



Современные аспекты генетического анализа

Лекция 5

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. Развитие представлений о гене как о единице мутации, рекомбинации и функции.
 - Опыты С. Бензера по картированию мутаций. Межаллельная комплементация.
 - Внутригенное картирование. Метод перекрывающихся делеций.
 - Опыты С. Бензера по картированию мутаций. Цис- транс- тест.
2. Генные мутации. Молекулярные механизмы возникновения генных мутаций.
3. Геномные мутации. Закономерности образования гамет.
4. Генетика популяций.

Теория гена

Развитие представлений о гене как о единице мутации, рекомбинации и функции

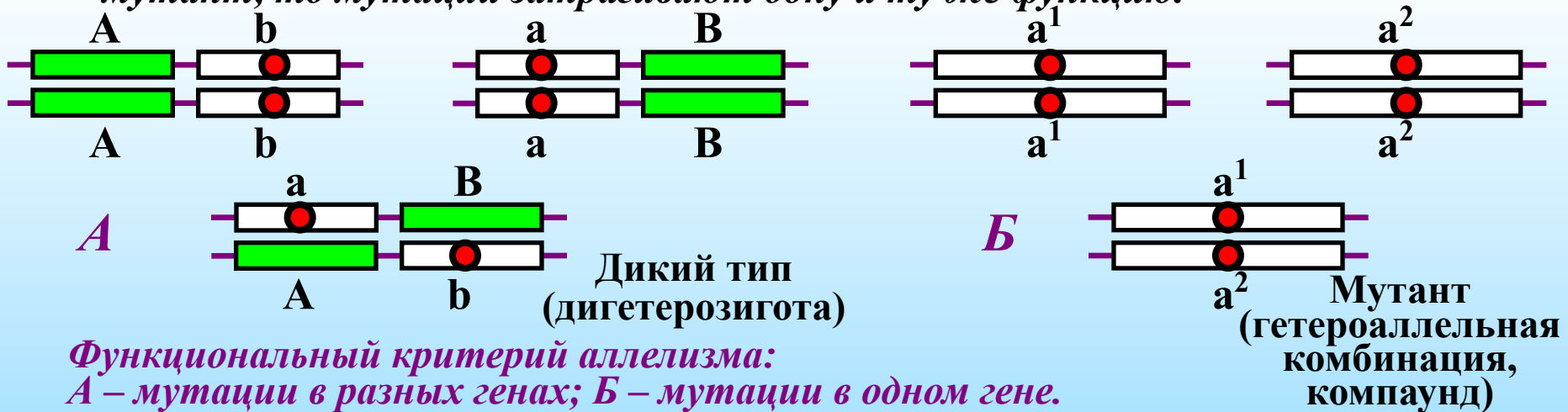
Ген – это структурная единица наследственной информации далее неделимая в функциональном отношении. Впервые термин «ген» ввел В. Л. Иогансен в 1909 году.

Существование гена, как дискретной единицы наследственной информации было постулировано Г. Менделем. Представления Т. Моргана о гене были изложены в классическом труде «Теория гена», 1926 г. Основные положения теории:

- Все признаки организмов находятся под контролем генов;
- Гены находятся в хромосомах;
- Гены представляют собой далее не делимые единицы мутации, рекомбинации и функции.

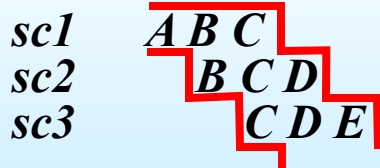
Для определения аллельности двух независимо возникших мутаций, т.е. установления затрагивают они один и тот же или разные гены, Т. Морган разработал критерии аллелизма:

- рекомбинационный – если мутации не рекомбинируют, то они аллельны;
- функциональный – если при скрещивании двух мутантов появляется гибрид дикого типа, то мутации затрагивают разные функции, если образуется мутант, то мутации затрагивают одну и ту же функцию.



Развитие представлений о гене как о единице мутации, рекомбинации и функции

А.С. Серебровский и его сотрудники в 1929-1930 гг. они впервые экспериментально доказали сложную структуру гена в работах по исследованию ступенчатого аллеломорфизма. Это явление было открыто при исследовании локуса *sc-ac*, который контролирует развитие щетинок на теле дрозофилы. Мутации в этом локусе приводят к редукции разных щетинок. Под действием X-лучей А. С. Серебровским и его сотрудниками был получен ряд мутантов по этому локусу. При скрещивании таких мутантов между собой у гетерозигот, как правило, отсутствовали лишь те щетинки, которые были редуцированы у обеих гомозиготных родительских особей. Так, если в результате мутации *sc1* редуцируются щетинки в участке *ABC*, а в результате мутации *sc2* редуцируются щетинки в участке *BCD*, то при скрещивании таких особей между собой у потомства в компаунде будут отсутствовать щетинки только в участке *BC*. При графическом изображении результатов скрещивания нескольких пар аллеломорфов получалась лестница, ступенями которой служили отдельные аллели. Это явление получило название «ступенчатый аллеломорфизм»:



Графическое изображение результатов скрещивания нескольких пар аллеломорфов.

Н.П. Дубининым был сделан вывод о том, что ген *sc* состоит из более мелких элементов – центров и при мутировании изменяется не весь ген, а только его центры.

Изучение ступенчатого аллеломорфизма показало, что ген не является единицей мутации и аллельные мутации способны рекомбинировать.

*Развитие представлений о гене
как о единице мутации, рекомбинации и функции*

От «псевдоаллелизма» к концепции «один ген – один фермент»

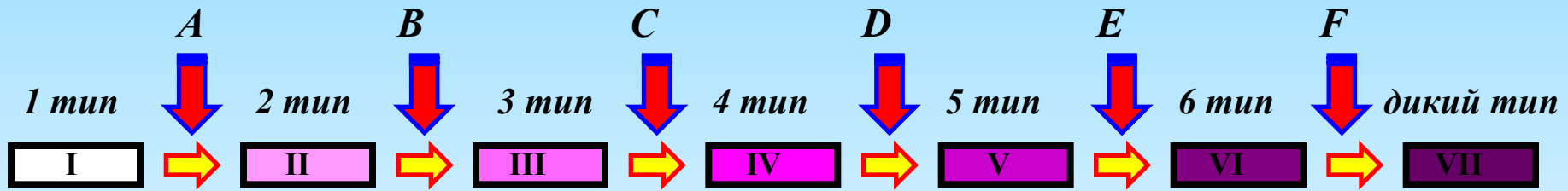
В 40-х годах прошлого века начали появляться работы М. Грина, К. Оливера, Е. Льюиса в которых была показана рекомбинация мутаций, которые в соответствии с функциональным тестом Моргана должны быть аллельными. Это противоречие между рекомбинационным и функциональным критерием аллелизма и отразилось в термине «псевдоаллелизм». Вначале предполагали, что псевдоаллелизм встречается только в исключительных случаях, но затем, с увеличением числа анализируемых особей в выборках, стало очевидным широкое распространение данного явления.

Большой вклад в развитие теории гена внесли Дж. Бидл и Е. Тейтум. В своей работе, вышедшей в 1941 г., они сформулировали концепцию «один ген – один фермент».

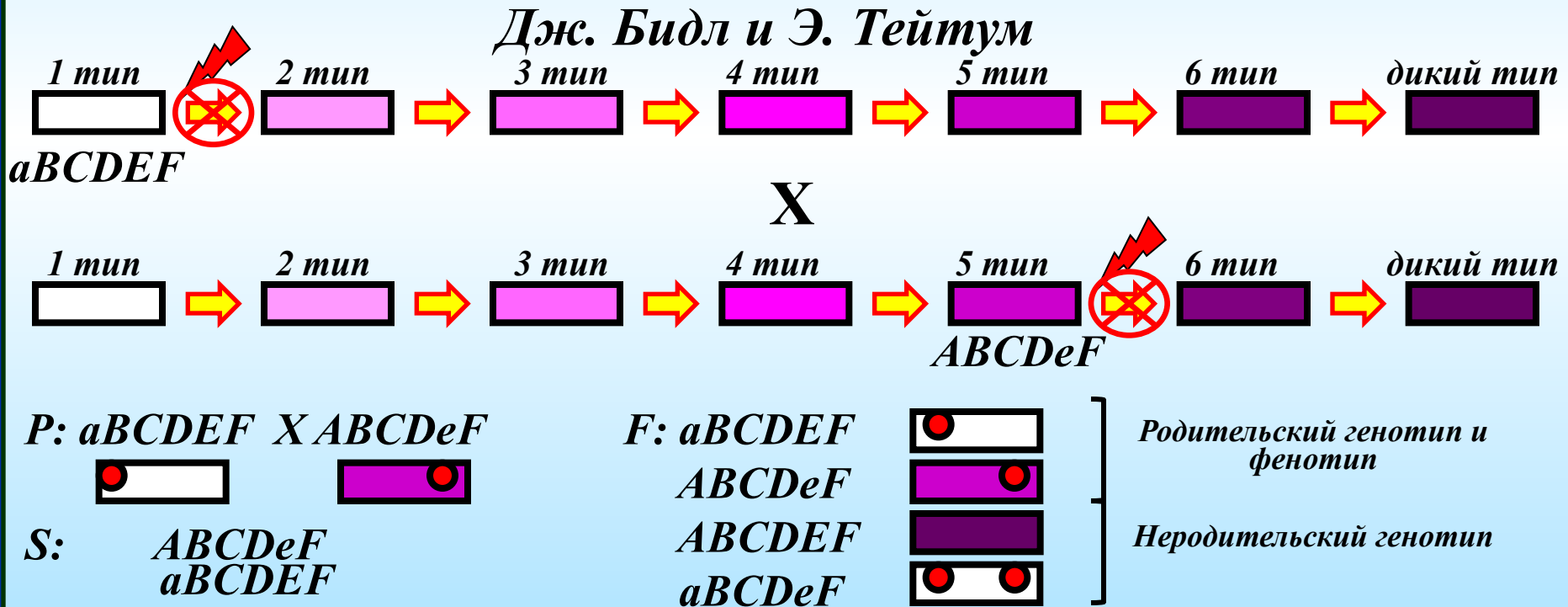
Дж. Бидл и Э. Тейтум облучали микроконидии нейроспоры рентгеновскими лучами, а затем высевали их на полноценную питательную среду. Выросшие колонии пересевали на минимальную среду. Ими было отмечено, что клетки некоторых колоний были не способны формировать колонии на минимальной среде (мутантные).

