

Н. В. БЫСТРАКОВА, О. А. ЕРМАКОВ, С. В. ТИТОВ

**РУКОВОДСТВО
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО ГЕНЕТИКЕ**



Пенза - 2011

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. Г. БЕЛИНСКОГО

УДК 575

Н. В. Быстракова, О. А. Ермаков, С. В. Титов

**РУКОВОДСТВО
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО ГЕНЕТИКЕ**

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

Пенза – 2011

Печатается по решению редакционно-издательского совета Пензенского государственного педагогического университета имени В. Г. Белинского

УДК 575

РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО ГЕНЕТИКЕ:
Учебно-методическое пособие / Авторы-составители: Н.В. Быстракова, О.А. Ермаков, С.В. Титов (Пенз. гос. пед. ун-т им. В. Г. Белинского). – Пенза, **2011**. – с. **69**.

Учебно-методическое пособие «Руководство к практическим занятиям по генетике» предназначено для студентов биологических специальностей высших учебных заведений. Пособие включает краткую теоретическую информацию по основным разделам общей, популяционной и молекулярной генетике, а также подробные планы проведения лабораторных занятий.

Авторы-составители: кандидаты биологических наук, доценты
Н.В. Быстракова, О.А. Ермаков
доктор биологических наук, профессор
С.В. Титов

Рецензент: заведующий кабинетом методов молекулярной диагностики
Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,
ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук
М.В. Холодова

© Коллектив авторов

© Пензенский государственный педагогический университет
имени В. Г. Белинского, **2011**

СОДЕРЖАНИЕ:

Раздел 1. МАТЕРИАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ	4
Работа № 1. Определение полового хроматина человека	4
Работа № 2. Изучение мейоза в молодых пыльниках лилии	5
Работа № 3. Приготовление хромосомного препарата мыши	7
Работа № 4. Составление кариограмм	10
Раздел 2. ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ НАСЛЕДОВАНИЯ	12
Моногибридное скрещивание	22
Работа № 5. Наследование рецессивного признака <i>ebony</i>	22
Работа № 6. Наследование доминантных летальных признаков <i>curly-plum</i>	27
Дигибридное скрещивание	28
Работа № 7. Наследование рецессивных признаков <i>ebony</i> и <i>vestigial</i>	28
Наследование признаков, сцепленных с полом	31
Работа № 8. Наследование рецессивного, сцепленного с полом признака <i>white</i>	31
Работа № 9. Наследование полудоминантного, сцепленного с полом признака <i>Bar</i>	35
Работа № 10. Анализирующее скрещивание дрозофилы	37
Взаимодействие генов	38
Работа № 11. Изучение взаимодействия генов при формировании окрасов собак и кошек и мастей лошадей	45
Раздел 3. ИЗМЕНЧИВОСТЬ И МЕТОДЫ ЕЕ ИЗУЧЕНИЯ	46
Работа № 12. Изучение модификационной изменчивости на примере земляники	46
Работа № 13. Выделение ДНК из тканей животных	54
Работа № 14. Амплификация ДНК и электрофорез продуктов амплификации	60
Работа № 15. Экскурсия в природу на тему «Полиморфизм популяций»	65
Работа № 16. Установление частоты генотипов в популяции при разных частотах аллелей	67
Работа № 17. Изучение частоты генов в популяции человека	68
Список рекомендуемой литературы	69

Раздел 1. МАТЕРИАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

Работа № 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛОВОГО ХРОМАТИНА ЧЕЛОВЕКА

Материал и оборудование: микроскоп, небольшой шпатель, предметное и покрывное стекла, 96% метанол, краситель Гимза.

Ход работы:

1. Сделать соскоб со слизистой оболочки полости рта (с внутренней поверхности щек). Соскоб берут небольшим стерильным шпателем, слегка отточенным для этой работы. Соскоб (беловатый налет) размазать как можно ровнее посередине предметного стекла.
2. Для фиксации клеток мазок поместить в 96% спирт. Через 15-20 мин. мазок вынуть и подсушить на воздухе. Такой мазок можно сохранять неопределенно долгое время. На мазок можно нанести 1-2 капли ацетоорсеина и положить на него покрывное стекло. Через 2-5 мин. препарат можно рассматривать под микроскопом.
3. Исследовать препарат сначала на малом увеличении, потом с иммерсией. В поле зрения микроскопа хорошо видны ядра клеток округлой и овальной формы с четко выраженной оболочкой. Учитывают только интерфазные ядра с мелкозернистым хроматином.
4. Найти и рассмотреть ядра, содержащие половой хроматин.

Тельца полового хроматина прилегают к ядерной мембране и заметны в виде ее утолщения. Они могут иметь треугольную, овальную, прямоугольную, чечевицеобразную и другую форму.



5. Установить процент клеток, содержащих половой хроматин. При этом следует подсчитать не менее 100 интерфазных ядер.

У женщин половой хроматин бывает в 20-60% ядер. В остальных ядрах он не обнаруживается в связи с определенным состоянием клеток. Количество глыбок полового хроматина в клетках равно числу X-хромосом минус 1. Следовательно, у женщин в норме в каждом ядре должно быть одно тельце полового хроматина. У мужчин полового хроматина практически нет (в отдельных случаях бывает незначительное количество).

Работа № 2. ИЗУЧЕНИЕ МЕЙОЗА В МОЛОДЫХ ПЫЛЬНИКАХ ЛИЛИИ

Материал и оборудование: молодые бутоны лилии *Lilium tigrinum* (фиксированные в смеси Лилли с предварительной обработкой), микроскоп, иммерсионное масло, предметное и покровное стекла, спиртовка, пинцет, препаровальные иглы, фильтровальная бумага.

Реактивы: краситель Гимза.

Подготовка материала:

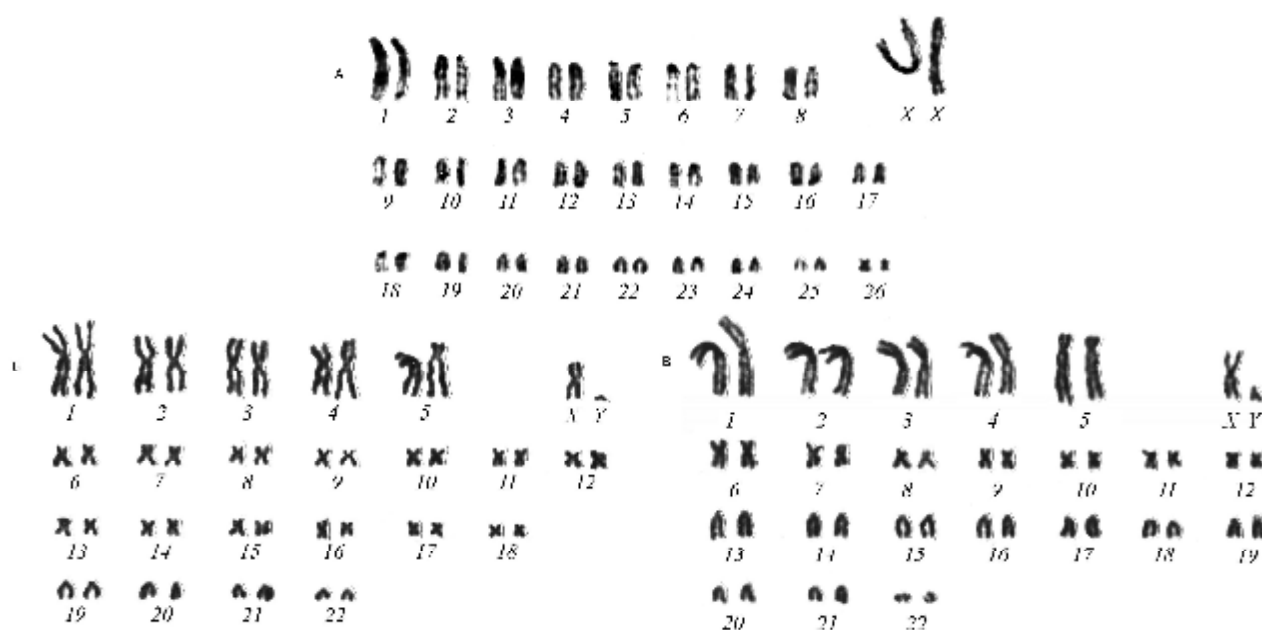
1. Фазы мейоза в бутонах лилии можно видеть только в бутонах не больше 5 мм (зрелые – до 10 см). Летом: срезать бутоны, удалить околоцветник, поместить в смесь Лилли (абсолютный этанол + ледяная уксусная к-та 3:1) на 24 ч.
2. Фиксированный материал промыть в этаноле в 3 этапа: 1) 96% - 30-40 мин.; 2) 96% - 30-40 мин.; 3) 70% - оставить на хранение.

Ход работы:

1. Из фиксированного бутона лилии длиной 7-9 мм вычленить пыльник размером 3-5 мм и перенести его на предметное стекло в каплю красителя Гимза.
2. Осторожно выдавить содержимое пыльника, не повреждая клеток. Для этого следует разрезать пыльник пополам, удерживая его препаровальной иглой, а второй иглой надавить на отрезанную половинку пыльника.
3. Добавить к препарату еще 1-2 капли красителя и подогреть над пламенем спиртовки около 3 мин, избегая закипания красителя.
4. Фильтровальной бумагой убрать края большой капли; объект накрыть покровным стеклом; клетки распределить в 1 слой раздавливанием.
5. Просмотреть препарат на большом увеличении микроскопа, найти хорошие метафазы 1 и 2-го делений. Нанести на покровное стекло масло, перевести на иммерсионный объектив.
6. Сфотографировать, подсчитать число хромосом, помечая их порядковым номером. Вклеить подписанные фотографии в тетрадь.

КАРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Анализ кариотипов организмов – неотъемлемая часть исследования генетической структуры популяций некоторых видов. Более того, в случае видов-двойников анализ кариотипа зачастую остается единственным способом определения видовой принадлежности особи. Например, виды-двойники рода серых полевков – обыкновенная (*Microtus arvalis*, $2n=46$) и восточноевропейская (*M. rossiaemeridionalis*, $2n=54$) – надежно различаются только после анализа кариотипа.



Кариотипы видов-двойников серых полевков:

А – *Microtus rossiaemeridionalis*; Б – *M. arvalis*, форма «*arvalis*»; В – *M. arvalis*, форма «*obscurus*».

Вся процедура кариологического исследования сводится к трем основным этапам:

1. Приготовление хромосомных препаратов;
2. Различные способы их окраски;
3. Анализ.

Приготовление хромосомных препаратов млекопитающих

Получение хромосомных препаратов различается в случае крупных и мелких животных.

У крупных животных для хромосомного анализа используется кровь, пунктат костного мозга или кусочек кожи, которые затем инкубируют в стерильных условиях; животное при этом остается живым.

У мелких животных, как правило, используют свежие ткани, обладающие высокой митотической активностью (костный мозг, селезенка, семенники, яичники, эмбриональные ткани и др.). В этом случае ткани можно использовать непосредственно без предварительного культивирования в питательных средах, но животное при этом умерщвляется.

Дальнейшие этапы приготовления хромосомных препаратов универсальны для любых животных (методику разработали **Ford, Hamerton, 1956**).

Работа № 3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ХРОМОСОМНОГО ПРЕПАРАТА МЫШИ

Материал и оборудование: живая мышь, фильтровальная бумага, шприц на 1 мл для колхицинирования, одноразовый шприц на 2-3 мл, тонкие ножницы, тонкий пинцет, центрифужные пробирки, пробки для пробирок, обернутые фольгой, центрифуга, термостат, таймер, фильтровальная бумага, 3 пипетки, предметные стекла, обработанные в хромпике, промытые и охлажденные; спиртовка.

Реактивы: 0,04% колхицин, физ. раствор (0,9% NaCl), 0,56% KCl, абсолютный метанол (допускается этанол), ледяная уксусная к-та (ЛУК), краситель Гимза.

Ход работы:

Суть процесса	Протокол работы
1. Колхицинирование	
Для остановки митоза в активно делящихся тканях животного внутрибрюшинно ему вводится 0,04% раствор колхицина из расчета 1 мл на 100 г массы животного. Время колхицинирования определяется обычно опытным путем, но оно не должно превышать 45 мин в случае мелкого животного, иначе хромосомы чрезмерно	Ввести мыши внутрибрюшинно колхицин комнатной температуры (мелкой мыши – 0,1 мл, крупной – до 0,5 мл). Посадить мышь в отсадник на 35-45 мин. В течение этого времени подготовить рабочее место: включить водяную баню (на 37 °C), добавить в центрифужную пробирку

<p>спирализуются и препарат не будет пригодным для анализа.</p>	<p>2–3 мл физ. раствора, поместить ее в водяную баню, подготовить к работе шприц, инструменты, приготовить фиксатор Карнуа (метанол и ЛУК в соотношении 3 : 1) и поставить его в холодильник.</p>
<h2>2. Подготовка клеток к гипотонической обработке</h2>	
<p>После умерщвления животного извлекаются необходимые ткани. Чаще всего используется костный мозг, который вымывают из бедренных и большеберцовых костей шприцом с подогретым до температуры тела физ. раствором. От животных крупнее мыши достаточно одной бедренной кости. У насекомых, имеющих слишком миниатюрные кости, хорошие результаты дает обработка целой селезенки. Взятые ткани тщательно гомогенизируются в физ. растворе, который поддерживает клетки живыми (однако часто ткани помещают сразу в гипотонический раствор KCl).</p>	<p>Умертвить мышь с помощью эфира или путем цервикальной дислокации. Быстро извлечь бедренные и большеберцовые кости, очистить их от мышц, срезать эпифизы и шприцом вымыть содержимое костей (красный костный мозг) в центрифужную пробирку с физ. раствором. Хорошо промытая кость должна быть прозрачной на просвет. Очень тщательно размешать костный мозг в растворе, несколько раз набрав раствор из пробирки в шприц и с силой выдавив обратно в пробирку, до образования обильной пены.</p>
<p>После гомогенизации клетки осаждают центрифугированием и удаляют физ. раствор</p>	<p>Центрифугировать пробирку 5 мин. на 1000 об/мин (не забыв уравновесить центрифугу). В это время поставить KCl в термостат.</p>
<h2>3. Гипотоническая обработка клеток.</h2>	
<p>Обработка клеток гипотоническим раствором KCl (0,56%) необходима для набухания деалящихся клеток и «разбавления» их содержимого – спирализованных хромосом. Температура раствора должна оставаться постоянной на уровне 37 °C. Очень важно и время гипотонии, поскольку при недостаточной экспозиции хромосомы оказываются сжатыми и непригодными для анализа, а при</p>	<p>Слить надосадочную жидкость. Добавить в пробирку 2–3 мл подогретого KCl, перемешать осадок и раствор при помощи шприца (как и с физ. раствором) и поместить в водяную баню на 10–12 мин.</p>

<p>излишней экспозиции – слишком далеко разбросанными, вплоть до «потери» отдельных хромосом из метафазной пластинки.</p>	
<p style="text-align: center;">4. Фиксация клеток.</p>	
<p>Фиксация необходима для удаления воды между клетками, что позволяет длительно хранить полученную суспензию. Фиксация проводится смесью метанола и ледяной уксусной к-ты (3:1). Для предотвращения резких изменений состояния клеток иногда проводят предфиксацию – добавление фиксатора непосредственно в гипотонический раствор.</p>	<p>В пробирку добавить 7–8 капель фиксатора Карнуа (предфиксация). Через 5 мин. пробирку центрифугировать 5 мин.</p>
<p>После предфиксации клетки осаждают центрифугированием, сливают надосадочную жидкость и добавляют фиксатор. Общее время фиксации – не менее 30 мин., в течение которых фиксатор сменяют 2-3 раза для окончательного удаления воды из суспензии. Наилучшие результаты дает использование охлажденного фиксатора и осуществление самого процесса фиксации на холоде.</p>	<p>Слить надосадочную жидкость, добавить к осадку 2 мл фиксатора, осторожно размешать осадок в растворе (легкими прокачивающими шприца), закрыть пробкой с фольгой и поставить в холодильник на 10 мин.</p>
	<p>Тщательно суспендировать раствор, центрифугировать 5 мин. Снова добавить фиксатор, тщательно суспендировать и поставить в холодильник на 15 мин.</p>
	<p>Повторить процедуру, увеличив время фиксации до 20 мин. После центрифугирования добавить фиксатор в таком количестве, чтобы после суспендирования получился полупрозрачный беловатый опалесцирующий раствор. Суспензия клеток костного мозга готова; при условии герметичности упаковки она может храниться в холодильнике 1-2 месяца.</p>

5. Оценка качества хромосомного препарата.

<p>Для дальнейшего анализа хромосомного препарата огромное значение имеет процесс нанесения суспензии на предметное стекло. Это делается путем ее раскапывания с достаточно большой высоты, чтобы набухшие при гипотонии клетки с хромосомами упали на стекло и «разбились», при этом рвется клеточная мембрана и хромосомы разлетаются друг от друга на некоторое расстояние, что позволяет оценить морфологию каждой из них в дальнейшем. Изменяя высоту раскапывания, можно в некоторой степени подкорректировать качество имеющегося хромосомного препарата.</p>	<p>Тщательно суспендировать полученную смесь, зажать спиртовку, шприцом или чистой пипеткой набрать несколько капель суспензии и капнуть их на охлажденное предметное стекло с высоты около 20 см. Немедленно поджечь стекло в пламени спиртовки.</p> <p>После высыхания стекла окрасить его в свежем растворе красителя Гимза (10–15 мин), ополоснуть в дистиллированной воде и подсушить на воздухе в вертикальном положении.</p> <p>После высыхания исследовать стекло под микроскопом.</p>
--	--

Работа № 4. СОСТАВЛЕНИЕ КАРИОГРАММ

Материал и оборудование: микропрепараты хромосом млекопитающих, микроскоп с фотонасадкой, бумага, ножницы, клей.

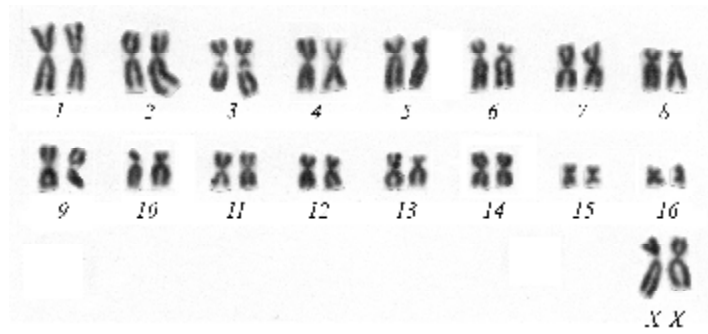
Ход работы:

1. Исследовать под малым увеличением микроскопа препарат митотических хромосом млекопитающего. Найти качественные (полные, без наложений) метафазные пластинки, выписать их координаты.
2. Сфотографировать лучшую метафазную пластинку, распечатать изображение (2 копии) и вырезать изображения всех хромосом из одной копии.
3. Разложить вырезанные изображения хромосом сначала попарно (гомологичные хромосомы) с учетом пола объекта, а затем расположить на чистом листе бумаги пары хромосом в порядке убывания их размеров, либо в соответствии со стандартной для данного вида раскладкой. Наклеить изображения целой метафазной пластинки и кариограмму на чистый лист и затем в тетрадь.

4. Пронумеровать пары аутосом и обозначить половые хромосомы.



