

Документ подписан простой электронной подписью

Информация о владельце:

ФИО: Романчук Иван Сергеевич

Должность: Ректор

Дата подписания: 05.06.2024 14:30:39

Уникальный программный ключ:

6319edc2b582ffdacea443f01d5779368d0957ac34f5cd074d81181530452479

ФГАОУ ВО «ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УТВЕРЖДЕНО

зам. директора ШЕН

Крековым С.А.

РАЗРАБОТЧИК

Жигилева О. Н.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Популяционная генетика

для обучающихся по специальности

06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика

профиль подготовки:

Молекулярная и клеточная биоинженерия

форма обучения очная

3) белки со сходными свойствами можно выделить у многих видов организмов, поэтому можно изучать совершенно не исследованные (с точки зрения генетики) виды.

В связи с развитием молекулярных методов анализа геномов, широкое применение получили **ДНК-маркеры**. К ним относятся нуклеотидные последовательности разного типа: уникальные, повторяющиеся, мобильные генетические элементы, случайные, мини- и микросателлиты. Это могут быть участки определенных генов с известной функцией, а также анонимные последовательности, в том числе, находящиеся в некодирующей части генома; это могут быть последовательности, соответствующие геномной, а так же – митохондриальной или хлоропластной ДНК. ДНК хромосом и органелл является первоосновой свойств не только легко выделяемых белковых продуктов, но и регуляторных белков, присутствующих в клетке в следовых количествах, ДНК включает в себя регуляторные последовательности, непосредственно участвует в эпигенетических событиях. Многообразие явлений, связанных с нуклеотидными последовательностями, позволяет применять ДНК-маркеры существенно шире, чем морфологические, хромосомные и белковые. ДНК-маркеры применяются в разнообразных исследованиях на стыке генетики и других биологических наук (физиология, цитология, математическая биология, эволюционное учение).

БЛОК 1. ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА БЕЛКОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Основной метод изучения полиморфизма белков в популяциях – **электрофорез макромолекул** в полиакриламидных или крахмальных гелях с последующей визуализацией. Метод электрофореза был

разработан в середине 1950-х гг. (Smithies, 1955). Принцип метода заключается в разделении смеси макромолекул на фракции в геле под действием электрического поля. Подвижность белка определяется его свойствами: суммарным электрическим зарядом всех входящих в его состав аминокислот, его массой, третичной и четвертичной структурой. Все эти свойства зависят от набора аминокислот, входящих в данный белок, т.е. в конечном итоге определяются его первичной структурой.

В качестве субстрата для разделения макромолекул сначала использовалась целлюлоза, но этот метод не достаточно точен. Революционное значение имела разработка метода **электрофореза в гелях** (желеобразных веществах). Гели, используемые для электрофореза, должны обладать следующими свойствами: быть химически инертными, электрически нейтральными, насыщенными водой. Наибольшее применение получили три вида гелей:

- 1) **крахмальный гель** - изготавливается из модифицированного крахмала; обладает низкой разрешающей способностью, применяется для изучения белков;
- 2) **агарозный гель** – изготавливается из агарозы – вещества, извлекаемого из агар-агара, обычно он используется для разделения тотальной ДНК и ее фрагментов;
- 3) **полиакриламидный гель (ПААГ)** - синтетический полимер, состоящий из двух мономеров – акриламида и метилен-бис-акриламида; обладает наибольшей разрешающей способностью, но, в отличие от двух первых, ПААГ токсичен, сложнее в работе, чем агарозный гель; применяется для изучения как белков, так и нуклеиновых кислот.

Скорость движения изучаемых макромолекул в геле, находящемся в электрическом поле, зависит от их размеров, формы и заряда. Поэтому различающиеся по характеристикам фракции белков

оказываются на разном расстоянии от старта. Заряд белковых молекул зависит от pH среды, в нейтральном буфере большинство белков заряжено отрицательно, поэтому движется в электрическом поле в направлении от катода к аноду (рис. 1).

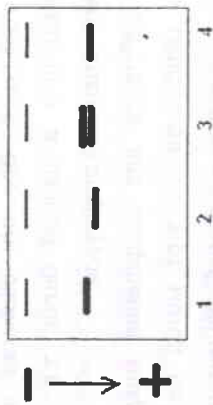


Рис. 1. Схема электрофоретического разделения макромолекул в гелях: 1-4 – номера образцов.

Различают следующие виды электрофореза:

1. диск-электрофорез (в колонках геля);
2. блот-электрофорез (в пластинах геля):
 - а) горизонтальный (при горизонтально ориентированных пластинах крахмального или агарозного геля)
 - б) вертикальный (при вертикально ориентированных пластинах ПААГ)

В зависимости от вида электрофореза, используют различные формы для заливки геля и электрофоретические камеры (рис. 2). Камера для вертикального электрофореза (на рисунке слева) состоит из поставленных друг над другом камер для катодного (КБ) и анодного буферов (АБ). В работающем состоянии, эти камеры соединены парой стекол, между которыми находится тонкий полиакриламидный гель (Г). Камера для горизонтального электрофореза (на рисунке справа) представляет собой одну прямоугольную ёмкость с одним буфером

(Б). Центральная часть камеры, на которую кладётся крахмальный или агарозный гель (Г), приподнята так, чтобы слой залитого буфера в этом месте был близок к толщине геля. Кроме собственно конструкции для размещения геля и буфера, в состав электрофоретических камер входят электроды: катод (К) и анод (А), подсоединяемые к источнику постоянного электрического тока (ИП). Источники тока, используемые для электрофореза, позволяют регулировать напряжение и силу тока. Для постановки электрофореза так же необходимы приспособления, связанные с изготовлением гелей нужной формы: столик для заливки геля с приспособлениями для герметизации пластин и «гребенки» - приспособления для формирования углублений (слотов) в геле для нанесения образцов.

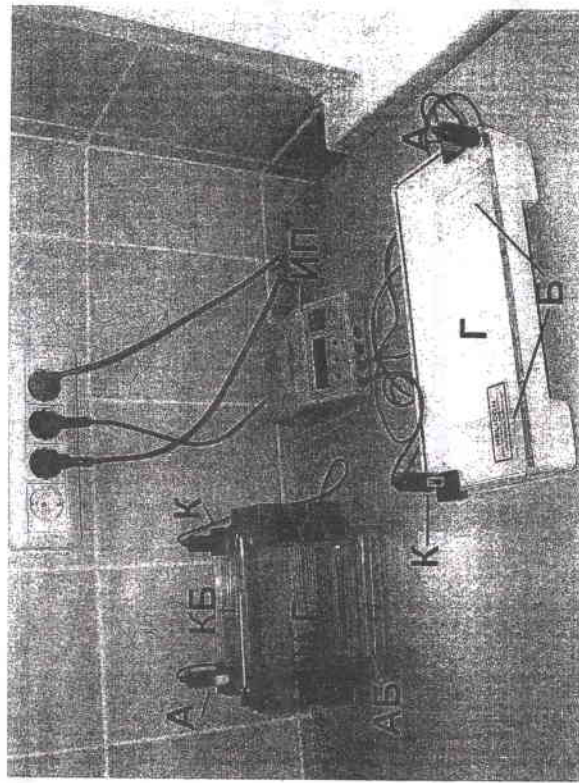


Рис. 2. Камеры для вертикального (слева) и горизонтального (справа) электрофореза в гелях (HELIKON) (пояснения в тексте).

