



Генетический анализ

Лекция 1

Генетические задачи решаются легко только тогда, когда они предварительно уже решены другими. Поэтому необходимо предостеречь тех, кто впервые приступает к генетическому анализу, от уныния и пессимизма, если их первые попытки окажутся неудачными.

Александр Сергеевич Серебровский

Вопросы

1. Предмет и задачи генетического анализа.
2. Логика, принцип и этапы генетического анализа.
3. Методы генетического анализа.
4. Генетические коллекции: особенности создания и поддержания коллекций растений, животных, микроорганизмов; банки тканей, клеточных культур, генов. Использование коллекционного материала в генетическом анализе.
5. Значение биологических особенностей объекта для генетического анализа. Модельные объекты и их роль в генетическом анализе.
6. Жизненные циклы и особенности размножения животных, растений, микроорганизмов и вирусов.*

* - самостоятельная проработка материала (Орлова Н.Н. Генетический анализ. М.: Изд-во МГУ, 1991).

Предмет генетического анализа – фенотип организма, его отдельные признаки.

Признаком в генетике считают любое свойство, любую особенность, по которым особи могут отличаться друг от друга.

Признаки

- морфологические (цвет, форма, размер);
- биохимические;
- физиологические:
- анатомические;
- поведенческие различия;
- чувствительность или устойчивость к различного рода веществам, воздействиям и т.д.

Признаки

Простые (элементарные)

контролируются
аллелями одного гена

Сложные

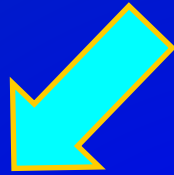
контролируются несколькими
генами, представляя собой
определенное сочетание фенов

Фен – простой, элементарный признак, контролируемый аллелями одного гена.

Фенотип особи можно представить как совокупность элементарных единиц – «фенов», каждый из которых контролируется аллелями одного гена.

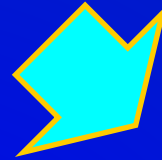
Основная задача анализа фенотипа – это разложение признака на элементарные признаки – фены.

Анализ признаков позволяет



простых

1. выявить связь между **геном** и **феном**;
2. изучать структуру и функции каждого гена, его **изменчивость** и **плейотропные** эффекты.



сложные

1. выявить механизм **неаллельных** взаимодействий;
2. исследовать на биохимическом уровне этапы метаболизма, изменение которых приводит к тому или иному **фенотипическому** проявлению изучаемого признака.

Задачи генетического анализа

**Задачи генетического анализа в зависимости от
уровня организации объекта исследования
(на уровне популяций, организмов, клеток,
молекул нуклеиновых кислот)**

- 1. Изучение наследования отдельных признаков;*
- 2. Локализация генов;*
- 3. Анализ структуры и функции гена;*
- 4. Геномный анализ;*
- 5. Анализ генетической структуры популяций;*
- 6. Анализ мутаций.*

Изучение наследования отдельных признаков

Изучение наследования отдельных признаков – важнейшая часть генетического анализа, позволяющая:

- проследить тип наследования (ядерное или внеядерное);*
- установить гены, по которым различаются исходные формы;*
- установить общее число генов, контролирующих данный признак;*
- выявить типы взаимодействия генов и характер их наследования (сцепление).*

В случае обнаружения внеядерного наследования выясняют, с какими органеллами (пластидами, митохондриями, цитоплазмой) или другими компонентами клетки (плазмидами, вирусами и пр.) оно связано.

Локализация генов

В решение этой задачи входит:

- определение группы сцепления для вновь обнаруживаемых мутаций;*
- изучение совместного наследования нескольких признаков;*
- локализация генов в группе сцепления с помощью уже картированных генов;*
- построение генетических, цитологических, физических (рестрикционных) карт плазмид, хромосом и т.д..*

Арсенал методов: метод гибридизации с использованием специально создаваемых линий, маркированных по разным хромосомам рецессивными или доминантными мутациями или перестройками хромосом; картирование на основе митотического кроссинговера; гибридизация соматических клеток; рестрикционное или физическое картирование, гибридизация in situ.