Метафазная пластинка



Кариограмма крякчатого суслика

Раздел 2. ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ НАСЛЕДОВАНИЯ

ОСНОВНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕРМИНЫ И НЕКОТОРЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ЗАМЕЧАНИЯ, КОТОРЫЕ НЕОБХОДИМО ИМЕТЬ В ВИДУ ПРИ РАБОТЕ

1. Термины **наследственный фактор** и **ген** всюду употребляются как синонимы. То же относится к терминам **аллеломорф** и **аллель**. Первый из них исторически более старый, второй – более позднего происхождения, вошедший в обиход из-за его краткости.
2. Фенотип природной формы дрозофилы принято обозначать терминами **нормальный**, или **D-32**; **дикий тип**, или **wild type**. Очень часто дикую форму дрозофилы называют серой (*gray*), несмотря на то, что она вовсе не серая, а скорее желтовато-коричневая. Однако это обозначение давно и прочно вошло в литературу.
3. В соответствии с принятой в литературе о дрозофиле системой, **гены рецессивных особенностей** (мутантов) обозначают малыми буквами – первыми в английских названиях соответствующих мутантов; например, **e** – **ebony** (тело цвета эбенового дерева); **c** – **curved** (загнутые крылья) и т. д. В тех случаях, когда с одной и той же буквы начинается название другого или других мутантов, то для их различения к первой букве прибавляют вторую, например, **ey** – **eyeless** (безглазый); **cm** – **carmine** (карминные глаза); **cn** – **cinnabar** (киноварные глаза) и т. д.
4. **Гены доминантных особенностей** (мутантов) обозначают большими буквами алфавита с соблюдением того же принципа наращения дополнительной второй или третьей букв, если в них есть необходимость; например, **B** – **Bar** (полосковидные глаза); **Bx** – **Beadex** (вырезанные крылья) и т. д.
5. Нормальные аллели рецессивных и доминантных генов принято обозначать знаком + возле символа фенотипа. Например, рецессивный аллель гена окраски тела **ebony** – **e**, нормальный аллель **e⁺**.
6. Буквами **PP** (начальные от слова **parents** – родители) обозначают скрещиваемые, т. е. родительские формы.
7. Знак × между обозначениями, или формулами, родителей означает их скрещивание.
8. В написании любого скрещивания на первом месте принято ставить обозначение самки (матери), на втором – самца. Предпочтение матери отдается потому, что в генетическом анализе потомство родителей неизвестного происхождения (например, выловленных в природе или возникших в результате мутаций) реже

вызывает сомнения в отношении материнства; отцовство же их в одних случаях всегда неизвестно, в других – сомнительно в той или иной степени.

9. В английской литературе для обозначения скрещивания двух неодинаковых гомозигот, например, $AA \times aa$, или $aa \times AA$, с которыми нам в большинстве случаев придется иметь дело в дальнейшем, существует термин **кросс** (cross), соответствующий недифференцированному русскому понятию скрещивание.
10. Если же скрещивают две одинаковые гомозиготы, например, $AA \times AA$, или $aa \times aa$, такое скрещивание по-английски обозначают особым термином – **инкросс** (incross), т. е. скрещивание внутри себя, или сходных особей (откуда происходит термин **inbreeding**).
11. Буквой F (от слова **filial** – дочерний) и цифрой при ней, например, F1, F2, F3 и т.д., обозначают потомства первого, второго, третьего и последующих гибридных поколений – потомков данного исходного скрещивания.
12. Гибриды F2 от каждого исходного скрещивания могут быть получены тремя путями:
 - а) Скрещиванием гибридов F1 между собой, т. е. $F1 \times F1$, или $Aa \times Aa$. Этот тип скрещиваний называется **прямым**, а гибриды F2, полученные от таких скрещиваний – **гибридами F2 от прямого скрещивания F1**. В английской литературе для обозначения скрещиваний этого типа существует особый термин – **интеркросс** (intercross); по-русски он означает то же самое, т.е. скрещивание между собой, или друг с другом. Соответственно с этим гибриды F2 от интеркрасса можно кратко называть **интеркроссным F2**.
 - б) Скрещиванием гибридов F1 с одной родительской формой, например, с доминантной AA , т. е. $Aa \times AA$, или $AA \times Aa$.
 - в) Скрещиванием гибридов F1 с другой родительской формой, например, с рецессивной aa , т.е. $Aa \times aa$ или $aa \times Aa$. Скрещивания обоих этих типов носят название **возвратных** (возврат к одному из родителей); в животноводстве они называются также **поглотительными**. По-английски возвратные скрещивания и возникающее в них потомство обозначаются термином, аналогичным соответствующему русскому, а именно – **беккроссные** (backcross). Те и другие сокращенно обозначаются также буквами **BC** (начальные от слов **back** – возврат, назад и **cross** – скрещивание). Поэтому вместо пространного определения возвратных гибридов F2, полученных от скрещивания гибридов F1, например, с AA , или с aa , можно обозначить их соответственно более кратко: **BC от скрещивания F1 с AA** , или **BC от скрещивания F1 с aa** .

Если по характеру опыта или исследования возвратные скрещивания с той или другой родительской формой продолжают и в последующих поколениях, тогда возвратных гибридов F3, F4, F5 и последующих поколений можно соответственно

обозначить как **BC2**, **BC3**, **BC4** и т. д. (Обратите внимание, что номера последовательных беккроссных поколений на единицу меньше соответствующих им гибридных за счет выпадения из нумерации беккроссных поколений гибридов первого поколения.)

- 13.** Обозначения зигот и гамет в тексте иногда могут несколько отличаться от их табличного написания. В таблицах все зиготы для наглядности изображены в виде дроби с двумя черточками, соответствующими двум хромосомам диплоидного организма. Находящиеся в них гены записаны в две строки – над черточками и под ними. Так, например, формула $\frac{ab}{++}$ означает, что у данного гибрида (дигибрида) в одной гомологичной $^{++}$ хромосоме локализованы рецессивные гены **a** и **b**, а в другой, гомологичной хромосоме – их нормальные аллели, **+** и **+**. У такого гибрида при отсутствии перекреста образуются два типа гамет с одной хромосомой, а именно **ab** и **++**.

Текстовые обозначения этого гибрида и образующихся у него двух типов гамет для краткости иногда будут несколько упрощены и записаны соответственно так: **a b**/**++**, **a b** и **++**.

- 14.** Порядок расположения неаллельных генов в обозначении генотипов должен соответствовать их действительному порядку (локализации) по длине данной хромосомы, причем на первом месте принято писать ген, занимающий крайнее положение на условно левом конце этой хромосомы.
- 15.** При расположении гамет на сторонах решетки Пеннета самки располагаются в верхней половине решетки, а самцы – в нижней.

МЕТОДЫ И ПРИНЦИПЫ ПРОВЕДЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Особенности гибридологического метода. Гибридологический анализ – основной и специфический метод генетики. Он состоит в проведении скрещиваний и изучении наследования отдельных признаков и свойств у гибридов в ряду поколений.

Гибриды – потомки от скрещивания родительских форм, отличающихся между собой наследственными свойствами и признаками;

Гибридизация, или скрещивание – процесс получения гибридов.

Разработанный Менделем гибридологический метод, связанный с исследованием характера наследования отдельных признаков и свойств, сыграл очень большую роль в изучении явлений наследственности и изменчивости. Совокупность разных методов изучения наследственности называют **генетическим анализом**.

Поведение признаков скрещиваемых родительских форм в последующих гибридных поколениях впервые тщательно проследил г. Мендель в работе с горохом. Требования, которых он придерживался, составляют основу гибридологического анализа:

1. Для скрещивания нужно брать особей, которые отличаются одной, двумя, тремя или более парами контрастирующих признаков. Например, мухи с красными и белыми глазами, с нормальными и укороченными крыльями, с серым и черным телом и т. д. Каждый такой признак исключает возможность развития другого, противоположного; такие признаки называются **альтернативными**.
2. В каждом поколении изучать отдельно каждую пару альтернативных признаков, не учитывая других отличий между скрещиваемыми организмами.
3. Применять строгий математический учет гибридов, которые отличаются по исследуемым признакам.
4. Проводить индивидуальный анализ потомков от каждого гибридного организма отдельно.

ПРАВИЛА СОСТАВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СХЕМ

При гибридологическом анализе всегда составляют генетические схемы, для чего используется общепринятая символика:

P (или **PP**) — родительские формы, взятые для скрещивания (от лат. *parenta* — родители; при написании схем скрещивания на первом месте принято ставить материнскую форму);

× — знак умножения, который означает скрещивание;

♀ женский пол (зеркальце богини Венеры);

♂ — мужской пол (щит и копье бога Марса);

F1, **F2** и т.д. — гибридные поколения (от лат. *fili* — дети), цифровой индекс показывает порядковый номер гибридного поколения.

Гены обозначают буквами латинского алфавита:

A — доминантный ген;

a — рецессивный ген;

AA — доминантная гомозигота;

aa — рецессивная гомозигота;

Aa — гетерозигота по одному признаку.

Кроме обозначения генов любыми латинскими буквами, принята еще определенная номенклатура генов для отдельных видов. Согласно этой номенклатуре ген обозначается одной или двумя первыми буквами названия того признака, который он детерминирует. Например, рецессивный ген черного тела у дрозофилы обозначается буквой **b** (**black** – черный); рецессивный ген, детерминирующий зачаточные крылья у дрозофилы, обозначается **vg** (**vestigial** – зачаточный) и т. д. Доминантные аллели этих генов, обуславливающие развитие нормальных признаков, в таком случае обозначают знаком «+» (**b⁺**, **vg⁺**).

При написании генетических формул аллельные гены, локализованные в гомологичных хромосомах, ставятся всегда рядом: **AaBb**, **AaBbCc** и т. д. Для того, чтобы показать связь генов с хромосомами, в генетических формулах гомологичные хромосомы обозначают в виде двух черточек (или для краткости – одной). Тогда формула дигетерозиготы (**AaBb**) приобретает вид $\frac{A}{a} \frac{B}{b}$. При такой записи дигетерозиготы видно, что аллельные гены **Aa** и **Bb** находятся в двух разных парах хромосом, а формула $\frac{AB}{ab}$ показывает, что две пары аллельных генов **Aa** и **Bb** локализованы в одной паре гомологичных хромосом, доминантные гены **A** и **B** локализованы в одной хромосоме, а их рецессивные аллели **a** и **b** – в другой.

Гаметы содержат по одной из гомологичных хромосом и одной аллели каждого гена; их формулы **AB**, **ab**, **Ab** и т. д.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов для генетических экспериментов пригодны такие организмы, которые отличаются четкими наследственными признаками, быстро размножаются, дают многочисленное потомство, позволяющее накапливать значительный статистический материал. Этим требованиям отвечает **плодовая**, или **уксусная, мушка** (***Drosophila melanogaster***), которой принадлежит воистину выдающаяся роль в разработке большинства проблем современной генетики. Дрозофилу широко используют в экспериментах благодаря таким свойствам:

- 1) **очень короткий цикл развития;**
- 2) **высокая плодовитость;**
- 3) **большое разнообразие мутантных линий;**
- 4) **малое число хромосом.**

Дрозофила успешно разводится и в лабораторных условиях в пробирках с питательной средой. Срок развития от яйца до взрослой особи **12-14** дней при температуре **21-22 °C**. При оптимальной температуре (**24-25 °C**) цикл развития равен приблизительно **10** суткам. С понижением температуры развитие мушки сильно замедляется. Повышение температуры сокращает цикл развития, но при температуре выше **31 °C** мушка становится частично или полностью бесплодной.

Цикл развития дрозофил необходимо регулировать так, чтобы он равнялся двум неделям – срок наиболее удобный для проведения опытов на занятиях по расписанию. Для этого мушки должны развиваться сначала при оптимальной температуре (24-25 °С), а в стадии куколки (на 6-7-й день) им следует создать условия пониженной температуры (18-20 °С), задерживающие развитие. Если все время содержать мушек при температуре 21-22 °С, при которой цикл развития равен двум неделям, то понижается плодовитость и повышается восприимчивость к болезням.

Дрозофила исключительно плодовита. Одна пара мушек при обычных условиях разведения может дать поколение численностью 100-200 и более (до 500-700) особей. Продолжительность жизни взрослой мушки в лабораторных условиях равна 3-4 неделям и в значительной мере зависит от условий содержания: температуры, влажности, питательной среды, числа особей в пробирке, наличия в питательной среде бактерий. Необходимым условием содержания должна быть стерильность окружающей среды, поэтому пробирки перед разливом среды и вату для пробок подвергают сухой стерилизации (выдерживают в термостате при температуре 160 °С на протяжении 2 ч).

Нормальная дикая форма (D-32) характеризуется красными (буро-красными) глазами, имеющими форму полушара, большими крыльями правильного строения и серо-коричневым цветом тела. Жизнеспособность мутантных форм в большинстве случаев понижена по сравнению с нормальными мухами.

МУТАЦИИ У ДРОЗОФИЛЫ чаще всего касаются цвета и формы глаза, строения крыла и щетинок.

Пигментация глаз у разных мутантов изменяется от цвета бордо до белого со всевозможными переходами (абрикосовый, коралловый, карминовый и др.).

Форма глаза дрозофилы обусловлена степенью развития глазных фасеток. Редукция последних приводит к образованию полосковидных (*Bar*), лопастных (*Lobe*) глаз и даже к полному исчезновению их (*eyeless*). При редукции глаз уменьшаются размеры головы мух.

Мутации крыла выражаются в изменении его конфигурации, размеров, жилкования. У нормальной мухи крыло плоское. У мутантов оно может быть изогнуто в виде арки (*arc*), лыжи (зИ), загнуто книзу (*curved*).

Размеры крыла колеблются от появления вырезов на них (*cut*) до сильной редукции (*vestigial*) и полного исчезновения (*apterous*).

Изменение **жилкования** выражается в появлении добавочных и в исчезновении одной или нескольких жилок.

Щетинки у дрозофилы, как и у всех *Diptera*, имеют значение систематического признака. При мутационном изменении могут исчезнуть или удвоиться щетинки на голове, груди и щитке.

Кроме щетинок, мутируют **волоски**, покрывающие тело мух.

Особенностью мух является также и **пигментация тела** (серое, черное, темное).

Для учебных генетических экспериментов пригодны также мыши, кролики, куры, золотистые хомяки и другие животные. Наряду с животными объектами в генетических исследованиях широко используют растительные: горох, кукурузу, пшеницу, арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*) и др.

ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЕ РАБОТЫ К СКРЕЩИВАНИЮ ДРОЗОФИЛЫ

Приготовление и разлив корма для дрозофилы. Главными составными частями среды, на которой разводят дрозофилу, в лабораториях являются сахар, дрожжи, агар-агар. Сахар полностью или частично заменяют изюмом, содержащим дополнительно витамины и органические кислоты. Широкое распространение получили среды, приготовленные из манной крупы, изюма, сухих дрожжей и агар-агара. Дрожжи составляют главный элемент пищи дрозофилы и предохраняют среду от поражения плесенью. Агар-агар придает среде желеобразную консистенцию.

Составные компоненты питательной среды (на 1 л раствора):	
Сахар – 10 г	Дрожжи сырые – 72 г (сухие – 24 г)
Манная крупа – 10 г	Агар-агар – 10 г
Изюм (без косточек) – 40 г	Пропионовая к-та (или яблочный уксус) – 5 мл

Порядок приготовления питательной среды

(в алюминиевой посуде):

- Изюм хорошо промыть и размельчить в мясорубке или растереть в ступке, приливая горячую воду.
- В емкость налить около 0,5 л воды, добавить в нее изюм, поместить на огонь.
- Залить водой дрожжи.
- Замочить агар.
- Сахар и санныю крупу смешать сухими, засыпать в закипающую воду, помешивая. Варить до консистенции жидкой каши.
- Дрожжи перемешать, залить в раствор, довести до кипения и варить 40-60 мин (задача – убить дрожжи).
- Набухший агар влить в раствор, помешивать до полного растворения.
- После выключения огня добавить пропионовую кислоту.

Приготовленную питательную среду нужно разлить в прокаленные пробирки или стаканчики в горячем состоянии при помощи воронки так, чтобы она не попадала на стенки посуды. Если на стенках остается среда, то отложенные на нее яйца погибнут, потому что тонкий слой среды быстро подсыхает. Пробирки заполняются средой на 1/3 – 1/4 объема. После остывания среды до 40-50°C пробирки необходимо заткнуть чистыми ватными тампонами. Держать открытыми

пробирки со средой нельзя, т.к. в них могут отложить яйца «убежавшие» во время предыдущих работ мухи. Готовую среду удобно хранить в холодильнике, где она может надежно сохраняться в течение длительного времени.

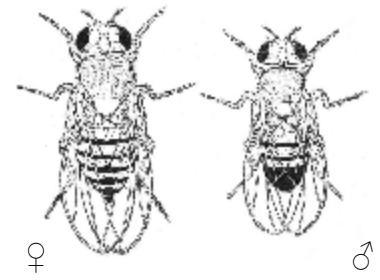
Получение виргинных (девственных) самок дрозофилы.

Жизнеспособная сперма может сохраняться в половых путях самки в течение нескольких суток после спаривания. Поэтому каждая оплодотворенная самка в любой данный момент времени может содержать в семяприемнике некоторое количество спермы от предыдущей копуляции. Отсюда возникает необходимость брать для скрещиваний заведомо девственных самок не старше **10 – 12** час после вылупления. Для этой цели из тех культур, из которых надлежит взять девственных самок, за несколько часов до начала массового вылета мух (на стенках пробирки темные куколки) следует удалить родительских или вообще недевственных мух. После этого культуру просматривают через **8-10-часовые** интервалы. Вылупляющихся девственных самок изолируют от самцов и используют для скрещиваний. БОЛЬШАЯ ЧАСТЬ НЕУДАЧ В ОПЫТАХ НАЧИНАЮЩИХ ГЕНЕТИКОВ СВЯЗАНА С НЕСОБЛЮДЕНИЕМ ИМЕННО ЭТОГО УСЛОВИЯ. Для скрещивания лучше использовать мушек в возрасте **3-4** дней, т.к. их продуктивность в этом возрасте более высокая, чем сразу после выхода из куколки.

Наркотизация мушек. Все работы с мушками можно выполнять только под наркозом. В качестве наркотизирующего средства употребляют серный эфир **pro narcosi**. Хлороформ мухи переносят значительно хуже. Для наркотизации смачивают очень малым количеством эфира ватную пробку пробирки или стаканчика, в котором содержатся мухи, и помещают пробирку в горизонтальное положение, чтобы мухи уснули на стенке пробирки, а не прилипли к среде. Как только мухи уснут, их пересыпают из пробирки в белый «поднос» их пенопласта. Очень важно не передержать мух в парах эфира, т.к. от большой дозы они погибают через **3-5** мин. Мертвых мушек можно распознать по растопыренным вверх и в стороны крыльям и лапкам. Умеренное же, хотя бы и многократное наркотизирование мух позволяет держать их под наркозом часами без вредных последствий. Разумеется, следует также остерегаться того, чтобы в пробирку попала с ваты капля эфира: мухи в этом случае моментально погибают. Мушек можно брать пинцетом только за крылышки, а бескрылых – за ножки. Если во время просмотра мухи просыпаются, надо рядом с ними положить ватку, смоченную каплей эфира, и накрыть стаканчиком.

Знакомство с морфологическими особенностями мух и сравнение между собой различных мутационных рас удобнее всего производить под лупой или слабым увеличением бинокля, располагая мух на подносики из белого пенопласта. Для детального сравнения многих признаков мух важно ориентировать одинаковым образом по отношению к источнику света, для чего необходимо расположить их на подносики в ряд, одну возле другой. В этом случае все различия выступают весьма отчетливо.