1.1. Приготовление растворов и буферных смесей

для электрофореза белков в ПААГ

- 1. Раствор для утяжеления проб (40% раствор сахарозы)**
сахароза – 10 г
дистиллированная вода - до 25 мл
- 2. Раствор красителя-метки (0,1 % раствор бромфенолового синего)**
бромфеноловый синий – 5 мг
дистиллированная вода – до 5 мл
затем на 25 мл раствора сахарозы не более 250 мкл 0,1 % раствора бромфенолового синего
- 3. Буфер для приготовления проб мышечной ткани позвоночных животных (трис-НСl, pH=8,0)**
трис – 1,2 г
1 Н HCl – 9, 72 мл
дистиллированная вода – до 20 мл
- 4. Маточный буфер (трис-ЭДТА-боратный, ТБЕ, pH=8.3)**
Трис – 10,8 г
ЭДТА динатриевая соль – 4,4 г
H₃BO₃ – 5,5 г
дистиллированная вода – до 1000 мл
- 5. Раствор акриламида (АКА)**
метилен-бис-акриламид – 4 г
акриламид – 96 г
дистиллированная вода – до 500 мл

! Сначала растворить метилен-бис-акриламид в небольшом количестве воды на магнитной мешалке, затем добавить акриламид

6. Электродный буфер

маточный буфер развести в 17 раз:
маточный буфер – 50 мл
дистиллированная вода – 750 мл

7. Гелевый буфер

маточный буфер развести в 2,5 раза:
маточный буфер - 10 мл
дистиллированная вода – 22,5 мл

8. Раствор для приготовления Трис-НСl буферов (0,2 М Трис)

Трис – 4,84 г
дистиллированная вода – до 200 мл

9. Раствор для доведения pH (1 Н HCl)

концентрированная HCl – 2,88 мл
дистиллированная вода – до 100 мл
! раствор готовить под тягой, в резиновых перчатках и маске

10. Раствор для доведения pH (0,1 Н HCl)

1 Н HCl развести водой в 10 раз:
1 Н HCl – 20 мл
дистиллированная вода – 180 мл

11. Раствор для приготовления фосфатного буфера 1 (0,2 М

однозамещенный фосфат натрия – NaH₂PO₄)
NaH₂PO₄ – 7,8 г

дистиллированная вода - до 250 мл

12. Раствор для приготовления фосфатного буфера 2 (0,2 М двузамещенный фосфат натрия – Na_2HPO_4)

Na_2HPO_4 – 7,098 г

дистиллированная вода - до 250 мл

13. Раствор для фиксации электрофограмм (7% раствор уксусной кислоты)

дистиллированная вода – 465 мл

ледяная уксусная кислота – 35 мл

! раствор готовить под тягой, в резиновых перчатках и маске

14. Раствор для покраски на миогены (12,5 % трихлоруксусная кислота)

трихлоруксусная кислота – 50 г

дистиллированная вода – до 400 мл

1.2. Экстрагирование белков скелетных мышц позвоночных животных

и подготовка проб для электрофореза

Необходимым предварительным этапом в электрофоретическом изучении белков является их выделение из образца. Для выделения белков можно использовать любую ткань – кровь, печень, скелетные и сердечные мышцы, почки. Выбор ткани зависит от вида изучаемого фермента, поскольку существуют тканеспецифичные ферменты и их формы, а также отличия по активности ферментов в разных тканях. Ткани замораживают и хранят при температуре $-20\text{ }^\circ\text{C}$ или в жидком азоте. Перед проведением электрофореза:

1. Ткань разморозить на льду или при $+4\text{ }^\circ\text{C}$;

2. Взять навеску ткани 500 мг, поместить в пробирку Эппендорфа;
3. Залить 500 мкл буфера для проб;
4. Гомогенизировать до получения однородной массы (на льду);

5. Заморозить;

6. Разморозить на льду или при $+4\text{ }^\circ\text{C}$;

7. Центрифугировать при 3000 об./мин. 20-30 минут;

8. Отобрать супернатант в количестве 20 мкл;

9. Перед внесением в лунки геля пробы смешать с раствором для утяжеления проб в соотношении 1:1.

1.3. Разделение белков тканей позвоночных животных методом вертикального электрофореза в ПААГ

1. Подготовить электрофоретическую камеру для электрофореза: вымыть, ополоснуть дистиллированной водой, просушить, подготовить заливочный столик;

2. Приготовить раствор для получения 7,5% полиакриламидного геля (ПААГ):

раствор АКА – 17,5 мл

гелевый буфер – 14,5 мл

дистиллированная вода – 18 мл

3. Нагреть на водяной бане до $+45-50\text{ }^\circ\text{C}$;

4. Непосредственно перед заливкой раствора, добавить в него:

1,1,1,1-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД) – 4 капли
персульфат аммония (ПСА) – 20 мг

5. Залить гель в заливочный столик, вставить «гребенку»;

6. Оставить на 30 минут для полимеризации геля;

7. Собрать электрофоретическую камеру;

8. Залить электродный (катодный и анодный) буфер;

9. Вынуть «гребенки»;

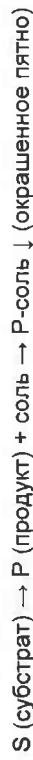
10. Внести пробы в слоты геля в количестве 40 мкл;

11. Подключить камеру к источнику тока. Электрофорез проводить в режиме: 200 В при силе тока 100 мА в течение 2,5 часов, наблюдая за продвижением метки;

12. По окончании электрофореза отключить прибор, вылить буфер, вынуть гелевые пластины, которые затем подвергают гистохимической окраске.

1.4. Гистохимическое выявление белков

В основе гистохимического выявления ферментов лежат специфические химические реакции на продукты ферментативных реакций, которые в общем виде можно представить так:



Общая схема варьирует в зависимости от конкретного вида белка.

1.4.1. Гистохимическое выявление неспецифических эстераз

Неспецифические эстеразы (Es 3.1.1.1, 3.1.1.2 и др.) – группа ферментов, способных расщеплять эфирные связи карбоновых кислот с нафтолом. Спектр эстераз различных тканей представляет собой полиферментный комплекс, в котором можно идентифицировать ализстеразу, арилэстеразу, ацетилэстеразу, ацетилхолинэстеразу, холинэстеразу, атропинэстеразу, каждая из которых кодируется разными генами. Обычно эстеразы, как правило, мономерны, их гены представлены несколькими копиями в геноме, высоко полиморфны у многих видов животных, один локус может иметь до 4-5 аллельных состояний.

Приготовление растворов

- 0,05 М фосфатный буфер для покраски на эстеразы:

15,25 мл двузамещенного фосфата натрия Na_2HPO_4

9,75 мл однозамещенного фосфата натрия NaH_2PO_4

75 мл дистиллированной воды

- Субстрат: α -нафтилацетат Na – 100 мг

β -нафтилацетат Na - 100 мг

растворить в 1 мл ацетона или этилового спирта, залить 50 мл фосфатного буфера;

- Краситель: прочный синий RR-соль (ББ-соль, RR-соль) – 200 мг
добавить в буфер непосредственно перед заливкой геля

Покраска

- гель залить раствором субстратов, затем буфером с красителем;

- инкубировать 15-30 мин. в термостате при 37 °С (до появления коричневых полос)

1.4.2. Гистохимическое выявление аспаратаминотрансфераз

Аспаратаминотрансфераза (ААТ) или
глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT 2.6.1.1) – фермент
белкового обмена, функция которого заключается в
переаминировании аминокислот с кетокислотами:

Аспарат + α -кетоглутаровая кислота \rightarrow оксалоацетат + глутаминовая
кислота

В клетках ААТ представлена в двух формах – растворимая (Aat-s) и
митохондриальная (Aat-m), поэтому на фореграммах выявляются две

зоны активности. ААТ-s – димерный белок, у позвоночных животных кодируется двумя генами.

Приготовление растворов

-0,05 М трис-НСl буфер рН 7,6:

0,2 М Трис – 12,5 мл

0,1 Н НСl – 12,5 мл

дистиллированная вода – до 100 мл

- Субстрат: α -аспартат - 200 мг

α -кетоглутаровая кислота – 100 мг

-Ко-фактор: пиридоксаль-5-фосфат – 5 мг

Субстрат и ко-фактор растворить в буфере, профильтровать;

- Краситель: прочный синий ББ соль – 400 мг

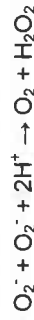
добавить в буфер непосредственно перед заливкой геля.

Покраска

- гель залить профильтрованным раствором и инкубировать в термостате при 37°C в течение 1-3 часов (до появления сине-зеленых полос на оранжевом фоне).

1.4.3. Гистохимическое выявление супероксиддисмутаза

Супероксиддисмутаза (SOD 1.6.4.3) – фермент, функция которого заключается в катализе свободных радикалов супероксида O_2^- , образующихся в клетках в ходе окислительно-восстановительных реакций, в перекись водорода и кислород:



физиологическая функция фермента – защита от повреждающего действия свободных радикалов кислорода. СОД в клетках

представлена в двух формах – растворимой (SOD-s) и митохондриальной (SOD-m), генетический контроль которых у позвоночных осуществляется двумя разными генами.

Приготовление растворов

-0,05 М трис-НСl буфер рН 8,5:

0,2 М Трис – 12,5 мл

0,1 Н НСl – 6,25 мл

дистиллированная вода – до 100 мл

-Ко-фактор: $MgCl_2$ – 20 мг

ко-фактор растворить в буфере;

- Красители: Феназинметасульфат (ФМС) – 15 мг

Нитросиний тетразолий (НСТ) – 15 мг

добавить в буфер непосредственно перед заливкой геля.

Покраска

- гель залить профильтрованным раствором и инкубировать в термостате при 37°C в течение 15-30 минут;

- поместить гель на 3-5 минут под ультрафиолетовое облучение (до появления белых пятен на фиолетовом фоне).

