

Молекулярно-генетические маркеры

Туранов С.В.

ННЦМБ ДВО РАН

Лаб. Молекулярной систематики

Осень 2019



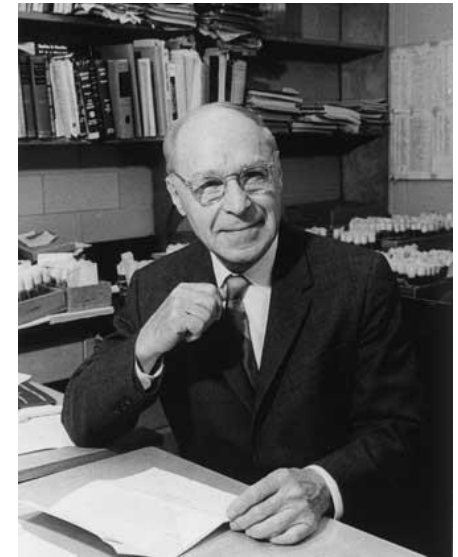
«...популяция, "как губка",
впитывает рецессивные мутации,
оставаясь при этом внешне
однородной...»

(Четвериков С.С. О некоторых
моментах эволюционного процесса с
точки зрения современной генетики.
1928).

Сергей Сергеевич Четвериков

1. Классическая теория. Большинство признаков находятся в гомозиготном состоянии. Отбор непринципиален. Изменения селективно нейтральны. Г.Жд. Мёллер (США, СССР).

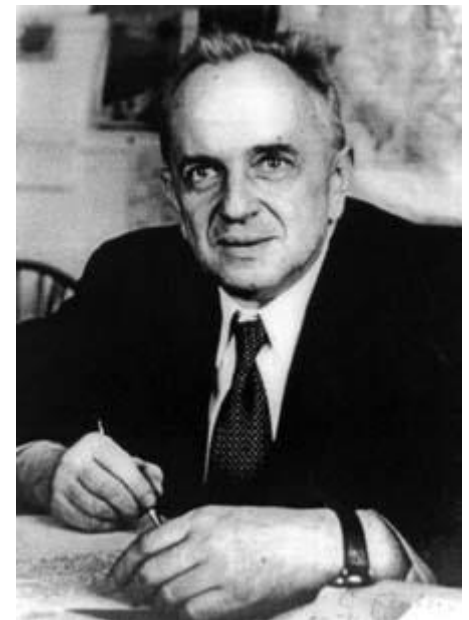
$$\frac{+++++ m + \dots +++++}{+++++ + \dots +++++} \quad \frac{+++++++ \dots + m +}{+++++++ \dots +++++}$$



Г.Дж. Мёллер

2. Балансовая теория. Наибольшее количество генетической изменчивости в природных популяциях хранится в гетерозиготном состоянии. Отбор поддерживает гетерозигот. Ф.Г. Добржанский (США), Е. Форд (Англия).

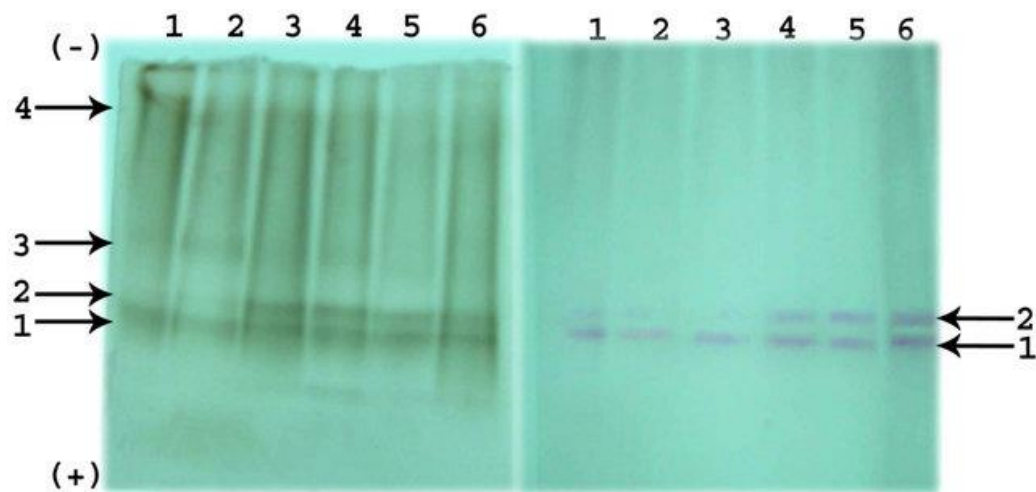
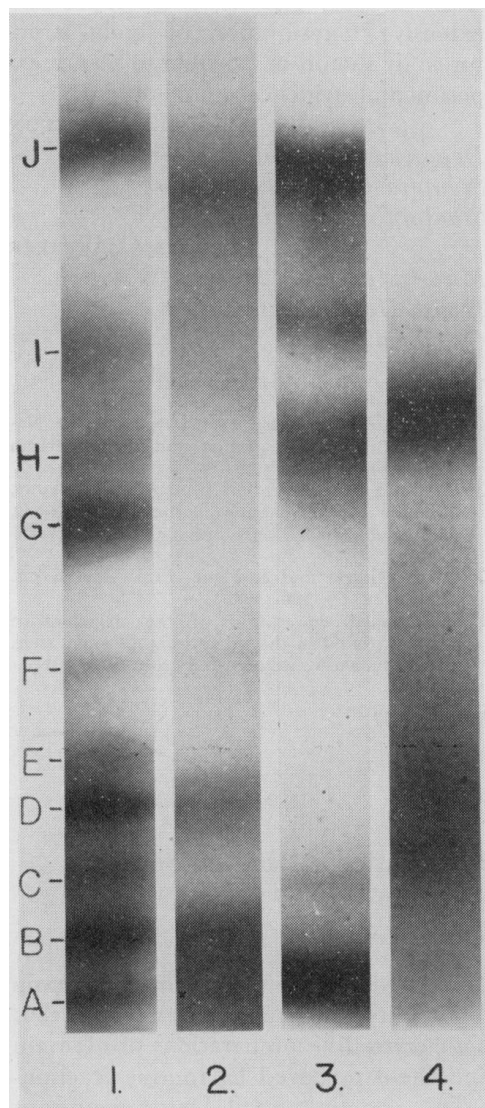
$$\frac{A_3 B_2 C_2 D E_5 \dots Z_2}{A_1 B_7 C_2 D E_2 \dots Z_3} \quad \frac{A_2 B_4 C_1 D E_2 \dots Z_1}{A_3 B_5 C_2 D E_3 \dots Z_1}$$