Дж. Бидл и Э. Тейтум установили, что каждая мутация блокирует синтез какой-либо вещества на одном из этапов. Эти мутации можно разбить на группы соответственно числу стадий в синтезе данного соединения. При этом мутации каждой группы аллельны друг другу, т. е. при скрещивании между собой они будут образовывать мутантные гибриды, тогда как при скрещивании мутантов из разных групп будут образовываться гибриды дикого типа.

Развитие представлений о гене как о единице мутации, рекомбинации и функции






Если ген кодирует синтез фермента какого-либо биосинтетического пути, то мутация в гене (например, гене *c*) может вызвать инактивацию фермента, и, соответственно, заблокировать синтез остальных промежуточных продуктов данного пути (соединений IV–VII).



Развитие представлений о гене как о единице мутации, рекомбинации и функции

Опыты С. Бензера по картированию мутаций

Огромным вкладом в развитие теории гена стали исследования С. Бензером локуса *rII* бактериофага T4 *E. coli*. Мутанты бактериофага T4 по локусу *rII* образуют на газоне *E. coli* В более крупные «фаговые бляшки», по сравнению с фагом дикого типа. Отличительной особенностью этих мутантов, по сравнению с фагом дикого типа является неспособность к размножению в клетках штамма *E. coli* K-12, лизогенного по фагу λ .

Тип колоний, образуемых фагом T4 на газоне <i>E. coli</i>		
Штамм	Генотип фага T4	
<i>E. coli</i>	дикий тип	мутант <i>rII</i>
В	 мелкие	 крупные
K-12	 мелкие	не образует

При инфицировании клеток *E. coli* K-12 фаголизатом, полученным при заражении клеток *E. coli* В двумя разными мутантами бактериофага T4 по локусу *rII*, на газоне возможно формирование бляшек фага дикого типа. Т.е., после инфекции бактериального штамма двумя мутантами *rII* в ходе репликации фаговых геномов могут образовываться рекомбинанты дикого типа. Частота появления этих рекомбинантов пропорциональна расстоянию между мутантными точками в геноме бактериофага.

Сложные аллельные отношения, возникающие при скрещивании двух мутантов и приводящие к появлению рекомбинантов в 1957 г. получили название межаллельная комплементация. Матрица межаллельной комплементации включает результаты всех проведенных скрещиваний. Если при скрещивании мутантов образуется гибрид дикого типа, то в соответствующей строке ставят знак «+», если образуется мутант – ставят знак «-». На основе функционального теста на аллелизм выяснилось, что локус *rII* включает два гена: А и В. В пределах этих генов было картировано более 2000 мутантов.

Бензер показал, что рекомбинация происходила на расстоянии около двух нуклеотидных пар и, очевидно, что рекомбинация может разделять соседние пары нуклеотидов, что наименьший участок ДНК, который изменяется мутации – нуклеотид (мутон), при рекомбинации – это пара нуклеотидов (рекон).

Опыты С. Бензера по картированию мутаций. Межаллельная комплементация

В таблице приведены результаты теста на комплементарность для десяти точковых мутаций. «+» – комплементация мутации; «-» – отсутствие комплементации. По результатам, приведенным в таблице, определите группы комплементации.

<i>Мутант</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>
<i>1</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>2</i>		-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>3</i>			-	-	-	+	+	-	-	+
<i>4</i>				-	-	+	+	-	-	+
<i>5</i>					-	+	+	-	-	+
<i>6</i>						-	-	+	+	+
<i>7</i>							-	+	+	+
<i>8</i>								-	-	+
<i>9</i>									-	+
<i>10</i>										-

Решение.

Анализируем поочередно горизонтальные строки.

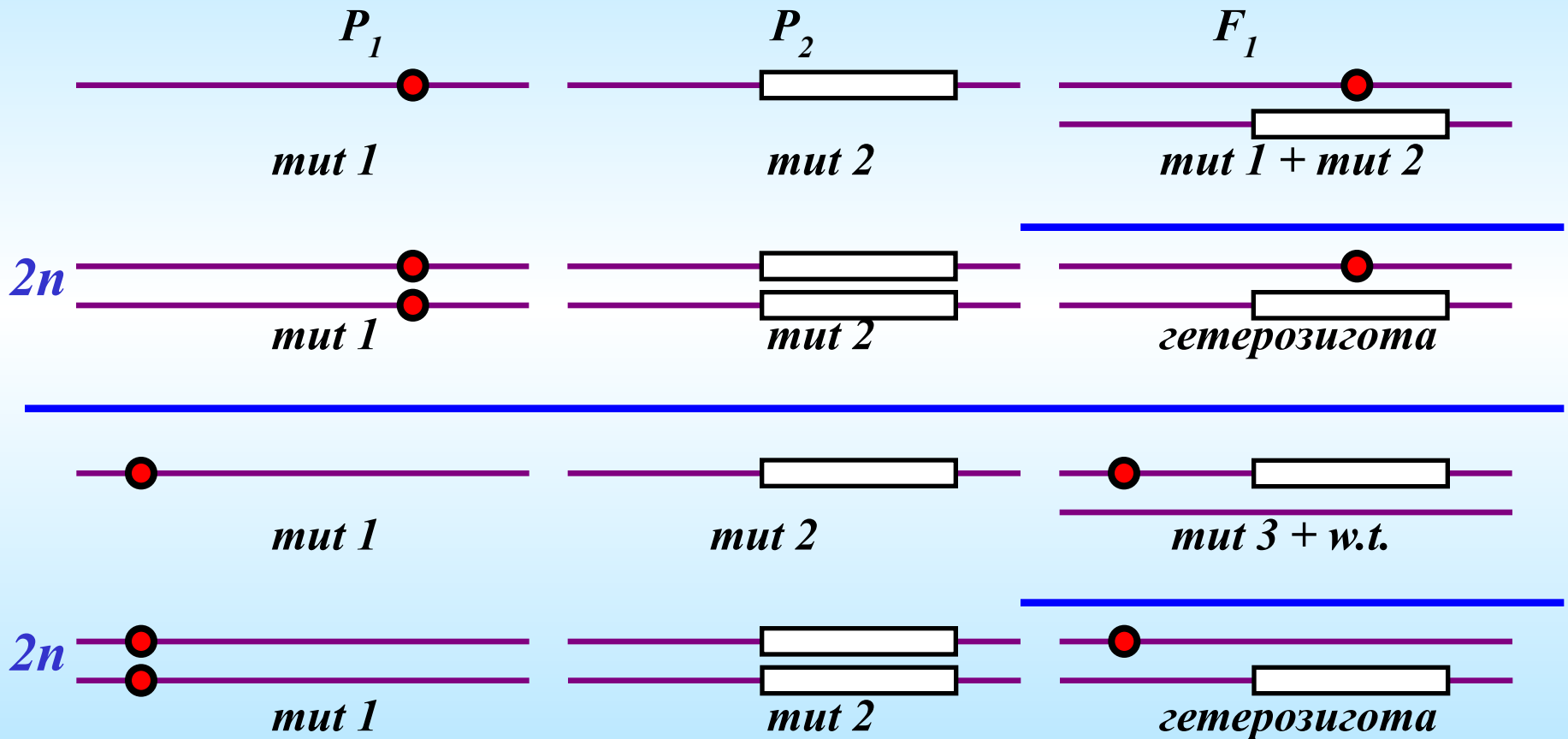
1. Мы видим, что при скрещивании мутанта 1 с мутантом 6 и 7 не происходит комплементации мутации (знак «-»), следовательно, эти мутации затрагивают одну область гена, поэтому мы можем отнести эти мутации к одной группе комплементации. При скрещивании мутанта 1 с мутантом 2, 3, 4, 5, 8, 9 и 10 происходит комплементации мутации (знак «+»), следовательно, эти мутации затрагивают разные области гена, поэтому мы можем отнести эти мутации к другой группе комплементации.

И так далее...

Ответ. Группа 1 – мут. 1, 6, 7; группа 2 – мут. 2, 10; группа 3 – мут. 3, 4, 5, 8, 9.

Опыты С. Бензера по картированию мутаций. Метод перекрывающихся делеций

Для точной локализации мутации Бензер использовал не только скрещивание точковых мутантов между собой, но и метод перекрывающихся делеций. При скрещивании точкового и делеционного мутантов рекомбинанты появляются только тогда, когда делеция не затрагивает участок, в котором локализована точковая мутация.



Опыты С. Бензера по картированию мутаций. Цис- транс- тест

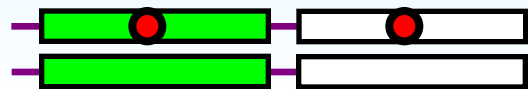
С. Бензер попытался ревизовать и понятие «ген». Для выяснения затрагивают ли две мутации одну и ту же или разные единицы функции он предложил использовать цис-транс-тест, изобретенный Е. Льюисом. Согласно этому тесту мутации попарно испытывают в гетерозиготе в двух конфигурациях: цис – когда обе мутации в гибриде происходят от одного родителя, и транс – когда они поступают в гибрид от разных родителей.

Конфигурация
мутаций
в гетерозиготе

Разные
функциональные
единицы

Одна
функциональная
единица

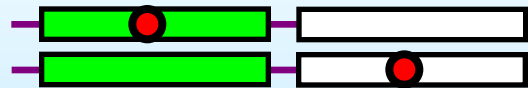
цис



дикий тип

дикий тип

транс



дикий тип

мутант

Согласно С. Бензеру, если цис- и транс-гетерозигота имеют одинаковый (дикий) фенотип, то мутации затрагивают разные единицы функций, а если цис- и транс-гетерозиготы разного фенотипа (цис – дикий, а транс – мутантный), то мутации затрагивают одну единицу функции, которую он предложил называть цистроном.