Отделение самцов от самок. Пол дрозофилы можно определить невооруженным глазом или лучше с помощью лупы (рис. 1). Для определения пола муху надо осторожно кисточкой перевернуть на спинку. Самец меньше самки, копчик б брюшка у него темно окрашен и закруглен. Самка крупнее, с широким брюшком, на котором хорошо видны пять черных поперечных черточек. Брюшко самки сужается и заканчивается яйцекладом.



Плотность населения. Оптимальные условия откладки яиц. В каждый стаканчик емкостью 100 мл с 25 мл питательной среды следует сажать 3-4 самки; число самцов, разумеется, не влияет на плотность населения в культуре. Превышение указанной нормы нежелательно во избежание в культуре перенаселения (**crowding effect**), что влечет за собой значительное измельчение мух и сокращение продолжительности их жизни.

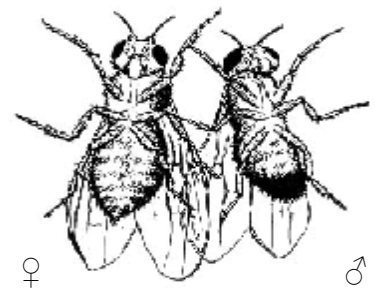


Рис.1.

Первые 1,5 – 2 суток после вылупления самки дрозофилы не откладывают яиц. Кладка начинается лишь с конца вторых суток и при благоприятных условиях продолжается до конца жизни. Число яиц, откладываемых одной самкой, сильно варьирует и зависит от плодовитости линии и от состояния питательной среды. В среднем одна самка откладывает 200–300 яиц. При благоприятных условиях содержания мух удавалось получить от одной самки до 2000 и более яиц.

Клещ и меры борьбы с ним. Бичом дрозофилы в лабораторных условиях является маленький, величиной с яйцо дрозофилы клещ, который иногда настолько обильно размножается на мухах, что может погубить их, если своевременно не принять соответствующих мер.

Лучшее средство борьбы с клещами – это содержание в чистоте стаканчиков для среды, а главное ватных пробок, которые при повторном употреблении обычно и являются переносчиками этого паразита. Поэтому стаканчики и пробки нужно стерилизовать каждый раз при закладке новых культур. Полезно время от времени дезинфицировать также термостат, в котором содержат культуры дрозофилы. При соблюдении этих элементарных условий, не составляющих и десятой доли тех предосторожностей, которые необходимы, например, в работе бактериологической лаборатории, от клещей можно вполне избавиться.

Книга протоколов опытов. Работа начинающего свои опыты с дрозофилой с первого дня пребывания в лаборатории должна фиксироваться в специально отведенном для этой цели дневнике.

Ведение дневника, или книги протоколов опытов, представляет собой важный элемент учебной и научно-исследовательской работы. Поэтому необходимо

с первого же дня обратить на это серьезное внимание и сделать для себя законом выполнение следующих основных правил:

1. **Никогда не полагаться на память;** иначе говоря, все наблюдения, цифры, расчеты и т. д. своевременно фиксировать в книге протоколов опытов.
2. **В книгу протоколов заносить не только те результаты и наблюдения, которые ясны, понятны, не вызывают сомнений в данную минуту.** Не менее, а иногда и гораздо более ценными могут оказаться те наблюдения, которые непонятны сегодня, но будут понятны или приобретут особый интерес завтра, через неделю, через год, через много лет.
3. **Поэтому время от времени нужно снова и снова возвращаться к просмотру протоколов,** помня, что они представляют собой не только формальный отчет о работе, но и источник новых догадок, предположений и обобщений.
4. **Никогда не следует придавать решающее значение опытам незаконченным, почему-либо неудавшимся или порождающим сомнения в их полноценности.** Против каждого такого опыта надо поставить вопросительный знак, опыт повторить, а затем уже делать сопоставления и выводы.
5. **Всякий опыт, как бы ни была проста и понятна его цель, необходимо обязательно сопровождать соответствующим контролем, являющимся неременным условием его доказательности.** Без соответствующего, адекватного, контроля ни один опыт не может ничего ни доказать, ни опровергнуть. Разумеется, что характер контроля в каждом отдельном случае определяется характером самого опыта. Следовательно, формы контроля разнообразны в такой же мере, в какой могут быть разнообразны и сами опыты. Для большинства тех опытов, о которых ниже идет речь, таким контролем могут служить результаты наблюдений над мухами при отсутствии скрепления, т. е. из чистых линий. Отсутствие расщепления в последних при прочих равных условиях явится тем элементарным контролем, который придаст опыту большую доказательность.
6. **Записи в книге протоколов лучше делать на одной стороне листа.** Этот способ ведения дневника включает в себе большие удобства для последующей обработки результатов. Действительно, если заполненный таким образом дневник расшить, то результаты опытов можно легко и быстро классифицировать по любому признаку.

Конечно, невозможно предусмотреть такую форму дневника, которая была бы пригодна на все случаи жизни. Это тем более верно еще и потому, что в протоколах одного и того же опыта обычно чередуются материалы цифровые и описательные. Поэтому приводимая ниже форма дневника (табл. 2) отнюдь не претендует на что-либо большее, как только привить начинающему сознание важности этого элемента лабораторной работы. А если эта цель достигнута, тогда достаточно несколько минут размышления и рациональная схема дневника для данного опыта родится сама собой.

Как видно, при наличии книги протоколов опытов на культурах достаточно поставить порядковый номер, под которым это скрещивание занесено в журнал. Если же скрещивание носит более сложный характер (см., например, главу о кроссинговере), для него в журнале необходимо отвести одну или даже несколько страниц, на которых выписывают сначала все ожидаемые классы мух, а затем уже заносят полученные результаты. Все неожиданные или исключительные мухи, конечно, также должны быть занесены в протоколы опытов.

МОНОГИБРИДНОЕ СКРЕЩИВАНИЕ

Работа № 5. НАСЛЕДОВАНИЕ РЕЦЕССИВНОГО ПРИЗНАКА *ebony*

Материал и оборудование: линии дрозофилы ***D-32*** и ***ebony***; пробирки с питательной средой и ватными пробками; коробки для переноса пробирок; вата для пробок и протирания изнутри пробирок; кисточки; пинцеты; подносики для рассматривания мух; стаканы 50 мл; диэтиловый эфир; баночка с этанолом; чашки Петри; маркер по стеклу; ручки; лабораторный журнал.

Ход работы:

1. Каждой паре студентов приготовить по 2 пробирки с питательной средой: 1 для прямого и 1 для обратного скрещивания. Если стенки пробирок влажные изнутри – протереть их ватой.
2. В пробирки поместить мушек – по 2-3 самки и 2 самца. Мушек кладут на стенки пробирок так, чтобы они не приклеились к питательной среде. Пробирки закрыть ватными пробками. Пробирки остаются в горизонтальном положении до тех пор, пока дрозофилы проснутся от эфира.
3. На пробирках написать дату и схему опыта:

$$\begin{array}{l} \text{♀ } D-32 \times \text{♂ } e \\ \text{♀ } e \times \text{♂ } D-32 \end{array}$$

Сделать соответствующую запись в лабораторном журнале. Рассчитать ожидаемые генотипы и фенотипы F₁.
4. При появлении первых куколок (через неделю после скрещивания) родителей необходимо удалить из пробирок. Для этого следует усыпить мух и вытряхнуть их в баночку со спиртом, постукивая пальцами по стенке.
5. При просмотре гибридов первого поколения необходимо установить:
 - 1) характер доминирования родительских признаков;
 - 2) роль материнского и отцовского организмов в передаче доминантного и рецессивного признаков;
 - 3) соотношение самцов и самок. Результаты подсчета мух занести в журнал:

№ пробирки	Комбинации скрещивания	Результаты			
		Серые		Черные	
		♀	♂	♀	♂

6. Поставить опыт на скрещивание гибридных мушек F1 для получения второго поколения (по 2 пробирки – от гибридов прямого и обратного скрещивания). Как и при скрещивании родительских форм, в каждую пробирку поместить по 2-3 самки и 2 самца. Комбинации скрещиваний записать на пробирках:

F1 (♀ *e* × ♂ *D-32*)

F1 (♀ *D-32* × ♂ *e*)

Сделать соответствующую запись в журнале. Рассчитать ожидаемые генотипы и фенотипы F2, составив решетку Пеннета (в тетради).

7. Поставить опыт на анализирующее скрещивание (по 2 пробирки). Для этого гибридных мушек F1 (самок или самцов) скрестить с рецессивной родительской формой, т. е. мушками **ebony**. Комбинации скрещиваний следующие:

♀ *e* × ♂ F1 (*D-32* × *e*)

♀ F1 (*D-32* × *e*) × ♂ *e*

Сделать соответствующую запись в журнале. Рассчитать ожидаемые генотипы и фенотипы BC.

8. Через неделю после скрещиваний из всех опытных пробирок убрать родителей.
9. Через две недели после скрещиваний просмотреть всех мух второго поколения, учитывая расщепление признака окраски тела в разных вариантах опыта. Подсчитать количество серых и черных мух и данные записать в тетрадь по образцу в п. 5.
10. Проанализировать полученные данные и сделать выводы: 1) о наследовании признака при прямом и обратном скрещиваниях; 2) о числовом соотношении при расщеплении признака в F1 и анализирующем скрещивании.
11. Установить достоверность результата по расщеплению признака в F2. Для этого использовать суммарные данные, полученные всеми студентами. При учете большого количества мушек расщепление в F2 ближе к теоретически ожидаемому. Все данные суммировать в таблице по образцу табл. 1.

Оценка достоверности экспериментальных данных

Полученное в опыте в F2 и Fb соотношение серых и черных мух отличается от теоретически ожидаемого 3 : 1 или 1 : 1. Решение вопроса о том, случайно ли это различие, или расщепление не соответствует теоретически ожидаемому, возможно только с помощью статистических методов. Очень прост и удобен метод χ^2

(хи-квадрат). Применение этого метода сводится к расчету величины χ^2 и ее оценке. Расчет осуществляется по формуле:

$$c^2 = \sum \frac{d^2}{q}$$

где \sum – знак суммы, q – теоретически ожидаемое число особей с определенным признаком; d – отклонение фактически полученных данных от теоретически ожидаемых для каждого класса ($p - q$).

В процессе расчетов сначала составляют таблицу по классам расщепления на основании опытных числовых данных (p). Затем из суммы частот всех классов, составляющей объем выборки, вычисляют теоретически ожидаемые величины (q) для каждого класса соответственно предполагаемой формуле расщепления (3 : 1, 1 : 1 и т. п.). Далее определяют отклонение (d) полученных данных от теоретически ожидаемых для каждого класса.

Каждое отклонение d возводят в квадрат (d^2), делят его на теоретически ожидаемое число (q) для данного класса. Затем все частные суммируют и получают величину χ^2 согласно приведенной формуле.

Оценка величины χ^2 производится по таблице Фишера (табл. 2).

Таблица 1. Результаты количественного анализа наследования окраски тела у дрозофилы (пример)

	ЧИСЛО МУХ		
	Серых	Черных	Всего
Материнская линия	0	Все	
Отцовская линия	Все	0	
F1	Все	0	
F2:			
Фактическое расщепление — данные, полученные студентом (p)	78	18	96
Ожидаемое отношение	3	1	4
Теоретически ожидаемое расщепление (q)	72	24	96
Отклонение (d)	+6	-6	
d^2	36	36	
$c^2 = \sum \frac{d^2}{q} = 0,50 + 1,50 = 2,00;$ $n' = 1; P > 0,05$			

F2: Фактическое расщепление — суммарные данные, полученные всеми студентами группы (p) Ожидаемое отношение Теоретически ожидаемое расщепление (q) Отклонение (d) d²	1199 3 1188 + 11 121	385 1 396 -11 121	1584 4 1584
$c^2 = \sum \frac{d^2}{q} = 0,10 + 0,31 = 0,41;$ $n' = 1; P \gg 0,05$			
Fb: Данные, полученные студентом Фактическое расщепление — суммарные данные, полученные всеми студентами группы (p) Ожидаемое отношение Теоретически ожидаемое расщепление (q) Отклонение (d) d²	66 504 1 495 +9 81	58 486 1 495 -9 81	124 990 -2 990
$c^2 = \sum \frac{d^2}{q} = 0,16 + 0,16 = 0,32;$ $n' = 1; P \gg 0,05$			

Таблица 2. Значение χ^2 при разных степенях свободы

Число степеней свободы (n-1)	Вероятность (p)						
	0,99	0,95	0,80	0,50	0,20	0,05	0,01
1	0,000157	0,0393	0,0642	0,455	1,642	3,841	6,635
2	0,101	0,103	0,446	1,386	3,219	5,991	9,210
3	0,115	0,352	1,005	2,366	4,642	7,815	11,341
4	0,297	0,711	1,649	3,357	5,989	9,488	13,277
5	0,554	1,145	2,343	4,351	7,289	11,070	15,086
6	0,872	1,635	3,070	5,348	8,558	12,592	16,812
7	1,239	2,167	3,822	6,346	9,803	14,067	18,476

При рассмотрении формулы χ^2 видно, что при полном соответствии опытных и теоретических данных χ^2 равен нулю. Если χ^2 не равен нулю, то всегда при применении этого метода предполагают, что различия сравниваемых величин

случайны (эта гипотеза называется **нулевой**). Вероятность, указанная в таблице, и есть не что иное, как вероятность этой нулевой гипотезы. Вероятность **0,05** говорит о том, что если сравниваемые величины отличаются случайно, то значение χ^2 , указанное в таблице, может появиться только в **5** выборках из **100** подобных. В статистике же принято считать, что события, имеющие вероятность **0,05** и меньше, практически не встречаются. Значит, указанное в таблице значение χ^2 в колонке **0,05** говорит о том, что различия между сравниваемыми величинами нельзя считать случайными, т.е. нулевую гипотезу необходимо отвергнуть. Вероятность **0,01** говорит о том же, только появление значения χ^2 , указанного в таблице, возможно лишь один раз на **100**, если различия случайны, т. е. еще более редко. Вот почему при значении χ^2 , равном или большем, чем указано в таблице, нулевая гипотеза отвергается, т. е. считают различия сравниваемых величин не случайными, а закономерными. В остальных случаях (когда χ^2 меньше табличного) принимают нулевую гипотезу, т. е. считают различия случайными.

Число степеней свободы – это число независимо рассчитанных теоретически ожидаемых величин. В рассматриваемом примере рассчитаны две теоретически ожидаемые величины (число серых и черных мух). Однако если рассчитать число серых мух, то число черных можно определить уже автоматически, оно зависит от суммы и числа серых мух. Следовательно, число независимо рассчитанных величин здесь равно единице. Это и есть степень свободы. В общем виде число степеней свободы при анализе расщепления всегда равно числу различных классов особей минус **1**.

Критерий χ^2 дает надежные результаты, если объем выборки более **50**, а теоретически ожидаемые частоты в классах не менее **5**.

Проведите статистическую обработку результатов расщепления F2 по собственным данным (самостоятельно) и по суммарным данным, полученным всеми студентами группы, исходя из ожидаемого отношения **3:1**. Докажите, что полученное расщепление соответствует теоретически ожидаемому отношению. В рассматриваемом примере **1** степень свободы и $\chi^2 = 2,00$ и **0,41**, что меньше, чем указанные в первой строке значения $\chi^2 = 3,841$ и **6,635**. Это значит, что различия между полученными в опыте и теоретически ожидаемыми величинами случайны. Убедитесь, что расщепление соответствует ожидаемому **3 : 1** тем точнее, чем большее количество мух проанализировано. Суммарные данные, полученные всеми студентами группы, дают лучшее совпадение с ожидаемым отношением ($P > 0,05$), чем данные одного студента ($P > 0,05$).

Аналогичным образом проведите статистическую обработку расщепления в Fb по суммарным данным, полученным всеми студентами группы. Докажите, что оно соответствует ожидаемому отношению **1:1**.

Работа № 6. НАСЛЕДОВАНИЕ ДОМИНАНТНЫХ ЛЕТАЛЬНЫХ ПРИЗНАКОВ *Curly-Plum*

Материал: линии дрозофилы ***D-32*** и ***Curly-Plum*** (сбалансированная система летальных генов); **Оборудование:** см. работу №5.

Ход работы:

1. Каждой паре студентов приготовить по 2 пробирки: 1 для прямого и 1 для обратного скрещивания. В пробирки поместить мушек – по 2-3 самки и 2 самца.
2. На пробирках написать дату и схему опыта:
 $\text{♀ } Cy-Pm \times \text{♂ } D-32$
 $\text{♀ } D-32 \times \text{♂ } Cy-Pm$
 Сделать соответствующую запись в лабораторном журнале. Рассчитать ожидаемые генотипы и фенотипы F1, составив решетку Пеннета (в тетради).
3. Через неделю после скрещивания удалить родителей из пробирок.
4. При оценке результатов необходимо установить: 1) характер доминирования родительских признаков; 2) роль материнского и отцовского организмов в передаче доминантного и рецессивного признаков; 3) соотношение самцов и самок. Результаты подсчета мух занести в журнал:

№ пробирки	Комбинации скрещивания	Мушки			
		с загнутыми крыльями		с прямыми крыльями	
		♀	♂	♀	♂

5. Данные, полученные всеми студентами, суммировать и установить достоверность опыта методом χ^2 .

Таблица 1. Результаты количественного анализа наследования летальных генов у дрозофилы (пример)

	Число мух		
	с загнутыми крыльями	с прямыми крыльями	Всего
Материнская линия	0	Все	
Отцовская линия	Все	0	
F1: Фактическое расщепление – данные, полученные студентом (<i>p</i>)	42	50	92

Фактическое расщепление – суммарные данные, полученные всеми студентами группы (<i>p</i>)	500	468	968
Ожидаемое отношение	1	1	2
Теоретически ожидаемое расщепление (<i>q</i>)	484	484	968
Отклонение (<i>d</i>)	+16	-16	
d^2	256	256	
$\chi^2 = \sum \frac{d^2}{q} = 0,53 + 0,53 = 1,06;$ $n' = 1; P \gg 0,05$			

ДИГИБРИДНОЕ СКРЕЩИВАНИЕ

Работа № 7. НАСЛЕДОВАНИЕ РЕЦЕССИВНЫХ ПРИЗНАКОВ *ebony* и *vestigial*

Материал: линии дрозофилы *ebony* и *vestigial* (оборудование см. работу №5).

Ход работы:

- Каждой паре студентов приготовить по 2 пробирки: 1 для прямого и 1 – для обратного скрещивания. В пробирки поместить мушек – по 2-3 самки и 2 самца.
- На пробирках написать дату и схему опыта:

$$\begin{array}{l} \text{♀ } vg \times \text{♂ } e \\ \text{♀ } e \times \text{♂ } vg \end{array}$$
 Сделать соответствующую запись в лабораторном журнале. Рассчитать ожидаемые генотипы и фенотипы F1.
- Как и в предыдущих опытах с дрозофилой, при появлении первых куколок удалить из опытных пробирок родительских мушек (то же сделать и после скрещивания гибридных потомков F1).
- Рассмотреть первое поколение дигибридного скрещивания, разобрав мушек по исследуемым признакам: серое тело, длинные крылья – доминантные признаки; черное тело, зачаточные крылья – рецессивные признаки. Полученные данные записать в журнал:

№ пробирки	Комбинация скрещивания	Мушки	
		серые с длинными крыльями	черные с зачаточными крыльями

5. Поставить опыт на скрещивание гибридных мушек F1 для получения второго поколения F2 (по 2 пробирки для гибридов прямого и обратного скрещиваний). На пробирках написать комбинации скрещиваний:

F1 ($\text{♀ } e \times \text{♂ } vg$)

F1 ($\text{♀ } vg \times \text{♂ } e$)

Сделать соответствующую запись в лабораторном журнале. Рассчитать ожидаемые генотипы и фенотипы F2, составив решетку Пеннета (в тетради).