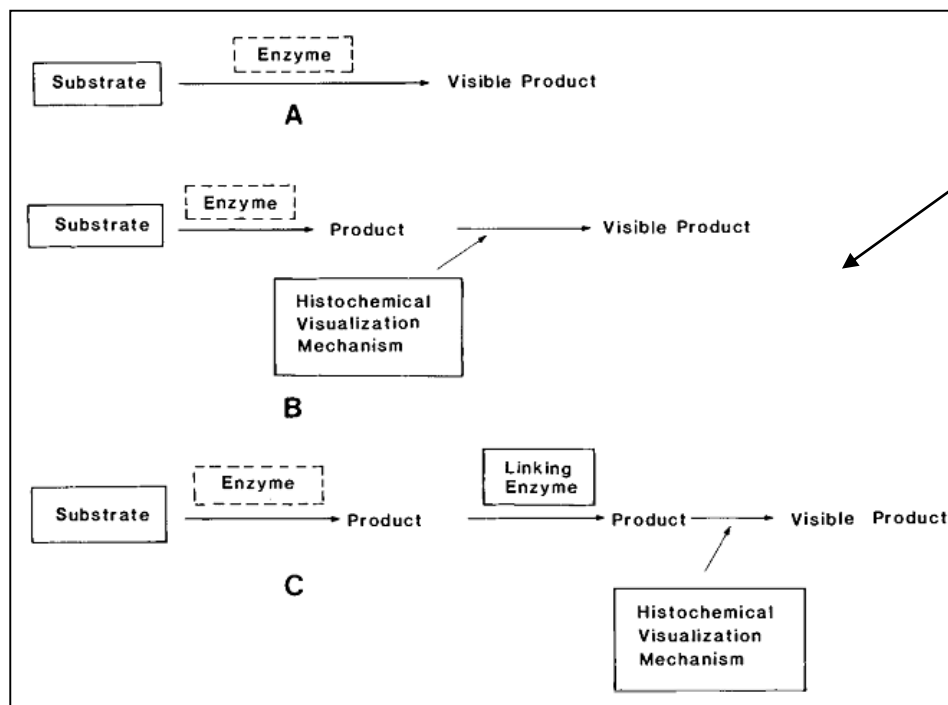


Ф.Г. Добржанский

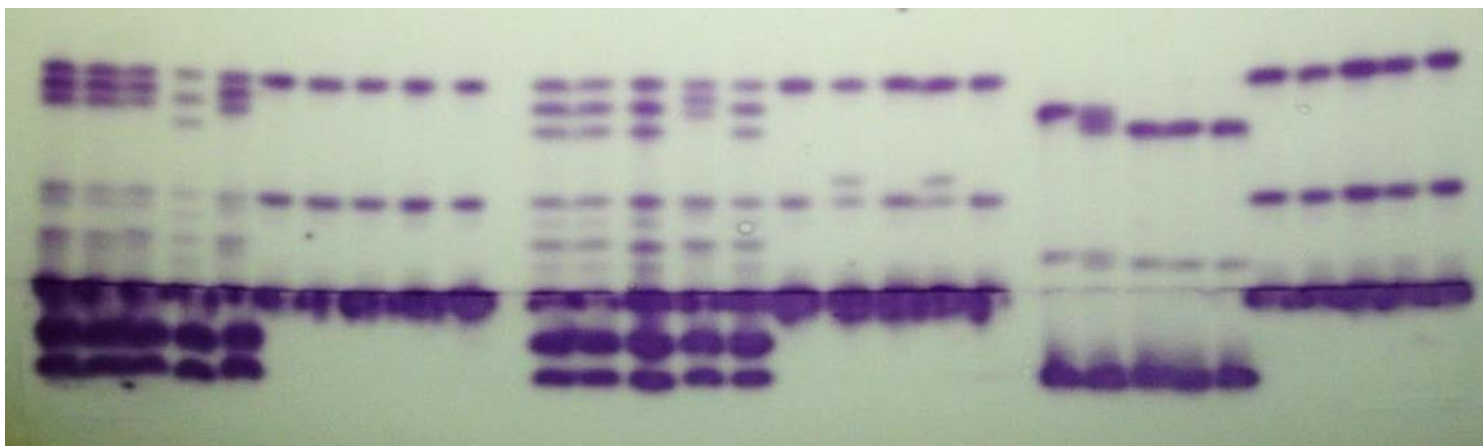
Для решения фундаментальной проблемы необходим был метод, который мог бы свободно оценивать (if any) **гетерозиготность** — т.е. одновременно распознавать разные аллели одного и того же признака.

1957 г. – разработка гистохимических принципов визуализации ферментов (энзимов) и изозимов. Хантер и Маркерт.





Механизмы визуализации ферментов



«Полоски на киселе»

Ферменты, как оказалось, проявляют такое свойство как **полиморфизм**.