Генные

мутации

Генные мутации

Генные мутации – это наследственно закрепленные изменения генетического материала на уровне отдельных генов.

Используют:

- для идентификации генов;
- для картирования хромосом и генов;
- для установления функций гена, последовательности этапов биосинтетического пути,
- в селекционной практике.

Кроме того, с помощью генных мутаций изучают механизмы спонтанного и индуцированного мутагенеза, оценивают специфичность действия мутагенов, исследуют роль репликации, репарации и рекомбинации в мутационном процессе.

Генные мутации бывают:

- **прямые** - приводящие к мутантному фенотипу;
- **реверсии** - приводящие к дикому типу.

Если после мутагенеза восстанавливается исходная пара нуклеотидов, мутация называется обратной или истинной реверсией, если же восстановление дикого типа обеспечивается мутацией в другом участке гена или за его пределами, то мутация носит название супрессорной (внутригенная или внегенная супрессия, соответственно). Возможность получения ревертантов служит важной характеристикой, позволяющей отличить замены пар оснований в гене от вставок или делеций.

Генные мутации

Изучение генных мутаций может осуществляться на трех уровнях:

- 1 – на молекулярном уровне (на уровне ДНК или РНК);*
- 2 – на уровне белка;*
- 3 – на уровне признака.*

Спонтанные и индуцированные мутации.

Спонтанные мутации возникают в процессе репликации ошибочных оснований, которые появляются в ДНК в результате повреждения оснований – апуринизации, дезаминирования или их окисления. Возникающие при этом мутации могут быть транзициями (замена пурина на пурин) или трансверсиями (замена пурина на пиримидин, или наоборот). Спонтанные мутации могут возникнуть также в результате случайной потери или вставки дополнительного нуклеотида в ходе репликации ДНК.

Индуцированные мутации возникают при направленном воздействии агентов различной природы. Индуцируют появление мутации физические факторы: УФ-свет, γ -лучи, СВЧ и химические агенты: нитрозогуанидин (НГ), нитрозометилмочевина, этилметансульфонат, HNO_2 , 5-бромурацил, 2-аминопурин, акридиновые красители и т.д.), а также транспозоны и некоторые вирусы. Радиация чаще всего вызывает разрывы молекулы ДНК, образуящиеся либо в результате прямого действия лучей, либо опосредованно под действием возникающих в клетке радикалов. УФ-свет, в основном, индуцирует образование пиримидиновых димеров. Химические агенты действуют на ДНК различными способами: они могут вызывать дезаминирование, алкилирование оснований, что приводит к замене пар оснований, а также индуцировать выпадение и вставки отдельных нуклеотидов.

В соответствии с этим, индуцированные мутации могут быть транзициями, трансверсиями, вставками и выпадениями нуклеотидов.

Типы мутации, вызываемых мутагенами

Мутаген	Тип мутации	Переходы, проявления
НГ	Транзиции, трансверсии	ГЦ→АТ, ГЦ→ЦГ, ГЦ→ТА
Этилметансульфонат Нитрозометилмочевина	Транзиции, трансверсии	ГЦ→АТ, ГЦ→ЦГ, ГЦ→ТА
Азотистая кислота	Транзиции	ГЦ→АТ, АТ→ГЦ
5-бромурацил 2-аминопурин	Транзиции	ГЦ→АТ, АТ→ГЦ
Гидроксиаламин Афлатоксин	Транзиции, трансверсии	ГЦ→АТ, ГЦ→ТА
Акридиновые красители	Вставки и выпадения нуклеотидов	Сдвиг рамки считывания
ICR-170 (акридин-иприт)	Вставки и выпадения нуклеотидов	Все возможные замены пар оснований
УФ-свет	Пиримидиновые димеры	

При анализе генных мутаций на уровне ДНК необходимо помнить, что повреждение нуклеотидов может быть как в кодирующей, так и в некодирующей нити ДНК.

В молекуле ДНК транскрибируется 3'→5' нить (матричная нить), в результате образуется 5'→3' нить мРНК, трансляция которой начинается на 5'-конце с АУГ кодона. В соответствии с этим матричная нить ДНК (3'→5') называется смысловой, а комплементарная нить ДНК (5'→3') – антисмысловой.

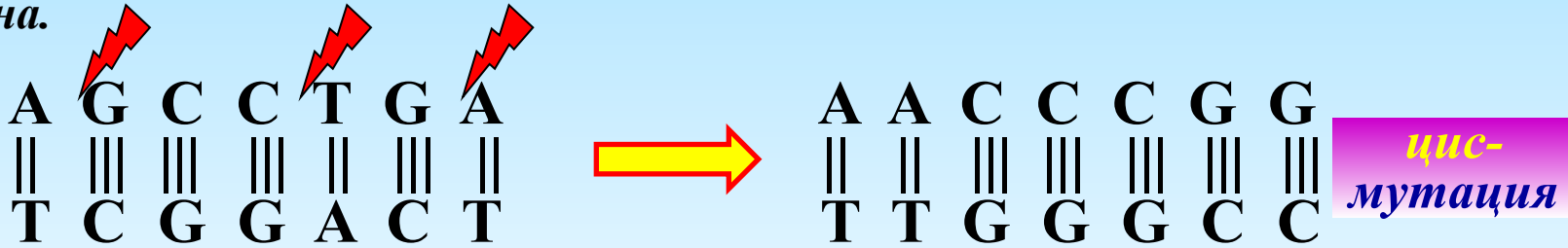
Поскольку антисмысловая нить ДНК идентична синтезированной мРНК (за исключением того, что в ДНК – тимины, а в РНК – урацилы), она называется кодирующей, а смысловая, соответственно, некодирующей.

Для того чтобы определить аминокислотную последовательность полипептида по нуклеотидной последовательности мРНК используют таблицу генетического кода.

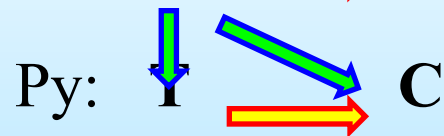
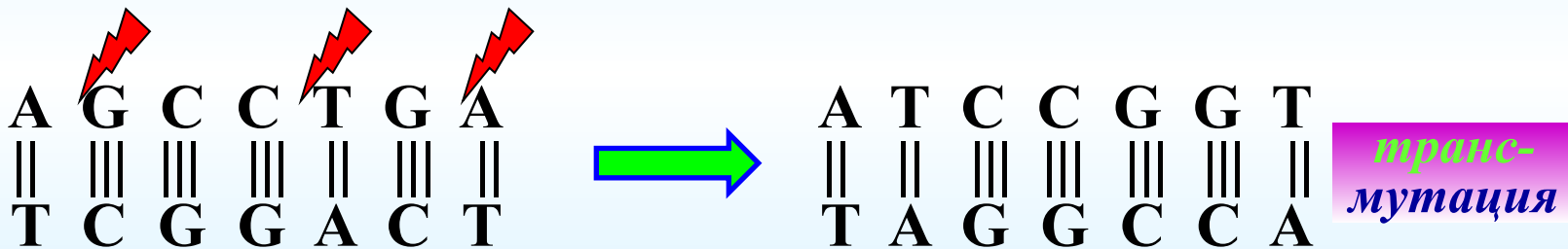
**Молекулярные механизмы
возникновения
генных мутаций**

Типы генных (точечных) мутаций

Транзиции (транзиционные мутации) – мутации, при которых происходит замещение одного пурина на другой, либо одного пиримидина на другой, либо замена одной пары оснований на другую при сохранении исходной ориентации пурина и пиримидина.



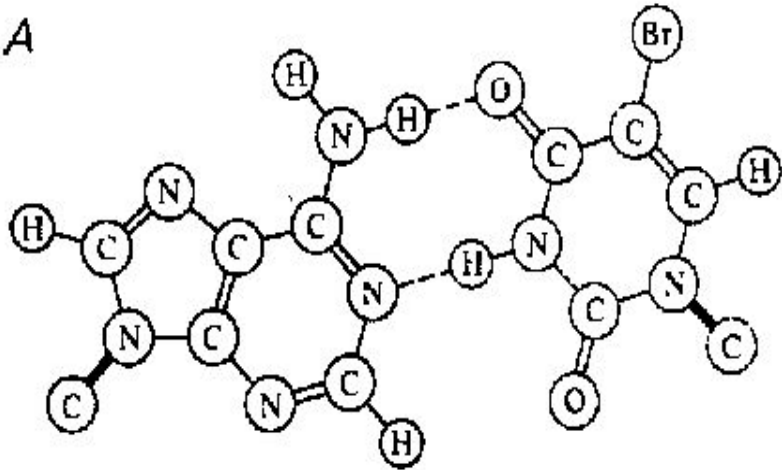
Трансверсии (трансверсионные мутации) – мутации, при которых происходит замещение пурина пиримидином или наоборот, либо замена одной пары оснований на другую, имеющую обратную ориентацию пурина и пиримидина (A/T – T/A, C/G).



Вставка, выпадение пары нуклеотидов – мутации, при которых происходит количественное изменение числа пар оснований в последовательности нуклеиновой кислоты.