6. Выяснить наследование родительских признаков во втором поколении (F2). Мушек разделить на четыре группы по такому сочетанию признаков: серые крылатые; серые с зачаточными крыльями; черные крылатые; черные с зачаточными крыльями. Подсчитать количество мушек каждой группы и установить числовое соотношение этих групп. Результаты записать в журнал:

№ пробирки	Комбинация скрещивания	Мушки			
		серые крылатые	серые с зачаточными крыльями	черные крылатые	черные с зачаточными крыльями

7. Результаты опыта сравнить с теоретически ожидаемыми. При дигибридном скрещивании расщепление происходит в соотношении **9 : 3 : 3 : 1**. Мушки с двумя доминантными признаками должны составлять **9** частей от общего количества, мушки с одним доминантным и одним рецессивным признаками – по **3** части, мушки, рецессивные по двум признакам – **1** часть.
8. Данные, полученные всеми студентами, суммировать и установить достоверность опыта методом χ^2 .

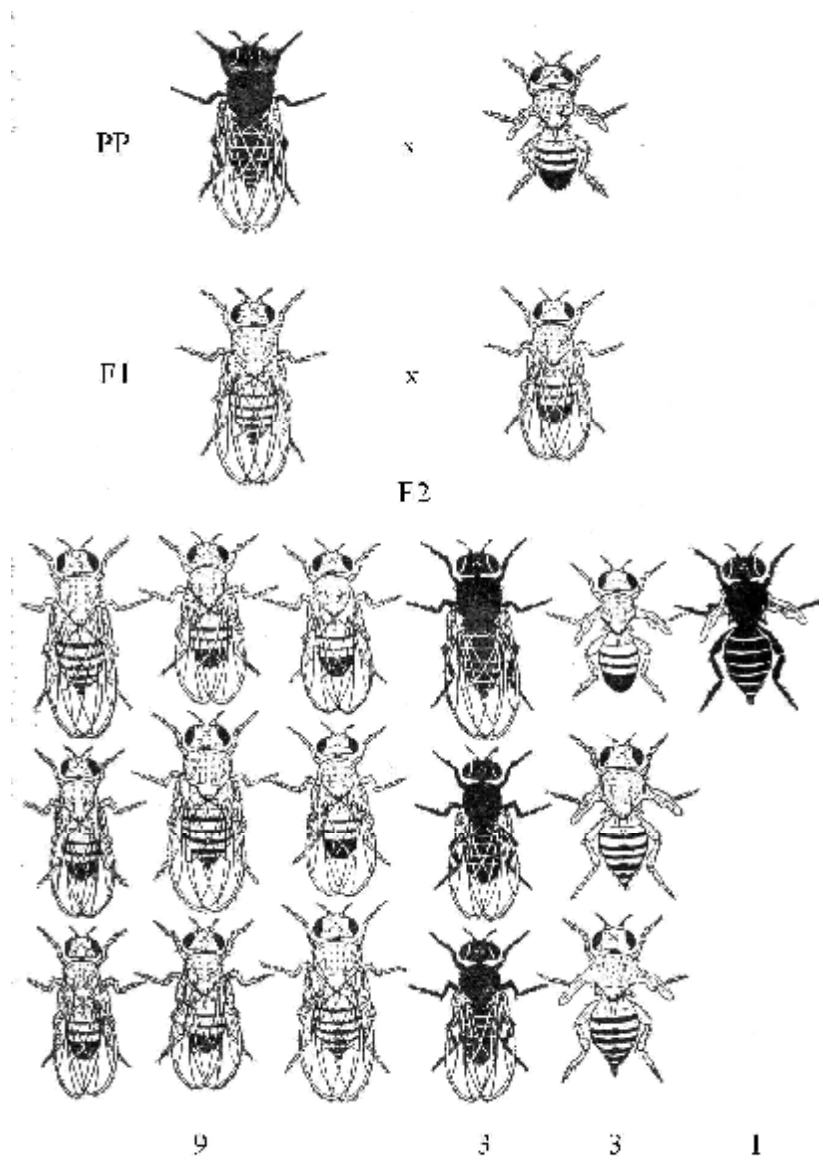
Оценка достоверности экспериментальных данных

Все вычисления проводятся аналогично рассмотренному ранее примеру моногибридного скрещивания (работа №5).

Таблица 1. Результаты количественного анализа наследования окраски тела и формы крыльев у дрозофилы (пример)

	ЧИСЛО МУХ				
	серых крылатых	серых с зачаточными крыльями	черных крылатых	черных с зачаточными крыльями	Всего
Материнская линия	0	Все	0	0	
Отцовская линия	0	0	Все	0	
F1	Все			0	
F2: Фактическое расщепление – данные, полученные студентом (p)	42	15	20	3	80
Фактическое расщепление – суммарные данные, полученные всеми студентами группы (p)	904	273	301	90	1568
Ожидаемое отношение	9	3	3	1	16
Теоретически ожидаемое расщепление (q)	882	294	294	98	1568
Отклонение (d)	+22	-21	+7	-8	
d ²	484	441	49	64	
$c^2 = \sum \frac{d^2}{q} = 0,55 + 1,50 + 0,16 + 0,65 = 2,86;$ $n' = 3; P \gg 0,05$					

Вычислив величину χ^2 (0,26), определяют ее место в таблице Фишера (см. табл. 2 в работе №1). Для этого находят в третьей строке таблицы (при дигибридном скрещивании число степеней свободы составляет 3) два значения χ^2 , между которыми находится значение 2,86. Такими являются числа 2,366 и 4,642, которым отвечает вероятность 0,2 – 0,5.



Дигибридное скрещивание (самка *ebony* x самец *vestigial*).
 Независимое (свободное) комбинирование признаков

НАСЛЕДОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ, СЦЕПЛЕННЫХ С ПОЛОМ

Работа № 8. НАСЛЕДОВАНИЕ РЕЦЕССИВНОГО, СЦЕПЛЕННОГО С ПОЛОМ ПРИЗНАКА *white*

Материал: линии дрозофилы ***D-32*** и ***white*** (оборудование см. работу №5).

Ход работы:

1. Поставить опыт на прямое и обратное скрещивания (по 1 пробирке каждого варианта). На пробирках написать комбинации скрещиваний:

♀ ***D-32*** × ♂ ***w***

♀ ***w*** × ♂ ***D-32***

Сделать соответствующую запись в журнале. Рассчитать ожидаемые генотипы и фенотипы F1.

2. Разобрать гибридных мушек F1 по окраске глаз и полу. Подсчитать мушек каждой группы и результаты записать в журнал:

№ пробирки	Комбинации скрещивания	Результаты			
		красноглазые		белоглазые	
		♀	♂	♀	♂

3. Сравнить результаты наследования изучаемого признака при прямом и обратном скрещиваниях.
4. Заложить опыт на скрещивание гибридов F1 между собой для получения F2 (отдельно по первому и второму вариантам). Записать комбинации скрещиваний:

♀ **X^+X^w** × ♂ **X^+Y**

♀ **X^+X^w** × ♂ **X^wY**
5. Разобрать мух F2 с учетом пола и окраски глаз. Проанализировать их по этим признакам, подсчитать и результаты записать в тетрадь (форма записи такая же, как и при анализе первого поколения).
6. Написать схемы наследования рецессивного, сцепленного с полом признака ***white*** при прямом (А) и обратном (Б) скрещиваниях. Провести генетический анализ.

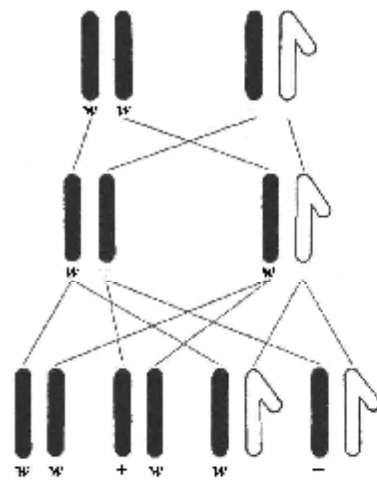


Схема скрещивания самок w/w
с самцами w^+Y

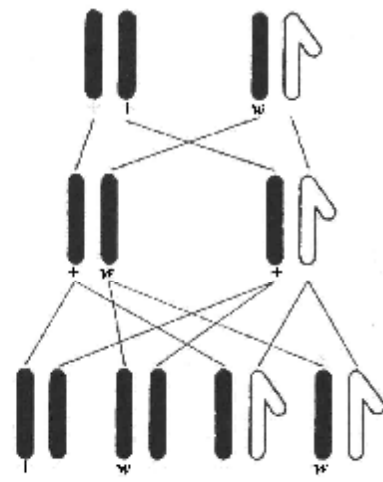
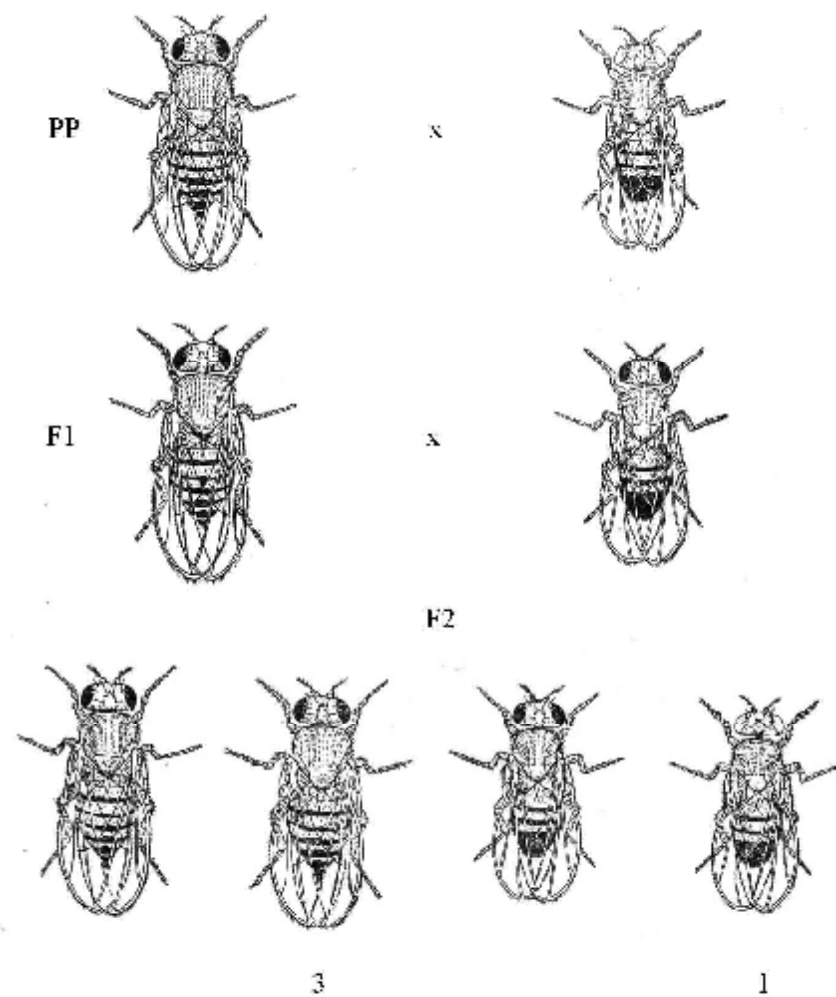


Схема скрещивания самок w^+/w
с самцами w^+Y

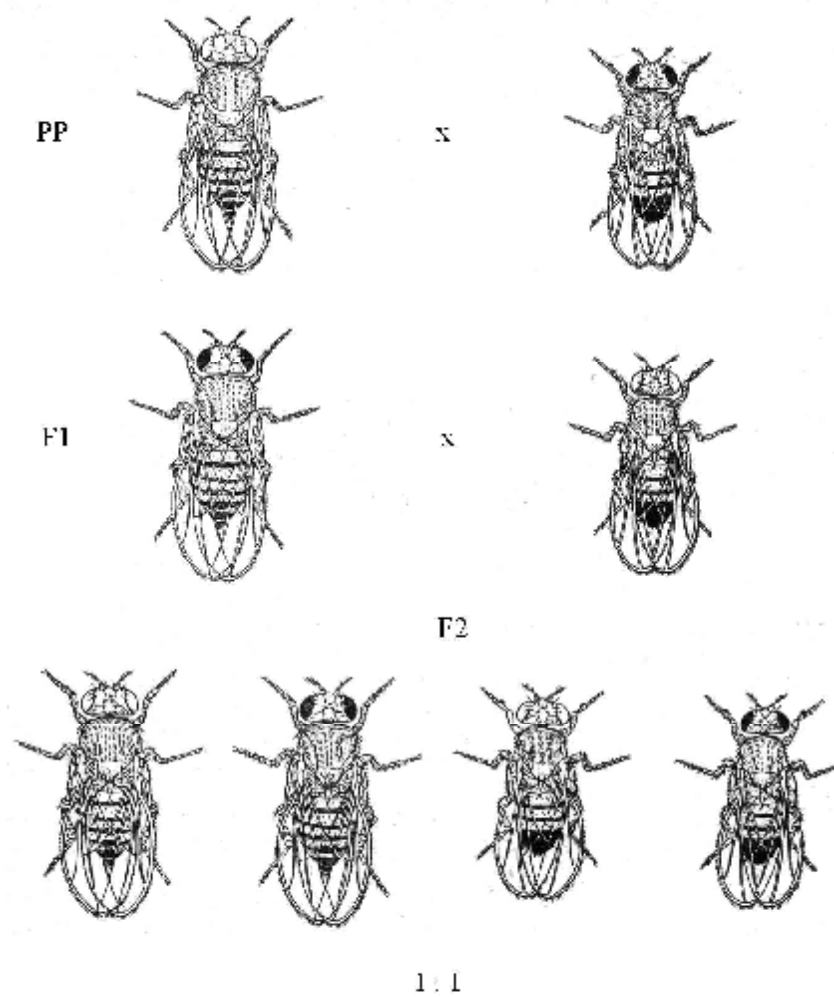
7. Сравнить данные опыта с теоретически ожидаемыми для каждого варианта.

Таблица 1. Результаты количественного анализа наследования формы глаз у дрозофилы (пример)

	Прямое скрещивание: ♀ Красноглазая х ♂ Белоглазый					Обратное скрещивание: ♀ Белоглазая х ♂ Красноглазый				
	Число мух в F1 и F2									
	красноглазых		белоглазых			красноглазых		белоглазых		
	самок	самцов	самок	самцов	всего	самок	самцов	самок	самцов	всего
F1:										
Данные, полученные студентом	48	44	0	0	92	55	0	0	47	102
Фактическое расщепление — данные, полученные всеми студентами группы (p)	256	226	0	0	482	215	0	0	183	398
Ожидаемое отношение	1	1	0	0	2	1	0	0	1	2
Теоретически ожидаемое расщепление (q)	241	241	0	0	482	199	0	0	199	398
Отклонение (d)	+15	-15				+16			-16	
d^2	225	225				256			256	
$c^2 = \sum \frac{d^2}{q} \qquad \qquad \qquad = 0,93 + 0,93 = 1,86; \qquad \qquad \qquad = 1,29 + 1,29 = 2,58;$ $\qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad n' = 1; P > 0,05 \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad n' = 1; P > 0,05$										
F2:										
Данные, полученные студентом	56	28	0	20	104	31	28	29	24	112
Фактическое расщепление — данные, полученные всеми студентами группы (p)	312	163	0	129	604	130	151	160	127	568
Ожидаемое отношение	2	1	0	1	4	1	1	1	1	4
Теоретически ожидаемое расщепление (q)	302	151	0	151	604	142	142	142	142	568
Отклонение (d)	+10	+12		-22		-12	+9	+18	-15	
d^2	100	144		484		144	81	324	225	
$c^2 = \sum \frac{d^2}{q} \qquad \qquad \qquad = 0,33 + 0,95 + 3,21 = 4,49; \qquad \qquad \qquad = 1,01 + 0,57 + 2,28 + 1,58 = 5,44;$ $\qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad n' = 2; P > 0,05 \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad n' = 3; P > 0,05$										



Наследование рецессивного, сцепленного с полом признака *white*.
Прямое скрещивание



Наследование рецессивного, сцепленного с полом признака *white*.
Обратное скрещивание.

Работа № 9. НАСЛЕДОВАНИЕ ПОЛУДОМИНАНТНОГО, СЦЕПЛЕННОГО С ПОЛОМ ПРИЗНАКА *Bar*

Материал: линии дрозофилы ***D-32*** и ***Bar*** (оборудование см. работу №5).

Ход работы:

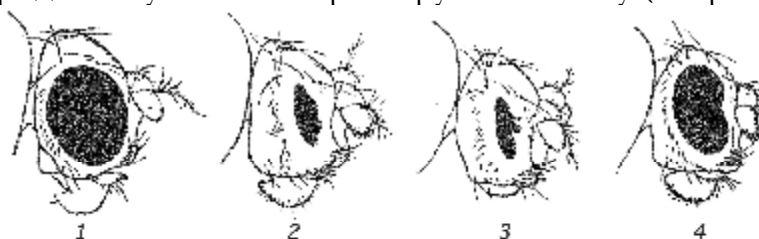
1. Поставить опыт на прямое и обратное скрещивания (по 1 пробирке каждого варианта). На пробирках написать комбинации скрещиваний:

♀ ***Bar*** × ♂ ***D-32***

♀ ***D-32*** × ♂ ***Bar***

Сделать соответствующую запись в журнале. Рассчитать ожидаемые генотипы и фенотипы F1.

2. Разобрать гибридных мушек F1 по размеру глаз и полу (см. рис.).



Форма и размеры глаз дрозофилы:

1 - нормальная самка; 2 - гомозиготная самка *Bar*; 3 - самец *Bar*;
4 - гетерозиготная самка *Bar*

Подсчитать число мушек каждой группы и результаты записать в журнал:

№ пробирки	Комбинации скрещивания	Результаты					
		круглые глаза		полосковидные глаза		промежуточные глаза	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂

3. Сравнить результаты наследования изучаемого признака при прямом и обратном скрещиваниях.
4. Заложить опыт на скрещивание гибридов F1 между собой для получения F2 (отдельно по первому и второму вариантам). Записать комбинации скрещиваний:
- ♀ X^+X^B × ♂ X^+Y
 ♀ X^+X^B × ♂ X^BY
5. Разобрать мух F2 с учетом пола и формы глаз. Проанализировать их по этим признакам, подсчитать и результаты записать в тетрадь (форма записи такая же, как и при анализе первого поколения).
6. Написать схемы наследования полудоминантного, сцепленного с полом признака ***Bar*** при прямом (А) и обратном (Б) скрещиваниях. Провести генетический анализ.
7. Сравнить данные опыта с теоретически ожидаемыми для каждого варианта.