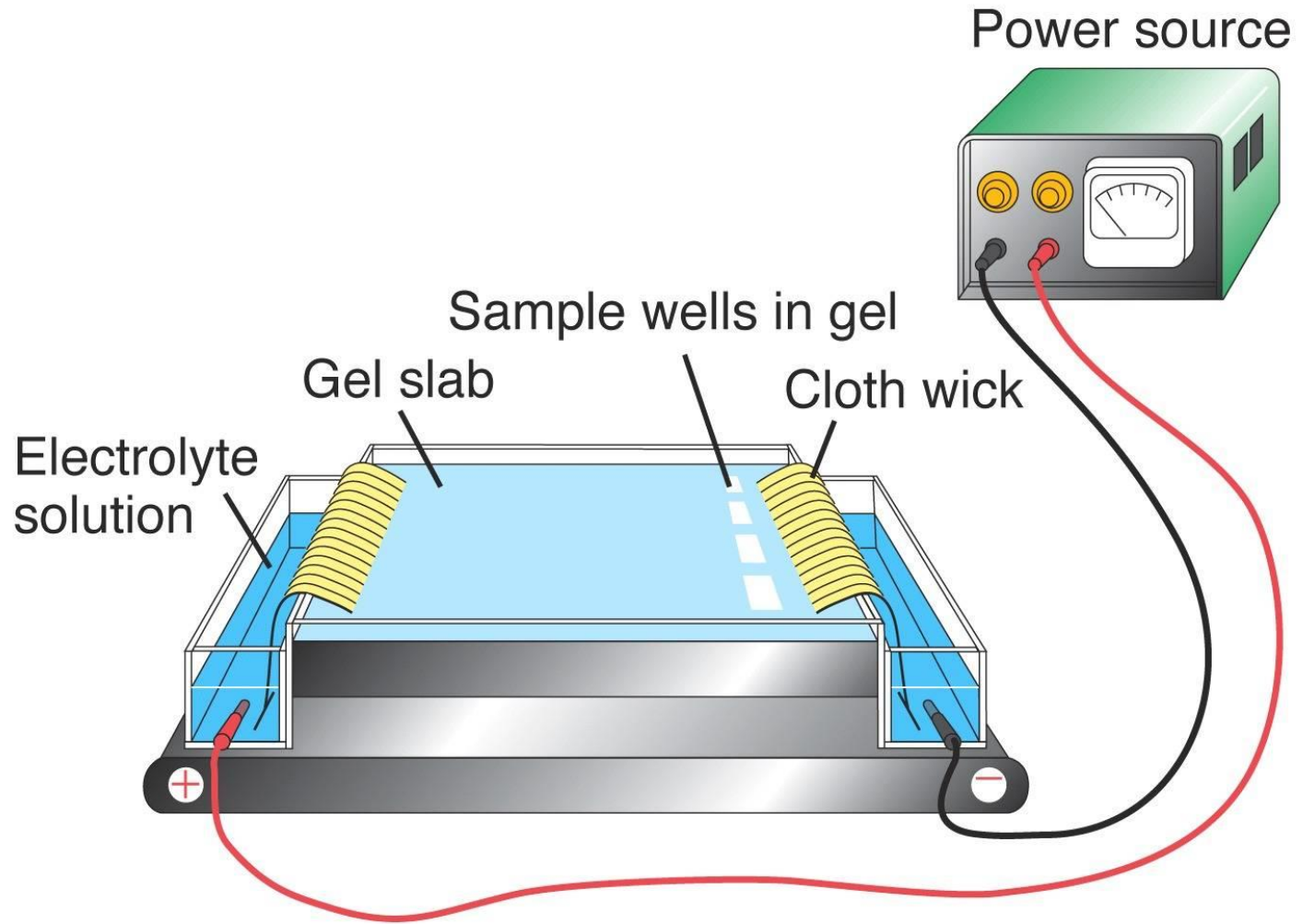
Полиморфизм — проявление индивидуальной прерывистой изменчивости живых организмов.

Генетический полиморфизм:

- наличие в одной и той же популяции двух или более хорошо различимых форм, способных проявляться в потомстве одной самки и встречающихся с частотой, достаточно высокой для того, чтобы исключить поддержание самой редкой из них повторяющимися мутациями;
- наличие в популяции двух или более аллелей одного локуса, встречающихся с ощутимой частотой.

Изоферменты (или **изозимы**) – генетически детерминированные молекулярные формы одного и того же фермента, отличающиеся по первичной структуре.

Аллозимы – **изоферменты**, кодируемые аллелями одного и того же гена и отражающие внутривидовой полиморфизм.



Ограничения генетики изоферментов:

Избыточность генетического кода (одну аминокислоту, как правило, кодируют несколько различающихся нуклеотидных триплетов).

Изменения в структуре белка могут не вызывать изменения подвижности (полиморфизм есть, но его нельзя выявить).

Ферменты должны быть «живыми» (сложности с хранением).

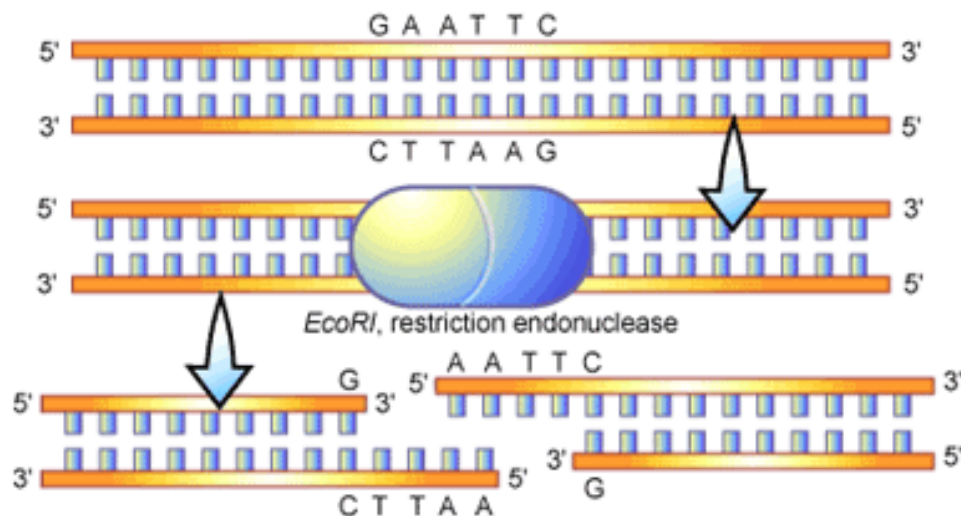
- Альтернатива?
- ДНК.