Анализ структуры и функции гена

Является логическим продолжением предыдущих этапов и включает:

- этап установления аллельности вновь возникших и уже изученных мутаций, затрагивающих изучаемый признак;*
- локализацию мутаций внутри гена (внутригенное картирование).*

Включает весь арсенал молекулярно-биологических методов; основными методами изучения из которых являются – гибридологический, метод делеционного картирования; рестрикционного анализа, методы выделения, клонирования и секвенирования ДНК. Для изучения структуры генов эукариот применяют также электронно-микроскопическое наблюдение гетеродуплексов между зрелыми мРНК и соответствующими генами.

Геномный анализ

Анализ генетического потенциала на основе оценки степени родства (растения).

Единицей анализа является геном — исходное гаплоидное число хромосом, качественно специфичное для данного вида.

Родство геномов определяется на основе наличия гомологии или гомеологии хромосом при отдаленной гибридизации и полиплоидии. Гомологичные хромосомы конъюгируют между собой (синdez) в профазе мейоза и образуют биваленты. Гомеологичные хромосомы неспособны конъюгировать, но могут функционально взаимозаменять друг друга в процессе онтогенеза растений. Виды, обладающие гомеологичными геномами, скрещиваются между собой, но дают бесплодные гибриды.

Основные методы геномного анализа: отдаленная гнбридизация и цитогенетический анализ, с помощью которого изучают конъюгацию хромосом в мейозе у гибридов для определения их гомо- и гомеологии. Используют также метод полиплоидии, биохимические методы и др.

Анализ генетической структуры популяций

Выявление генетической структуры популяций начинается с изучения их генетической гетерогенности при разных способах размножения. Для этого используют метод гибридологического анализа на основе инбридинга и изучения потомков инбредных поколений, в которых выявляются рецессивные гены, часто скрывающиеся в популяциях в гетерозиготах. Поскольку число и форма хромосом – это систематические видовые признаки, то для изучения хромосомного полиморфизма в популяциях исследуют кариотипы разных видов и их гибридов. Частоты генотипов, генов и аллелей в популяциях определяются на основе анализа результатов свободных скрещиваний и инбридинга. Для оценки полиморфизма широко используют биохимические и молекулярно-биологические методы, такие, как белковый электрофорез, ПДРФ-анализ и др.

Анализ мутаций

Закljučается в изучении спектра и частоты мутаций, возникающих спонтанно и при индуцированном мутагенезе. В зависимости от объекта применяют разные методы этих оценок. У низших эукариот для выделения и количественного учета мутаций используют методы отпечатков и селективные среды, молекулярно-генетические методы. У диплоидов рецессивные мутации могут проявляться только в поколениях. Для их анализа создают специальные линии-тестеры, маркированные различными мутациями и перестройками хромосом, препятствующими прохождению кроссинговера; используют цитогенетические методы и др.

Логика, принцип и этапы генетического анализа

В основе генетического анализа лежит следующая логика:



Где: 1 - вычленение признака; 2 - разложение признаков на фены; 3 - установление гена для каждого фена; 4, 5 - установление генного продукта и выяснение молекулярных механизмов его действия; 6 - расшифровка генетического контроля метаболических путей, обуславливающих развитие изучаемого признака.

Принцип анализа — получение наследственно различающихся по изучаемым признакам форм (создание генетических коллекций) и изучение этих различий на разных уровнях организации.

Основные этапы анализа генетического контроля выражения отдельных признаков:

- изучение наследования отдельных признаков для*
- 1) установления гена;*
 - 2) локализация установленных генов в группе сцепления и картирование;*
 - 3) расшифровка биохимических нарушений метаболизма в результате действия установленных генов, выяснение механизмов их действия и функций и анализ структуры генов.*

Данные о наследовании отдельных признаков используются при решении других задач генетического анализа (изучении генетической структуры организмов, геномный и популяционный анализ и др.).

На каждом этапе могут использоваться разные методы анализа.

Методы генетического анализа

Методы генетического анализа

- 1** *гибридологический;*
- 2** *генеалогический (метод анализа родословных);*
- 3** *близнецовый;*
- 4** *цитогенетический;*
- 5** *метод гибридизации соматических клеток;*
- 6** *группа молекулярно-генетических и биохимических методов.*

Гибридологический метод

Основной специфический метод генетического анализа был создан и разработан И. Г. Менделем в 1865 г.