	Прямое скрещивание: ♀ Полосковидные глаза x ♂ Круглоглазый							Обратное скрещивание: ♀ Круглоглазая x ♂ Полосковидные глаза						
	Число мух в F1 и F2													
	круглые глаза		полосковидные глаза		промежуточные глаза		всего	круглые глаза		полосковидные глаза		промежуточные глаза		всего
	♀	♂	♀	♂	♀	♂		♀	♂	♀	♂	♀	♂	
F1: Данные, полученные студентом	0	0	0	44	48	0	92	0	55	0	0	47	0	102
Фактическое расщепление — данные, полученные всеми студентами группы (p)	0	0	0	226	256	0	482	0	215	0	0	183	0	398
Ожидаемое отношение	0	0	0	1	1	0	2	0	1	0	0	1	0	2
Теоретически ожидаемое расщепление (q)				241	241		482		199			199		398
Отклонение (d)				+15	-15				+16			-16		
d²				225	225				256			256		
$c^2 = \sum \frac{d^2}{q} = 0,93 + 0,93 = 1,86; \quad n' = 1; P > 0,05$														
F2: Данные, полученные студентом		15	12	10	17		54	15	12		10	17		54
Фактическое расщепление — данные, полученные всеми студентами группы (p)		110	102	120	98		430	110	102		120	98		430
Ожидаемое отношение		1	1	1	1		4	1	1		1	1		4
Теоретически ожидаемое расщепление (q)		108	107	108	107		430	108	107		108	107		430
Отклонение (d)		-2	+5	-12	+9			-2	+5		-12	+9		
d²		4	25	144	81			4	25		144	81		
$c^2 = \sum \frac{d^2}{q} = 0,04 + 0,23 + 1,33 + 0,76 = 2,36; \quad n' = 3; P > 0,05$														

Работа № 10. АНАЛИЗИРУЮЩЕЕ СКРЕЩИВАНИЕ ДРОЗОФИЛЫ

Материал: дрозофилы с диким фенотипом и неизвестным генотипом, линии дрозофилы **ebony**, **white** и **vestigial** (оборудование см. работу №5).

Ход работы:

1. Каждой паре студентов приготовить по 3 пробирки для скрещивания мух неизвестного генотипа с мухами трех чистых линий: В пробирки поместить по 2-3 самки линейных мух и по 1 «неизвестному» самцу.

2. На пробирках написать дату и схему опыта:

♀ **vg** × ♂ **D-32-** ♀ **e** × ♂ **D-32-** ♀ **w** × ♂ **D-32-**

Сделать соответствующую запись в лабораторном журнале.

3. При появлении первых куколок удалить из опытных пробирок родительских мух.

4. Рассмотреть результаты скрещивания, полученные данные записать в журнал:

№ пробирки	Комбинация скрещивания	Мушки		
		серые с длинными крыльями	черные с зачаточными крыльями	...

5. Сделать вывод о генотипе неизвестного родителя.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ

НАСЛЕДОВАНИЕ ОКРАСА И ШЕРСТИ У СОБАК

Окраска и структура шерсти относятся к очень немногочисленной категории качественных признаков. Однако окраска контролируется большим количеством менделирующих генов, поэтому существует огромное разнообразие ее вариантов.

Окраску собак (как и других млекопитающих) определяют **2** основных группы меланиновых пигментов – **эумеланины** (в разных модификациях обуславливают черный и коричневый цвет волос) и **феомеланины** (имеют диапазон окраски от желтого до красного цвета). Исходным соединением для образования меланинов обеих групп является **тирозин**.

ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ОКРАСОВ СОБАК:

Зонарные:

- зонарно-серый
- доминантный рыжий

Сплошные разной интенсивности:

- черный голубой
- коричневый изабелловый
- рыжий шиншилловый
- белый

Трехцветный

Пятнистые:

- белая пятнистость:
 - пегий
 - пятнистый
 - крапчатый
 - мраморный
- желтая пятнистость:
 - подпалый
 - чепрачный
 - тигровый

Генетическая символика локусов и аллелей, контролирующих окрас
(по Пасечник, 2007; * - окраскообразующие локусы):

Локус В (Black-brown) – определяет форму пигментных гранул и характер отложения эумеланина в волосе (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

В – овальные гранулы, упорядоченное отложение → **окрас черный**.

в – сферические гранулы, беспорядочное отложение, причем не только в шерсти но и в коже (поэтому мочка носа, губы, веки коричневые, радужка светлее, чем у черных собак) → **окрас коричневый (шоколадный)**. Аллель **в** не влияет на желтый пигмент.

***Локус А (Agouti)** – аллели тормозят производство черного пигмента → автоматически включается производство рыжего пигмента (НЕПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

Ay (Agouti yellow) – «**редуцированный черный**» - тормозит производство черного пигмента по всему телу → рыжие волосы часто имеют черные кончики (такса); часть волос имеют чисто-рыжий окрас различной интенсивности, часть волос – полностью черные → один из вариантов рыжего окраса – **доминантный рыжий (соболиный, красный, абрикосовый, платиновый и мн. др.)**.

aw (иногда обозначается ag) (agouti wild) – тормозит производство черного пигмента в несколько циклов → чередование черных, рыжих и неокрашенных участков по длине волоса →



зонарно-серый окрас (агути, волчий, кабаний, дикий, перец с солью: волк, западно-сибирская лайка, серая немецкая овчарка).

asa (agouti saddle) – тормозит производство черного пигмента лишь после окрашивания верхних поверхностей тела собаки → **чепрачный окрас** («седло» темной пигментации на спине и боках корпуса, остальное тело коричневое – эрдельтерьер).

at (agouti tan) – тормозит производство черного пигмента лишь на отдельных «островках» → **подпалый окрас**: равномерная темная (черная или коричневая) окраска тела с рыжими подпалинами в строго определенных местах (внутренняя поверхность конечностей, грудь, морда, вокруг анального отверстия, над глазами – доберман, ротвейлер, такса, Муха).

a – не препятствует производству черного пигмента → **рецессивный черный окрас** (немецкие и шотландские овчарки).

***Локус E (Extension)** – антагонист локуса A – стимулирует выработку черного пигмента (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

Em (Extension mask) – детерминирует образование **маски** на морде; перекрывает действие аллеля *Ay* (на доминантном рыжем окрасе может образоваться черная маска).

E (Extension) – вызывает нормальное распределение черного пигмента по телу.

e (non-extension - yellow) – обуславливает нераспространение черного пигмента → **рецессивный рыжий окрас** (не влияет на пигментацию кожи → нос, губы, веки черные). От доминантного рыжего окраса отличается полным отсутствием в шерсти гранул черного пигмента. Эпистатичен ко всем прочим окрасам → сочетание *ee* всегда дает рыжий окрас независимо от сочетаний в других окраскообразующих локусах.

***Локус K** – отвечает за распределение черного пигмента по телу (→ собака с генотипом *eeKK*, у которой отсутствует черный пигмент, будет рыжей) (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

K – вызывает распространение черного пигмента по всему телу → **доминантный черный окрас** (в случае *bb* – коричневый).

kbr (brindle) – распределяет черный пигмент поперечными полосами (заметно на светлом фоне) → **тигровая расцветка** базового окраса (боксер).

k – не препятствует проявлению аллелей других локусов.

Локус D (Dilute) – определяет интенсивность пигментации, распределяя гранулы эумеланина в шерсти и коже. На рыжий пигмент не влияет (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

D (Dense) – равномерно распределяет пигментные гранулы → интенсивное прокрашивание шерсти → **черный или коричневый окрас**.

d (dilute) – распределяет пигментные гранулы неравномерно → ослабление пигментации (одна из форм альбинизма!): черный → **сери-голубой окрас**, коричневый → **изабелловый окрас**.

Локус C (Color или Albino) – приостанавливает синтез феомеланина в шерсти и коже. На черный пигмент не влияет (НЕПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

C – не влияет на синтез феомеланина → интенсивное прокрашивание шерсти → **ярко-рыжий окрас**.

ch (chinchilla) – ослабляет рыжий до светлого палевого → **«шиншиловый» окрас**.

cl – ослабляет рыжий до белого → **белый окрас**. Гомозиготы – **лейцисты** (неполные альбиносы: шерсть белоснежная, но в коже пигмент имеется – нос, веки, губы, когти черные, но глаза голубые; почти всегда глухие).

c (*albino*) – самый рецессивный аллель в локусе, в гомозиготе приводит к **альбинизму**, т.к. полностью блокирует синтез пигмента (отсутствует везде, кожа розовая, глаза красноватые; зрение ослаблено).

Локус G (Graying) – определяет прогрессирующее поседение (НЕПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

G – вызывает постепенное перераспределение пигмента из коркового слоя волоса в его сердцевинную часть, что приводит к **прогрессирующему с возрастом поседению** (черные при рождении собаки к 1-2 годам становятся серебристо-седыми – серебристый пудель, бобтейл). В гомозиготе поседение происходит значительно быстрее, чем в гетерозиготе. Осветляет только черный пигмент; на пигментацию кожных покровов не влияет.

g – рецессивный аллель, в гомозиготе обуславливает стойкую в течение всего онтогенеза окраску шерсти.

Локус S (Spotting) – останавливает формирование меланоцитов на разных стадиях (НЕПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ)

S – нормальный доминантный аллель, образует **сплошной окрас**.

si (*irish spotting*) – формирует различные варианты **ирландской пятнистости** (белые пятна на груди, лапах, морде, узкий воротник на шее – лайка, колли).

sp (*piebald*) – формирует **пегий окрас** (темные и белые пятна соотносятся примерно 1 : 1 – фокстерьер).

sw (*extreme white*) – формирует **пятнистую (почти белую) окраску**, глаза темные (бультерьер).

Локус T (Ticked) – обуславливает наличие или отсутствие на белых участках мелких пигментированных пятен (крапа) – результат вторичной волны пигментации. Крап у щенков появляется через несколько недель после рождения (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

T – доминантный аллель, обеспечивает развитие **мелкого крапа** (сеттер, спаниель).

Td – обеспечивает формирование **крупных круглых пятен** (далматин).

t – рецессивный аллель, обуславливает отсутствие крапа.

Локус R (Roaning) – вызывает формирование чалости (чередование окрашенных и неокрашенных волос по телу); работает только на белых участках. Число белых волос с возрастом не увеличивается (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

R – доминантный аллель, вызывает **чалый окрас** (дратхаар).

r – нормальный окрас.

Локус M (Merle) – дестабилизирует работу пигментных клеток; на черный пигмент действует сильнее (НЕПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

M – доминантный аллель → **мраморный окрас**: у догов – белые пятна, у такс, колли – ослабление черного цвета до серого, коричневого до изабеллового, рыжего до палевого. В гомозиготе у догов обеспечивает **белый окрас**, голубую радужку, редукцию глазного яблока и в целом малую жизнеспособность; у такс и др. – белые отметины площадью **20-90%** тела. Предполагается наличие гена-модификатора (H), обуславливающего степень воздействия на аллель M.

m – нормальный аллель.

Гены структуры шерсти:

Локус Hr (Hairlessness) – контролирует развитие шерстного покрова.

Hr – доминантный аллель, обуславливает почти полное **отсутствие шерсти** на коже гетерозигот **Hrhr** (гомозиготы нежизнеспособны).

hr – нормальный рецессивный аллель, обеспечивает **нормальное развитие шерстного покрова**. При разведении китайских и мексиканских голых собачек неизбежно рождаются гомозиготные по нормальному аллелю «пуховки».

Локус L (Long) – контролирует длину шерсти.

L – нормальный аллель «дикого типа», обуславливает развитие **волос нормальной длины**.

l – рецессивная мутация, удлиняющая срок роста волос и формирование шерстного покрова большей, чем в норме, длины. Шерсть может быть длинной не по всему телу, а в определенных местах (воротник, очесы, штаны, подвес – сеттер), либо равномерно большой длины (бобтейл).

Локус Wh (Wire hair) – контролирует жесткость шерсти.

Wh – доминантная мутация – породный признак эрдельтерьеров, фокстерьеров и др.

wh – рецессивный аллель нормальной структуры шерсти.

Локус Wa (Wavy Coat) – контролирует волнистость шерсти.

Wa – нормальный аллель.

wa – рецессивный аллель, обеспечивающий **волнистую шерсть** (кокер-спаниель).

Локус K (Kinky Coat) – обеспечивает курчавость шерсти.

K – прямая шерсть.

k – вызывает **курчавость**.

Гены некоторых морфологических признаков:

Большинство морфологических особенностей собак формируется под контролем полигенов, т.е. являются количественными признаками и наследуются без соответствия менделевским закономерностям.

Локус H – детерминирует постав ушей.

Ha – полностью доминантный аллель, определяет образование **полустоячих ушей «типа колли»**.

H – аллель **висячего уха**, неполностью доминирует над рецессивным.

h – рецессивный аллель стоячего уха. У **Hh** – образуются полувисячие уши.

ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ОКРАСОВ КОШЕК:

Сплошные:

- белый
- черный
- шоколадный
- красный
- голубой
- лиловый
- кремовый

Пятнистые:

- биколоры
- черепаховый
- калико:

Агути:

- табби
- серебристые
- абиссинский
- макрелевй
- мраморный
- дым
- шиншилла
- камео

Сиамские:

- колор-пойнт
- сил-пойнт

Генетическая символика локусов и аллелей, контролирующих окрас:

Локус В (Black-brown) – определяет форму пигментных гранул и характер отложения эумеланина в волосе и коже (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

В – овальные гранулы, упорядоченное отложение, **окрас черный**.

в – сферические гранулы, беспорядочное отложение, **окрас коричневый (шоколадный)** – очень редко встречается.

Локус А (Agouti) – контролирует распределение пигментных гранул по волосу (НЕПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

А – обеспечивает зонарную окраску волоса => **рисунчатый окрас**. **а** – «неагути» – равномерно распределяет пигмент по длине волоса => в гомозиготе – **сплошной окрас**.

Локус Т (Tabby) – обуславливает характер рисунка в присутствии аллеля А (а эпистатичен к Т); при действии полигенов полосы разрываются => пятна (НЕПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

Та – **абиссинский окрас**: полосы сохраняются на морде, слегка – на передних лапах, бедрах, хвосте, но отсутствуют на теле.

Т – **тигровый окрас (макрель)**.

tb – **мраморный**: характерный рисунок из широких темных полос, пятен и колец (хорошо проявляется на боках, лапах, хвосте).

Локус О (Orange) – прекращает синтез эумеланина; локализован в Х-хромосоме, наследуется сцепленно с полом (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

О – останавливает синтез эумеланина => **рыжий (красный) окрас** (в гомозиготе у кошек, в гемизиготе у котов). Действует только в присутствии аллеля А (а эпистатичен к О) => подавляющее большинство рыжих кошек имеют полосатый рисунок. В гетерозиготе **Оо** (только у кошек!) => **черепаховый окрас** (расположение пятен определяется инактивацией «рыжей» или «черной» Х-хромосомы).

о – обеспечивает окрас согласно генетической формуле.

Локус D (Dilution) – определяет интенсивность пигментации, распределяя гранулы эумеланина в шерсти и коже (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

D (Dense) – равномерно распределяет пигментные гранулы => интенсивное прокрашивание шерсти => **черный** или **коричневый окрас**.

d (dilute) – распределяет пигментные гранулы неравномерно => ослабление пигментации. Черный => **серо-голубой**, шоколадный => **лиловый**, рыжий => **кремовый окрас**.

Локус С (Albino alleles) – приостанавливает синтез пигментов на теле (НЕПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ). **С** – не влияет на синтез пигментов => интенсивное прокрашивание шерсти.

сс – приостанавливает синтез пигментов на теле; окраска морды, хвоста, лап, ушей – в соответствии с основным окрасом => **сиамский окрас** (сцеплен с голубыми глазами); на сплошном окрасе – **колор-пойнт**, на рисунчатом –

сил-пойнт. Активность синтеза пигмента зависит от температуры тела и снижается в более «теплых» местах => котята рождаются белыми.

Локус I (Silver) – вызывает ослабление окраса (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ). *I* – ослабляет пигментацию в прилежащей к телу части волоса; кончик окрашен в соответствии с основным окрасом => подшерсток белый => **серебристый окрас**. Варианты: окрашено 3/4 волоса – **окрас дымчатый**, окрашена 1/8 волоса – **окрас типированный**.

i – не влияет на пигментацию => **интенсивный окрас**.

Локус S (Spotting) – останавливает формирование меланоцитов на разных стадиях (НЕПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

Sw – **ванский окрас**: белый окрас с двумя небольшими пятнами на голове и окрашенным хвостом.

Sr – **пятнистый окрас «арлекин» (биколор)**; на исходном черепаховом окрасе – **калико**).

s – формирует **нормальный окрас** без белых пятен.

Локус W (White dominant) – определяет **доминантный белый окрас** (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

W – прекращение синтеза пигментов в самом начале цепи химических реакций => **белый окрас**. Неполная пенетрантность в отношении цвета глаз (40% белых кошек имеют голубые глаза, около половины из них глухие).

w – окрас согласно генетической формуле животного.

НАСЛЕДОВАНИЕ МАСТЕЙ У ЛОШАДЕЙ

ОСНОВНЫЕ МАСТИ:

Рыжая

- соловая
- каурая
- игреневая

Гнедая

- буланая
- саврасая
- гнедо-чубарая

Вороная

- мышастая
- вороно-чубарая
- вороно-пегая

Серая

Изабелловая

ОТМАСТКИ:

- рыже-чубарая
- рыже-чалая
- рыже-пегая
- гнедо-чалая
- гнедо-пегая
- серебристо-гнедая
- серебристо-вороная
- караковая

Генетическая символика локусов и аллелей, контролирующих масть:

Локус E (Extension) – определяет тип синтезируемого в организме пигмента (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

E – стимулирует синтез эумеланина, образуется **вороная масть**.

e – стимулирует синтез феомеланина, образуется **рыжая масть**.

Локус A (Agouti) – отвечает за распределение пигмента по телу и по отдельно взятому волосу; действие проявляется только в присутствии аллеля E (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

A – переключает часть меланоцитов на синтез феомеланина; ноги, грива и хвост остаются черными, образуется **гнедая масть**.

A^t – переключает на синтез феомеланина только меланоциты в областях вокруг глаз, ноздрей, в паху, образуется **караковая масть**.

a – не влияет на синтез эумеланина, образуется **вороная масть**.

Локус D (Dun, ген дикой окраски) – ген-осветлитель (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

D – доминантный аллель, определяет **нормальную** масть, т.к. пигмент (черный или рыжий) располагается по всей длине волоса.

d – осветляет оба пигмента, вызывая зонарную окраску волоса. На длинные волосы (грива, хвост, ноги) не действует; на спине остается «ремень», на ногах – зеброидность. Осветляет вороную масть до **мышастой**, гнедую масть до **саврасой**, рыжую до **каурой**.

Локус C (Cream) – ген-осветлитель (НЕПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

C^{cr} – доминантный мутантный аллель, в гомозиготе превращает любую масть в **изабелловую**. В гетерозиготе вызывает осветление рыжего пигмента, образуя из рыжей **соловую** или из гнедой **буланую** масти.

ccr – нормальный аллель дикого типа, обеспечивает возможность синтеза любого пигмента в зависимости от генотипа, т.е. **нормальную** масть.

Локус M (Mealy) – ген-осветлитель (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

M – не изменяет масть животного.

m – формирует подласость: шерсть вокруг губ, ноздрей, глаз, внизу живота, с внутренней стороны ног, в паху более светлая, почти белая. Подласость может возникать на основе любой масти.

Локус F (Flaxen) – ген-осветлитель рыжего пигмента, проявляется у лошадей рыжей масти (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

F – не изменяет масть животного.

f – осветляет рыжий пигмент; действие выражено на гриве и хвосте; образуется **игрневая масть**.

Локус Z (Silver) – ген-осветлитель черного пигмента (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

Z – осветляет черный пигмент; действие наиболее выражено на гриве и хвосте. Осветляет вороную масть до **серебристо-вороной**, гнедую – до **серебристо-гнедой**. На основе саврасой и буланой масти проявляется слабо.

z – не влияет на масть животного.