Механизм мутантного действия 5-бромурацила

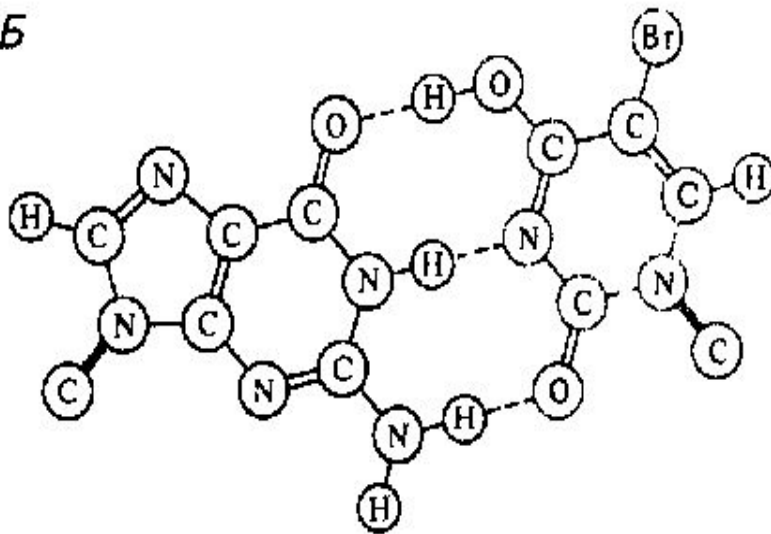
А



Аденин (А)

5-бромурацил (ВU)
(нормальная кетоформа)

Б



Гуанин (G)

5-бромурацил (ВU)
(редкая енольная форма)

Существуют два механизма, приводящие к транзициям:

ошибка репликации (A/T → G/C)

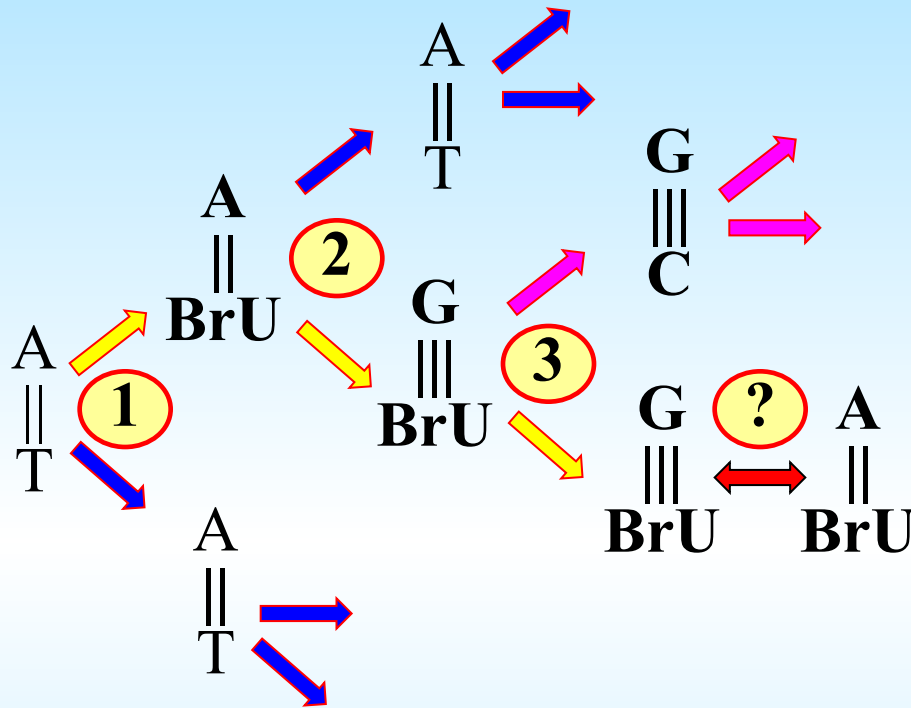
5-бромурацил включается в ДНК вместо тимина и образует пары с аденином (норма). При репликации такой ДНК возможен переход 5-бромурацила из кето- в енольную форму и ошибочное спаривание с гуанином, а при возвращении в кетоформу повторное спаривание с аденином.

ошибка включения (G/C → A/T)

5-бромурацил находясь в енольной форме включается в ДНК вместо цитозина и образует пары с гуанином. При репликации такой ДНК 5-бромурацил возвращается из енольной в кетоформу и спаривается с аденином.

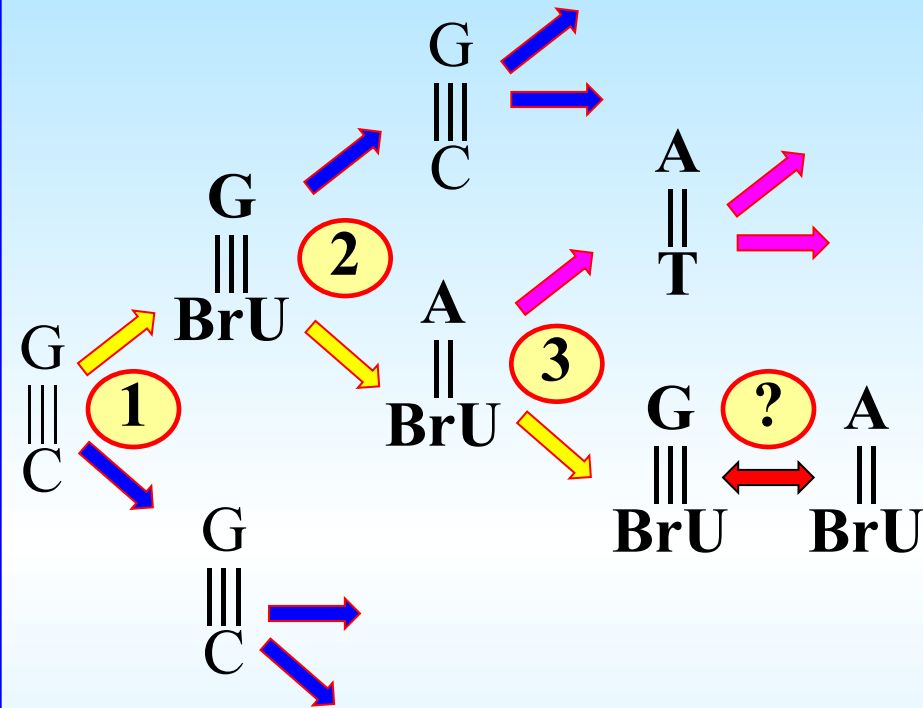
Механизм мутантного действия 5-бромурацила

ошибка репликации (A/T → G/C)



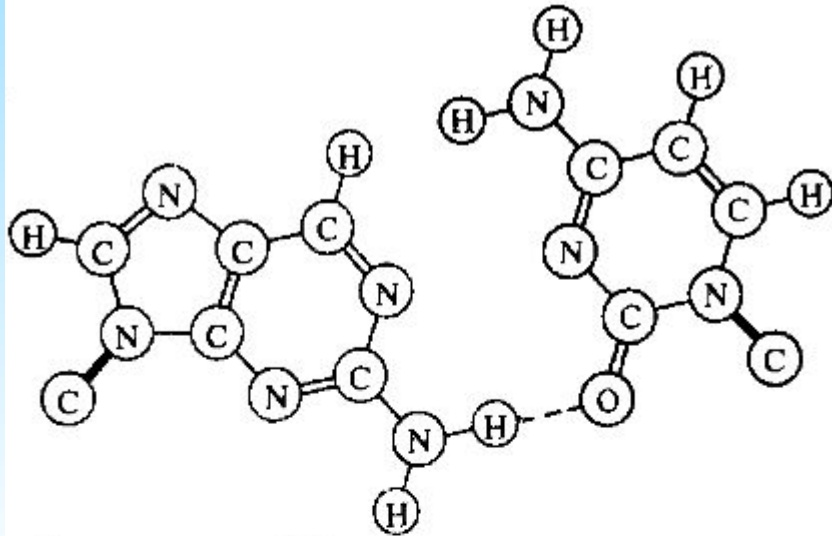
1) при первом цикле репликации BrU включается на место T;
 2) находясь в нехарактерной енольной форме BrU спаривается с G;
 3) в следующем (минимум третьем) цикле репликации G нормально спаривается с C, завершается переход **A/T → G/C**.

ошибка включения (G/C → A/T)



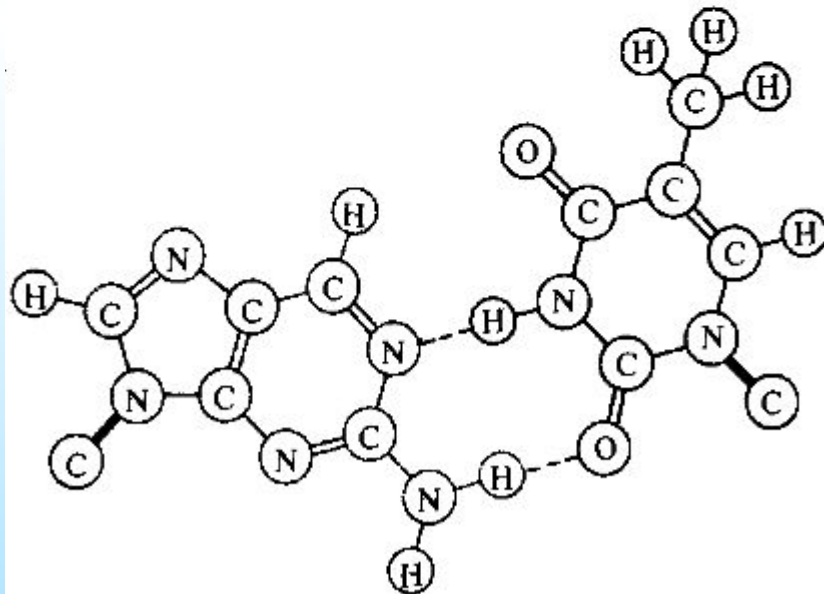
1) при первом цикле репликации BrU находясь в редкой енольной форме ошибочно спаривается с G;
 2) в кетоформе BrU спаривается с A;
 3) в следующем (минимум третьем) цикле репликации A нормально спаривается с T, завершается переход **G/C → A/T**.