Основные виды молекулярно-генетических маркеров, используемых в аквакультуре.

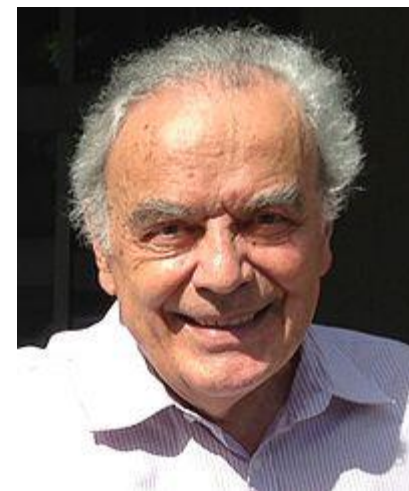
Marker	Abbreviation	Prior molecular information requirement	Type	Polymorphism or power	Expression
Allozyme	–	Yes	Type I	Low	Codominant
Amplified fragment length polymorphism	AFLP	No	Type II	High	Dominant
Expressed sequence tags	EST	Yes	Type I	Low	Codominant
Insertions or deletions	Indels	Yes	Type I or Type II	Low	Codominant
Microsatellites	SSR	Yes	Mostly Type II	High	Codominant
Mitochondrial DNA	mtDNA	Yes	–	–	Maternal inheritance
Random amplified polymorphic DNA	RAPD	No	Type II	Moderate	Dominant
Restriction fragment length polymorphism	RFLP	Yes	Type I or Type II	Low	Codominant
Single nucleotide polymorphisms	SNPs	Yes	Type I or Type II	High	Codominant



Рестриктазы. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP (произносится как “риф лип”), ПДРФ)



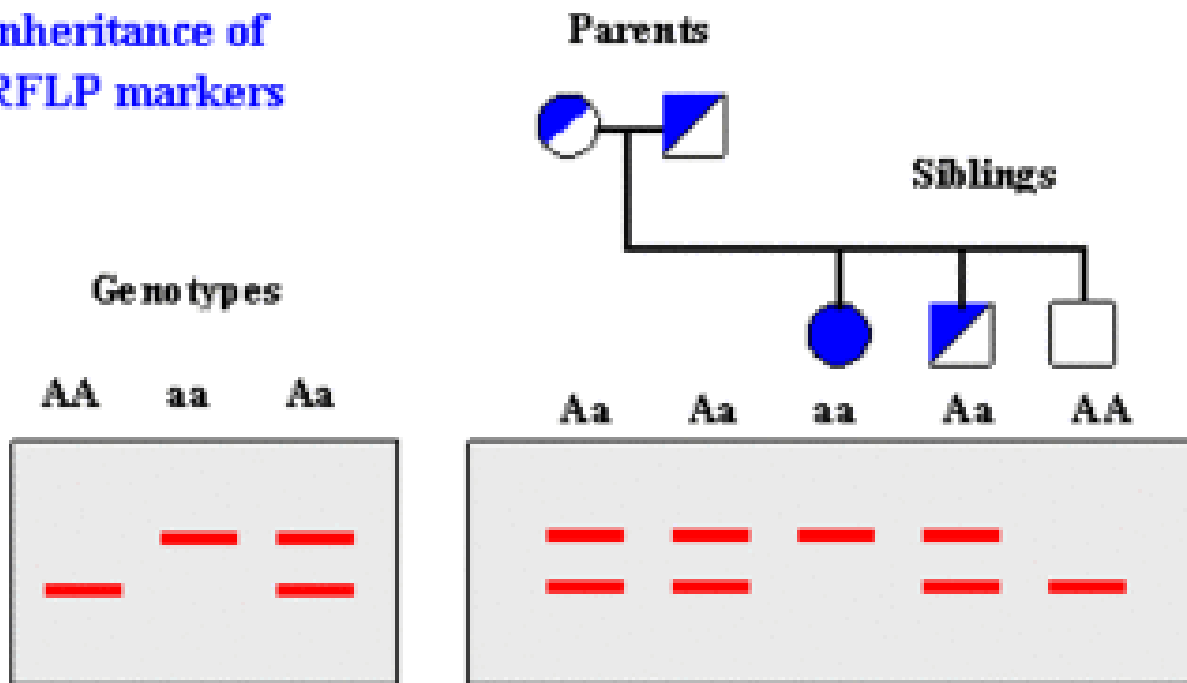
Механизм разрезания чужеродной ДНК
ферментом рестрикции *E. coli*.



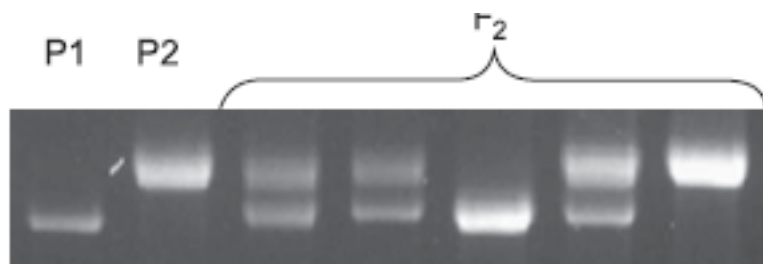
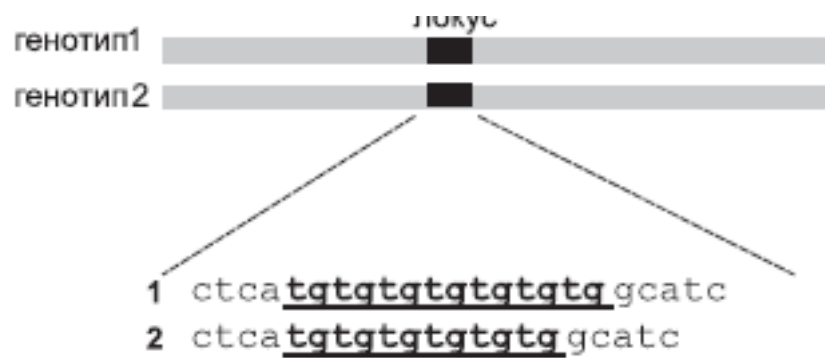
Вернер Арбер