Локус G (Gray) – определяет прогрессирующее поседение. Эпистатичен ко всем другим генам (НЕПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

G – не полностью доминантный аллель, вызывает постепенное перераспределение пигмента из коркового слоя волоса в его сердцевинную часть, что приводит к **прогрессирующему с возрастом поседению** (жеребята рождаются в соответствии с генетической формулой). В гомозиготе поседение происходит значительно быстрее, чем в гетерозиготе.

g – рецессивный аллель, в гомозиготе обуславливает стойкую в течение всего онтогенеза окраску шерсти.

Локус Rn (Roan) – вызывает формирование чалости (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

Rn – доминантный аллель, вызывает **чалую** масть (равномерное вкрапление непигментированных волос между нормально пигментированными).

rn – нормальная масть.

Локус To (Tobiano) – обуславливает пятнистость, т.к. в корнях некоторых волос отсутствуют пигментообразующие клетки (ПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

To – формирует различные варианты **пегой** масти.

to – нормальный аллель, образует **нормальную** масть.

Локус Lp (Leopard) – обуславливает крапчатость (НЕПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ АЛЛЕЛЕЙ).

Lp – доминантный аллель, обеспечивает развитие крапа на белом фоне, т.е. **чубарую** масть. В гетерозиготе – много темных пятен на белом фоне, в гомозиготе – мало.

lp – рецессивный аллель, обуславливает **нормальную** масть.

Работа № 11. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ОКРАСОВ СОБАК И КОШЕК И МАСТЕЙ ЛОШАДЕЙ

Материал и оборудование: домашние животные различных окрасок (желательно связанные родством), родословные домашних животных.

Ход работы:

1. Изучить локусы и аллели, ответственные за окраску млекопитающих (см. материал выше).
2. Проанализировать родословные домашних животных, изучив наследование окраски.
3. Научиться определять генотип домашних животных по фенотипу.

Раздел 3. ИЗМЕНЧИВОСТЬ И МЕТОДЫ ЕЁ ИЗУЧЕНИЯ

Работа № 12. ИЗУЧЕНИЕ МОДИФИКАЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ НА ПРИМЕРЕ ЗЕМЛЯНИКИ

Материал и оборудование: гербарные экземпляры: листья нескольких видов земляники, наклеенные на листы бумаги (по 5 штук; каждый студент получает по 10 таких листов, т.е. по 50 листьев земляники); линейки или полоски миллиметровой бумаги.

Ход работы:

1. Измерить длину листа (с точностью до 1 мм) и подсчитать на нем зубчики. Результаты записать в таблицу:

№№ листьев по порядку	Длина листа (см)	Число зубчиков
1	6,3	23
2	4,0	18
3	3,2	17
*	*	*
*	*	*
*	*	*
50	3,8	17

2. Обработать полученные результаты:

Длина листа характеризует непрерывную изменчивость, при которой вариации отличаются друг от друга на сколь угодно малую величину, определяемую точностью измерения. Такие признаки можно измерить.

Число зубчиков может быть сосчитано и выражено только целым числом, поэтому вариации по этому типу характеризуют прерывистую, или дискретную, изменчивость.

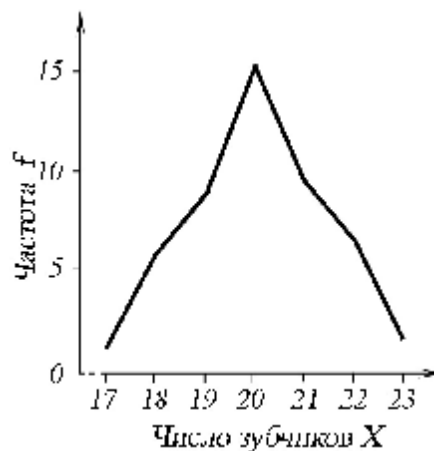
Начало обработки в обоих случаях одинаково: необходимо определить **размах изменчивости** (лимиты – *lim*), т.е. самую маленькую вариацию (X_{min} , длина листа – 3,2, число зубчиков 17) и самую большую (X_{max} , 6,3 и 23, соответственно). Для оценки размаха варьирования (*lim*) в единицах необходимо вычесть из X_{max} число, предшествующее X_{min} ($6,3 - 3,1 = 3,2$ ед., $23 - 16 = 7$).

Составить **вариационный ряд**, т.е. систематизировать варьирующие величины. Для дискретной изменчивости, где размах варьирования мал, можно ограничиться ранжированием вариаций (X), т.е. записать подряд все варианты от меньшей до большей ($X - 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23$). В связи с тем, что каждая вариация встречается не по одному разу, определить их **частоты** (f), т.е. число вариантов, имеющих одинаковое значение вариаций.

Вариационный ряд
представить в виде таблицы:

А затем на графике:

x	f	a	af	a^2f
17	1	-3	-3	9
18	6	-2	-12	24
19	9	-1	-9	9
20	15	0	0	0
21	10	1	10	10
22	7	2	14	28
23	2	3	6	18
	$n = \sum f = 50$		6	98



Для общей характеристики всего материала необходимо найти такую величину, которая бы минимально отличалась от всех вариаций. Такой величиной является **средняя арифметическая** \bar{X} , определяется как частное от деления суммы всех вариантов на их число:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

Можно воспользоваться другой формулой: $\bar{X} = A + \frac{\sum af}{n}$, где A – условное среднее (любая из вариаций X , но лучше та, которая чаще встречается), $a = X - A$, т.е. отклонение вариаций от условного среднего, $n = \sum f$ – сумма всех частот, или объем выборки. В примере удобно выбрать $A = 20$ зубчиков, т.к. эта вариация встречается чаще всего.

В таблице вариационного ряда в колонке «а» первой заполняют строчку $X = A$, в ней ставят 0. Затем нумеруют строчки вверх и вниз от нее. Строчки, идущие вверх – это вариации, которые меньше выбранной условной средней, они получают знак минус. Затем заполняют колонку af путем перемножения чисел соседних колонок. Алгебраическую сумму произведений записывают в нижней строчке, а затем вносят в формулу: $\bar{X} = 20 + \frac{6}{50} = 20,12 \approx 20,1 \text{ зуб.}$

Кроме общей характеристики изучаемого признака, необходимо объективно оценить его изменчивость, для чего используют специальный параметр – **стандартное отклонение (среднее квадратичное отклонение) – σ (сигма)**:

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

σ – число именованное и выражается в тех же единицах, в которых проводилось измерение. Стандартное отклонение показывает, насколько в среднем отличается каждая из вариаций от среднего арифметического.

Для вычисления σ по методу условного среднего используется следующая формула:

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum a^2 f - \frac{(\sum af)^2}{n}}{n-1}}$$

Для того, чтобы воспользоваться этой формулой, необходимо заполнить еще одну колонку в таблице вариационного ряда « $a^2 f$ ». Ее данные получают от перемножения цифр двух соседних колонок. Произведения всегда положительны, их суммируют и сумму записывают в нижней строке.

В рассматриваемом примере

$$s = \pm \sqrt{\frac{98 - \frac{6^2}{50}}{49}} = \pm 1,41 \text{ зуб.}$$

При равенстве средних арифметических, чем больше величина σ , тем больше изменчивость. Однако суждение о степени изменчивости по величине σ становится невозможным, если средние не равны или если надо сравнивать изменчивость разных признаков (σ – величина именованная). Поэтому для характеристики изменчивости используется еще одна относительная (безразмерная) величина – **коэффициент вариации**, или **изменчивости**, который определяется по формуле: $V = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100\%$

Он показывает, какую долю σ составляет от \bar{X} . В рассматриваемом примере $V = 7,0\%$.

Если коэффициент вариации необходим для сравнения изменчивости разных признаков, то стандартное отклонение (σ) удобнее использовать для анализа изменчивости одного признака. Можно проверить, на сколько сигм отличаются минимальная и максимальная вариации от среднего арифметического в вариационном ряду. Эта величина обозначается t и называется **нормированным отклонением**: $t = \frac{X - \bar{X}}{s}$

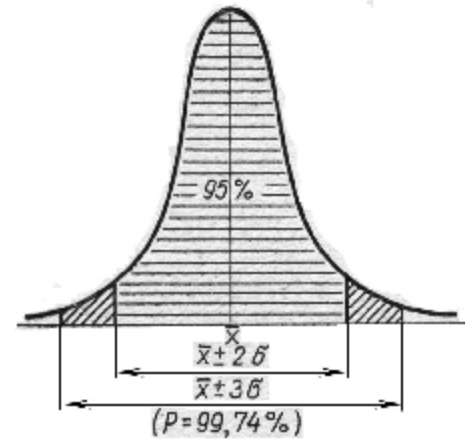
В рассматриваемом примере (каждый рассчитывает на своем материале!)

$$t = \frac{X_{\min} - \bar{X}}{s} = \frac{17 - 20,1}{1,41} = 2,2 \quad t = \frac{X_{\max} - \bar{X}}{s} = \frac{23 - 20,1}{1,41} = 2,0$$

В выборке, состоящей из $n = 100$, размах изменчивости увеличивается: $X_{\min} = 16$, а $X_{\max} = 24$, увеличивается и $t_{\min} = 2,9$, и $t_{\max} = 2,8$.

Всюду, где имеют дело с массой случайных явлений, t бывает близкое к 2 или к 3. И чем больше по объему выборка, тем точнее t приближается к 3, т.е. проявляется «правило трех сигм». Эта закономерность, характеризующая массу случайных явлений, характерна и для модификационной изменчивости. Все вариации, как бы они ни различались, укладываются в пределы от $\bar{X} - 3s$ до $\bar{X} + 3s$, т.е. в пределы 6σ (рис.). Правда, в указанные пределы попадают не все 100% вариант (особей), а лишь 99,74%. Остальные 0,26% составят вариации меньше ($\bar{X} - 3s$) и больше ($\bar{X} + 3s$), но они встречаются очень редко. События, имеющие вероятность появления меньше 5% ($P < 0,05$), практически не встречаются, поэтому их относят к числу редко встречающихся и считают

возможным ими пренебрегать. Исходя из этого эмпирического правила, вводится понятие **доверительной вероятности**. Чаще всего пользуются доверительной вероятностью, равной 95%, реже – 99%. Отсюда можно считать, что модификационная изменчивость укладывается в пределы $\bar{X} \pm 2s$, т.е. в 4 сигмы (ошибка составит 5 случаев на 100), или в пределы 5,2 сигмы $\bar{X} \pm 2,6s$ (ошибка составит 1 случай на 100).



Итак, для модификационной изменчивости закономерно, что чаще всего встречаются особи, имеющие среднее или близкое к среднему выражение признака. Особи, у которых признак выражен очень слабо или очень сильно, встречаются редко. Максимальное отличие признака от среднего не превышает в 95% случаев двух σ , и только в 5% случаев признак может отличаться от среднего уровня больше чем на 2σ или в 1% случаев – больше чем на $2,6\sigma$.

Знание этой закономерности позволяет характеризовать всю генеральную совокупность, а также отличить случайное от закономерного при сравнении разных групп организмов.

3. Провести обработку данных по длине листа:

В этом случае при составлении вариационного ряда используется прием разбивки на классы, т.е. объединения в одну группу нескольких вариаций. Для этого необходимо определить величину **классового интервала** (λ – лямбда), т.е. определить число вариаций, которые будут объединены в одну группу – класс. λ зависит от размаха выборки (lim) и ее объема (n); который определяет число классов (r). Число классов определяют по таблице:

n	r
20	5
30-40	6
40-90	7

$$I = \frac{lim}{r}$$

Расчет λ ведется лишь приблизительно, т.к. для дальнейшей работы удобно (но не обязательно), чтобы ее величина была числом округлым (5,10 и т.д. единиц). Чтобы не ошибиться в расчете размаха изменчивости (lim), рекомендуется округлять X_{max} и X_{min} таким образом, чтобы минимальная величина стала округлой, но меньше той, которая встретилась в выборке, а максимальная величина – больше той, которая встретилась.

В рассматриваемом примере $X_{min} = 3,2 \approx 3,0$; $X_{max} = 6,3 \approx 6,5$.

$$I \approx \frac{6,5 - 3,0}{7} \approx 0,5$$

После определения λ можно составить вариационный ряд:

Классы	f	a	af	a ² f
	$n = \sum f =$			

Прежде всего записывают классы: сначала записывают самую малую из вариаций, затем путем прибавления в ней величины λ определяют нижнюю границу

следующего класса и т.д. Затем приступают к разноске – к определению частот (f) тем же способом, как и в случае с числом зубчиков. Затем вариационный ряд можно изобразить графически:

На оси абсцисс нужно откладывать границы классов, а перпендикуляры к оси абсцисс восстанавливать из середины класса.

Для простоты расчетов $a = X - A$ удобно выражать не в абсолютных величинах, а в относительных, в числе классовых интервалов:

$$a = \frac{X - A}{I}$$

Для расчета в таблице вариационного ряда в колонке « f » на строчке, соответствующей $X = A$, записывают нуль, затем вверх и вниз нумеруют строчки точно так же, как и в предыдущем случае. Эта операция по существу сводится к тому, что величина λ выносится за скобки при определении $\sum af$, что и отражается в формуле:

$$\bar{X} = A + I \frac{\sum af}{n}$$

В рассматриваемом примере $\bar{X} = 4,7 - 0,5 \frac{8}{50} = 4,62 \text{ см}$

Точно так же видоизмененная формула для определения стандартного отклонения:

$$s = \pm I \sqrt{\frac{\sum a^2 f - \frac{(\sum af)^2}{n}}{n-1}}$$

В рассматриваемом примере

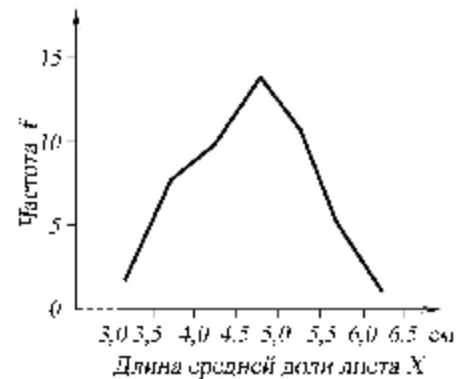
$$s = \pm 0,5 \sqrt{\frac{100 - \frac{(-8)^2}{50}}{49}} = \pm 0,715 \text{ см}$$

Теперь можно определить $t = \frac{X - \bar{X}}{s}$ и убедиться, что и длина листа земляники варьирует так же, подчиняясь закону нормального распределения (т.е. закону модификационной изменчивости).

4. Сравнение двух групп производится по их основным характеристикам – по средним арифметическим.

Однако несколько выборок, взятые из одной генеральной совокупности, имеют разные средние арифметические, хоть и очень близкие. Различия двух конкретных выборок не имеют практического значения, обычно важно выяснить, отличаются ли генеральные совокупности (сорта, породы, виды). Возможно ли в таком случае на основании данных одной выборки составить представление о всей генеральной совокупности? Можно, если рассчитать величину **ошибки средней арифметической** (m , число именованное), которая определяется по формуле:

$$m = \frac{s}{\sqrt{n}}$$



Величина m показывает, на сколько ошибаются, когда считают, что среднее арифметическое выборки соответствует среднему арифметическому генеральной совокупности. С ее помощью на основании данных одной выборки можно определить пределы, в которых лежит среднее арифметическое генеральной совокупности, или, иначе, определить пределы, в которые будут укладываться средние арифметические всех выборок, сколько бы их ни было сделано из одной генеральной совокупности. Т.к. средние арифметические этих выборок будут различаться между собой случайно, то они также должны подчиняться закону нормального распределения, т.е. размах их изменчивости должен быть $\pm 2s$ (с ошибкой в 5% случаев) или $\pm 2,6s$ (с ошибкой в 1% случаев). Для рассматриваемых примеров это значит, что по числу зубчиков

$$m = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{1,41}{\sqrt{50}} = 0,20 \text{зуб},$$

а среднее арифметическое, характеризующее вид земляники *Fragaria vesca*, лежит в пределах $\bar{X} \pm 2m = 20,1 \pm 2 \times 0,20 = 20,1 \pm 0,40$ зубч., т.е. в пределах от 19,7 до 20,5 зубчиков. По длине листа

$$m = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0,715}{\sqrt{50}} = 1,101 \text{см},$$

а $\bar{X} \pm 2m = 4,62 \pm 0,202$ см, т.е. от 4,42 до 4,82 см.

Если средние величины для характеристики вида (генеральной совокупности) выражаются пределами, значит, и сравнивать 2 вида нужно через сравнение этих пределов. Так, например, если длина листа у *Fragaria vesca* характеризуется пределами 4,42–4,82 см, а у *Fragaria ananassa* – 6,62–7,56, то ясно, что эти два вида имеют листья разной длины. В математической статистике предложен специальный метод определения **коэффициента достоверности разности средних**:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

В числителе на первое место ставится большее среднее арифметическое, чтобы оценить абсолютное значение разности. В основу этого метода положена нулевая гипотеза, которая всегда предполагает, что различия между средними арифметическими случайны.

Правоту или несправедливость этой гипотезы можно определить, оценивая t ; t может быть любым числом, но для суждения о достоверности разности средних его сравнивают обычно с 2, 2,6 или 3 (см. закон нормального распределения).

Каждый студент должен сравнить полученные им данные (по длине листа и числу зубчиков) для одного вида земляники с аналогичными данными, полученными для другого вида земляники, и решить вопрос, различаются ли эти виды по анализируемым признакам. Для этого необходимо обменяться данными с другим студентом.

Итак, если длина листа одного вида равна $4,62 \pm 0,101$ см, а другого – $7,09 \pm 0,237$ см, то

$$t = \frac{7,09 - 4,62}{\sqrt{0,101^2 + 0,237^2}} = \frac{2,47}{0,26} = 9,5 >> 3$$

Это значит, что нулевая гипотеза должна быть отвергнута, а различие средних арифметических признано достоверным, неслучайным, т.е. можно сделать прогноз, что, сколько бы ни делали выборок из этих генеральных совокупностей, всегда среднее арифметическое из II совокупности будет больше, чем среднее из I совокупности, т.е. листья сравниваемых сортов различаются по длине.

Если $t = 2$, то это значит, что различие средних арифметических также неслучайно, т.е. $\bar{X}_1 > \bar{X}_2$ будет повторяться и впредь, но этот прогноз справедлив лишь в 95 случаях из 100, а в 5 случаях может быть $\bar{X}_1 = \bar{X}_2$ или, наоборот, $\bar{X}_1 < \bar{X}_2$.

Если $t = 1,8 < 2$, то это значит, что нулевую гипотезу нельзя отвергнуть, т.е. на основании имеющихся данных нельзя различия между средними считать неслучайными, т.е. они могут быть и случайными, что и предполагает нулевая гипотеза, т.е. впредь может быть $\bar{X}_1 > \bar{X}_2$, $\bar{X}_1 = \bar{X}_2$ или $\bar{X}_1 < \bar{X}_2$. Избежать такой неопределенности вывода можно, как правило, увеличив объем выборки (n). Это уменьшит величину m ($m = \frac{s}{\sqrt{n}}$), а следовательно, при той же абсолютной разнице средних увеличит t , что и необходимо для определенного вывода.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ

Для выявления уровня полиморфизма и гетерозиготности природных популяций недостаточно исследования фенотипов особей, поскольку взаимодействие генов по типу полного доминирования скрывает рецессивные аллели. Анализ ДНК и ее «продуктов» (белков) дает полную информацию о генетической структуре популяции. Для исследования ДНК применяется целый ряд биохимических методов (выделение, амплификация и «разрезание», «прочтение» ДНК).