1.4.4. Гистохимическое выявление миогенов

Миогены (My) – саркоплазматические (растворимые) белки мышц. Обычно в геноме имеется несколько (4-6 и более) генов, кодирующих эти белки. Как правило, подвижность миогенных фракций видоспецифична и одинакова у большинства особей вида. Иногда наблюдается полиморфизм по 1-2 локусам, нередко полиморфизм обусловлен наличием 0-аллеля.

Приготовление растворов

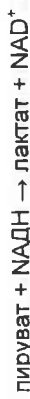
- 10 мг красителя (амидочерного) растворить в 1 мл спирта и довести до 100 мл дистиллированной водой.

Покраска

- гель поместить на 30 минут в 12,5 %-ый раствор трихлоруксусной кислоты, поставить в темноту;
- промыть дистиллированной водой;
- залить раствором красителя, оставить на сутки.

1.4.5. Гистохимическое выявление лактатдегидрогеназы (ЛДГ)

Лактатдегидрогеназа (LDH 1.1.1.27) – фермент анаэробного гликолиза, который восстанавливает пируват в лактат, тем самым поддерживая окислительно-восстановительное равновесие, например, при интенсивной нагрузке в мышцах:



ЛДГ кодируется парой генов, кодирующих, соответственно, два типа субъединиц - А (или М – от англ. *muscle*) и В (или Н – от англ. *heart*). У большинства позвоночных ЛДГ имеет тетрамерную четвертичную структуру и, следовательно, возможно образование пяти электрофоретических форм: А₄, А₃В, А₂В₂, АВ₃ и В₄, которые проявляются на электрофореграммах в виде пяти полос.

Приготовление растворов

- 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,4):

20,25 мл двузамещенного фосфата натрия, Na₂HPO₄

4,75 мл однозамещенного фосфата натрия, NaH₂PO₄

75 мл дистиллированной воды

- Субстрат: 1 М лактат натрия – 4 мл (448 мг)

или лактат лития – 180 мг

(для получения лактата натрия (лактата лития) к 4 мл молочной кислоты добавить Na₂CO₃ (или Li₂CO₃) до получения рН 7,4), залить 50 мл фосфатного буфера;

- Ко-фактор: НАД – 20 мг

добавить в буфер непосредственно перед заливкой геля;

- Красители: Феназинметасульфат (ФМС) – 2 мг

Нитросиний тетразолий (НСТ) – 30 мг

добавить в буфер непосредственно перед заливкой геля.

Покраска

- гель залить буфером с раствором субстратов;

- инкубировать 15-30 мин. в термостате при 37 °С (до появления фиолетовых полос)

1.4.6. Гистохимическое выявление изоцитратдегидрогеназы (ИДГ)

Изоцитратдегидрогеназа (IDH 1.1.1.42) – фермент цикла трикарбоновых кислот (Кребса), осуществляющего полное окисление белков, жиров и углеводов, катализирует окислительно-восстановительную реакцию:



ИДГ в организме представлена двумя формами – растворимой (ИДГ-s) и митохондриальной (ИДГ-m), генетический контроль которых у позвоночных осуществляется двумя разными ядерными генами. ИДГ-s у позвоночных животных димер.

Приготовление растворов

- 0,2 М трис-НСl буфер рН 8,0:
 - трис – 2,178 г
 - 1 Н НСl – 20 мл
 - дистиллированная вода – до 120 мл
- Субстрат: 0,1 М изоцитрат натрия – 3 мл (75 мг)
- Ко-фактор: $MgCl_2$ – 12 мг
- растворить в буфере;
- Ко-фактор: НАДФ – 20 мг
- добавить в буфер непосредственно перед заливкой геля;
- Красители: Феназинметасульфат (ФМС) – 3 мг
- Нитросиний тетразолий (НСТ) – 10 мг
- добавить в буфер непосредственно перед заливкой геля.

Покраска

- гель залить профильтрованным раствором и инкубировать в термостате при 37°C в течение 15-30 минут до появления сиреневых полос;

1.4.7. Гистохимическое выявление малатдегидрогеназы (МДГ)

Малатдегидрогеназа НАД-зависимая, МДГ, НАД-МДГ (MDH 1.1.1.37) – последний фермент цикла трикарбоновых кислот (цикла Кребса), катализирует окислительно-восстановительную реакцию:



НАД-МДГ в организме представлена двумя формами – растворимой (МДГ-s) и митохондриальной (МДГ-m), которые у животных

кодируются разными ядерными генами. Обе формы – димеры, поэтому гетерозиготы представлены на электрофореграммах тремя полосами. Полиморфизм по МДГ описан у многих видов животных.

Малатдегидрогеназа НАДФ-зависимая, НАДФ-МДГ (MDH 1.1.1.40) – не является ферментом цикла трикарбоновых кислот (цикла Кребса), катализирует обратную реакцию, выполняет функцию пополнения цикла Кребса промежуточными продуктами.

Приготовление растворов

- 0,1 М трис-НСl буфер рН 8,1:
 - 0,2 М трис - 25 мл
 - 0,1 Н НСl – 27,5 мл
 - дистиллированная вода – до 100 мл
- Субстрат: 0,5 М малат натрия – 15 мл (580 мг)
- (для получения малата натрия 1 г яблочной кислоты растворить в 15 мл дистиллированной воды и добавить Na_2CO_3 до получения рН 7,0)
- залить 50 мл трис-НСl буфера;
- Ко-фактор: $MgCl_2$ – 15 мг
- ко-фактор растворить в буфере;
- Ко-фактор: НАД – 20 мг
- добавить в буфер непосредственно перед заливкой геля;
- Красители: Феназинметасульфат (ФМС) – 5 мг
- Нитросиний тетразолий (НСТ) – 15 мг
- добавить в буфер непосредственно перед заливкой геля.

Покраска

- гель залить профильтрованным раствором и инкубировать в термостате при 37°C в течение 15-30 минут до появления сиреневых полос.

1.5. Расшифровка электрофореграмм белков

В 1957 г. Хантер и Маркерт (Hunter, Markert, 1957), сочетая методы электрофоретического разделения белков и гистохимической окраски, установили, что один и тот же фермент может быть представлен в организме несколькими формами. Позднее варианты ферментов (белков), характеризующиеся сходной субстратной специфичностью, выполняющие одинаковые функции и кодируемые разными аллелями одного локуса, назвали **аллоферментами (аллоформами)**. Варианты ферментов (белков), выполняющие одинаковые функции и кодируемые разными локусами – **изоферментами (изоформами)**.

Разные зоны активности одного и того же фермента на электрофореграмме соответствуют разным локусам. Это изоферменты. Их обозначают по названию фермента и нумеруют в порядке уменьшения электрофоретической подвижности.

Затем устанавливают наличие полиморфизма. Если у всех изучаемых особей выборки присутствует одна одинаковая по подвижности фракция, locus мономорфный. Если выявлено более одной фракции, то это указывает на наличие изменчивости. Выявление на электрофореграммах «пустых» лунок у некоторых особей при наличии окрашенных пятен у других особей изучаемой выборки может быть признаком полиморфизма по 0-аллелю (нуль-аллелю). После установления факта изменчивости, устанавливают количество аллелей. В случае кодоминантных аллелей, на которые приходится подавляющая часть выявляемой белковой изменчивости, оно соответствует количеству фракций. Исключением являются белки, имеющие четвертичную структуру. Различные фракции в каждой из зон соответствуют аллелям данного локуса. Это аллоферменты. Их

обозначают, начиная с наиболее подвижной фракции. Существует два способа обозначения аллелей:

1) буквенный – для кодоминантных аллелей используются сокращения: F (от англ. fast) – быстрый, S (от англ. slow) – медленный, M (от англ. middle) – средний; для двухаллельной системы – F и S, для трехаллельной – F, S и M. Для четырехаллельной и более – заглавными буквами английского алфавита – A, B, C, D и т.д.; в случае полиморфизма по 0-аллелю, доминантный ген A, рецессивный 0-аллель, прописной буквой – a.

2) числовой – по относительной электрофоретической подвижности аллеля (ОЭП). Для определения ОЭП сначала измеряют длину пробега фракции на электрофореграмме от старта до локализации пятна. Это расстояние называется **абсолютной электрофоретической подвижностью (АЭП)**. Устанавливают АЭП для всех фракций. Затем АЭП самой распространенной фракции данного локуса принимают за 1. ОЭП других фракций рассчитывают относительно нее, при этом ОЭП более подвижных фракций принимает значения больше 1, а менее подвижных – меньше 1. Иногда значения ОЭП выражают в %.