Механизм мутантного действия 2-аминопурина



2-аминопурин (AP)

Цитозин (С)



2-аминопурин (AP)

Тимин (Т)

Существуют два механизма, приводящие к транзициям:

ошибка репликации (A/T → G/C)

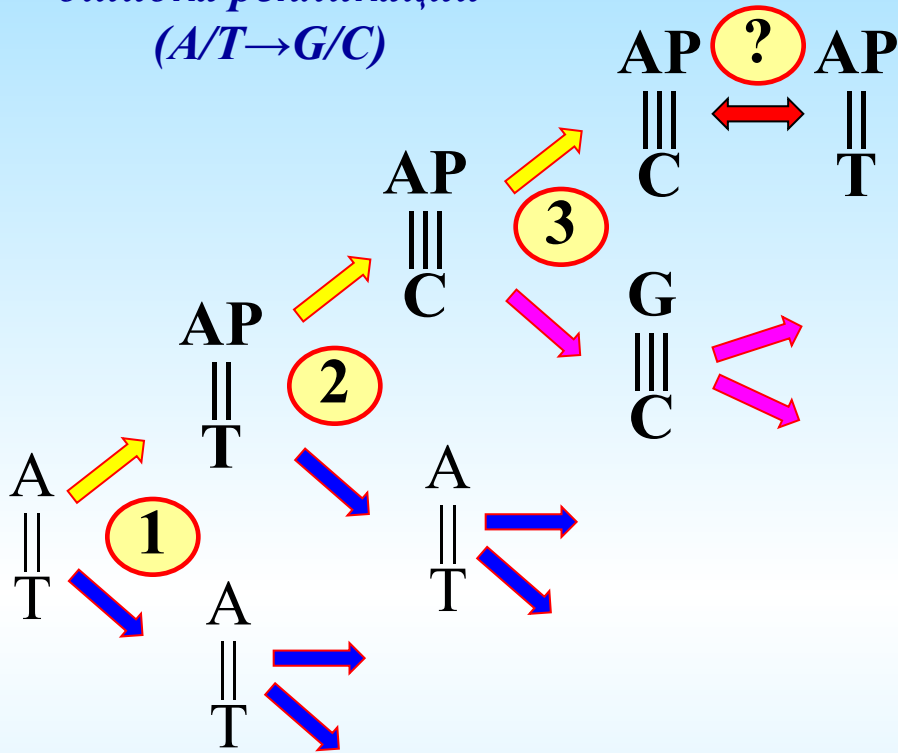
2-аминопурин в аминформе включается в ДНК вместо аденина и образует пары с тиминном (норма). При репликации такой ДНК возможно ошибочное спаривание 2-аминопурина (в иминоформе) с цитозином, а при реверсии повторное спаривание с тиминном.

ошибка включения (G/C → A/T)

2-аминопурин в иминоформе при включении в ДНК может ошибочно спариться с цитозином, занимая место гуанина. При репликации такой ДНК 2-аминопурин переходит в аминформу и восстанавливает нормальное спаривание с тиминном.

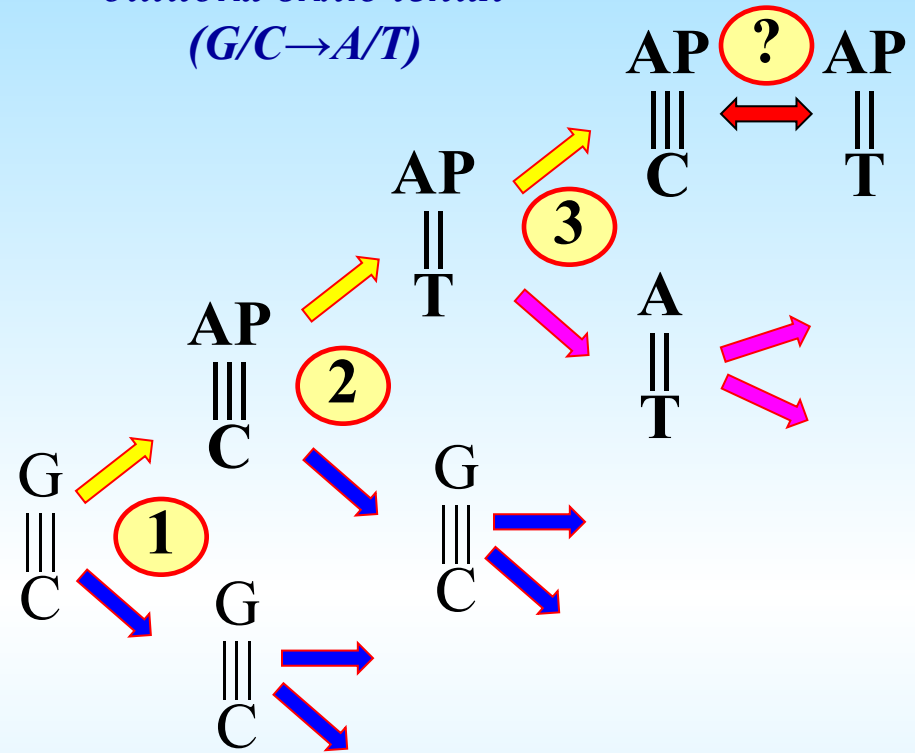
Механизм мутантного действия 2-аминоурурина

ошибка репликации (A/T → G/C)



1) при первом цикле репликации АР включается на место А;
 2) находясь в возбужденном состоянии ошибочно спаривается с С;
 3) в следующем (минимум третьем) цикле репликации С нормально спаривается с G, завершается переход **A/T → G/C**.

ошибка включения (G/C → A/T)

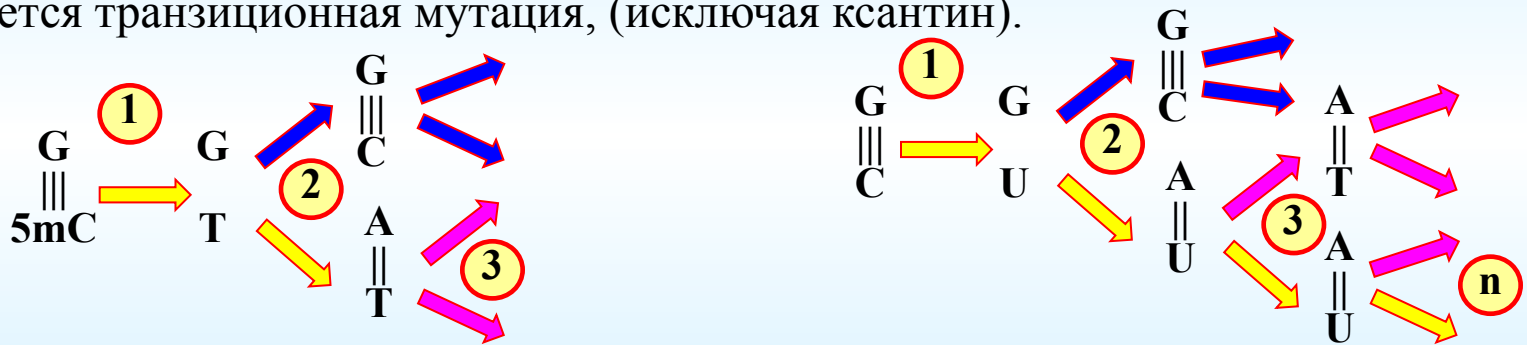


1) при первом цикле репликации АР находясь в возбужденном состоянии ошибочно спаривается с С;
 2) АР (норма) спаривается с Т;
 3) в следующем (минимум третьем) цикле репликации Т нормально спаривается с А, завершается переход **G/C → A/T**.

Причины спонтанных мутаций

Апуринизация – потеря нуклеотидом пуринового основания вследствие разрыва фосфодиэфирной связи между основанием и остатком дезоксирибозы, что приводит к образованию «апуринового сайта», напротив которого при следующем акте репликации в синтезирующейся нити ДНК встраивается любой нуклеотид (чаще всего аденин), что в конечном итоге приводит к возникновению мутации. Наиболее характерный пример для спонтанной транзиции G/C меняется на A/T.

Спонтанное дезаминирование нуклеиновых кислот – удаление аминогруппы у дезоксирибонуклеотидов, вызывающее изменение их свойств и их ошибочное спаривание. Так, дезаминирование превращает цитозин в урацил, 5-метилцитозин в тимин, гуанин в ксантин, который спаривается с цитозином. В ходе следующих актов репликации вместо пары G/C в ДНК появляется пара A/T, т.е. Наблюдается транзиционная мутация, (исключая ксантин).

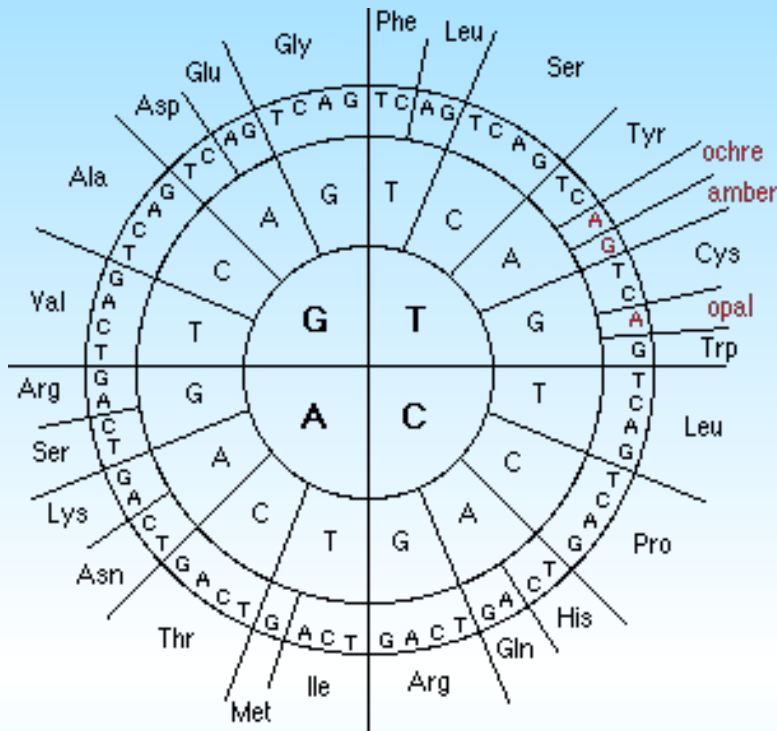


Таутомеризация оснований как причиной возникновения спонтанных мутаций.

Известно, что азотистые основания могут находиться в четырех формах:

- кето- и енольной (характерно для тимина и гуанина);
 - амино- и иминоформе (характерно для цитозина и аденина).
- Кето- и аминоформа являются нормой, а переход оснований в енольную или иминоформу приводит к образованию неправильных пар и вызывает мутации типа замены пар оснований. Тимин в енольной форме в ходе репликации ошибочно спаривается с гуанином, гуанин в енольной форме – с тиминам, цитозин в иминоформе – с аденином, аденин в иминоформе – с цитозином.