Источники ДНК

ДНК есть в каждой клетке организма, и во всех тканях одного организма она одинакова. Отличаются эти ткани относительным содержанием ДНК (например, ее очень много в молоках рыб, мало – в костной ткани; в некоторых органах клетки тетраплоидны (печень), потому ДНК в них в два раза больше, чем во всех остальных). В семенах растений относительное содержание ДНК выше, чем в стебле, а из молодых растущих побегов ее можно выделить существенно больше, чем из такого же по объему куска одревесневшего ствола.

Если перед исследователем не стоит какой-то специальной задачи и имеется возможность выбора, он старается выбрать для работы ткань, в которой мало межклеточного вещества и много самих клеток. Причем желательно, чтобы ткань легко распадалась на эти составляющие, а клетки не были перегружены белками (как мышечные), липидами (как жировые) или полисахаридами (как клетки мозга).

Для обработки более предпочтительна свежая ткань; возможно использование тканей после однократной заморозки, однако современные методы позволяют выделить ДНК практически из любого источника – даже из костей, ногтей, волос животных, чешуи рыб или древесины, где клеток не так уж много по сравнению с объемом внеклеточного вещества. Эксперты-криминалисты выделяют ДНК из микроколичеств тканей или их производных (волос, крови, слюны и т.п.). ДНК может быть выделена также из сухого коллекционного материала.

Сохранение образца ткани, содержащей ДНК

Образец свежей ткани для получения ДНК не всегда возможно сразу обработать в лаборатории. Обычно образцы консервируют в чистом **этанол** (предварительная консервация сухих тканей не имеет смысла). Для сохранения небольшой кусочек ткани $\approx 5 \times 5$ мм помещают в этанол (его объем должен превышать объем образца ткани не менее чем в **5** раз) и герметично закрывают. Через сутки, когда вода выйдет из ткани в раствор, этанол желательно заменить на свежий. Образцы тканей, закрытые герметично, могут храниться в спирте при комнатной температуре неопределенно долго.

I этап исследования ДНК. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

Для выделения ДНК используют различные методики в зависимости от поставленных задач. Их суть заключается в **экстракции** (извлечении) ДНК из биопрепарата и удалении или нейтрализации посторонних примесей для получения препарата ДНК с чистотой, пригодной для постановки ПЦР (полимеразной цепной реакции).

Методы выделения ДНК:

1. Стандартной и ставшей уже классической считается методика получения чистого препарата ДНК, описанная Ариджи. Она включает в себя ферментативный протеолиз с последующей депротеинизацией и переосаждением ДНК спиртом. Этот метод позволяет получить чистый препарат ДНК. Однако он довольно трудоемок и предполагает работу с такими агрессивными и имеющими резкий запах веществами, как фенол и хлороформ.
2. Одним из популярных в настоящее время является метод выделения ДНК, предложенный **Boom** с соавторами. Этот метод основан на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента - гуанидина тиоционата (**GuSCN**), и последующей сорбции ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко» и т.д.). После отмывок в пробе остается ДНК, сорбированная на носителе, с которого она легко снимается с помощью элюирующего буфера. Метод удобен, технологичен и пригоден для подготовки образца к амплификации. Однако возможны потери ДНК вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок. Особенно большое значение это имеет при работе с небольшими

количествами ДНК в образце. Кроме того, даже следовые количества **GuSCN** могут ингибировать ПЦР. Поэтому при использовании этого метода очень важен правильный выбор сорбента и тщательное соблюдение технологических нюансов. Следует отметить, что из-за большого количества стадий добавления и удаления растворов при работе с образцом требуется аккуратность, т.к. возможна перекрестная контаминация между пробами образующейся аэрозолью ДНК.

3. Другая группа методов пробоподготовки основана на использовании ионообменников типа **Chilex**, которые, в отличие от стекла, сорбируют не ДНК, а наоборот, примеси, мешающие реакции. Как правило, эта технология включает две стадии: кипячение образца и сорбция примесей на ионообменнике. Метод чрезвычайно привлекателен простотой исполнения. К сожалению, иногда встречаются образцы с такими примесями, которые невозможно удалить с помощью ионообменников.

Работа № 13. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Материал и оборудование: образец печени суслика в спирте; пробирки Эппендорф, штатив, дозаторы переменного объема, наконечники к дозаторам, набор реактивов для выделения ДНК, водяная баня, пленка парафилм, маркер по стеклу; ручки; лабораторный журнал.

Ход работы:

Суть процесса	Протокол работы
1. Гомогенизация образца ткани.	
Вначале необходимо облегчить реактивам и ферментам доступ к ДНК, для чего небольшой кусочек образца (по объему немного больше спичечной головки) механически измельчают.	Измельчить кусочек ткани при помощи скальпеля и пинцета или препаровальной иглы; поместить измельченный образец в заранее подписанную пробирку объемом 1,5 мл.
2. Промывка от фиксатора.	
Далее ткань необходимо промыть от фиксирующей жидкости (спирта), для чего используется STE (буферный раствор, состоящий из трис-HCl, NaCl, EDTA, pH = 8,0). После тщательного перемешивания раствор центрифугируют.	Добавить 1 мл STE (pH = 8,0). Закрыть пробирку, поместить в вортекс и перемешивать ≈ 3 мин. Центрифугировать 2-3 мин; аккуратно слить надосадочную жидкость.

3. Освобождение ДНК из клеток и разрушение белков

<p>К осадку снова добавляют STE, а также детергент (SDS – sodium dodecyl sulfate 10%, $\text{pH} = 7,2$), нарушающий целостность клеточных мембран (в том числе ядерных), в результате чего содержимое клеток оказывается в растворе.</p> <p>После этого в раствор добавляют фермент, разрушающий белки – протеиназу К. Фермент работает при $t = 50^{\circ}\text{C}$ в течение довольно длительного времени, поэтому раствор герметично закрывают и помещают в водяную баню не менее, чем на 4 часа (обычно - на ночь).</p>	<p>К осадку добавить 1 объем STE (обычно – 0,5 мл), постукиванием по дну пробирки добиться перемешивания осадка и раствора. Добавить в пробирку 0,1 объема SDS (обычно 50 мкл) и 17–20 мкл протеиназы К. Закрыть пробирку, загерметизировать крышку парафилмом. Поместить пробирку в «плотик» и затем – в водяную баню (на 50°C) на ночь.</p>
---	---

4. Очистка ДНК

<p>Для очистки смеси от белков и их остатков используют фенол (карболовую кислоту). Фенол разрушает белки, поэтому работать с ним надо очень осторожно и не допускать его попадания на кожу. Хранится фенол в холодильнике в емкости из темного стекла под слоем воды, в которой не растворяется. Фенол добавляют в раствор и тщательно перемешивают, после чего смесь центрифугируют. В результате тяжелый фенол, захвативший из раствора белки и другие примеси, оказывается внизу пробирки, а нуклеиновые кислоты, не взаимодействующие с фенолом, но хорошо растворимые в воде, оказываются в верхней водной фазе. Растворенную ДНК аккуратно собирают из этого верхнего слоя и переносят в новую пробирку.</p>	<p>Добавить в пробирку равный имеющемуся объем фенола (550 мкл) (набирать фенол необходимо очень аккуратно из-под водной фазы). Закрыть пробирку и загерметизировать крышку парафилмом; перемешивать в вортексе 10 мин. Центрифугировать 10 мин на 8000 об/мин.</p> <p>Отобрать водную фазу (~350–400 мкл) в новую заранее подписанную пробирку. Во избежание затягивания осадка обрезать кончик наконечника на 1–2 мм.</p>
<p>Очистку образца от фенола производят с помощью хлороформа (ХИС – смесь хлороформа и изоамилового спирта 24 : 1), который добавляют в раствор и тщательно перемешивают, а затем таким же образом центрифугируют и забирают верхнюю водную фазу, содержащую ДНК.</p>	<p>Добавить равный имеющемуся объем ХИС (24:1 – 400 мкл), перемешивать в вортексе 5 мин. Центрифугировать 5 мин.</p> <p>Отобрать водную фазу (300 мкл) в чистую подписанную пробирку.</p>

5. Осаждение ДНК	
<p>Осаждение ДНК производят при помощи ацетата натрия (3М, рН = 5,2) и абсолютного этанола (хранится при -20°C), которые добавляют в раствор ДНК после очистки хлороформом. Объем этанола должен превышать объем раствора в 2,5 раза. Наливать спирт в пробирку с ДНК-содержащей смесью следует осторожно. Затем пробирку закрывают и аккуратно покачивают жидкость в горизонтальном положении. В результате из раствора выпадает ДНК.</p> <p>Для завершения процесса осаждения пробирку следует поместить в морозильник.</p>	<p>Добавить 0,1 имеющегося объема ацетата Na (30 мкл) и 2,5 объема (750 мкл) абсолютного этанола (из морозильника).</p> <p>Медленно покачивать; примерно в течение 10-15 с должен появиться медузообразный осадок.</p> <p>Поместить пробирку в морозильник на 0,5 – 1,5 ч (чем больше чистой ДНК выпало, тем на меньшее время).</p>
6. Перевод выделенной ДНК в раствор	
<p>Выпавшую ДНК осаждают из спирта центрифугированием.</p>	<p>Центрифугировать 5 (если выпало много чистой, «белой» ДНК) или 10 мин (если ДНК коричневатая и ее мало, либо она выпала в виде хлопьев). Слить спирт.</p>
<p>Далее осажденную ДНК необходимо очистить от ацетата натрия и «размягчить» перед последующим растворением, что достигается добавлением в пробирку 70% этанола и периодическим легким покачиванием пробирки.</p> <p>ГЕРМЕТИЧНО ЗАКРЫТАЯ ДНК МОЖЕТ ХРАНИТЬСЯ В 70% ЭТАНОЛЕ НЕОПРЕДЕЛЕННО ДОЛГО ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ.</p>	<p>Добавить 1 мл 70% этанола (можно комнатной температуры). Оставить на 1 час, иногда покачивая, либо перемешивать в вортексе ≈ 15-20 мин.</p>
<p>Если планируется дальнейшая работа с ДНК, то ее переводят в водный раствор. Для этого смесь сначала центрифугируют и удаляют надосадочную жидкость с последними примесями.</p>	<p>Центрифугировать 3 мин, слить надосадочную жидкость.</p>
<p>Затем ДНК высушивают от спирта на воздухе либо в термостате; пересушивание нежелательно, т.к. в этом случае она хуже растворяется.</p>	<p>Сушить на боку в открытой пробирке при комнатной температуре до образования «звездочки» на месте осадка.</p>

Высушенную ДНК растворяют в деионизированной воде; объем приливаемой воды прямо пропорционален количеству ДНК.	Добавить deionH₂O в зависимости от количества ДНК: - если много (со спичечную головку) – 400 мкл; - если хорошо видна – 200 мкл; - если мало – 50-100 мкл; - если не видна – 15-20 мкл.
Окончательный рабочий раствор должен быть достаточно вязким; оптическая плотность раствора определяется на фотоэлектроколориметре. Если не планируются скрининговые исследования, контролировать оптическую плотность раствора можно «на глаз». ХРАНИТЬ Р-Р ДНК МОЖНО ТОЛЬКО ПРИ -20°C.	Контролировать визуально объем добавляемой воды: если раствор остается вязким (не «подпрыгивает» при постукивании по дну пробирки) – добавлять еще воды.
7. Осаждение ДНК в спирте для транспортировки	
Если кто-нибудь любезно подарил Вам необходимый раствор ДНК, то транспортировать его в лабораторию (особенно из другого города) следует в спирте. Для этого к водному р-ру ДНК вновь добавляют абсолютный этанол и ацетат натрия в соотношении 2 : 0,1 .	В пробирку с водным раствором ДНК добавить 2 объема абсолютного этанола и 0,1 объем ацетата Na , осторожно покачивать пробирку в горизонтальном положении до появления медузообразного осадка (в случае малого количества или плохого качества образца осадок может не появиться).

Амплификация ДНК и электрофорез продуктов амплификации.

Выделенная ДНК (целая в случае свежего образца ткани или деградированная в случае выделения из старого или плохо зафиксированного образца) сама по себе не информативна; кроме того, ее количество обычно ничтожно малó для каких-либо манипуляций. Для проведения сравнительных исследований обычно используют не всю имеющуюся ДНК данного организма (включающую около **3** млрд. п.н.), а только **специфичные относительно короткие** (от **100-150** до **2 000** п.н.) нуклеотидные последовательности (участок гена, интрон и т.п.). Однако прежде, чем изучать и сравнивать эти последовательности, они должны быть «растиражированы», поскольку на следующем этапе ДНК должна быть выявлена визуально.

Суть данного этапа исследования ДНК – получить множество копий выбранной последовательности нуклеотидов путем амплификации для последующего сравнения этих копий от разных организмов путем электрофореза ДНК.

Таким образом, второй этап исследования ДНК включает следующие процессы:

1. Выбор участка ДНК для амплификации.

Для каждого вида организмов (иногда и для более мелких внутривидовых группировок) можно подобрать специфичные последовательности и в дальнейшем их сравнивать. Подбор осуществляется на основании знания генома (полного или отдельного участка) данного вида (расшифрованные геномы некоторых видов размещаются на сайте **NCBI – National Catalog Biotechnology Information**) с помощью специальных компьютерных программ.

2. Выбор праймеров.

Праймеры – синтетические олигонуклеотиды, состоящие из **16-30** оснований. Праймеры комплементарны участкам матричной ДНК, между которыми находится выбранная последовательность-мишень. Обычно для каждого участка ДНК необходимы прямой и обратный праймеры (для смысловой и матричной цепей ДНК). Иногда используют так называемые случайные праймеры (очень короткие последовательности), комбинация нуклеотидов в которых встречается в геноме очень часто (например – **ACCGA**). В таком случае в обратном праймере нет необходимости, а в результате амплификации образуется большое количество отрезков ДНК разной длины (метод **RAPD-PCR**).

3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР, или амплификация).

Механизм амплификации универсален для любых ДНК (разработан в **1983** г.), однако различается в деталях в зависимости от химического строения выбранного участка ДНК. Чаще всего осуществляется в присутствии фермента **термостабильной ДНК-полимеразы (Taq)** (кофактором данного фермента являются ионы Mg^{2+} из добавляемого в смесь **$MgCl_2$**), **праймеров** и смеси **дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP – A, G, C, T)** в специальном приборе – **термоциркуляторе** (термоциклере, или амплификаторе), в котором последовательно чередуются процессы нагревания и охлаждения ДНК.

Обычно любая ПЦР-реакция включает три циклически повторяющихся этапа:

- 1** – разрыв водородных связей между двумя цепями материнской ДНК (**94°C**);
- 2** – отжиг (посадка на ДНК) праймеров (обычно **56-64°C**, см. формулу ниже);
- 3** – синтез дочерних последовательностей ДНК (**72°C**).

С третьего цикла начинается производство фрагментов ДНК заданной длины (первоначально образуются более длинные). С каждым циклом амплификации количество продукта прогрессивно возрастает; общее количество циклов – **15-35**. Увеличение количества циклов нецелесообразно по причине частичной инактивации полимеразы и истощения праймеров и **dNTP**, а также наработки неспецифических продуктов амплификации.

Для точного расчета оптимальной температуры отжига праймера (по его нуклеотидному составу) существует множество различных программ и алгоритмов. Упрощенный же расчет можно провести, используя следующие формулы:

$T_m = [(A+T) \times 2 \text{ } ^\circ\text{C}] + [(G+C) \times 4 \text{ } ^\circ\text{C}]$ – если суммарная длина олигонуклеотида не превышает **20** оснований.

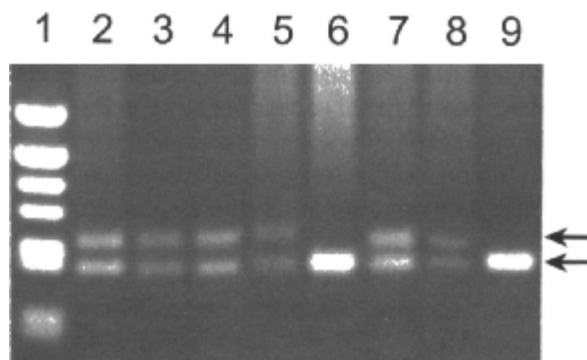
$T_m = 22 + 1.46([2 \times (G+C)] + (A+T))$ – если суммарная длина олигонуклеотида составляет **20-30** оснований.

Различные дополнительные агенты, используемые в ПЦР (буфер **10 B₁**, бычий сывороточный альбумин) необходимы для оптимизации работы полимеразы, увеличения выхода целевого продукта и специфичности реакции.

Метод ПЦР сверхчувствителен, что является как достоинством (можно работать со следовыми количествами матрицы), так и недостатком (высока вероятность контаминации, т.е. амплификации участка случайно попавшей в смесь молекулы посторонней ДНК вместо необходимой).

4. Электрофорез продуктов амплификации.

Амплифицированные участки ДНК различаются по своей длине, массе и, соответственно, по количеству электрических зарядов. Эту разницу можно выявить визуально с помощью электрофореза, при котором наиболее короткие фрагменты ДНК движутся к положительному электроду в полиакриламидном (или в агарозном) геле с наибольшей скоростью. Визуализировать ДНК можно при помощи специального красителя **бромистого этидия**, молекулы которого встраиваются в ДНК, а при освещении ультрафиолетовым светом возбуждаются и испускают свечение. Для определения точной длины полученных отрезков ДНК одновременно с исследуемыми пробами ДНК через гель проводят **маркер молекулярной массы** – ДНК, разрезанную рестриктазой на фрагменты известной длины (маркеры производятся специализированными фирмами; для относительно коротких фрагментов часто используют маркер из плазмиды **pBR**, разрезанной рестриктазой **Hpa II**).



Результаты электрофореза ДНК: 1 – маркер молекулярных масс, 2-9 – исследуемые образцы ДНК.

Работа № 14. АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК И ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Материал и оборудование: растворы исследуемой ДНК, пробирки Эппендорф 0,5 мл, штатив, автоматические пипетки, наконечники к пипеткам, амплификатор, форезная камера, зажимы, лейкопластырь шириной 2-3 см, шприц на 20 мл, штатив для окрашивания ДНК, пленка парафилм, пластина из оргстекла, вытянутый наконечник для пипетки (для нанесения проб), резиновые перчатки, транс-иллюминатор, маска, фотоаппарат, маркер по стеклу; ручки; лабораторный журнал.

Реактивы: набор реактивов для амплификации ДНК, набор реактивов для приготовления полиакриламидного геля, краска для проб, буфер $\times 10$ TBE, раствор бромистого этидия.

