Большой генетический практикум 2013-14

Методы генетического анализа *Drosophila melanogaster*

Новосибирск ФЕН НГУ

Волошина Марина Александровна

ИЦиГ, лаб. генетики популяций (Захаров), с.н.с, к.б.н.

к. 1220 гл. корпуса.

Тел.лаб. 363 49 39 * 1220

Моб. 953 866 72 96

Е-мэйл: postoronnim@ngs.ru

Сайт: biologii.net

Цели практикума

Познакомиться с классическими
и современными методами
работы с дрозофилой

Основы работы с мухами

Самец или самка?

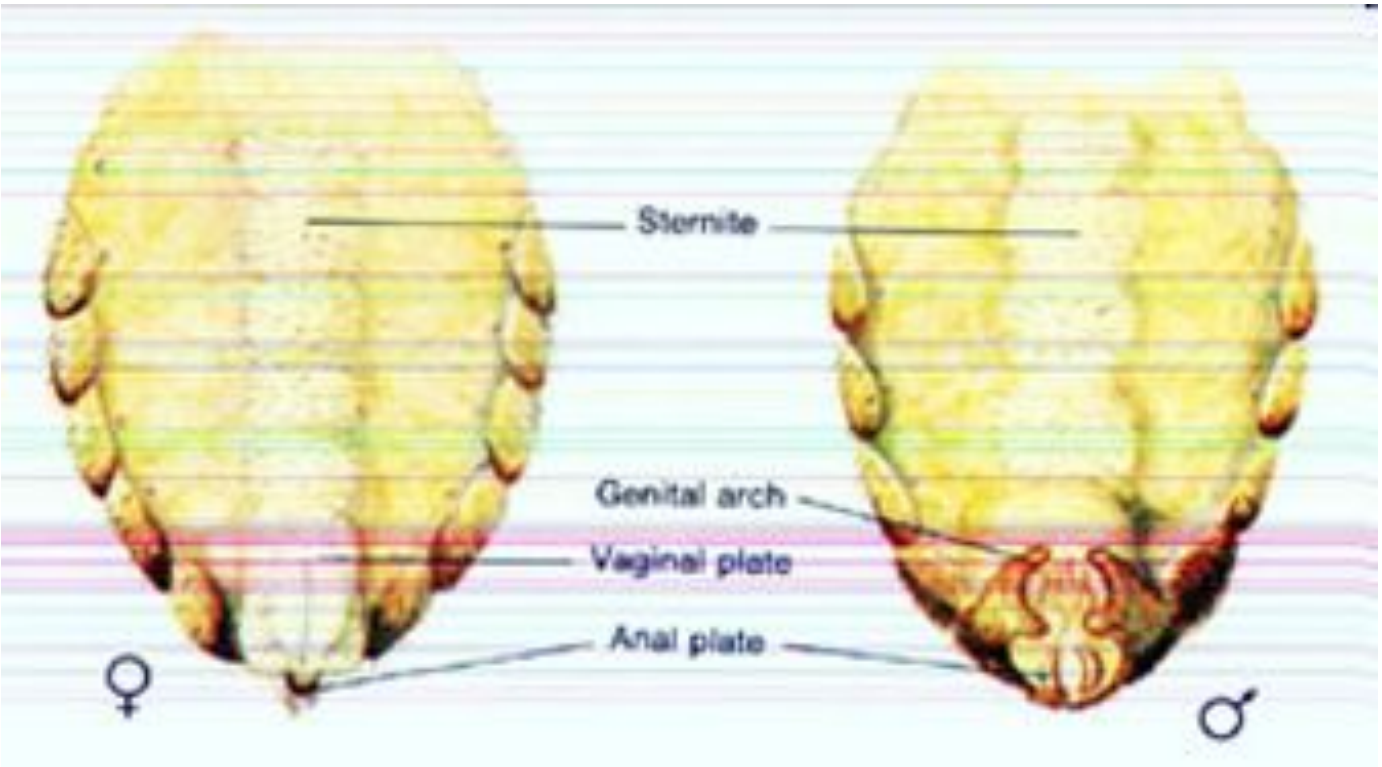
♀ ♂

♀ ♂

Первый признак самца – «**точка**» на конце брюшка (половой аппарат)

На размер ориентироваться **нельзя**!

(зависит от условий питания личинки)


Sternite
Genital arch
Vaginal plate
Anal plate
♀
♂

♀ ♂

Самый надежный признак – **половые гребешки** на передних лапках самца

Размножение линий

- Для поддержания линии мух просто пересыпают на свежий корм, можно не замаривать
- Старые стаканы не выбрасывайте
  - из них можно собрать самок при необходимости
  - вновь пересаженные мухи могут «не пойти» - плесень, переморены, влипли

Как собирать девственных (виргинных) самок

- Все дело **в самцах**!
- Они становятся фертильными ~ через **6 часов** после вылупления из куколки.
- У дрозофилы выраженный суточный ритм – пик вылупления в утренние часы (любящая росу)
- За сутки до вылупления сквозь куколку начинают просвечивать черные крылья

- Утром выбросить всех мух (проверить, чтобы никто не влип в корм и не остался)
- Не позже, чем через 6 часов собрать всех вылетевших за это время самок.
- Посадить их в отдельную пробирку, оставить ее в лежачем положении.
- Использовать лучше в возрасте 3-10 дней, позже яйценоскость самок падает.