Затем расшифровываются гомо- и гетерозиготные генотипы. Для кодоминантных аллелей одна полоса – гомозигота, две полосы – гетерозигота (рис. 3 а). Характер гетерозиготы зависит от структуры белка. В случае димерных белков, способных к формированию гетеродимеров, гетерозигота представлена тремя полосами (рис. 3 б), для тримерных 4 и более полосами, для тетрамерных 5 и более полосами (рис. 3 в). В случае 0-аллеля гомо- и гетерозиготные генотипы различают по интенсивности окрашивания. Отсутствие окрашивания соответствует гомозиготе по 0-аллелю, наиболее окрашенное пятно – другой гомозиготе, а промежуточная – гетерозиготе (рис. 3 г).

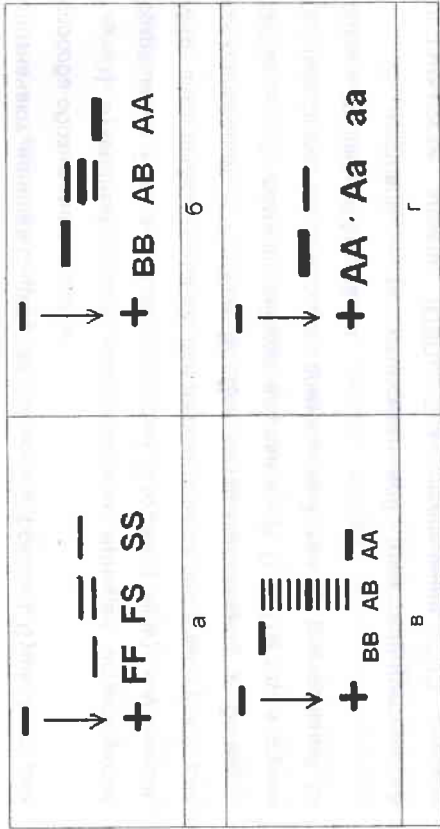


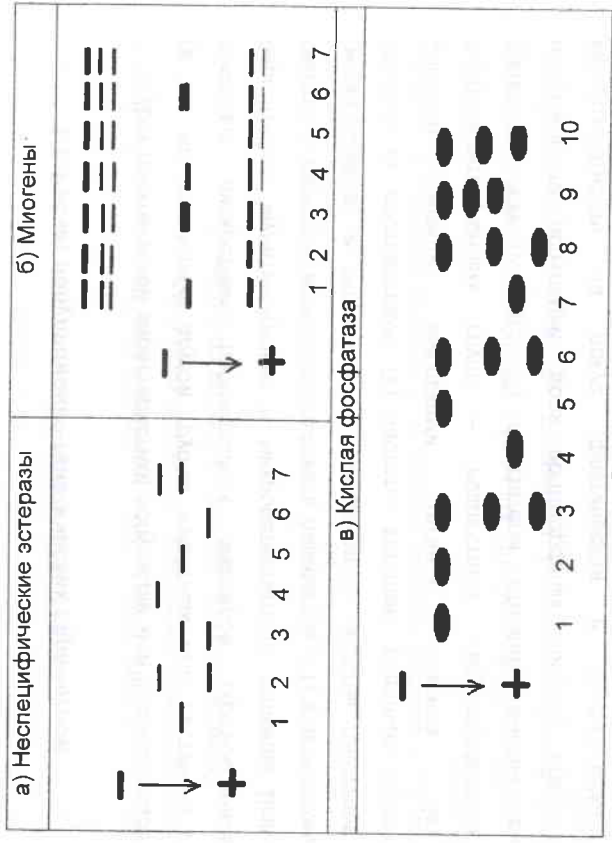
Рис. 3. Варианты электрофореграмм: а – полиморфизм по двум кодоминантным аллелям (F и S) мономерного белка, гетерозигота представлена двумя полосами; б – полиморфизм по двум кодоминантным аллелям (А и В) димерного белка, гетерозигота представлена тремя полосами; в – полиморфизм по двум аллелям (А и В) тетрамерного белка, гетерозигота представлена десятью полосами, г – полиморфизм по 0-аллелю, доминантная гомозигота – широкая полоса, гетерозигота – узкая полоса, рецессивная гомозигота – отсутствие полосы.

1.6. Задание для практической работы по теме «Расшифровка электрофореграмм белков»

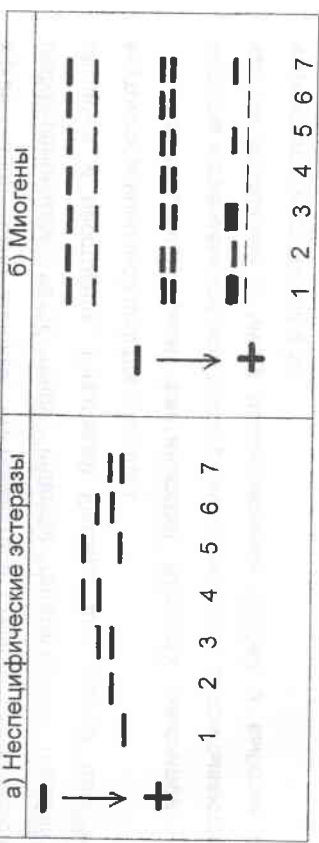
- По приведенным схемам электрофореграмм определите количество локусов, дайте им названия;
- Установите, какие локусы являются полиморфными, какие – мономорфными;

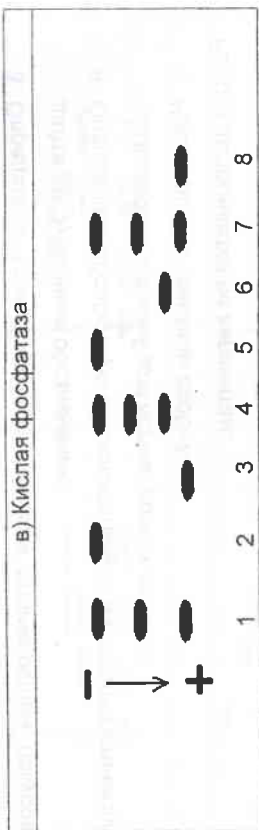
- Определите количество аллелей (для полиморфных локусов), дайте им буквенные обозначения;
 - Определите абсолютную и относительную электрофоретическую подвижность аллелей для полиморфных локусов;
 - Расшифруйте генотипы особей.
- Работа выполняется по вариантам.

Вариант 1



Вариант 2





1.7. Расчет популяционно-генетических параметров

Для генетической характеристики популяции или близких видов (а так же какой-либо другой группы животных или растений) с помощью дискретных полиморфных маркеров (хромосомные перестройки, мультилокусные и микросателлитные маркеры ДНК, белковые маркеры) можно использовать параметры: (1) фактические (наблюдаемые) и теоретические (ожидаемые) частоты генотипов, степень их соответствия; (2) частоты аллелей, различия частот аллелей между выборками разных сезонов, лет, внутрипопуляционных групп – возрастных, территориальных, фенотипических и т.д.; (3) показатели степени генетической изменчивости популяции: доля полиморфных локусов, средняя гетерозиготность на локус (фактическая и теоретическая), эффективное число аллелей; (4) показатели степени генетической дифференциации: поток генов, индексы генетического подобия, различия и расстояния, F-критерий Фишера для оценки меж- и внутрипопуляционной дифференциации.

Наблюдаемые (или фактические) частоты генотипов – частоты встречаемости носителей разных генотипов рассчитываются как их отношение к числу исследованных особей в выборке и выражаются в долях или в %:

$$f_i = n_i / n,$$

где f_i – фактическая частота генотипа, n_i – количество особей, носителей данного генотипа, n – объем выборки.

Частоты аллелей – частоты встречаемости аллельных вариантов в популяциях, рассчитываются по формуле:

$$p_i = (2 f_{гом} + f_{гет}) / 2n,$$

где p_i – частота гена i , $f_{гом}$ – частота гомозигот по гену i , $f_{гет}$ – частота гетерозигот по гену i , n – объем выборки.

Ошибка частоты аллеля находится по формуле:

$$S_{p_i} = \sqrt{\frac{p_i(1-p_i)}{2n}},$$

где S_{p_i} – ошибка частоты аллеля, p_i – частота аллеля i , n – объем выборки.

При сравнении частот аллелей в разных популяциях для оценки достоверности различий применяют критерий Стьюдента (Лакин, 1990).

Ожидаемые (теоретические) частоты генотипов (в случае диаллельной системы) рассчитываются исходя из равновесия Харди-Вайнберга:

$$(p)^2 + 2pq + (q)^2 = 1,$$

$$f_{aa} = (p)^2,$$

$$f_{bb} = (q)^2,$$

$$f_{ab} = 2pq,$$

где p – частота аллеля a , q – частота аллеля b , f_{aa} – ожидаемая частота генотипа aa , f_{bb} – ожидаемая частота генотипа bb , f_{ab} – ожидаемая частота гетерозиготного генотипа ab в популяции.