Характер проявления генных мутаций



По характеру проявления на уровне белкового продукта генные мутации классифицируют как миссенс и нонсенс-типа.

В случае возникновения **миссенс мутации** замена пары нуклеотидов приводит к замене аминокислоты в белке и снижению или утрате его функции.

При возникновении **нонсенс мутации** замена нуклеотида в ДНК приводит к образованию бессмысленного кодона в мРНК (**стоп-кодона**) - **UAG**, **UAA** или **UGA**, что вызывает преждевременную остановку трансляции, и как следствие – к формированию abortивного белка. Добавление или выпадение одного или двух нуклеотидов вызывает мутации со сдвигом рамки считывания (**frame-shift**), в результате чего изменяется последовательность нуклеотидов в ДНК, а также смысл кодонов в мРНК, и, следовательно, правильное считывание полипептида в процессе трансляции

На молекулярном уровне генные мутации могут проявляются в изменении последовательности нуклеотидов в ДНК, смысла считываемой последовательности мРНК, рРНК или тРНК, и, как результат этого, изменению аминокислотной последовательности синтезируемых полипептидов, либо полной остановке их синтеза.

Анализ генных мутаций **на уровне признака** производится путем исследования их фенотипов. Генные мутации могут быть доминантными и рецессивными. Для некоторых генов характерно явление множественного аллелизма. В гетерозиготном состоянии генные мутации могут находиться в аллельных взаимодействиях – доминантно-рецессивном, неполном доминировании и кодоминировании. Иногда генные мутации в гомозиготном состоянии могут вызывать летальный эффект.

Генные мутации наследуются согласно законам Г. Менделя (при отсутствии сцепления), сцеплено с полом (при локализации в X- или Y-хромосоме), или сцеплено (в зависимости от их расположения на хромосоме относительно друг друга). При экстрахромосомальной локализации генные мутации наследуются согласно принципам внехромосомного наследования.

Методы выявления генных мутаций

Выявление мутационных изменений связано с рядом трудностей, обусловленных следующими факторами:

- большинство мутаций рецессивны, и могут проявляться только в гомозиготном либо гемизиготном состоянии, следовательно приходится получать несколько поколений потомков организмов, подвергнутых воздействию мутагена;
- не всегда фенотипическое изменение является результатом мутации: оно может быть результатом рекомбинационного события;
- изменения фенотипа могут быть связаны не с мутациями, а с морфозами и модификациями.

Наглядные и достаточно простые методы обнаружения различного рода генных гаметических мутаций (летальных и видимых) были разработаны Меллером в 1927 г. (за что он и был удостоен Нобелевской премии).

Общие правила:

Используются специально созданные линии-анализаторы, которые в своих генотипах содержат инверсии, блокирующие кроссинговер, благодаря чему вновь возникшая мутация всегда наследуется с хромосомой, полученной от мутагенизированной особи. В ряде случаев линии содержат сбалансированные летали, позволяющие неограниченно долго сохранять летальные и другие мутации в сбалансированной хромосоме.

- самцов, подвергнутых мутагенной обработке в возрасте 3-5 дней, скрещивают с самками того же возраста из линии-анализатора (более молодые самцы – разная чувствительность к мутагену, самки – замедлена яйцекладка);
- через двое суток мух удаляют (на третий день в оплодотворении участвуют половые клетки, находящиеся на стадии сперматид в момент обработки самцов);
- через 9-10 дней (24-25С) начинается анализ мух F_1 ;
- индивидуальные скрещивания, анализ F_2 в течение 9-10 дней (культуры просматриваются ежедневно).

Выявление рецессивных летальных и видимых мутаций, возникающих в X хромосоме зрелых сперматозоидов самцов дрозофилы

Метод Меллер-5

Линия анализатор содержит две инверсии. Протяженная инверсия sc^8 захватывает большую часть X-хромосомы. Для предотвращения возможного кроссинговера в этой инверсии в нее введена другая более короткая $\delta 49$, подавляющая кроссинговер в средней части X хромосомы, что приводит к полному блоку кроссинговера в X хромосоме. Инверсии не влияют на жизнеспособность мух, линия Меллер-5 дополнительно маркируется видимыми мутациями (w^a -apricot – абрикосовые глаза и B-Bar – полосковидные глаза).

P: ♀♀ $w^aB//w^aB$ × ♂♂ $++//\text{—}$

Gp: w^aB ++ +*+ —

F₁: ♀♀ $w^aB//++$ ♂♂ $w^aB//\text{—}$ ♀♀ $w^aB//+*+$

GF₁: w^aB ++ w^aB — w^aB +*+

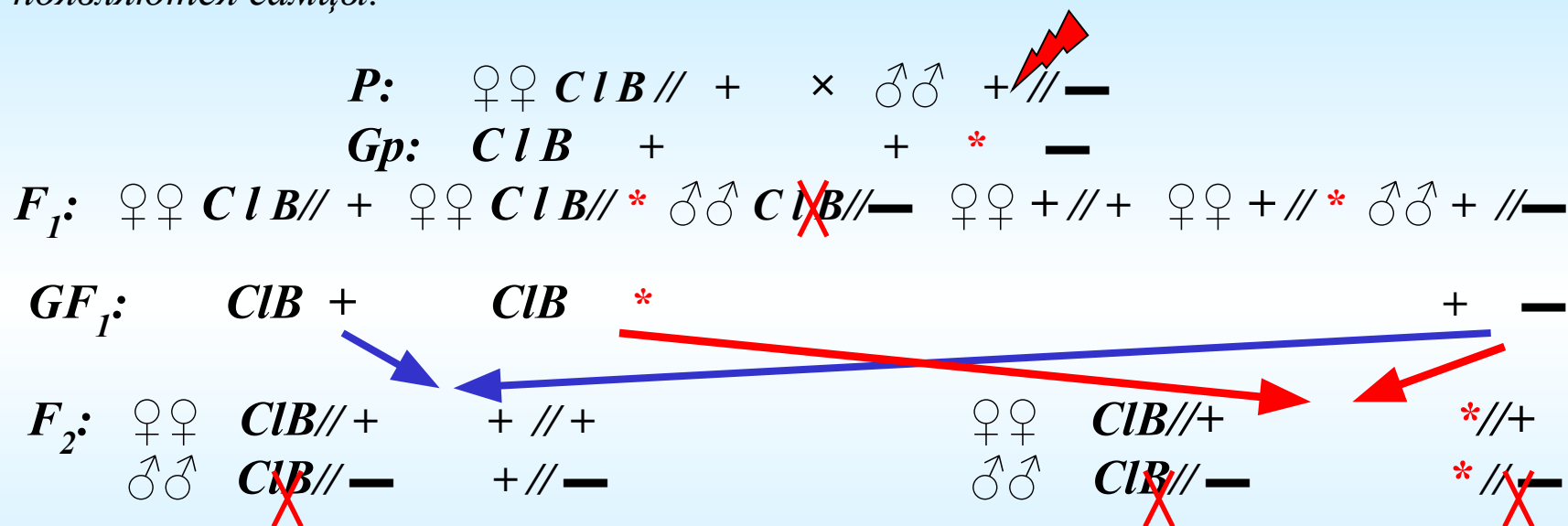
F₂: ♀♀ $w^aB//w^aB$ $w^aB//++$ ♀♀ $w^aB//w^aB$ $w^aB//+*+$
 ♂♂ $w^aB//\text{—}$ ++ // — ♂♂ $w^aB//\text{—}$ +*+X//—

Самцы первого поколения имеют фенотип линии Меллер-5. У самок глаза красные, более узкие чем у мух дикого типа (неполное доминирование гена B), каждая из них имеет одну X хромосому, пришедшую от отца. В этой хромосоме может быть локализована рецессивная мутация. У большинства самок мутация отсутствует. Анализ индивидуальных скрещиваний самок из F₁ с самцами из линии Меллер-5 позволяет выявить мутацию по характеру расщепления в F₂. В случае отсутствия нормальных самцов самки из F₂ повторно скрещиваются с самцами из линии Меллер-5.

Выявление рецессивных летальных и видимых мутаций, возникающих в X хромосоме зрелых сперматозоидов самцов дрозофилы

Метод ClB

Линия анализатор содержит протяженную инверсию, захватывающую большую часть X-хромосомы, мутацию V-Bar – полосковидные глаза и рецессивную леталь в гетерозиготном состоянии, поэтому в F1 не образуется самцов ClB, а в F2 появляются только нормальные самцы, если в X хромосоме нет летали. Если в X хромосоме полученной самками F1 от мутагенизированного самца есть леталь, то в F2 вообще не появляются самцы.



Метод ClB используется не очень часто, так как нет полного «запирания» кроссинговера.

Поскольку мутация событие достаточно редкое, при постановке конкретного опыта важно оценить, какое количество самцов следует облучить и какое количество культур нужно поставить. Очевидно, что увеличение числа обработанных самцов и культур увеличивает вероятность выявления мутаций. Частота мутации определяется как доля X хромосом, несущих мутацию, от общего числа проанализированных.

Учет генных мутаций

При проведении количественного учета генных мутаций используют два основных приема: определение частоты появления мутаций и скорости мутирования.

Частота мутаций определяется величиной, с которой мутация определенного типа обнаруживается в популяции клеток или целых организмов. Клеточной популяцией при этом могут быть гаметы, споры или любые другие типы клеток.

Частота мутаций выражается формулой:

$$a = n / N * 100 \%$$

где n – число мут. клеток (организмов), а N – общее число анализируемых клеток.

Скорость мутирования характеризует частоту появления мутаций в гене или геноме за определенный промежуток времени. Эта величина определяется как число мутаций на ген (геном) на генерацию (клеточное деление) или поколение и равна:

$$m = n / (N * g) * 100 \%$$

где n – число мутантных клеток, N – общее число анализируемых клеток, а g – число генераций, которое прошло от первого деления клетки до момента проведения анализа. Число N может быть также выражено формулой: $N = 2^g$.

Пример решения задач.

Пусть бактериальная колония состоит из 1024 клеток. Среди них 1,5% клеток являются мутантными. На каком цикле клеточного деления (генерации) возникла мутация?