- На крайний случай
  - если вы не успели придти через 6 часов
  - или куколок в пробирке мало
- Можно брать самок, по которым видно, что они только что вылупились:
  - с нерасправленными крыльями
  - очень светлых – зеленоватых (такими они остаются около часа после вылупления)

Если вы не уверены в своих самках

- Не сажайте их слишком много в пробирку – не более 5-6
  - может затесаться самец или одна самка оказаться не девственной
- Подержите несколько дней и проверьте, не началось ли там развитие личинок
  - если началось –придется всех выбросить
- Помните, что девственные самки тоже откладывают яйца – только они не развиваются

- Подумайте, насколько критична девственность для вашего скрещивания – сможете ли вы отличить среди потомков и выбросить тех, что от «неправильного» самца.
- Лучше собирать самок в хорошо идущих линиях, а из более слабых брать самцов.

Не перемаривайте мух!

1 минуты вполне достаточно –

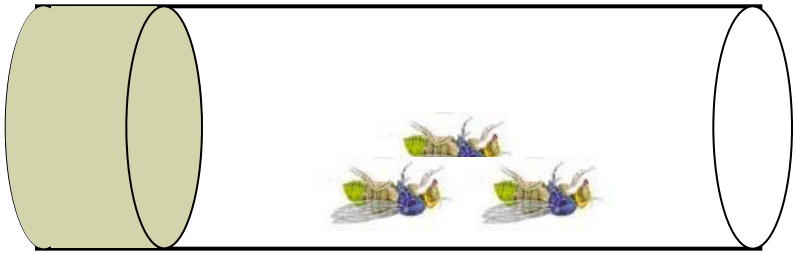
как только перестали двигаться

Не наливайте слишком много эфира!

Эфир наливаем, вытащив воронку, а не через нее

(прямой контакт с эфиром мух убивает)

- В один стаканчик ~ по 5 самок и самцов
- Самца можно и одного. Иногда это необходимо – **индивидуальные** скрещивания.
- Если нужно поставить индивидуальное скрещивание самки, то берут не стаканчик, а пробирку (поменьше).



Пока мухи не проснутся – пробирка в лежачем положении!

ИНАЧЕ ВЛИПНУТ В КОРМ

Каждую пробирку – сразу подписать !!!

- В одной связке – одна линия
  - или одно скрещивание
- Можно ставить бумажную этикетку – что делать с F_1
- Обязательно пишите **дату** – иначе у вас может там оказаться F_2

The life cycle of *Drosophila melanogaster*

10 дней

- Через 3-5 дней родителей удаляем из пробирки.
- Можно перебросить на новый корм, если нужно много потомков.
- Потмоков собираем не реже раза в два дня. Если некогда их просмотреть сразу – хотя бы отсадить на новый корм (иначе погибнут)

Температура важна!

- Ни одно яйцо не будет отложено при температуре

ниже 18° выше 31°

Оптимум – 25°

- Температура влияет на частоту кроссинговера

Тема 1

Генетический анализ неизвестной мутации

1. Фенотипическое описание
   - Видимые проявления, плейотропная или нет
   - Пенетрантность и экспрессивность
   - Жизнеспособность, если снижена – на каких стадиях гибель
2. Определить отношения доминирования
   - с нормой
   - с другими аллелями данного гена, если ген известен.

3. Картирование
   - Определить хромосому
   - Определить локализацию в хромосоме.
4. Установить, является ли новая мутация аллелем уже известного гена.
   - Поиск в установленном районе хромосомы мутаций с аналогичным фенотипом по Красной книге и Fly Base.
   - Тест на комплементарность с генами-кандидатами.

План работы

Скрещивание 1.

P_1 Мутация × дикий тип (Canton S или Oregon R)

↓

F_1

P_2 F_1 × F_1

↓

F_2

Цели – определить:

- доминирование
- сцеплена или нет с полом
- жизнеспособность по сравнению с нормой

Метод доминантных маркеров

Картирование до хромосомы

Линия , в которой хромосомы 2 и 3 маркированы доминантными мутациями:

Cy (Curly, 2) – загнутые вверх крылья, БАЛАНСЕР

L (Lobe, 2) – уменьшенные глаза

D (Dichaete, 3) – расставленные крылья, БАЛАНСЕР

Sb (Stubble, 3) – короткие щетинки

Метод доминантных маркеров

P_1 ♀♀ $\frac{m}{m}$ $\frac{+}{+}$ × ♂♂ $\frac{Cy}{L}$ $\frac{D}{Sb}$

↓

F_1 ♂ и ♀ $\frac{m}{Cy \text{ или } L}$ $\frac{+}{D \text{ или } Sb}$

P_2 ♂ F_1 × ♀♀ $\frac{m}{m}$ $\frac{+}{+}$

↓

Метод доминантных маркеров

$$P_2 \quad ♂ F_1 \; \frac{m}{L} \; \frac{+}{Sb} \quad \times \quad ♀♀ \; \frac{m}{m} \; \frac{+}{+}$$

$$\downarrow$$

$$\frac{m}{m} \; \frac{+}{Sb} \quad \text{и} \quad \frac{m}{L} \; \frac{+}{+}$$

Мутантный фенотип m никогда не будет встречаться вместе с доминатным маркером той же хромосомы, где расположена мутация m

Рабочий журнал

- Пронумеруйте страницы и сделайте оглавление
- Ведите журнал не по датам, а **по экспериментам** – эксперимент 1, эксперимент 2, …
- В начале каждого раздела – описание линий и схема скрещивания
- Далее – даты и результаты
- На отдельной странице записываются возникшие проблемы и их решение

Ресурсы

- Fly Base http://flybase.org/
- The Interactive fly
  http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm
- Berkeley Drosophila Genome Project
  http://www.fruitfly.org/about/pubs/ - статьи
- Bloomington Stock Center
  http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/browse.htm