Следует отметить, что существует ряд условий соответствия частот генотипов в популяции равновесию Харди-Вайнберга (Клаг, Каммингс, 2007):

1. В популяции не действует отбор;
 2. Отсутствует мутационный процесс;
 3. Популяция изолирована; миграционные процессы отсутствуют;
 4. Численность популяции бесконечно велика;
 5. Особи в популяции скрещиваются случайным образом (популяция панмиктична).
- Фактически, так как любая реальная популяция не может удовлетворять требованиям равновесия Харди-Вайнберга, то в ней могут наблюдаться отклонения в частотах генотипов (выраженные в избытке, или, чаще, дефиците гетерозигот).

В случае, если число аллелей более двух, частоты аллелей и генотипов описываются более общей формулой:

$$(p+q+\dots+z)^2=1 \text{ или}$$

$$p^2+q^2+\dots+z^2+2pq+\dots+2qz+\dots=1,$$

где p, q, \dots, z – частоты рассматриваемых аллелей; p^2, q^2, \dots, z^2 – частоты соответствующих гомозигот; $2pq, \dots, 2pz, \dots, 2qz, \dots$ – частоты соответствующих гетерозигот.

Формулу можно представить в виде, близком к закономерности, введённой Харди и Вайнбергом:

$$(p+(q+\dots+z))^2=1 \text{ или}$$

$$p+2p(q+\dots+z)+(q+\dots+z)^2=1.$$

Проверка соответствия теоретических и фактических частот генотипов производится с использованием критерия χ^2 :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e},$$

где f_o – наблюдаемое, f_e – ожидаемое число образцов с определённым генотипом по данному локусу, j – число возможных генотипов. Найденное значение χ^2 сравнивается со стандартным значением χ^2 (Лакин, 1990) для данного числа степеней свободы k . В биологической статистике число степеней свободы – это минимальное число классов, для которых надо знать число (или долю) относящихся к ним по отдельности образцов (или результатов экспериментов), чтобы описать всю выборку. Как правило, число степеней свободы равно числу классов минус единица. То есть, в тесте на равновесие Харди-Вайнберга ожидается три класса генотипов, достаточно знать объём выборки и количество особей в 2-х классах, чтобы рассчитать количество особей в 3-м классе. Для двухаллельного локуса $k = 2$, $\chi^2_{\phi} = 5,99$ ($P < 0,05$).

Доля полиморфных локусов (P). Полиморфным называется локус, поддержание разнообразия по которому невозможно объяснить только мутированием при постоянной элиминации образующихся новых вариантов. В разных работах, связанных с описанием

полиморфизма, полиморфными считаются локусы, в которых или встречается более одного варианта, или же частота самого редкого варианта не менее 1 или 5 %. На оценку доли полиморфных локусов большое влияние оказывают ряд параметров, например, размер выборки (чем он больше, тем больше вероятность выявления полиморфных вариантов), количество и свойства исследованных локусов. Следовательно, для получения достоверных оценок доли полиморфных локусов требуется анализ довольно больших выборок (100-1000 особей) и изучение не менее 20 (лучше 40-50) локусов. Доля полиморфных локусов рассчитывается по формуле:

$$P = N_p / N,$$

где P – доля полиморфных локусов, N_p – количество полиморфных локусов, N – общее количество исследованных локусов.

Следует подчеркнуть, что доля полиморфных локусов не зависит от количества аллелей рассматриваемых локусов и их частот в популяции (если частоты позволяют попасть в выборку не менее чем двум аллельным вариантам локусов при частотах не менее порога признания их полиморфными). Доля полиморфных локусов, в биологическом отношении, зависит от функциональной нагрузки рассматриваемых локусов (локусы с высокой важностью для жизнедеятельности, как правило, малополиморфны или мономорфны); популяционно-генетические последствия дрейфа генов так же могут привести к потере генетического разнообразия.

Средняя гетерозиготность (H) – мера генетического разнообразия, связанная с соотношением частот полиморфных аллелей изучаемых локусов. Рассчитывается как среднее значение гетерозиготности по группе изучаемых локусов:

$$H = \sum f_{get} / N,$$

где H – средняя гетерозиготность, f_{get} – фактическая частота гетерозигот по каждому локусу, N – количество исследованных локусов.

Средняя гетерозиготность – более варибельная мера генетического разнообразия, чем доля полиморфных локусов, так как зависит не только от наличия/отсутствия полиморфизма, но и от частот аллелей в группах изучаемых образцов. Оценки средней гетерозиготности меньше зависят от объема выборки и количества изученных локусов. Для достоверной оценки средней гетерозиготности можно использовать меньшие (чем для оценки доли полиморфных локусов) по объему выборки (30-50 особей) и количество локусов не менее 4.

Помимо фактической гетерозиготности рассчитывают теоретическую, а также их соотношение по критерию χ^2 с целью обнаружения избытка или дефицита гетерозигот. Для сравнения гетерозиготности разных популяций рассчитывают ошибку гетерозиготности, как среднюю арифметическую гетерозиготностей отдельных локусов, и в этом случае применяют критерий Стьюдента (Лакин, 1990).

Эффективное число аллелей (n_e) – расчётное число аллелей, которые, при условии, что встречаются в популяции с равной частотой и при случайном скрещивании, дают такую же среднюю гетерозиготность, что и изучаемая популяция. Это величина, обратная доле гомозиготных локусов:

$$n_e = 1 / (1-H),$$

где n_e – эффективное число аллелей, H – средняя гетерозиготность.

Если $p_e = 1$, то $H = 0$, а если $p_e = 2$, то $H = 0,5$, то есть два аллеля встречаются с равной частотой, частоты гомозиготных генотипов равны 0,25 каждая, гетерозиготного – 0,5. Следует отметить, что p_e при изменении количества аллельных вариантов меняется сильнее, чем средняя гетерозиготность. Например, в популяции было 2 аллеля с частотами по 0,5, стало 4 аллеля с частотами по 0,25. При этом гетерозиготность увеличилась с 0,50 до 0,75 в 1,5 раза, а эффективное число аллелей с 2 до 4 – в 2 раза. Тем не менее, эффективное число аллелей однозначно связано со средней гетерозиготностью.

Поток генов (строго говоря, поток аллелей генов) – характеристика степени межпопуляционной дифференциации. Эта мера показывает, насколько интенсивно идёт обмен мигрантами (точнее – генетическим материалом) между популяциями. Измеряется в количестве мигрантов на поколение. Прямой метод оценки миграции связан с мечением особей в одной локальности и их поимкой в другой. Этот метод позволяет точно оценить интенсивность обмена мигрантами между географически близкими популяциями, однако он трудоёмок. Этот метод не применим в случае, когда прямой обмен генетическим материалом между популяциями невозможен в связи с тем, что мигранты гибнут в промежуточных локальностях, при этом всё же оставляют в этих локальностях потомство, которое может мигрировать далее.

Рассмотрим модель, поясняющую принципы непрямои оценки потока генов между популяциями. Пусть есть две популяции, изначально имеющих одинаковый набор аллелей рассматриваемых локусов. На эти популяции из всех микровозволюционных факторов действует только дрейф генов. Со временем, в этих популяциях гетерозиготность по всем аллелям станет равной нулю, так как под действием дрейфа генов часть аллелей исчезнет из популяций. В

разных популяциях фиксированными станут как одинаковые, так и разные аллели локусов. Если измерить генетическое расстояние или расхождение этих популяций с помощью какой-либо меры, то оно достигнет определённых (пределных) значений. В случае, если между популяциями всё же существует слабая миграция, степень дифференциации популяций будет меньше. По мере роста миграции, равновесное состояние популяций будет соответствовать всё меньшему их различию, как по присутствию/отсутствию аллелей, так и по их частотам. Существуют формулы, связывающие расхождение популяций по наличию или частотам аллелей и расчётные значения потока генов между ними. Ниже приводятся формулы, созданные для так называемой островной модели миграции и связывающие уровень миграции и расхождение популяций по частотам аллелей:

$$N_m = 0,5 (1 - G_{st}) / G_{st},$$

$$G_{st} = (H_T - H_S) / H_T,$$

где N_m – величина потока генов, G_{st} – межпопуляционная составляющая генетической изменчивости, H_T – средняя гетерозиготность для группы популяций при условии полной панмиксии между входящими в их состав особями, H_S – усреднённое значение средней гетерозиготности в отдельных популяциях (Slatkin, Barton, 1989).