Рестриктазы. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ, RFLP)

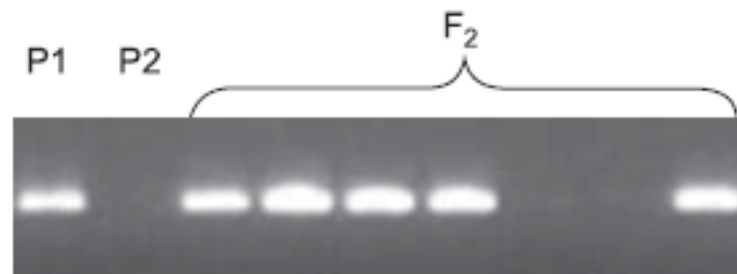
Inheritance of RFLP markers



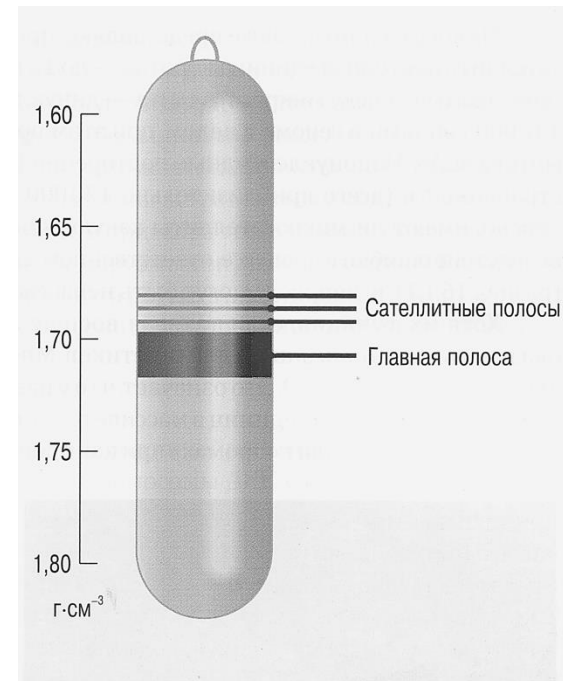
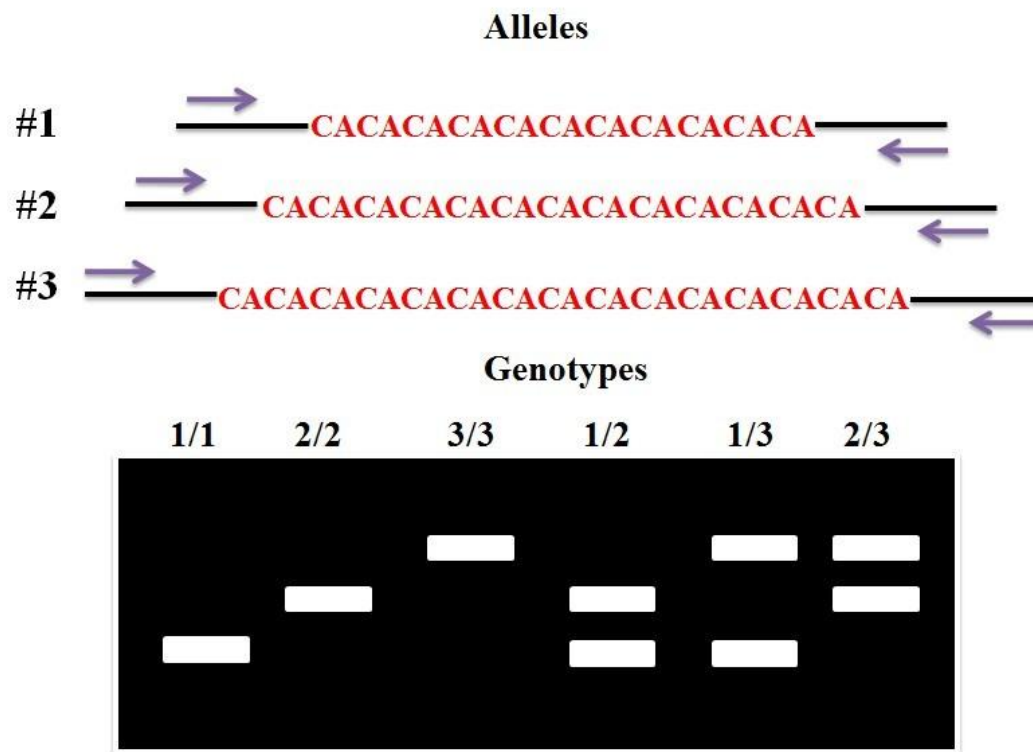
Кодоминирование



Доминирование



Микросателлиты. Микросателлитная ДНК (VNTR, SSR, STR)



Фракционирование
геномной ДНК в плавающем
градиенте хлористого цезия.

