和致DNA损伤剂的阳性参照化合物^[6].

之前用于流式细胞仪检测的酵母YPD培养基的主要成分为酵母提取物和蛋白胨,或SD培养基的主要成分中含有氮碱,其所含成分比较复杂,且具有颜色,因此本底荧光干扰较大.F1培养基含有足以供酵母正常生长的基本成分,因其本身几乎不具有荧光,所以是更合适的应用于荧光酶标仪检测的酵母培养基.

本研究中所用生物传感器的菌株的生长和报告基因的诱导表达必须在充分有氧的条件下进行,因此之前用于流式细胞仪检测的酵母培养和试剂暴露的容器都是在相对体积较大的试管和24孔板中进行.使用96孔透明底黑色细胞培养板,可以实现同时进行细胞培养和药物诱导的高通量检测,可以在一块培养板上进行细胞浓度和荧光值的检测,进而简化操作和节省时间.但由于96孔板的小孔体积较小,对酵母细胞的生长和yEGFP的诱导表达有影响.每孔100 μL的菌液体积和OD_{600 nm}为0.05的菌液初始体积更适合酵母细胞生长和荧光诱导.

参比本实验室已发表的有关流式细胞仪的实验结果^[5],在同样浓度的MMS暴露条件下,荧光酶标仪检测所表现出来的剂效和时效关系与流式细胞仪的实验结果是一致的.荧光酶标仪检测的最低效应浓度为2.03 μg/mL,尽管没有流式细胞仪检测的灵敏度高(0.36 μg/mL),相比而言荧光酶标仪检测方法更加价廉、快捷、简单.

检测条件优化后的超敏感酵母HUG1-yEGFP生物传感器对遗传毒性化合物MMS的暴露有良好的剂效与时效关系,其检测灵敏度与流式细胞仪方法处于同一水平^[5],并且,使用荧光酶标仪和96孔透明底黑色培养板的检测手段,可以使遗传毒性化合物的检测实现高通量,操作更加简便、省时.

在此优化检测条件下,超敏感酵母HUG1-yEGFP生物传感器可以应用于大量环境污染物和新型化合物的遗传毒性效应的筛查,可为环境健康风险评估提供一种新型的检测手段.

参考文献 [References]

- 1 van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2003, **13** (2): 57-149
- 2 Vainio H. Use of biomarkers in risk assessment [J]. *Intern J Hygiene Environ Health*, 2001, **204** (2-3): 91-102
- 3 Jia XM, Zhu Y, Xiao W. A stable and sensitive genotoxic testing system based on DNA damage induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mutat Res-Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2002, **519** (1-2): 83-92
- 4 Cahill PA, Knight AW, Billinton N, Barker MG, Walsh L, Keenan PO, Williams CV, Tweats DJ, Walmsley RM. The GreenScreen(R) genotoxicity assay: a screening validation programme [J]. *Mutagenesis*, 2004, **19** (2): 105-119.
- 5 Wei T, Zhang C, Xu X, Hanna M, Zhang XH, Wang Y. Construction and evaluation of two biosensors based on yeast transcriptional response to genotoxic chemicals [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, **44**: 138-145
- 6 Afanassiev V, Sefton M, Barker G, Walmsley RM. Application of yeast cells transformed with GFP expression constructs containing the *RAD54* or *RNR2* promoter as a test for the genotoxic potential of chemical substances [J]. *Mutat Res-Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2000, **464** (2): 297-308
- 7 Walsh L, Hastwell P W, Keenan P O, Knight A W, Billinton, Walmsley R M. Genetic modification and variations in solvent increase the sensitivity of the yeast *RAD54-GFP* genotoxicity assay [J]. *Mutagenesis*, 2005, **20**

- (5): 317-327
- 8 Benton MG, Glasser NR, and Palecek SP. The utilization of a *Saccharomyces cerevisiae* HUG1P-GFP promoter-reporter construct for the selective detection of DNA damage [J]. *Mutat Res-Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2007, **633**(1): 21-34
- 9 Basrai MA, Velculescu V, Kinzler KW, and Hieter P. *NORF5/HUG1* is a component of the *MEC1*-mediated checkpoint response to DNA damage and replication arrest in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (10): 7041-7049
- 10 Zhang M, Liang YP, Zhang XH, Xu Y, Dai HP, XiaoW. Deletion of yeast *CWP* genes enhances cell permeability to genotoxic agents [J]. *Toxicol Sci*, 2008, **103** (1): 68-76
- 11 Zhang M, Michelle H, Li J, Butcher S, Dai HP, XiaoW. Creation of a hyperpermeable yeast strain to genotoxic agents through combined inactivation of *PDR* and *CWP* genes [J]. *Toxicol Sci*, 2010, **113** (2): 401-411
- 12 Zhang M, Zhang C, Li J, Michelle H, Zhang XH, Dai HP, XiaoW. Inactivation of *YAP1* enhances sensitivity of the yeast RNR3-lacZ genotoxicity testing system to a broad range of DNA-damaging agents [J]. *Toxicol Sci*, 2011, **120** (2): 310-321
- 13 Sherman F. Getting started with yeast [J]. *Methods Enzymol*, 2002, **350**: 3-41
- 14 Walmsley RM, Gardner DCJ, Oliver SG. Stability of a cloned gene in yeast grown in chemostat culture [J]. *Mol Gen Genet*, 1983, **192**: 361-365
- 15 Beranek DT. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents [J]. *Mutat Res*, 1990, **231** (1): 11-30
- 16 Lundin C, North M, Erixon K, Walters K, Jenssen D, Goldmanand SHA, Helleday T. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks [J]. *Nucl Acids Res*, 2005, **33** (12): 3799-3811