1. Определяем общее число генераций: $g = \log_2 1024 = 10$.
 2. Определяем количество мутантных клеток: $1024 * 0,015 = 16$.
 3. Определяем число генераций мутантных клеток: $g = \log_2 16 = 4$.
- Ответ: мутация возникла на 6-й генерации ($10 - 4 = 6$).

Геномные мутации

Типы геномных мутаций

Геномные мутации – мутации, изменяющие структуру и состав генома в целом, т. е. изменение числа хромосом у особи, ведущее к полиплоидии (эуплоидии), если происходит увеличение нормального числа целых геномов, или анеуплоидии, если изменение числа хромосом не равно нормальному гаплоидному набору хромосом.

Эуполиплоидия - кратное гаплоидному изменение количества хромосом.

Анеуплоидией – изменение количества отдельных хромосом.

Полиплоиды классифицируются следующим образом:

- автополиплоиды, возникающие на основе умножения геномов одного вида;
- аллополиплоиды, возникающие на основе умножения геномов разных видов при их гибридизации: регулярные и нерегулярные, когда один или несколько хромосомных наборов представлены однократно, а остальные многократно.

В зависимости от числа умноженных геномов различают три-, тетра-, пентаплоиды и т.д. У полиплоидов часто снижена плодовитость из-за образования несбалансированных гамет. Последнее связано с нарушением расхождения гомологичных хромосом в мейозе вследствие образования поливалентов и унивалентов.

Полиплоиды широко распространены среди растений, у животных они встречаются реже. У многоклеточных диплоидов клетки некоторых тканей (печени млекопитающих, слюнных желез и мальпигиевых сосудов двукрылых) являются полиплоидными. Полиплоиды получают с использованием агентов, нарушающих процесс нормального расхождения хромосом (колхицин). Для получения аллополиплоидов используют межвидовые гибриды с последующим увеличением их набора хромосом.

При полиплоидизации наблюдается увеличение размеров организма, однако слишком высокий уровень полиплоидии действует угнетающе на организм.

Типы геномных мутаций

Анеуплоиды у диплоидных видов бывают следующих типов:

- *Моносомики ($2n-1$), при этом отсутствует один гомолог;*
- *Трисомики ($2n+1$), имеется дополнительный гомолог;*
- *Двойной моносомик ($2n-1-1$), отсутствует по 1 гомологу из двух пар хромосом и др.*

У гаплоидных видов можно получить дисомики ($n+1$). Анеуплоиды возникают спонтанно при нерасхождении хромосом или индуцируют их получение у полиплоидов и диплоидов.

Расщепление в потомстве поколений полиплоидов и анеуплоидов по признакам, гены которых расположены в хромосомах, представленных в аномальном или в увеличенном числе, отличается от обычного диплоидного. Эту особенность у анеуплоидов используют для генанализа и определения групп сцепления генов.

Вероятностное соотношение фенотипов в потомстве дуплекса по двум взаимодействующим генам

Тип взаимодействия генов	Фенотипические расщепления	
	Тетраплоидов ($4n$)	Диплоидов ($2n$)
Комплементарность	$1225 : 35 : 35 : 1$ $1225 : 70 : 1$ $1225 : 35 : 36$ $1225 : 71$	$9 : 3 : 3 : 1$ $9 : 6 : 1$ $9 : 3 : 4$ $9 : 7$
Эпистаз	$1260 : 35 : 1$ $1260 : 36$	$12 : 3 : 1$ $13 : 3$
Полимерия некум.	$1295 : 1$	$15 : 1$

Типы геномных мутаций. Автополиплоидия.

У автополиплоидов каждая хромосома набора представлена гомологичными хромосомами в количестве, соответствующем уровню пloidности – 3, 4 и т.д. В мейозе у них возникают мультиваленты:

- квадριваленты;
- триваленты и униваленты,
- биваленты (значительно реже).

Расхождение хромосом из мультивалентов и распределение унивалентов происходит либо случайно, либо избирательно.

При нарушении нормального расхождения хромосом возникают гаметы с несбалансированным набором хромосом, а в их потомстве появляются анеуплоиды, возможна и частичная их потеря.

При автополиплоидии меняется доза гена. Так у тетраплоида (4n) может возникнуть 5 генотипов по одному гену:

AAAA – квадриплекс, AAAa – триплекс, AAaa – дуплекс,
Aaaa – симплекс, aaaa – нуллиплекс,

соответственно, при случайном хромосомном расщеплении эти генотипы будут давать разное количество типов гамет. Поэтому и соотношение фенотипических классов в расщеплении у разных тетраплоидов будет различно. У симплекса расщепление по фенотипу при полном доминировании равно 3 : 1 ((1+1)²), у дуплекса 35A : 1a. ((5+1)²).

3Aa : 3aa

1	<u> </u>	A
2	<u> </u>	a
3	<u> </u>	a
4	<u> </u>	a

G: Aa, Aa, Aa,
aa, aa, aa

1AA : 4Aa : 1aa

1	<u> </u>	A
2	<u> </u>	A
3	<u> </u>	a
4	<u> </u>	a

G: AA, Aa, Aa,
Aa, Aa, aa

1A : 2Aa : 2a : 1aa

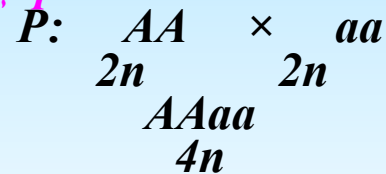
1	<u> </u>	A
2	<u> </u>	a
3	<u> </u>	a

G: Aa, Aa, A
a, a, aa

Геномные мутации: закономерности образования гамет

У автополиплоидов и аллополиплоидов отмечены случаи предпочтительной (избирательной) бивалентной конъюгации хромосом из квадрилвалентов, что сказывается и на характере расщепления гибридов. На него может влиять и случайное хроматидное расщепление, а также эффект взаимодействия генов. Автотетраплоид может возникнуть:

1) при слиянии нередуцированных гамет двух диплоидных форм

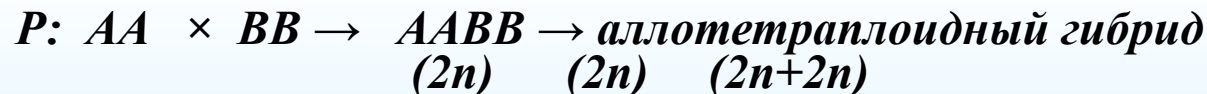


2) при увеличении хромосом одного вида с последующей партенокарпией



Аллополиплоид возникает в процессе гибридизации

при слиянии двух нередуцированных при мейозе гамет разных видов:



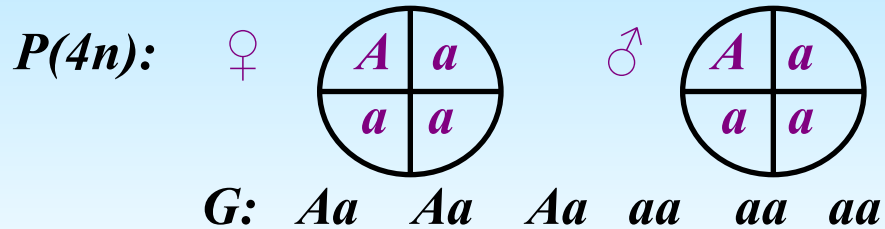
В мейозе при случайной конъюгации гомологичных хромосом образуются униваленты, биваленты, триваленты и квадрилваленты. Если процесс конъюгации случаен, то частота образования гамет у гетерозиготного автотетраплоида будет определяться коэффициентами бинома Ньютона: $(a+v)^4$; т.е. 1 : 4 : 6 : 4 : 1.

Возможно образование гаметы с 4, 3, 2, 1 и 0 гомологичных хромосом в следующих количествах:

с 4 и 0 хромосомами	1/16
с 3 и 1	4/16
с 2 и 2	6/16
с 1 и 3	4/16
с 0 и 4	1/16

Геномные мутации: закономерности образования гамет

Возможно и другое схематическое изображение генотипа тетраплоида, образование у него гамет и расщепление по гено- и фенотипу в потомстве тетраплоидов при их самоопылении:



Иначе соотношение гамет можно записать как: $\frac{3}{6}Aa + \frac{3}{6}aa$ у двух родителей, а их случайная встреча при оплодотворении даст расщепление по фенотипу $(\frac{3}{6}Aa + \frac{3}{6}aa) \times (\frac{3}{6}Aa + \frac{3}{6}aa) = \frac{9}{36}AAaa + \frac{9}{36}Aaaa + \frac{9}{36}Aaaa + \frac{9}{36}aaaa = \frac{27}{36}A--- + \frac{9}{36}aaaa$ или 3 : 1.

Зная эти соотношения гамет, можно рассчитать число гамет со сбалансированным и несбалансированным набором хромосом, а соответственно и процент фертильных растений автотетраплоидов.

Генетика популяцій

Закон Г. Харди и В. Вайнберга

Популяция – это совокупность особей одного вида свободно скрещивающихся между собой, характеризующаяся общностью происхождения, местообитания и приспособления к данным условиям жизни и отделена от соседних той или иной степенью давления изоляций.

Популяция, в которой особи размножаются половым путем, называется менделеевской популяцией.

Провести генетический анализ популяции – значит, установить ее генотипическую структуру, а, именно, определить, какие генотипы и в каком отношении составляют популяцию, а также с какой частотой встречаются различные аллели. Существует два различных типа популяции – с самооплодотворением (самоопылением) и с перекрестным опылением. Закономерности наследования в этих популяциях различны.

Для популяции с перекрестным оплодотворением, в которой особи свободно скрещиваются между собой (панмиксическая популяция), генотипическую структуру можно установить, используя закон Г. Харди и В. Вайнберга.

Для изучения наследования в панмиксической популяции гена, существующего в форме двух аллелей A и a , закон Харди-Вайнберга можно представить следующим образом. Если частота доминантного аллеля (A) в популяции равна p , а частота рецессивного аллеля $a = q$, а сумма $p + q = 1$, то мы можем получить уравнение, описывающее генотипическую структуру популяции:

$$p^2AA + 2pqAa + q^2aa = 1,$$

где p^2 – количество доминантных гомозигот,
 q^2 – количество рецессивных гомозигот,
 $2pq$ – количество гетерозигот в популяции.