Использование STR маркеров для идентификации пола

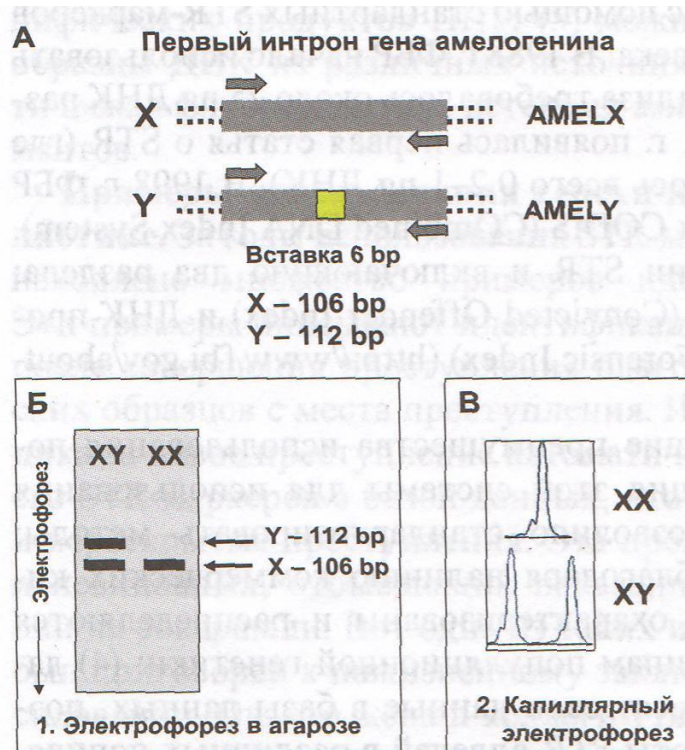


Рис. 5.9. Использование ПЦР в генотипировании. Определение пола. **А.** Расположение праймеров, фланкирующих фрагменты в 106 и 112 нуклеотидов в первом интроне гена амелогенина в X- и Y-хромосомах соответственно. **Б.** Электрофорез с последующей Саузерн-гибридизацией выявляет две полосы для генотипа XY. Два фрагмента, образующихся в случае генотипа XX, при электрофорезе дадут одну слитную полосу размером 106 bp. **В.** При использовании капиллярного электрофореза гетерозигота XY даст два пика, а XX — один соответственно

Использование STR маркеров в криминалистике

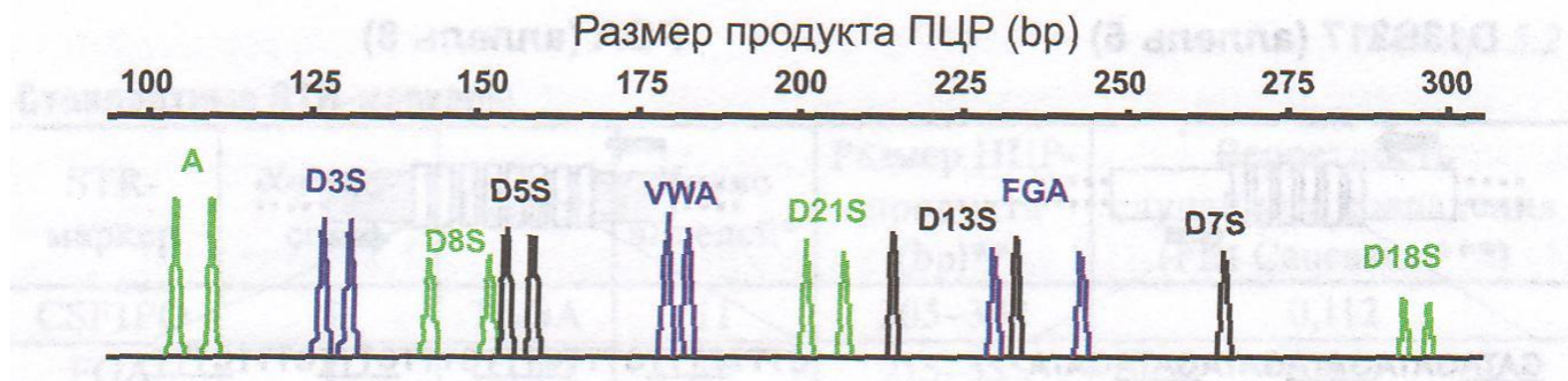
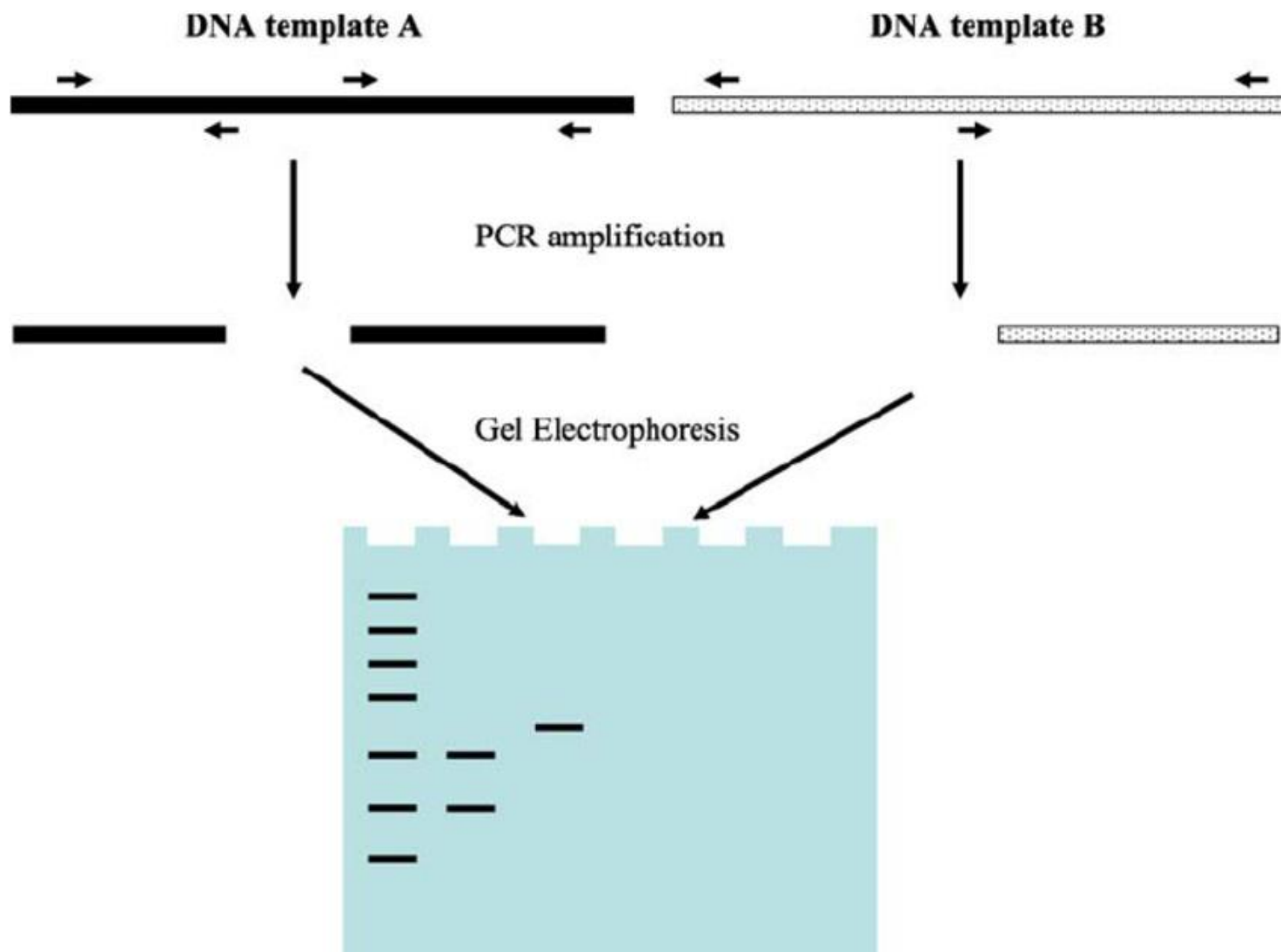