Его основные особенности:

- 1. Для скрещивания подбираются (или создаются) гомозиготные исходные формы, различающиеся по одному или нескольким альтернативно, контрастно проявляющимся признакам.*
- 2. Проводится индивидуальный анализ потомства, от каждого скрещивания в ряду поколений.*
- 3. В каждом поколении ведется строгий количественный учет всех потомков по всем изучаемым признакам, причем отдельно по каждому признаку, независимо от других. Это — один из важнейших принципов анализа расщеплений. Обычно анализируют два или три (иногда больше) поколения различных скрещиваний.*

Реципрокные скрещивания — система из двух скрещиваний (прямое и обратное). В прямом скрещивании признак в одном из своих проявлений вносится со стороны матери, в обратном — со стороны отца.

прямое скрещивание



желтая
окраска зернах

зеленая
окраска зерна

обратное скрещивание



зеленая
окраска зерна

желтая
окраска зернах

Прямым можно называть любое из этих скрещиваний.

По результатам F_1 таких скрещиваний в большинстве случаев можно определить: характер генетической природы признака (ядерная или внеядерная), выявить сцепление признака с полом.

Внеядерное наследование проявляется в однородительском типе передачи — гибриды П. и О. скрещиваний похожи на мать — матроклинное наследование.

При ядерном наследовании результаты F_1 зависят от локализации гена в аутосоме или половой хромосоме, фенотип гибридов может зависеть от условий среды, от пола и др.

Анализ расщеплений в F_2 :

- *служит основой для предложения гипотез о числе генов, типе их взаимодействия и характере наследования.*

Анализирующее скрещивание — скрещивание с гомозиготной рецессивной формой, которая служит анализатором, так как образуется только один тип гамет с рецессивными аллелями, на фоне которых выявляются аллели анализируемой особи.

P: ♀  X ♂ 
желтая окраска зернах зеленая окраска зерна

F₁: все 

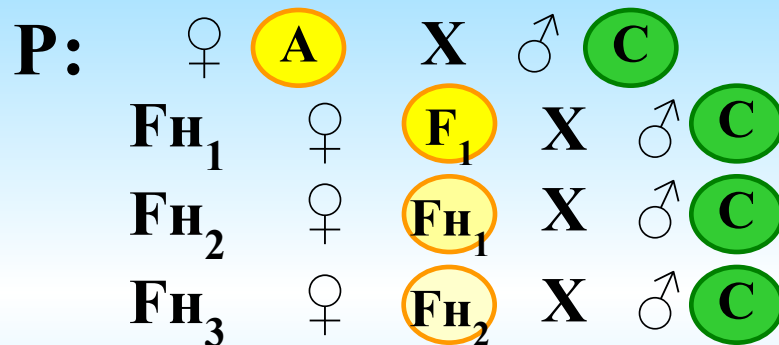
P: ♀  X ♂ 
желтая окраска зернах зеленая окраска зерна

F₁: 2  + 2 

На основе расщеплений в F₂ можно определять все, что и в F₁, кроме типа взаимодействия генов, но на меньшей по сравнению с F₂ выборке. Его используют для анализа наследования при сцеплении, для картирования хромосом и оценки частоты гамет, образуемых гетерозиготным родителем.

Возвратные скрещивания — скрещивания потомков с одним из родителей. В ряде случаев оно может оказаться анализирующим. Для решения ряда задач ставятся системы скрещиваний с участием нескольких форм.

Насыщающие или поглотительные скрещивания — последовательные скрещивания женских потомков нескольких поколений возвратных скрещиваний, имеющих цитоплазму, пришедшую от матери в исходном скрещивании, с исходной отцовской формой.



Эти скрещивания применяются, в частности, при изучении материнского эффекта цитоплазмы и других типов неядерного наследования.

Циклические скрещивания — система скрещиваний многих форм, различающихся или сходных по одному признаку, друг с другом во всех сочетаниях. Применяются для выявления генетического контроля признаков.