Например, рассмотрим две популяции, в одной из которых фиксирован один аллель рассматриваемого гена ($p = 1, q = 0$), а во второй – другой аллель ($p = 0, q = 1$). Тогда при объединении выборки из этих популяций в одну (выборки должны быть одинакового объёма, или математическим путём вклад выборки должен быть выровнен) мы получим значение средней гетерозиготности $H_T = 0,5$. Учитывая, что в

каждой из популяций по-отдельности гетерозиготность равна нулю $H=2pq$, то усреднённое между популяциями значение средней гетерозиготности $H_S=(0+0)/2=0$. Подставив полученные значения в формулы получим:

$$G_{st} = (H_T - H_S) / H_T = (0,5 - 0) / 0,5 = 1$$

$$N_m = 0,5 (1 - G_{st}) / G_{st} = 0,5 (1 - 1) / 1 = 0$$

Другими словами – популяции изолированы. Следует помнить, что расчёты потока генов проводятся не по одному, как для упрощения показано в приведённом примере, а по серии локусов.

Считается, что если $N_m < 1$, то поток генов между популяциями отсутствует, популяции изолированы, а если $N_m > 4$, то поток генов значительный, рассматриваемые популяции ведут себя как единое панмиктическое сообщество. По мере увеличения сходства между популяциями, N_m стремится к бесконечности.

Следует иметь в виду, что поток генов, оцененный прямыми методами – величина расчётная, на различия между реальными и расчётными значениями этого параметра могут влиять множество факторов (например, относительно краткая история существования популяций, действие отбора на выбранные маркеры).

Индекс генетического сходства Нея (I) введён М. Неём (Nei, 1972) и показывает степень генетического сходства (родства) двух выборок (групп, популяций, видов, родов) по частотам аллелей; при расчёте учитываются частоты всех аллелей всех рассматриваемых локусов, в том числе, мономорфных:

$$I = \frac{\sum (x_{ij} y_{ij})}{\sqrt{\sum (x_{ij})^2 \sum (y_{ij})^2}}$$

где I – индекс генетического сходства Нея, x_{ij} и y_{ij} – частоты аллеля i локуса j в популяциях x и y .

Для изоферментных локусов, если I приближается к 1, это означает полное генетическое подобие. Как правило, это происходит, если выборки принадлежат единой популяции. Для разных популяций одного вида $I = 0,95-0,98$. Разным подвидам соответствует $I = 0,84-0,85$, разным видам одного рода – $0,55-0,60$, разным родам – $0,30$. Тем не менее, следует иметь в виду, что приведённые значения I являются не критерием соответствующего ранга сравниваемых групп, а усреднёнными значениями, характерными для групп сравниваемого ранга. Как самостоятельная мера, индекс генетического сходства используется редко, в основном его применяют в качестве промежуточной стадии расчёта генетического расстояния Нея.

Генетические расстояния показывают степень генетического различия групп или образцов. Существует несколько мер генетических расстояний, применимых для сравнения групп образцов. Одна из наиболее распространённых мер – это генетическое расстояние Нея, D_{Nei} (Nei, 1972) которое рассчитывается по формуле:

$$D_{Nei} = - \ln I,$$

где I – индекс генетического сходства Нея. Исходя из формулы расчёта I , можно сказать, что D_{Nei} описывает расхождение по частотам аллелей.

Другой мерой генетических расстояний, изначально разработанной для ДНК-маркеров RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – полиморфизм по длинам рестрикционных фрагментов), является мера **GD**, ориентированная не на частоты, а на наличие фракций ДНК (Link et al., 1995):

$$GD = \frac{N_x + N_y}{N_x + N_y + N_y}$$

где N_x – количество фракций ДНК, которые есть в популяции x , но отсутствуют в популяции y , N_y – количество фракций ДНК, которые есть в популяции y , но отсутствуют в популяции x , N_{xy} – количество общих фракций для популяций x и y .

Мера GD ориентирована на наличие/отсутствие фракций, но не связана с частотами выявленных фракций ДНК. Мера GD лучше, чем D_{Nei} , подходит для сравнения разных (близких) видов.

Значения мер генетических расстояний зависят от параметров сравниваемых групп образцов. Если рассматривается ряд выборов (более двух), то в оценку D_{Nei} вносят вклад те аллели, которые отсутствуют в паре сравниваемых выборов, но присутствуют, по крайней мере, в одной из остальных. По этим аллелям сравниваемые популяции идентичны, что уменьшает значение D_{Nei} по сравнению со случаем, когда рассматривается только две выборки. Этот эффект отсутствует только в том случае, если выбранные маркеры присутствуют во всех сравниваемых популяциях с такой частотой, при которой все аллели попадают в выборки. Изменение числа выборов не влияет на значение меры GD, так как в расчёт принимаются только те фракции ДНК, которые есть в паре сравниваемых выборов. Наличие в анализируемом материале «редких» фракций ДНК, которые могут по случайным причинам попасть или не попасть в выборки, влияет на значения GD. Например, если в каждой популяции из сравниваемой пары присутствует набор особей, несущий все возможные наборы электрофоретических фракций маркеров, хотя в выборку из первой популяции попали только особи с наиболее часто встречающимися фракциями, а во вторую (существенно большую) – особи, несущие весь набор фракций, – значение GD будет

некорректно оценено как отличное от нуля. Этот тип ошибки может быть несколько нивелирован, если все выборки, включённые в анализ, имеют одинаковый размер.

1.8. Задачи по теме «Расчет популяционно-генетических параметров»

1. У людей известно 3 генотипа по локусу фосфоглюкомутазы Pgm-1. В выборке 1110 человек. Определите фактические и ожидаемые частоты генотипов и аллелей.

Локус	Количество носителей генотипа		
	AA	AB	BB
Pgm-1	634	391	85

2. Гаптоглобины двух типов, присутствующие в сыворотке крови человека, определяются двумя аллелями одного локуса. Определите частоты этих двух аллелей, если среди обследованных 219 жителей Египта число обладателей разных генотипов было следующим:

Локус	Количество носителей генотипа		
	AA	AB	BB
Hr	9	135	75

3. При обследовании разных популяций человека по группам крови системы MN были получены следующие результаты. Оцените состояние генетической структуры каждой из популяций по этому генетическому маркеру, используя критерий χ^2 .

Популяции	Количество обладателей группы крови		
	M	MN	N
Аборигены Австралии	22	216	492
Эскимосы	475	89	5
Индийцы	83	46	11
Русские	195	215	79
Шведы	433	564	203
Китайцы	342	500	187
Японцы	356	519	225
Бельгийцы	896	1559	645
Англичане	121	200	101
Египтяне	140	245	117
Айны	90	253	161
Папуасы	14	48	138
Фиджийцы	22	89	89

4. У 23 шимпанзе (*Pan troglodytes*) и 10 горилл (*Gorilla gorilla*) исследовали 22 локуса, кодирующих белки крови. Все шимпанзе оказались гомозиготными по 21 локусу. По локусу фосфоглюкомутазы Pgm-1 6 особей были гетерозиготными (96/100), а 17 – гомозиготными (100/100). Все гориллы были гомозиготными по 19 локусам; по трем остальным локусам обнаружены следующие комбинации аллелей:

Локус	Количество носителей генотипа	
	98/98	98/100
Ak	0	4
Dia	4	5
G-Pgdh	0	3

Рассчитайте средние значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности по всем 22 локусам для шимпанзе и гориллы. Какая доля локусов у каждого вида полиморфна в соответствии с 95%-ым критерием? Рассчитайте среднее эффективное число аллелей для шимпанзе и гориллы.

5. Рассчитайте долю полиморфных локусов по 95%-ому и 99%-ому критериям.