Следствия, вытекающие из закона Харди-Вайнберга

Частоты аллелей не изменяются от поколения к поколению.

Доказательство: Частота аллеля (A или a) в потомстве равна сумме частот генотипов гомозигот (AA или aa , соответственно) и половине частот гетерозигот (Aa), т.е. частота доминантного аллеля $A = p^2 + pq = p(p + q) = p$;

$a = q^2 + pq = q(q + p) = q$ (т.к. сумма всех аллелей (гамет) равна 1, т.е. $p + q = 1$).

Это следствие очень важно для вычисления частоты аллеля в популяции, представленной известным соотношением генотипов. Предположим, чтобы определить генотипическую структуру второго поколения панмиксической популяции, представленной особями со следующей частотой генотипов – 50% PP , 30% Pp , 20% pp ; необходимо определить частоту аллелей P и p .

$P = 50\% PP + 15\% Pp = 65\% = 0,65$, $p = 20\% pp + 15\% Pp = 35\% = 0,35$ (или $100\% - 65\% = 35\%$), а затем подставив эти значения в формулу Харди–Вайнберга, определить генотипическую структуру популяции.

$(0,65)^2 PP + 2(0,65 \times 0,35) Pp + (0,35)^2 pp$

Частоты генотипов в панмиксической популяции не меняются в ряду поколений, так как частоты генотипов в следующем поколении, так же остаются неизменными и соответственно равными p^2 , $2pq$, q^2 . Таким образом, генотипическая структура популяции одинакова как в первом, так и в последующих поколениях при условии отсутствия давления отбора.

Нельзя избавиться от рецессивного аллеля в популяции.

Чем меньше частота рецессивного аллеля (q), тем больше частота доминантного аллеля (p), а, следовательно, увеличивается доля гетерозигот в популяции ($2pq$), которые с равной вероятностью образуют гаметы, содержащие рецессивный аллель (a) и доминантный аллель (A).

Следствия, вытекающие из закона Харди-Вайнберга

Частоты аллелей не изменяются от поколения к поколению.

Доказательство: Частота аллеля (A или a) в потомстве равна сумме частот генотипов гомозигот (AA или aa , соответственно) и половине частот гетерозигот (Aa), т.е. частота доминантного аллеля $A = p^2 + pq = p(p + q) = p$;

$a = q^2 + pq = q(q + p) = q$ (т.к. сумма всех аллелей (гамет) равна 1, т.е. $p + q = 1$).

Это следствие очень важно для вычисления частоты аллеля в популяции, представленной известным соотношением генотипов. Предположим, чтобы определить генотипическую структуру второго поколения панмиксической популяции, представленной особями со следующей частотой генотипов – 50% PP , 30% Pp , 20% pp ; необходимо определить частоту аллелей P и p .

$P = 50\% PP + 15\% Pp = 65\% = 0,65$, $p = 20\% pp + 15\% Pp = 35\% = 0,35$ (или $100\% - 65\% = 35\%$), а затем подставив эти значения в формулу Харди–Вайнберга, определить генотипическую структуру популяции.

$(0,65)^2 PP + 2(0,65 \times 0,35) Pp + (0,35)^2 pp$

Частоты генотипов в панмиксической популяции не меняются в ряду поколений, так как частоты генотипов в следующем поколении, так же остаются неизменными и соответственно равными p^2 , $2pq$, q^2 . Таким образом, генотипическая структура популяции одинакова как в первом, так и в последующих поколениях при условии отсутствия давления отбора.

Нельзя избавиться от рецессивного аллеля в популяции.

Чем меньше частота рецессивного аллеля (q), тем больше частота доминантного аллеля (p), а, следовательно, увеличивается доля гетерозигот в популяции ($2pq$), которые с равной вероятностью образуют гаметы, содержащие рецессивный аллель (a) и доминантный аллель (A).

Условия выполнения и применения закона Харди-Вайнберга

Закон Харди-Вайнберга применим для популяции, на которые не действуют внешние факторы (отборы, мутации, изоляция и др.), а также для панмиксических популяций с большим количеством особей (так как в малых популяциях дрейф генов изменит соотношение генотипов).

Следовательно, закон Харди-Вайнберга не описывает реальную популяцию, но, поскольку все вышеперечисленные факторы действуют на популяцию с низкой частотой и протяженны во времени, то, используя его, можно рассчитать структуру популяций (соотношение генотипов), так и зная структуру – вычислить частоты любых аллелей в популяции. При этом следует учитывать, что закон применим как для моно-, ди-, так и полигибридных различиях генотипов.

*Структура популяции самоопылителей
для самостоятельного изучения, ☺*

Структура популяции самоопылителей

$$AA = 2^n (2K_{AA} + K_{Aa}) - K_{Aa}$$

$$aa = 2^n (2K_{aa} + K_{Aa}) - K_{Aa}$$

$$Aa = 2K_{Aa}$$



Естественный отбор

Относительная эффективность размножения (приспособленность) = $b/(a \cdot c)$, где a – число зигот в первом поколении, b – число зигот этого же генотипа в следующем поколении, c – среднее число потомков лучшего генотипа, определяется как b/a ; c считается отдельно по каждому генотипу, у лучшего генотипа приспособленность равна 1, а $b/a = \max$.

	A_1A_1	A_2A_2	A_3A_3
<i>Число зигот в 1 поколении (a)</i>	40	50	10
<i>Число зигот в следующем поколении (b)</i>	80	90	10
<i>Среднее число потомков</i>	$80/40=2$	$90/50=1,8$	$10/10=1$
<i>Приспособленность (w)</i>	$2/2=1$	$1,8/2=0,9$	$1/2=0,5$

$$s \text{ (коэф. отбора)} = 1 - w$$

Относительная приспособленность указывает на направление отбора, но не учитывает динамику численности популяции.

Отбор против гетерозигот ($p=q$)

	AA	Aa	aa
w	1	0,8	1
<i>Число зигот в 1-ом поколении (a)</i>	100	200	100
<i>Число зигот в следующем поколении (b)</i>	100	160	100
<i>Коэффициент отбора ($s=1-w$)</i>	0	0,2	0

$$q_1 = (q - spq) / (1 - 2 spq)$$

$$\Delta q = spq (p - q) / (1 - 2 spq)$$

$\Delta q = 0,$
если $p = q$ (при $w(AA) = w(aa)$).

Отбор против гетерозигот ($p \neq q$)

	AA	Aa	aa
w	1	0,7	1
Коэф. отбора ($s=1-w$)	0	0,3	0
Число зигот в 1-ом поколении (a)	350	400	250
$p = (350 + 1/2 * 400) / 1000$ $q = (250 + 1/2 * 400) / 1000$	$p = 0,550$		$q = 0,450$
Число зигот в следующем поколении (b) (идеал)	3025	4950	2025
Число зигот в следующем поколении (b) (отбор)	3025	3465	2025
$p = (3025 + 1/2 * 3465) / 8515$ $q = (2025 + 1/2 * 3465) / 8515$	$p = 0,5587$		$q = 0,4413$

$$q_1 = (q - spq) / (1 - 2 spq), \quad \Delta q = spq (p - q) / (1 - 2 spq)$$

Если популяция изначально не в равновесии, то она в дальнейшем удаляется от него. Аллель, частота которого была изначально меньше равновесной, постепенно элиминируется. Если $q > p$, $\Delta q > 0$, элиминируется аллель A, если $p > q$, $\Delta p > 0$ соответственно элиминируется аллель a.

Эффективность отбора максимальна при промежуточных значениях частот аллелей.

Отбор против рецессивных гомозигот

	AA	Aa	aa
w	1	1	0,6
Коэф. отбора ($s=1-w$)	0	0	0,4
Число зигот в 1-ом поколении (a)	350	400	250
$p = (350 + 1/2 * 400) / 1000$ $q = (250 + 1/2 * 400) / 1000$	$p = 0,550$		$q = 0,450$
Число зигот в следующем поколении (b) (идеал)	3025	4950	2025
Число зигот в следующем поколении (b) (отбор)	3025	3465	1215
$p = (3025 + 1/2 * 4950) / 9190$ $q = (1215 + 1/2 * 4950) / 9190$	$p = 0,5985$		$q = 0,4015$

За 1 поколение

$$q_1 = (q - pq^2) / (1 - sq^2), \quad p_1 = p / (1 - sq^2)$$

$$\Delta q = q_1 - q = -spq^2 / (1 - sq^2)$$

Нормализованные частоты

$$(aa) \quad q^2 = q^2(1-s)/(1-sq^2) \quad (Aa) \quad 2pq = 2pq/(1-sq^2) \quad (AA) \quad p^2 = p^2/(1-sq^2)$$

Часть рецессивных зигот стерильна или погибает до половозрелости.

Отбор против доминантных аллелей

	AA	Aa	aa
w	0,6	0,6	1
Коэф. отбора ($s=1-w$)	0,4	0,4	0
Число зигот в 1-ом поколении (a)	350	400	250
$p = (350 + 1/2 * 400) / 1000$ $q = (250 + 1/2 * 400) / 1000$	$p = 0,550$		$q = 0,450$
Число зигот в следующем поколении (b) (идеал)	3025	4950	2025
Вклад каждого генотипа в следующее поколение	$p^2(1-s)$	$2pq(1-s)$	q^2
Число зигот в следующем поколении (b) (отбор)	1815	2970	2025
$p = (1815 + 1/2 * 2970) / 9190$ $q = (1215 + 1/2 * 2970) / 9190$	$p = 0,4846$		$q = 0,5154$

Более эффективен, чем против рецессивных гомозигот.

За 1 поколение $p_1 = p(1-s) / (1-s + sq^2)$, $\Delta p = -spq^2 / (1-s + sq^2)$

$\Delta q = q1 - q = spq^2 / (1-s + sq^2)$

При $s=1$ $\Delta p = -p$ (после первого поколения частота доминантного аллеля = 0)