В диаллельных скрещиваниях также используется много форм, но анализ проводится по сокращенной схеме циклического скрещивания, используется лишь часть этих скрещиваний.

Например, исследуют только результаты прямых скрещиваний либо только обратные скрещивания и т.д. При этом родительские линии могут быть специально отобраны для проведения их оценки, либо случайно (для оценки параметров популяции). По результатам этих скрещиваний выявляют комбинационную ценность инбредных линий, которая проявляется в варьировании величины гетерозиса по отдельным гибридным комбинациям. Комбинационная ценность одной и той же линии может быть выражена средней величиной гетерозиса, наблюдаемого у всех гибридных комбинаций с этой линией — общая комбинационная способность, либо степенью гетерозиса в конкретной комбинации — специфическая комбинационная способность.

Генеалогический метод (метод анализа родословных)

Метод используют при изучении наследования признаков у человека или при работе с малоплодовитыми животными. При анализе родословных проводят описание фенотипов в семьях у нескольких поколений, учитывая проявление изучаемого признака у членов семьи разного пола, число потомков с этим признаком и лишенных его проявления, а также родственные отношения между всеми членами родословной.

На основе этого анализа устанавливают:

- наследуется ли признак;*
- одним или многими генами контролируется различие;*
- сцеплен ли признак с полом;*
- доминантность и рецессивность его проявления (в том случае, если наследование моногенное).*

Близнецовый метод

В основе метода лежит сопоставление сходства (конкордантности) и различий (дискордантности) по изучаемому признаку между близнецами в группах моно- и дизиготных близнецов и в популяции. Повышенная конкордантность монозиготных (однойцевых) близнецов по сравнению с дизиготными (двуйцевыми) служит указанием на наследственный характер признака. Таким образом, метод позволяет выявить, наследуется ли признак, и оценить относительную роль факторов среды в его проявлении.

Цитогенетический метод

Используют при обнаружении отклонений в расщеплениях, причина которых может быть связана с нарушением процесса протекания мейоза и митоза, особенностями конъюгации и расхождения хромосом, хиазмообразования, споро- и гаметогенеза; оплодотворения и т.д. Цитогенетические методы используют и для решения других задач генанализа. С помощью светового и электронного микроскопирования, цитофотометрии, гибридизации *in situ* изучают структурную организацию хромосом и их функционирование, роль в процессах дифференцировки; строят цитогенетические карты хромосом. Цитогенетические методы применяются для анализа структурных изменений хромосом, их классификации, изучения поведения в мейозе; для идентификации хромосом и кариотипирования; как экспресс-методы оценки действия различных факторов среды (цитогенетический мониторинг).

Метод гибридизации соматических клеток

Позволяет получить внутри- и межвидовые гибриды соматических клеток.

Метод используют для:

- определения группы сцепления и картирования хромосом;*
- исследования процессов активации генома покоящейся клетки;*
- анализа природы злокачественной трансформации клеток под действием онкологических вирусов;*
- изучения регуляции генов в клетках эукариот и т.д.*

*Для определения локализации генов в хромосоме применяют также метод гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*.*

Молекулярно-генетические и биохимические методы

- *изучение механизмов генетических процессов (Р, Р, Р, Т, Т и М);*
- *выявление полиморфизма внутри и межгенных участков ДНК;*
- *изучение механизмов действия отдельных генов и межгенных взаимодействий;*
- *выделение и клонирование генов;*
- *физическое картирование;*
- *идентификации и паспортизации сортов и т.д.;*
- *идентификация патогенов, возбудителей заболеваний;*
- *медицинская диагностика.*

Основные методы: гель-электрофорез белков и нуклеиновых кислот и сопутствующие им методы анализа, хроматографические методы фракционирования белков и продуктов метаболизма, ИФА; рестрикционный анализ, совершенствование методов клонирования, синтеза нуклеиновых кислот, секвенирования; создание библиотеки генов и т.д.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОЛЛЕКЦИИ

Генетическая коллекция - совокупность форм какого-либо вида, которые характеризуются наследственными различиями по одному или нескольким признакам.

