

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

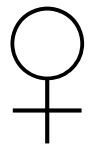
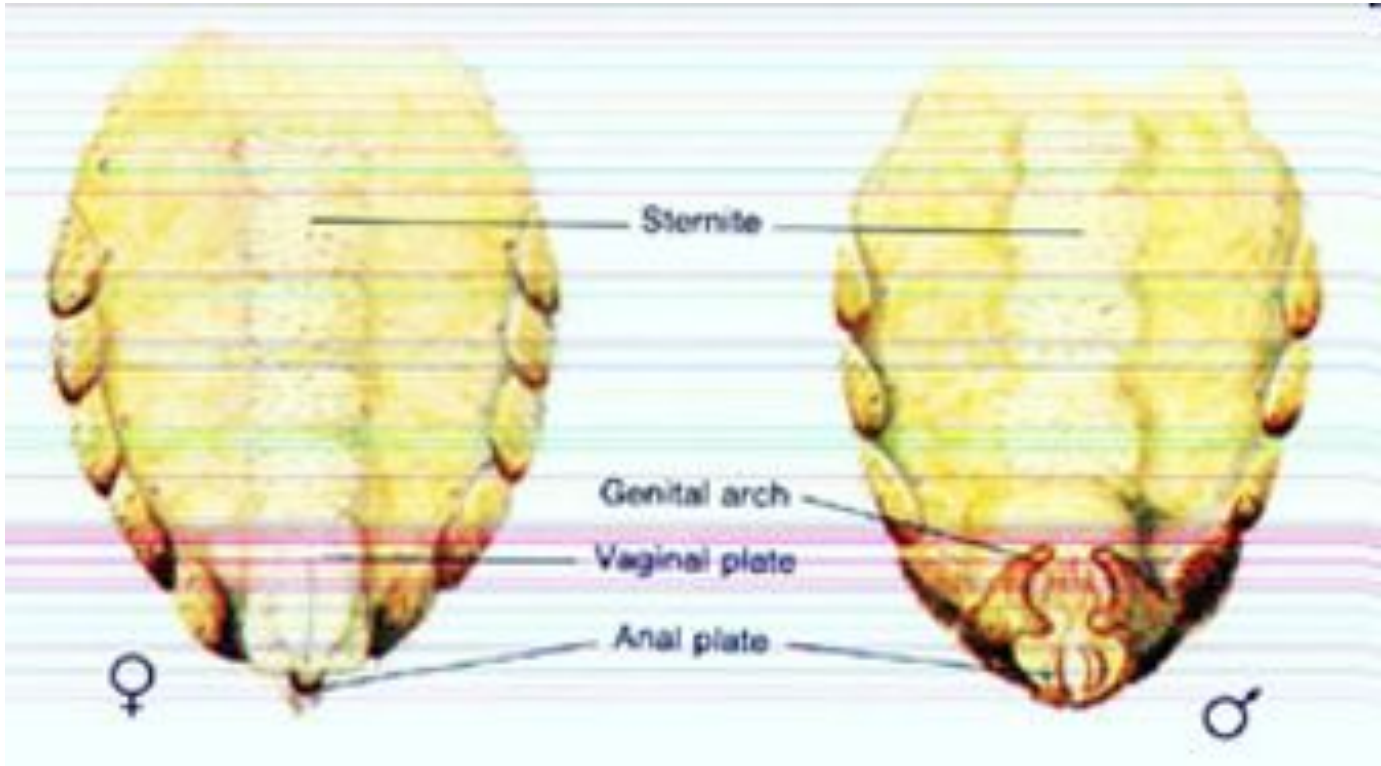
Основы работы с мухами

Самец или самка?



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

На размер ориентироваться **нельзя!**
(зависит от условий питания личинки)





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 лежащем 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

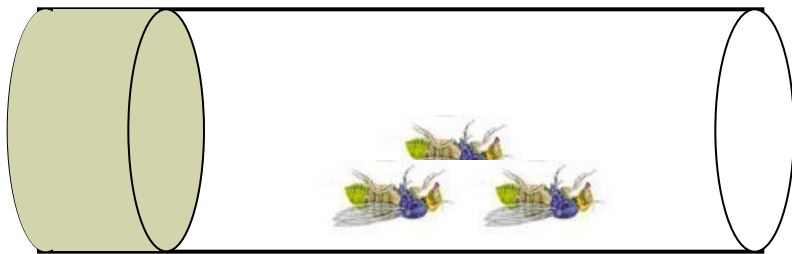


Не наливайте слишком много эфира!

Эфир наливаем, вытаскив
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 лежащем
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

Скращивание 1.