№ п/п	Локус	Частоты аллелей					
		A	B	C	D	E	F
1	Acph 1	0,995	0,005	0	0	0	0
2	Acph 2	0,009	0,066	0,882	0,014	0,005	0,024
3	Adk 1	0,472	0,528	0	0	0	0
4	Est 1	0,008	0,992	0	0	0	0
5	Est 2	0,076	0,924	0	0	0	0
6	Est 3	0,483	0,396	0,122	0	0	0
7	Est 4	0,010	0,990	0	0	0	0
8	Est 5	0,010	0,979	0,012	0	0	0
9	Est 6	0,986	0,014	0	0	0	0
10	Est 7	0,005	0,995	0	0	0	0
11	Fum	0,040	0,915	0,017	0,011	0,011	0,006
12	A-Gpd	0,043	0,900	0,057	0	0	0
13	G-3pd-1	0,996	0,004	0	0	0	0
14	G-6pd	0,005	0,978	0,016	0	0	0
15	Hk 1	0,992	0,008	0	0	0	0
16	Hk 2	0,038	0,962	0	0	0	0
17	ldh	0,014	0,986	0	0	0	0
18	Lap 3	0,004	0,551	0,326	0,019	0	0
19	Lap 4	0,008	0,987	0,004	0	0	0
20	Lap 5	0,979	0,021	0	0	0	0
21	Mdh	0,017	0,824	0,159	0	0	0
22	Me2	0,992	0,008	0	0	0	0
23	Me 3	0,995	0,005	0	0	0	0
24	Odh 1	0,159	0,827	0,013	0	0	0
25	Pgi	0,038	0,824	0,071	0,017	0	0
26	Pgm 1	0,929	0,071	0	0	0	0
27	Pgm 3	0,008	0,004	0,962	0,013	0,013	0
28	Tri 1	0,127	0,384	0,511	0	0	0
29	Ldh 1	0,011	0,160	0,829	0	0	0
30	Ldh 2	0,990	0,005	0,005	0	0	0

6. Исследовали популяцию одного из видов хомячков по 27 локусам. Всего в анализ было вовлечено 145 особей. По двум локусам популяция оказалась полиморфной (см. табл.). Рассчитайте частоты аллелей, определите степень соответствия ожидаемых частот генотипов наблюдаемым.

Лocus	Количество носителей генотипа		
	FF	FS	SS
Es-1	45	100	0
Es-2	24	97	24

7. Исследовали популяцию анчоусов по 43 локусам. Всего в анализ было вовлечено 240 особей. По двум локусам популяция оказалась полиморфной. По локусу глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы G-6-pdh 128 особей оказались гомозиготными по аллелю A, остальные - гетерозиготы AB. По локусу каталазы Kat 98 особей - гомозиготы AA, 114 - гетерозиготы AB и 28 - гомозиготы BB. Рассчитайте частоты аллелей, степень соответствия ожидаемых частот генотипов наблюдаемым.

8. У 208 изученных особей *Drosophila melanogaster* из местности Пинион-Флет было выявлено 9 генотипов по локусу лейцинаминопептидазы (см. табл.). Рассчитайте частоты аллелей, степень соответствия наблюдаемых частот генотипов ожидаемым.

Количество обладателей генотипов						
AB	AC	AD	BC	BD	CD	AA BB CC
40	53	5	37	3	7	31 11 21

9. На протяжении 11 месяцев выборки из популяции *Drosophila pseudoobscura* анализировали в отношении генотипов по локусу гексокиназы Hk-1, полиморфному по четырем аллелям - 96, 100, 104 и 108. Рассчитайте частоты аллелей для каждой выборки. Определите с помощью критерия χ^2 , различаются ли достоверно наблюдаемые и ожидаемые частоты гетерозигот для суммарной годовой выборки.

Месяц	Количество обладателей генотипов							Всего
	96/100	100/104	100/108	100/100	104/104	104/100	104/104	
Январь	0	1	0	20	0	0	21	
Февраль	1	0	0	43	0	0	44	
Март	1	0	0	167	0	0	168	
Апрель	1	13	1	363	1	1	379	
Май	1	11	0	283	0	0	295	
Июнь	0	20	0	270	1	1	291	
Июль	0	13	1	257	0	0	271	
Август	1	5	0	309	0	0	315	
Сентябрь	0	3	0	144	0	0	147	
Октябрь	0	1	0	177	0	0	178	
Ноябрь	0	13	0	215	0	0	228	
Всего	5	80	2	2248	2	2	2337	

10. Для хромосомы III *Drosophila pseudoobscura* известно несколько вариантов последовательного расположения различных генов, возникших в результате наложения нескольких инверсий. В трех природных популяциях встречаются хромосомы четырех типов: ST, AR, SN и TL. Число различных генотипов в выборках было следующим (см. табл.). Рассчитайте частоты хромосом каждого

типа и ожидаемые частоту и число гетерозигот в каждой из трех популяций.

Популяция	Количество обладателей генотипов											
	ST/AR	ST/CH	ST/TL	AR/CH	AR/TL	CH/TL	ST/AR	ST/AR	CH/AR	CH/AR	TL/AR	TL/AR
	AR	CH	TL	TL	TL	TL	AR	AR	AR	AR	AR	AR
Кин-Кемп	53	66	3	48	3	6	3	11	11	44	264	264
Пинион-Флет	40	53	5	37	3	7	31	11	21	208	208	208
Каньон-Андреас	87	47	12	20	4	2	89	18	4	283	283	283

11. Методом последовательного электрофореза и тепловой денатурации исследовали три фермента в популяции хомячка *Peromyscus maniculatus*. При обычном электрофорезе были получены следующие частоты аллелей:

Локус	Частоты аллелей		
	A	B	C
Got-1	0,094	0,875	0,031
Mdh	0,969	0,031	
Est-1	0,063	0,500	0,375
			0,063

В локусах Got-1 и Mdh критических вариантов не обнаружено, а в локусе Est-1 выявлено два дополнительных варианта: вместо двух наиболее часто встречающихся аллелей в действительности аллелей оказалось четыре с частотами 0,375, 0,125, 0,188 и 0,188. Рассчитайте значения средней гетерозиготности и эффективного числа аллелей для локуса Est-1 и для всех трех локусов по исходным данным и после выявления новых аллелей.

БЛОК 2. ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ДНК В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ЖИВОТНЫХ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

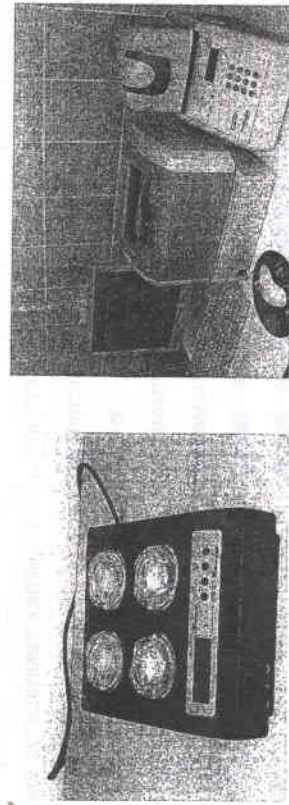
Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод амплификации *in vitro*, с помощью которого можно размножить определенную последовательность ДНК в миллионы раз. ПЦР была разработана американским ученым Кэрри Мюллисом в 1983 г. В 1993 г. за ее открытие К. Мюллис был удостоен Нобелевской премии в области химии. Изящность и простота исполнения, высокая чувствительность, специфичность и скорость получения результатов позволили стать ПЦР не только рутинным методом в научных лабораториях, но и широко используемым методом в практической сфере.

В основе ПЦР лежит способность ДНК-полимераз осуществлять точный матричный синтез ДНК по принципу комплементарности. В реакции используют два олигонуклеотидных праймера – затравки для работы ДНК-полимераз, фланкирующие интересующий участок ДНК, и комплементарные противоположным целям ДНК. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига олигонуклеотидов с комплементарными последовательностями ДНК и последующей достройки полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой - элонгации. Праймеры имеют такой состав, что при комплементарном взаимодействии с ДНК, оказываются ориентированными таким образом, что синтез с помощью полимеразы протекает только между ними. Поскольку матрицами для копирования в каждом цикле реакции являются как фрагменты, синтезированные в предыдущем цикле, так и матрицы, с которых они были копированы, в результате происходит экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента по формуле:

$$C = C_0 \cdot 2^{n-1}$$

где C – конечное количество копий амплифицированного продукта, C_0 – количество исходных матриц для синтеза n – число циклов амплификации (продукты нужного размера получают после второго цикла).

Процесс амплификации проводится в специальном программируемом термостате – **амплификаторе**, который позволяет создавать разный температурный режим для трех стадий ПЦР, циклически изменяя его по заданной временной программе (рис. 4 а). Существуют амплификаторы, в которых отжиг праймеров может происходить одновременно при разных температурах (в разных пробирках) – **градиентные амплификаторы**; а также приборы, позволяющие отслеживать и проводить количественное измерение фрагментов ДНК, синтезируемых в ПЦР по ходу процесса – **ПЦР-амплификаторы реального времени (Real-time PCR)** (рис. 4 б).



а б

Рис. 4. Амплификатор «Терцик» (ДНК-технология) (а) и амплификатор «Сhromo-4» (Bio-Rad) для проведения Real-time PCR (б)

Последние снабжены специальными оптическими модулями, позволяющими регистрировать флуоресценцию в пробирках с реакционной смесью. В этом случае при проведении ПЦР используются флуоресцентные красители, вводимые в состав олигонуклеотидов, или красители, избирательно связывающиеся с двухцепочечной ДНК.