Ход работы:

Суть процесса	Протокол работы
1. Сборка системы для амплификации.	
<p>Все компоненты амплификационной смеси (за исключением ДНК) смешивают в одной общей пробирке. Готовую смесь переносят в необходимое количество пробирок.</p> <p>Далее в каждую пробирку со смесью добавляют ДНК, встряхивают пробирки (чтобы капли со стенок упали на дно) и затем в каждую пробирку добавляют по 1 капле минерального масла (для предотвращения испарения жидкости при нагревании до 94°C во время амплификации).</p> <p>Пробирки перед амплификацией следует центрифугировать для полного осаждения амплификационной смеси под слой масла.</p>	<p>Расход реактивов (мкл) на 1 пробу ДНК:</p> <p>deH₂O – 14</p> <p>буфер $\times 10$ B₁ – 2,5</p> <p>MgCl₂ 2,5 mM – 0,5</p> <p>BSA 1,7 – 2</p> <p>dNTP 2mM – 2</p> <p>праймер D (прямой) 0,1 mM – 1</p> <p>праймер K (обратный) 0,1 mM – 1</p> <p>(при использовании «случайного праймера» RAPD – 2)</p> <p>Taq-полимераза – 0,1 (добавляют в последнюю очередь, не допуская пребывания при комнатной температуре более 3-4 мин!).</p> <p>Рассчитать необходимое количество реактивов для всех образцов ДНК, умножив приведенные цифры на количество образцов (+ 1 проба на каждые 10 образцов).</p> <p>Добавить в пробирку все реактивы в указанной последовательности (сразу после использования реактивы убрать в морозильник). Смесью перемешать в вортексе. Перенести смесь в заранее подписанные пробирки (по 23 мкл в</p>

	<p>каждую). В каждую пробирку добавить (отдельным наконечником!) 2 мкл ДНК соответствующего номера (сразу после использования ДНК убрать в морозильник).</p> <p>В каждую пробирку добавить 1 каплю минерального масла.</p> <p>Центрифугировать пробирки (до ускорения 3–4g).</p>
2. Амплификация ДНК.	
<p>Процесс происходит в амплификаторе, в котором устанавливается специально рассчитанный для каждого случая режим. Время амплификации – около 2-3 часов. Желательно не оставлять пробирки в амплификаторе на ночь, поскольку все время после окончания программы он будет поддерживать режим «хранения», т.е. работать как холодильник, что неблагоприятно сказывается на сроке службы прибора.</p>	<p>Пробирки разместить в амплификаторе с учетом разности режимов.</p> <p>Закрутить крышки конфорок.</p> <p>Включить амплификатор, выбрать необходимые режимы.</p>
3. Заливка геля.	
<p>Для электрофореза необходимо залить гель в форезную камеру.</p> <p>Предварительно выбрать плотность геля. Для обычного анализа (при длине фрагментов ДНК 200-600 п.н.) чаще всего используют 6% гель, в случае анализа коротких фрагментов (100-150 п.н.) – более плотный 8%, позволяющий разделить фрагменты, разница в длине между которыми не превышает 3-5 п.н. Кроме того, необходимо выбрать размер стекла камеры – для анализа RAPD-PCR используют стекло 20×20 или 15×15 см, для обычного анализа – 10×10.</p> <p>Стекла скрепляют попарно и герметизируют полученную «емкость для геля». Стекла должны быть идеально чистыми во избежание образования различных неровностей в геле.</p>	<p>Поместить спейсеры между стеклами, зажать стекла зажимами, выровнять все края, приклеить с нижней стороны лейкопластырь.</p> <p>Подготовить гребенку.</p>

<p>Затем в специальной пробирке готовят гель соответствующей концентрации. Работать необходимо аккуратно и быстро, т.к. гель вскоре застывает.</p> <p>Основу геля составляет полиакриламид, однако для создания необходимой структуры и образованием поперечных сшивок между полимерными нитями добавляют бис-акриламид. Реакция полимеризации геля цепная, запускается радикалом $\bullet\text{SO}_4$ (источник – PSA, персульфат аммония). Катализирует образование радикалов TEMED (тетраметилэтилендиамин)</p> <p>Дать гелю застыть, затем вынуть гребенку, и собрать форезную камеру.</p>	<p>В пробирку для приготовления 6% геля добавить поочередно следующие компоненты (расчет для 1 стекла 10×10):</p> <p>dH_2O – 6 мл, буфер ТБЕ×5 – 2 мл, ПААГ (смесь акриламида и бис-акриламида 29:1) – 2 мл, PSA (персульфат аммония) – 50 мкл, TEMED (тетраметилэтилендиамин) – 8 мкл.</p> <p>После добавления TEMED необходимо быстро, но плавно перевернуть закрытую пробирку 5–7 раз для смешивания компонентов, а затем быстро залить смесь между стеклами, не допуская образования пузырьков, до уровня вырезки короткого стекла.</p> <p>Вставить гребенку, так же не допуская образования пузырьков. Зубья гребенки должны войти в гель почти полностью.</p> <p>Положить стекло горизонтально для застывания геля, оставить на 20–25 мин.</p> <p>После застывания геля снять со стекла зажимы и лейкопластырь, смыть загрязнения с наружной поверхности стекол (дистиллированной водой), набрать в шприц буфер ТБЕ×1, полить им гребенку, затем аккуратно ее вытащить, удалить остатки геля из выемки стекла (не допуская попадания кусочков геля в лунки), тщательно промыть каждую лунку буфером.</p>
---	--

<p>Залить в камеру электролит (буфер ТБЕ×1) и включить ток мощностью 90В на 40 мин для проведения предфореза. Это необходимо для прочистки и структуризации штреков для ДНК.</p>	<p>Собрать форезную камеру, прикрепив стекла зажимами на ее обе стороны (стекла выемками внутрь). Поставить камеру в поддон, залить буфер ТБЕ×1 между стекол (покрыв выемки раствором), а затем залить его в поддон.</p> <p>Закрыть камеру контактами, включить электрический ток и выставить мощность 90В.</p> <p>Время предфореза – 30-40 мин.</p>
<p align="center">4. Нанесение ДНК на гель.</p>	
<p>Перед нанесением ДНК в лунки геля необходимо добавить в нее краску, маркирующую место расположения легких (бромфеноловый синий ~50 п.н.) и средних (ксиленцианол ~ 200) фрагментов ДНК в геле.</p> <p>Вначале в лунки специального штатива наносят краску (смесь красителей с глицерином), а затем в каждую лунку добавляют амплифицированную ДНК, осторожно вытягивая ее из-под слоя масла.</p>	<p>В штатив для ДНК поместить по 1 мкл смеси красителей бромфенолового синего и ксиленцианола, добавить в каждую каплю амплификата (в соотношении 1 часть красителя : 4 части амплификата), очень осторожно извлекая ее из-под слоя масла, и перемешать полученную смесь.</p>
<p>Нанесение окрашенной ДНК на гель производят одним и тем же вытянутым наконечником и специальной пипеткой для фореза. В первую лунку наносят маркер (pBR/Нра II), в остальные – ДНК (последовательность нанесения должна быть записана в журнал!). Каждый раз наконечник опускают на дно лунки и осторожно впускают туда ДНК, не допуская образования пузырька, что может привести к контаминации соседних лунок. После каждой пробы наконечник промывают в буфере, который залит в поддон камеры.</p> <p>По окончании нанесения проб включают электрический ток (мощность – 120-150 В).</p>	<p>Специальной пипеткой с вытянутым наконечником нанести маркер, например – pBR/Нра II (из морозильника) в первую слева лунку, промыть наконечник в буфере из поддона, а затем таким же образом нанести все образцы ДНК в остальные лунки.</p> <p>Включить камеру на 120-150 В.</p> <p>Следить за продвижением полос красителя, по окончании электрофореза выключить ток.</p>

<p>В ходе электрофореза необходимо следить за уровнем двух полос красителя. Момент выключения тока определяется задачей исследования – в случае изучения коротких фрагментов ДНК следует выключать ток при приближении первой полосы красителя к нижнему краю камеры, в случае изучения длинных фрагментов – ток иногда выключают после выхода второй полосы краски из геля.</p>	
5. Окрашивание ДНК.	
<p>Видимые синие красители лишь показывают уровень продвижения ДНК в геле по отношению к электродам. Визуализировать же расположение фрагментов ДНК в геле друг относительно друга можно с помощью красителя этидиум бромид.</p> <p>По окончании электрофореза камеру сразу же разбирают, разделяют стекла, помещают гель в раствор красителя и затем облучают гель ультрафиолетом на транс-иллюминаторе. Эта процедура вызывает люминесценцию красителя, связанного с ДНК, и появление в геле светящихся полосок.</p> <p>Гель фотографируют при включенном транс-иллюминаторе.</p>	<p>Вылить буфер из форезной камеры, разобрать ее, отделить друг от друга стекла, гель (остается на одном из стекол) поместить в емкость с раствором этидиум бромид на 6 мин (накрыть крышкой).</p> <p>Вынуть гель, осторожно ополоснуть dH_2O, поместить его на поверхность транс-иллюминатора, аккуратно сняв его лопаточкой со стекла, включить прибор, сфотографировать гель.</p>

Работа № 15. ЭКСКУРСИЯ В ПРИРОДУ НА ТЕМУ «ПОЛИМОРФИЗМ ПОПУЛЯЦИЙ»

<p>Основная цель экскурсии: выявить и провести анализ полиморфизма естественных популяций, уяснить его значение в эволюции.</p> <p>Материал: <i>белый клевер</i> (различный рисунок пигментированного пятна на листьях), <i>лютики едкий и ползучий</i> (имеют уклоняющиеся формы по числу лепестков в цветках).</p>
--

Полиморфизм популяций белого клевера проявляется в изменении рисунка седых пятен на листьях, обусловленном серией множественных аллелей: каждый аллель вызывает разный рисунок пятна. Гетерозиготы в большинстве случаев имеют два разных типа пятен: оба аллеля проявляются в фенотипе. Таким образом, по фенотипическому проявлению аллелей можно установить генотипы растений за исключением тех форм, где рисунки пятен, определяемые двумя аллелями, сливаются.

В популяции лютиков наряду с характерными пятилепестковыми цветками часто встречаются частично махровые цветки с 6 – 9 и 11-ю лепестками. Махровость проявляют рецессивные гомозиготы (aa).

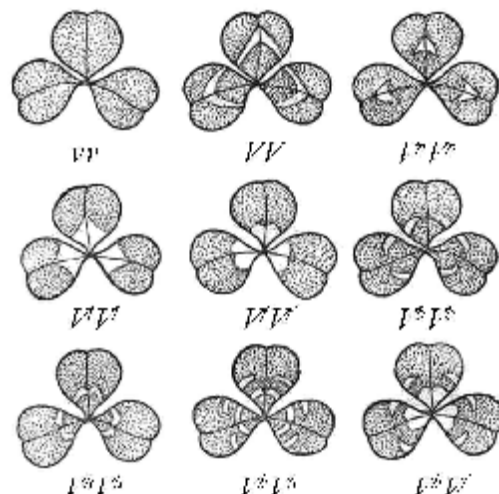


Схема рисунков седых пятен на листьях белого клевера

Ход работы:

1. РАБОТА НА ЭКСКУРСИИ. Найти листья белого клевера с разными рисунками, сорвать их и заложить в ботанические папки, чтобы сохранить для последующего анализа.
2. Выявить существующие в популяции белого клевера аллели гена, обуславливающие форму седого пятна на листьях. Установить генотипы разных уклоняющихся форм.
3. Не срывая растения лютика, учесть количество цветков с пятью лепестками и частично махровых с шестью и большим числом лепестков.
4. Провести анализ генетической структуры популяции лютика едкого.
5. По полученным цифровым данным о фенотипических классах рассчитать соотношение генных частот и генотипических классов в популяции. Расчет производится на основании закона Харди – Вайнберга; $p^2AA - 2pqAa - q^2aa = 1$.

Например, в одном звене насчитали **336** обычных цветков и **33** цветка с большим числом лепестков, что составляет примерно **91%: 9%**, или **0,91** и **0,09**.

Какова частота гена A и его аллеля a ? Известно, что генотип растений с махровыми цветками гомозиготный рецессивный – aa . Частота генотипа aa в популяции составляет q^2 , а частота гена $a = \sqrt{q^2}$, т. е. $\sqrt{0,09} = 0,3$, или 30%. Тогда частота (p) гена $A = 100\% - 30\% = 70\%$.

Соотношение гомозиготных и гетерозиготных генотипов в популяции определяют по найденным частотам генов. Гомозиготный доминантный генотип AA в популяции составляет: $q^2 = 0,7^2 = 0,49$, или 49%. Гетерозиготный генотип Aa составляет: $2pq = 2(0,7 \times 0,3) = 0,42$, или 42%, а гомозиготный рецессивный – 9% ($49\% AA + 42\% Aa + 9\% aa = 100\%$).

6. Провести наблюдение полиморфизма популяций у других видов растений и насекомых (мыльнянка лекарственная с белыми и розовыми цветками, гравилат городской с пятилепестковыми и частично махровыми цветками, тысячелистник с неокрашенными и окрашенными соцветиями и др.), отметить мутирующие признаки.
7. РАБОТА В ЛАБОРАТОРИИ. Сравнивая рисунок пятна на клеверном листе с рисунками на схеме, составить небольшие коллекции. На листе бумаги расположить сначала вариации с одним седым пятном, а затем – с двумя типами пятен, как показано на рисунке. Листья с двумя типами пятен встречаются очень редко. Упорядочив листья, их можно наклеить, используя для этой цели клей ПВА (хорошо фиксирует и сохраняет естественную окраску). В соответствии со схемой обозначить генотипы гомозигот: ген, определяющий этот признак, принято обозначать буквой v с индексами – v^b , v^f , v^h , v^l , v^p и т. д. По ним установить и обозначить генотипы гетерозигот. Гетерозиготы с v не отличаются от доминантных гомозигот.
8. Обсудить результаты самостоятельной работы. Сравнить данные, полученные звеньями с разных участков внутри популяции, с данными прошлых лет. Желательно иметь для сравнения показатели генетической структуры других популяций исследуемых видов растений.

Работа № 16. УСТАНОВЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ В ПОПУЛЯЦИИ ПРИ РАЗНЫХ ЧАСТОТАХ АЛЛЕЛЕЙ

Задание: проследить изменение частоты генотипов в популяции в зависимости от измененных частот аллелей.

Ход работы:

1. Начертить таблицу с разными частотами аллельных генов:

<i>p</i>	Частота генотипов			
	<i>AA (p²)</i>	<i>Aa (2pq)</i>	<i>aa (q²)</i>	<i>q</i>
0,95	0,9025	0,0950	0,0025	0,05
0,85				0,15
0,75				0,25
0,65				0,35
0,50				0,50
0,45				0,55
0,30				0,70
0,20				0,80
0,10				0,90

2. Вычислить число гомозиготных и гетерозиготных генотипов для каждого случая.

Пример. В первой строке таблицы частота доминантного гена *A* составляет **0,95**, а рецессивного аллеля – **0,05**. Частоту генотипов в этом случае определяем следующим образом:

$AA = p^2$, т.е. $(0,95)^2$; $aa = q^2 = (0,05)^2 = 0,0025$; гетерозиготы $Aa = 2pq = (0,95 \times 0,05) \cdot 2 = 0,0950$.

Найденные числа ставим в соответствующие графы. Проверяем вычисления, подставляя в формулу $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ искомые данные: $0,9025 + 0,0950 + 0,0025 = 1$.

3. Сравнить частоты доминантных гомозигот, гетерозигот и рецессивных гомозигот по строкам таблицы. Убедиться в том, что частота генотипов в популяции изменяется с изменением частоты аллелей.

Работа № 17. ИЗУЧЕНИЕ ЧАСТОТЫ ГЕНОВ В ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛОВЕКА

Задание: в группе студентов, принятой за популяцию, подсчитать частоту генов, обуславливающих цвет глаз.

Ход работы:

1. Посчитать число студентов в группе, имеющих карие и голубые глаза.
2. Вычислить процент отношения доминантного (карие) и рецессивного (голубые) признаков. Результаты записать в тетрадь по форме:

Фенотип	Число особей	%	Частота генов			
			доминантного		рецессивного	
Карие глаза						
Голубые глаза						

3. Определить частоту доминантных и рецессивных генов в популяции.

Частота рецессивного гена равна корню квадратному из числа гомозиготных рецессивных особей, выраженному в долях единицы.

Например, $aa = 25\% = 0,25; a = \sqrt{aa} = \sqrt{0,25} = 0,5 = 50\%$

Частоту доминантного гена определяют вычитанием частоты рецессивного гена из **100%**: $A\% = 100\% - a\%$

В приведенном примере процент доминантного гена А равен: $100\% - 50\% = 50\%$

Константные наследственные признаки человека, контролируемые разными аллелями генов:

Доминантный признак	Рецессивный признак
Темные волосы	Светлые волосы
Нерыжие волосы	Рыжие волосы
Вьющиеся волосы	Прямые волосы
Сильная волосатость тела	Слабая волосатость тела
Раннее облысение	Нормальный срок облысения
Черная кожа	Белая кожа
Карие глаза	Голубые или серые глаза
Наличие эпиканта (складки верхнего века)	Отсутствие эпиканта
Близорукость	Нормальное зрение
Дальнозоркость	Нормальное зрение
Свободные ушные мочки	Приросшие ушные мочки
Толстые губы	Тонкие губы

Большие глаза	Маленькие глаза
Длинные ресницы	Короткие ресницы
Низкий рост	Высокий рост
Гипертония	Нормальное давление
Нормальное состояние	Гемофилия
Нормальное состояние	Сахарный диабет
Нормальный слух	Врожденная глухота
Мигрень	Нормальное состояние
Нормальное состояние	Фенилкетонурия

Список рекомендуемой литературы

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях: учебное пособие. М., Академкнига, 2003.
2. Ватти К.В., Тихомирова М.М. Руководство к практическим занятиям по генетике. М.: Просвещение, 1979.
3. Дегтярева Н.И. Лабораторный и полевой практикум по генетике. Киев: «Вища школа», 1973.
4. Дубинин Н.П., Глембоцкий Я.А. Генетика популяций и селекция. М.: Наука, 1976.
5. Макгрегор Г., Варли Дж. Методы работы с хромосомами животных. М., Мир, 1986.
6. Медведев Н.Н. Практическая генетика. М.: Наука, 1968.
7. Меттлер Л., Грегг Т. Генетика популяций и эволюция. М.: «Мир», 1972.
8. Шварцман П.Я. Полевая практика по генетике с основами селекции: Учеб. пособие для студентов пед. ин-тов по спец. «Биология». М.: Просвещение, 1986.
9. Шварцман П.Я., Дегтярева Н.И., Клиновская Н.И., Папонова И.Т., Меркулов М.П. Учебно-полевая практика по генетике (для биологических факультетов). М., 1975.
10. Айала Ф, Кайгер Дж. Современная генетика: В 3-х т. Пер. с англ.: М.: Мир, 1987- 1988.
11. Алиханян С.И., Акифьев А.П., Черник А.С. Общая генетика: Учеб. для студ. биол. спец. ун-тов, М.: Высш. шк., 1985.
12. Бочков Н.П., Захаров А.Ф., Иванов В.И. Медицинская генетика М., Медицина, 1984.
13. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции; Учеб. для биол. спец. ун-тов. М., Высш.шк., 1989.
14. Кайданов А.З. Генетика популяций. Учеб. для биол., мед. и с-х. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1996.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Пензенский государственный педагогический университет
имени В. Г. Белинского

Н.В. Быстракова, О.А. Ермаков, С.В. Титов

РУКОВОДСТВО
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО ГЕНЕТИКЕ

Учебно-методическое пособие

Авторы-составители: кандидаты биологических наук, доценты: Наталья Викторовна Быстракова, Олег Александрович Ермаков; доктор биологических наук, профессор Сергей Витальевич Титов

В авторской редакции
План университета **2011** (Поз.)

Подписано к печати
Бумага писчая белая.
Усл.- печ. л.
Печать офсетная.
Цена

Формат **60 x 84 1/16**
Уч.-изд.л.
Тираж **50** экз.
Заказ №

Издательство ПГПУ им. В.Г. Белинского:
440026 Пенза, ул. Лермонтова, **37**. Корп. **5**, комн. **466**. РИО.