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:

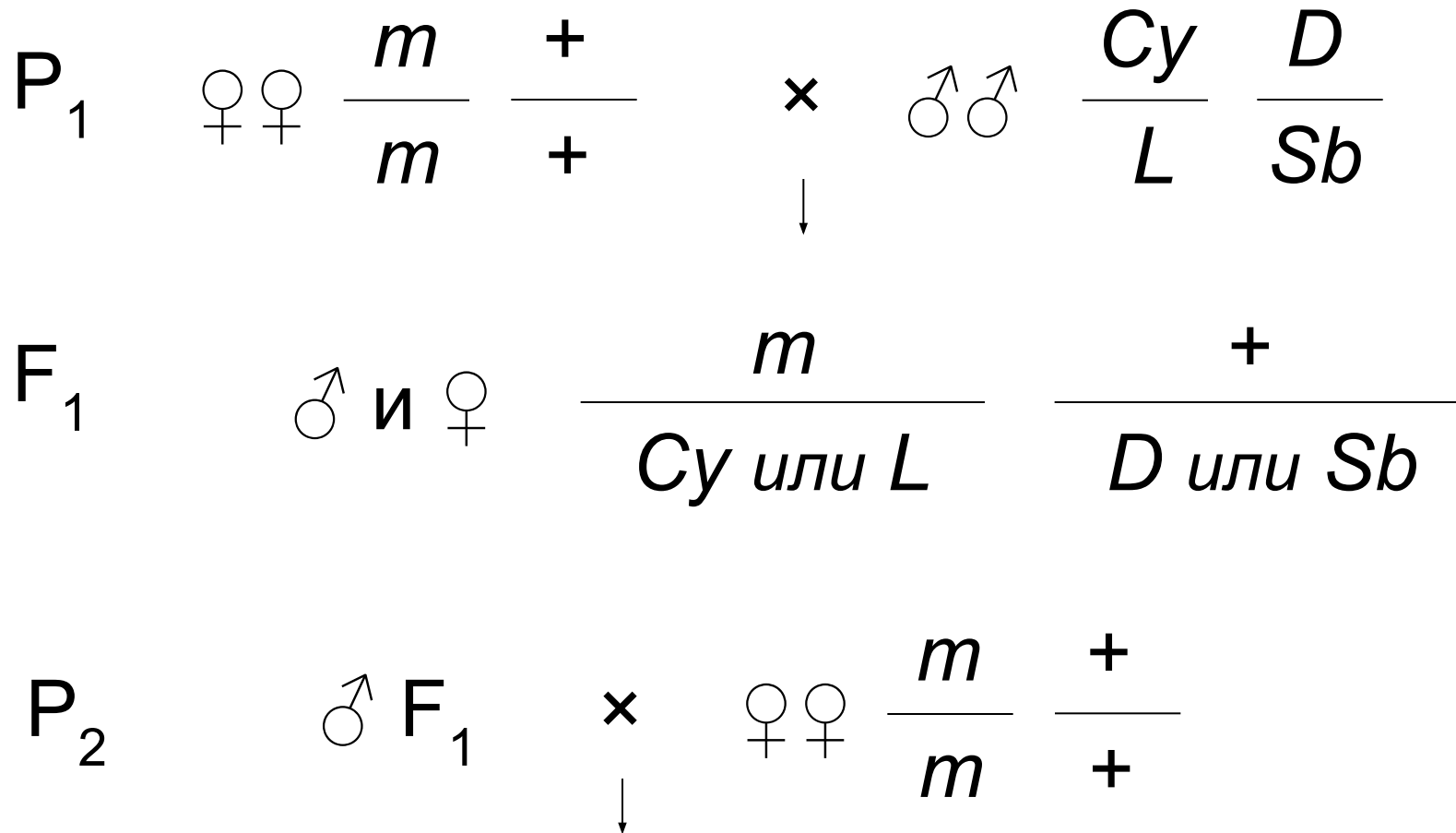
Cy (*Curly*, 2) – загнутые вверх крылья, БАЛАНСЕР

L (*Lobe*, 2) – уменьшенные глаза

D (*Dichaete*, 3) – расставленные крылья, БАЛАНСЕР

Sb (*Stubble*, 3) – короткие щетинки

Метод доминантных маркеров



Метод доминантных маркеров

$$\begin{array}{c}
 P_2 \quad \text{♂} \quad F_1 \quad \frac{m}{L} \quad \frac{+}{Sb} \quad \times \quad \text{♀} \quad \text{♀} \quad \frac{m}{m} \quad \frac{+}{+} \\
 \quad \downarrow \\
 \quad \quad \quad \quad \quad \quad \frac{m}{m} \quad \frac{+}{Sb} \quad \text{и} \quad \frac{m}{L} \quad \frac{+}{+}
 \end{array}$$

Мутантный фенотип m никогда не будет встречаться вместе с доминантным 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>