Роль генетические коллекции:

- основа знаний о наследственной изменчивости, норме реакции отдельных генотипов и т.д.;*
- образцы коллекций являются эталоном сравнения при идентификации новых мутаций;*
- служит источником ценного исходного материала для селекции.*

Частная генетика любого вида строится на изучении и создании в процессе изучения генетической коллекции.

Коллекции растительного материала

однолетние растений - основной материал для хранения семян, которые пересевают с определенной периодичностью;

у перекрестников (перекрестноопыляющихся растений) часто собраны спонтанные мутанты, а также формы, выделенные из популяций при инбридинге; индуцированный мутагенез используется редко, так как выделению мутантов и анализу их по потомству препятствует существование у них генетической системы самонесовместимости;

у самоопылителей (самоопыляющихся растений) коллекции чаще всего составлены из сортов, инбредных линий; для получения новых мутаций широко применяется индуцированный мутагенез.

Коллекции многолетних растений как правило представлены живым материалом и семенами, к примеру коллекция плодовых культур представлена живым материалом – дикими формами и культурными сортами, подвоями дикарей и т.д. Сложности создания и сохранения коллекционных образцов у многолетних культур связаны с большой продолжительностью их жизненного цикла, гетерозиготностью и полиплоидностью многих видов, склонностью их к апомиксису, низкой всхожестью семян и др.

Коллекции животных

могут быть представлены породами, линиями, культурами тканей и клеток. Также достаточно широко используется хранение спермы, ооцитов и эмбрионов.

Коллекции грибов и бактерий

представлены генетически маркированными штаммами (мутанты ауксотрофные, дефектные по системам репарации, репликации, рекомбинации и т.д.), могут быть представлены в виде покоящихся спор, лиофилизированном виде, в замороженном (-20, -70 °C), в нативном, вегетативном состоянии на селективных средах.

Генетические коллекции создаются на базе университетов и институтов, селекционно-генетических и биотехнологических центров. .

Банки клеточных культур человека и животных

Приобрели большое значение в связи с возможностью сохранения их гибридом, возникающих при слиянии нормальных клеток лимфоцитов с миеломными клетками, придающими гибриdomам свойства миелом – способности неограниченного роста. Гибридомы используются для получения моноклональных антител. Клеточные культуры применяют для получения биологически активных веществ высокой чистоты, для определения антигенов гистонесовместимости при трансплантации, получения и тестирования лекарственных препаратов, новых веществ на токсичность, канцерогенность и т.д.

Сохраняют клеточные культуры путем консервации в жидком азоте.

Банки генов

Обширнейшие банки генов созданы благодаря успешному развитию методов получения рекомбинантных молекул ДНК. Такие банки представляют собой наборы клонов бактерий, содержащих рекомбинантные плазмиды, вирусы или хромосомные векторы, несущие фрагменты генома организма определенного вида.

Сведения о коллекциях систематически публикуются в виде каталогов и служат в качестве справочников при подборе исходного материала для селекционной работы и генетических исследований. В них дан перечень наименований и символов генов, описание типов их взаимодействия, характеристика плейотропного действия отдельных генов, жизнеспособности мутантов; приводятся генетические и цитологические карты, характеристика образцов и способов их размножения и поддержания в коллекции; список основных работ о генетике и цитологии объекта и др. важная информация.

Модельные объекты

Характеристики объекта исследования

Среди биологических характеристик, необходимых для грамотного проведения генетического анализа, важнейшими являются:

- жизненный цикл;*
- способ размножения;*
- продолжительность жизни и репродуктивного периода;*
- плодовитость.*

Кроме того, нужно знать условия нормального культивирования, реакцию на влияние средовых воздействий и т.д.

У эукариот (высших растений, животных, грибов, водорослей, простейших) различают две группы: одноклеточные и многоклеточные организмы.

Чередований их поколений происходит при размножении, которое может осуществляться как половым, так и бесполом путем.