Рис. 5.10. **Одновременный анализ нескольких STR-маркеров.** Шкала для оценки размера ПЦР-продуктов показана сверху. Размер ПЦР-продуктов (слева–направо): А (амелогенин) — гетерозигота XY, 106 bp и 112 bp; D3S (D3S1358) — гетерозигота 127 bp и 129 bp; D8S (D8S1179) — гетерозигота 143 и 151 bp; D5S (D5S818) — гетерозигота 154 bp и 162 bp; VWA — гетерозигота 180 bp и 184 bp; D21S (D21S11) — гетерозигота 200 bp и 210 bp; D13S (D13S317) — гетерозигота 217 и 233 bp; FGA — гетерозигота 228 и 244 bp; D7S (D7S820) — гомозигота 269 bp; D18S (D18S51) — гетерозигота 290 bp и 300 bp.

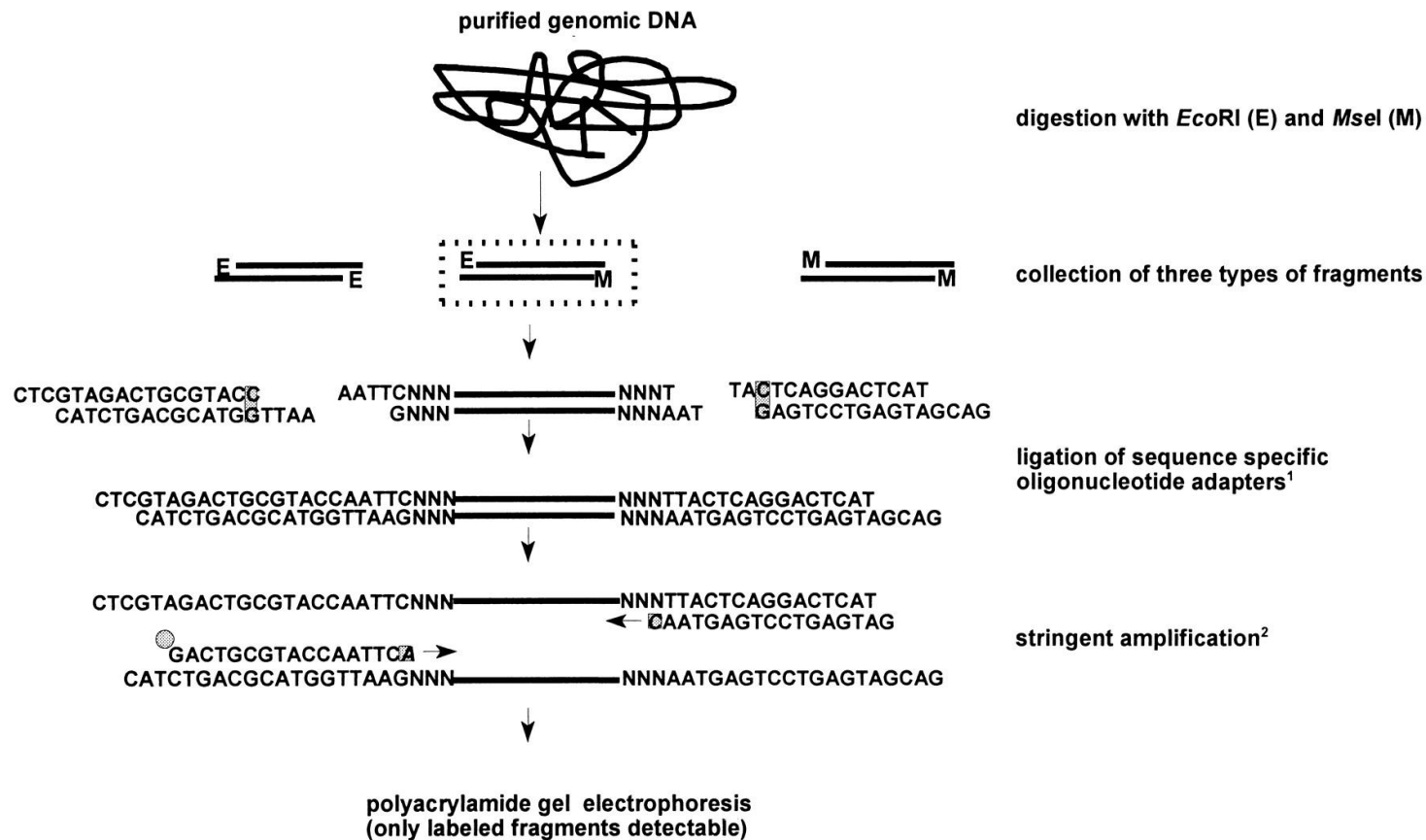
Схожий принцип используется при паспортизации популяций ценных гидробионтов (осетры, например)