Жизненные циклы

представляют собой чередование гапло- и диплофаз. У представителей разных групп и разных таксонов жизненные циклы отличаются в основном по продолжительности этих фаз. У ряда видов происходит чередование полового и бесполого типов размножения, у других, например у пчел и наездников, особи одного пола развиваются из неоплодотворенных яиц, их генеративные клетки гаплоидны и не претерпевают мейоза; особи другого пола развиваются из оплодотворенных яиц.

У эукариот (высших растений, животных, грибов, водорослей, простейших) различают две группы: одноклеточные и многоклеточные организмы. Чередований их поколений происходит при размножении, которое может осуществляться как половым, так и бесполым путем.

Половое размножение

При половом размножении происходит смена поколений благодаря развитию организмов из диплоидных зигот, возникающих при слиянии гаплоидных женской и мужской гамет.

Общая особенность полового размножения — наличие механизмов правильного распределения ядерного материала при смене фаз – митоза и мейоза. Половое размножение обеспечивает возможность обмена наследственной информацией и адаптацию к изменяющимся условиям среды.

Жизненный цикл и способ размножения определяют закономерности наследования признаков, тип зиготы, особенности рекомбинационных процессов, обеспечивают реализацию генетического определения пола, они обуславливают способ поддержания мутантов в генетических коллекциях.

Модельные объекты и их роль в генетическом анализе

Модельный объект – организм(ы), удовлетворяющие большинству требований экспериментатора при решении определенной генетической задачи, работа с которыми обеспечивает большую разрешающую способность анализа.

«Опыты над растительными гибридами», раздел: «Выбор подопытных растений» И.Г. Мендель, 1965:

*«...выбор растительной группы, которая будет служить опытам, должен быть сделан с наивозможной осторожностью, если мы не хотим подвергнуть риску сам успех опыта...»,
далее - качества, особенности растений, удобные для генетических опытов:*

- наличие у них константных альтернативно проявляющихся признаков;*
- хорошая плодовитость гибридов;*
- простота постановки скрещиваний;*
- сравнительно короткий период вегетации.*

Модельные объекты и их роль в генетическом анализе

Даже кратное знакомство с биологией некоторых объектов говорит о необходимости знания их биологических особенностей, что помогает и облегчает проведение генетического анализа, и позволяет грамотно подбирать исходный материал для скрещиваний, выбирать методы анализа, увеличивающие его разрешающую способность.

Пределом разрешения при генетическом анализе является возможность экспериментально определять наиболее близкие расстояния между мутациями и редкие частоты мутирования отдельных генов.

Задачи генетического анализа проще и быстрее решаются на модельных объектах, на которых проверяются гипотетические генетические модели, разрабатываются новые методы анализа, которые затем используются для других объектов; они служат тест-системами при оценке действия мутагенных и других факторов.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Айала Ф.* Современная генетика. В 3-х т. Т. 1-3: Пер. с англ. / Ф. Айала, Дж. Кайгер. М.: Мир, 1987.
2. *Глик Б.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. М.: Мир, 2002.
3. *Инге-Вечтомов С. Г.* Введение в молекулярную генетику / С. Г. Инге-Вечтомов. М: Высшая школа, 1983.
4. *Льюин Б.* Гены. Пер. с англ. / Б. Льюин. М.: Мир, 1987.
5. *Максимова Н.П.* Сборник задач по генетике / Максимова Н.П. Мн.: БГУ, 2008.
6. *Орлова Н.Н.* Генетический анализ / Орлова Н.Н. М.: Изд-во МГУ, 1991.
7. *Рыбчин В. Н.* Основы генетической инженерии / В. Н. Рыбчин Мн: Вышэйшая школа, 1986.
8. *Сингер М.* Гены и геномы. В 2-х т. Т. 1-2: Пер. с англ. / М. Сингер, П. Берг. М.: Мир, 1998.
9. *Серебровский А. С.* Генетический анализ / А. С. Серебровский. М.: Наука, 1970.
10. *Фадеева Т. С.* Сравнительная генетика растений. Учеб. пособие / Т. С. Фадеева, С. П. Соснихина, Н. М. Иркаева. Л.: Изд-во ЛГУ, 1980.
11. *Тихомирова М. М.* Генетический анализ / М. М. Тихомирова Л.: Изд-во ЛГУ, 1990.