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

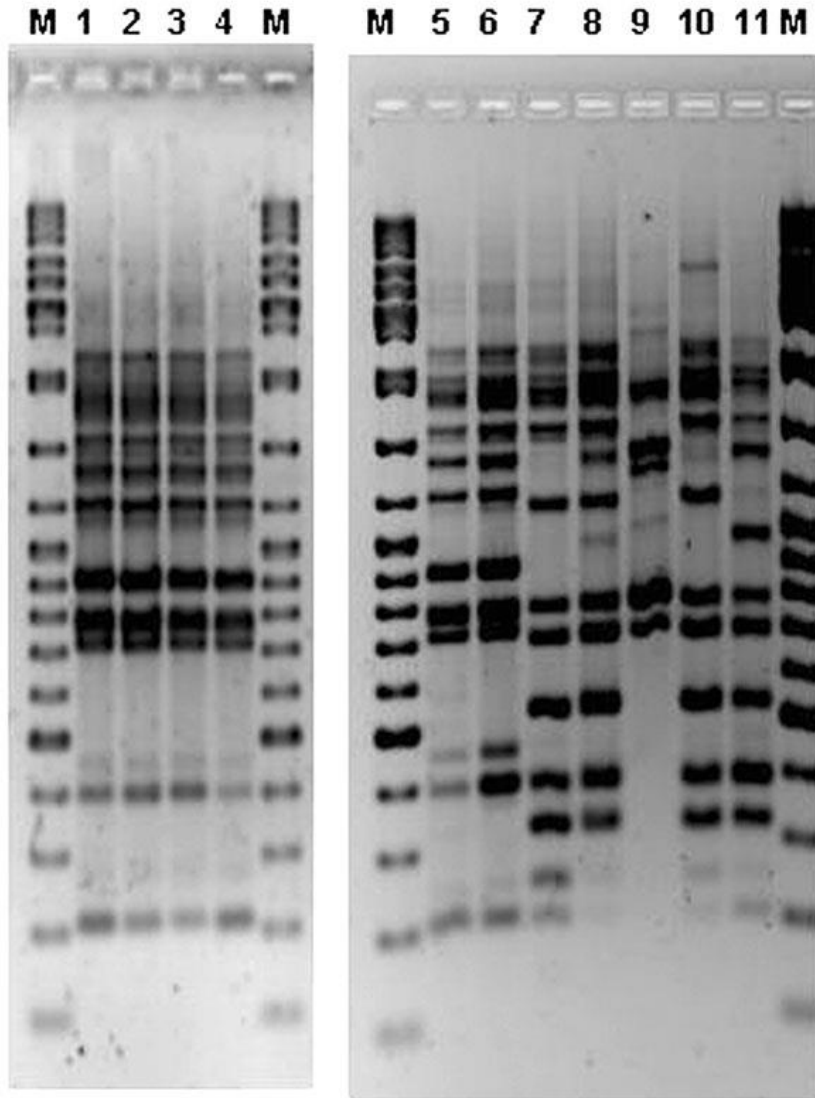


Принцип RAPD-анализа

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)



AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

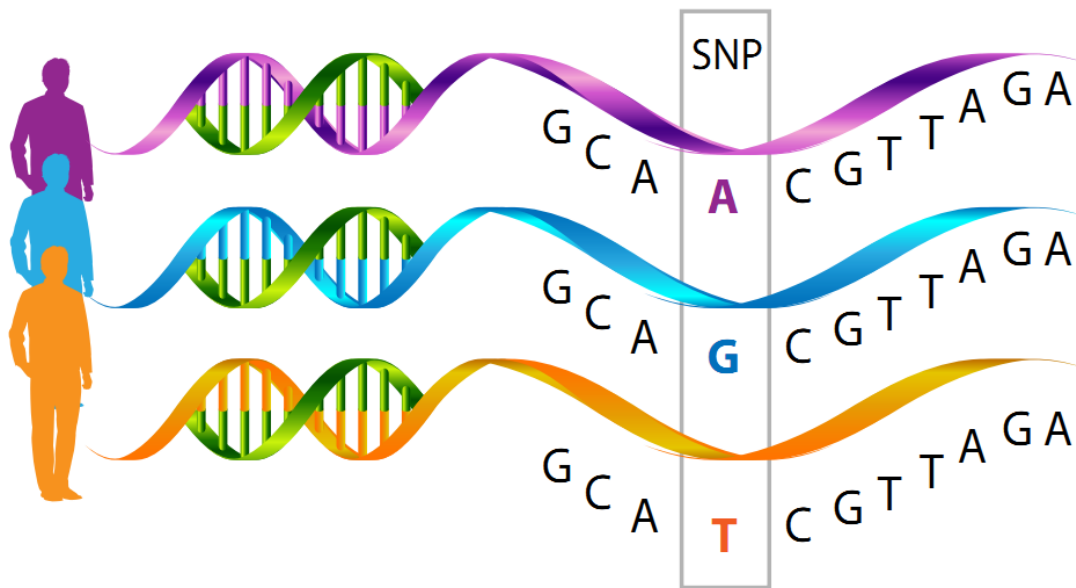


Последовательности нуклеотидов. Митохондриальная ДНК.

Некодирующая часть (контрольный регион) может быть использована для популяционно-генетических изысканий (внутривидовой уровень). Но есть исключения.

Белок-кодирующие фрагменты используются для филогенетических построений (в основном - надвидовой уровень).

Последовательности нуклеотидов. SNP (single nucleotide polymorphism).



SNP: частота в популяции $> 6\%$

Мутация: частота в популяции $< 1\%$

Литература:

1. Журавлева Г.А. Генная инженерия в биотехнологии — Спб.: Эко-Вектор, 2016. - 328 с.
2. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Курбатова О.Л., и др. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. Под редакцией Ю.П. Алтухова. М.: Наука. 2004г. 619 стр.
3. Кейлоу П. Принципы эволюции. 1986г.
4. Левонтин Р. Генетические основы эволюции. 1978г.