Реакционная смесь для ПЦР включает термостабильную ДНК-полимеразу, буфер для ДНК-полимеразы, смесь четырех типов дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, два специфических праймера и исследуемый образец (табл.). Для проведения ПЦР используется высокоочищенная деионизированная стерильная вода.

В ПЦР используют ДНК-полимеразы, выделенные из термофильных бактерий, которые сохраняют свою активность после тепловой денатурации ДНК. Такие **термостабильные ДНК-полимеразы** имеют более высокий температурный оптимум работы (70-80°C). Наиболее широко используются **Taq-полимераза**, изначально выделенная из *Thermus aquaticus*, **Pfu-полимераза** – из *Pfurococcus furiosus*, **Pwo-полимераза** – из *Pfurococcus woesei*, **Tth-полимераза** – из *Thermus thermophilus*. Фактически, сейчас полимеразы получают не прямо из упомянутых выше видов, а из *E. coli*, содержащих искусственные плазмиды с генами, необходимыми для синтеза этих полимераз. ДНК-полимеразы катализируют удлинение цепей праймеров в направлении 5' → 3'. Каждому виду полимеразы соответствует свой буфер (или группа буферов). Один из **буферов для ПЦР** с использованием Taq-полимеразы (в однократной концентрации, то есть – в реакционной смеси) содержит 50 мМ KCl, 10 мМ Трис-HCl pH 8.4, 2 мМ MgCl₂ и 100 мкг/мл желатины. Ионы Mg²⁺ связываются с dNTP с образованием комплексов, являющихся субстратом для полимеразы. Концентрация MgCl₂ может варьировать в буфере от 1 до 5 мМ. Увеличение концентрации резко влияет на

эффективность ПЦР: увеличивается выход продуктов, но более высокими темпами уменьшается специфичность.

Таблица. Пример состава реакционной смеси для ПЦР

Компонент	Исходная концентрация	Концентрация в реакции	Объем из расчета на 100 мкл смеси
Буфер	X 10	X 1	10 мкл
MgCl ₂	20 мМ	2 мМ	10 мкл
dNTP	2 мМ каждого	100 мкМ	5 мкл
Прямой праймер	10 мкМ	0,2 мкМ	2 мкл
Обратный праймер	10 мкМ	0,2 мкМ	2 мкл
ДНК-полимераза	5 ед./мкл	2,5 ед.	0,5 мкл
ДНК-матрица	1 мкг	1 мкг	4 мкг
H ₂ O			до 100 мкл

Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP) четырех видов: dATP, dCTP, dTTP, dGTP, используются в равной концентрации (как правило, исходный для постановки ПЦР раствор содержит по 2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата), поскольку несбалансированность в их соотношении может приводить к ошибочному включению нуклеотидов в ходе синтеза ДНК.

Праймеры – синтетические олигонуклеотиды, обычно имеющие длину 10-30 и более нуклеотидных остатков. При подборе праймеров учитывают следующие их характеристики: температура плавления, специфичность, комплементарность последовательностей праймеров, содержание гуанина и цитозина, протяженных полипуриновых и полипиримидиновых последовательностей; последовательность на 3'-

конце. Точная температура плавления праймера рассчитывается при помощи компьютерных программ по формуле:

$$T_{\text{пл праймера}} [^{\circ}\text{C}] = \Delta H [\Delta S + R \ln (c/4)] - 273,15 + 16,6 \log 10 [K^{\circ}],$$

где H – энтальпия, S – энтропия образования шпильки, R – молярная газовая константа, c – концентрация праймера. Для приблизительного расчета температуры плавления праймера можно использовать **правило Уоллеса**, сводящееся к следующей формуле:

$$T_{\text{пл праймера}} [^{\circ}\text{C}] = 2(A + T) + 4(G + C),$$

где A, T, C, G – количество остатков аденозина, тимина, цитозина и гуанина в праймере длиной 18-24 нуклеотида. Обычно при проведении ПЦР температуру отжига праймеров задают на 1-5 °С ниже значения температуры плавления более «легкоплавкого» олигонуклеотида.

Требования к подбору пары праймеров:

- температуры плавления обоих праймеров должны быть приблизительно равны. Если праймеры будут сильно отличаться по T_{пл}, тогда праймер с более высокой T_{пл} будет отжигаться с неспецифическими участками ДНК. Это приведет к появлению неспецифических продуктов реакции или понижению выхода продукта;
- оптимальным для температуры отжига большинства праймеров является интервал 50-65 °С;
- на **специфичность** реакции существенно влияет длина праймера: чем больше длина, тем выше специфичность. В большинстве случаев, желательнее, чтобы последовательность праймера имела минимум сайтов посадки на ДНК-матрице;

- отсутствие комплементарности как между двумя используемыми в реакции праймерами, так и самокомплементарности одного из праймеров, в противном случае олигонуклеотиды будут ассоциировать с образованием димеров или частично двухцепочечных участков;

- необходимо выбирать праймеры с содержанием гуанина и цитозина (G и C) около 50 % и случайным распределением оснований. Следует избегать использования праймеров с протяженными полипуриновыми (A, G) и полипиримидиновыми (T, C) участками. Наличие поли-G или поли-C последовательностей способствует неспецифическому отжигу, присутствие поли-A и поли-T – снижению эффективности амплификации за счет ослабления комплекса праймер-матрица; - желательно, чтобы праймер заканчивался остатком C, G или GC на 3'-конце. Это способствует более прочному связыванию праймера;

- последние три нуклеотида на 3'-конце праймера должны быть строго комплементарны матричной ДНК.

Матрицами для ПЦР являются как двухцепочечные (до начала ПЦР), так и одноцепочечные молекулы ДНК. Кроме того, в качестве матрицы может быть использована РНК, с которой обычно сначала путем обратной транскрипции получают кДНК, или реакцию проводят без этого предварительного этапа, но используют Tth-полимеразу, обладающую ревертазной активностью в присутствии ионов Mn^{2+} вместо ионов Mg^{2+} .

В стандартной ПЦР выделяют три этапа: денатурацию матрицы, отжиг праймеров и элонгацию цепи. Количество циклов обычно составляет 25-35. Увеличение числа циклов может приводить к отрицательным последствиям – синтезу более длинных продуктов, отношению праймеров и дезоксинуклеозидтрифосфатов, частичной инактивации фермента. Основным циклам предшествует этап денатурации образцов при 93-95 °С в течение 3-10 минут для полной

диссоциации двухцепочечной ДНК в одноцепочечную. В основных циклах денатурация проводится при температуре 94 °С в течение 20-30 секунд, отжиг праймеров – в течение 15-40 секунд при температуре, соответствующей составу праймера, элонгацию – при 72 °С (температура оптимальной работы термостабильной полимеразы) в течение времени, необходимого для синтеза участка ожидаемой длины. Время рассчитывают, исходя из скорости синтеза используемой ДНК-полимеразы. Для Taq-полимеразы скорость синтеза составляет 24 нукл./сек. при 55 °С. После завершения основных циклов вводится дополнительная инкубация образцов при 72 °С в течение 3-7 минут, необходимая для завершения сборки всех фрагментов ДНК в реакции.

Продукты реакции анализируют методом электрофореза в гелях. Использование технологии Real-time PCR позволяет получать результаты по ходу реакции, избегая этапа электрофореза, что значительно сокращает время анализа и повышает точность результатов.

В настоящее время метод ПЦР успешно используется при клонировании геномных последовательностей, секвенировании ДНК, генотипировании, диагностике рецессивных наследственных заболеваний, выявлении вирусных и бактериальных патогенов, исследовании ископаемых остатков живых организмов, проведении «молекулярной дактилоскопии» в судебной практике, биологическом контроле трансгенных животных и растений. В популяционной генетике ПЦР используется так же для изучения полиморфизма ДНК с использованием методов мультилокусных маркеров.

Методы мультилокусных маркеров ДНК – это методы, связанные с описанием разнообразия множества случайных участков генома, и которые основаны на выделении множества фрагментов ДНК, фланкированных одинаковыми последовательностями, с

последующим разделением полученных фрагментов электрофорезом. Функция этих участков неизвестна, поэтому маркеры этого типа иногда называют анонимными.

Особенности мультилокусных маркеров:

1. Нет необходимости иметь какие-либо предварительные знания о геномах изучаемых организмов;
2. Полученные данные для каждой особи характеризуют геном в целом, не описывая изменчивость какого-либо определённого известного участка;
3. Маркеры носят доминантный характер, только 10-15% кодоминанты; Отсутствие полосы на электрофореграмме рассматривается как рецессивная гомозигота, наличие – как доминантная гомозигота или гетерозигота;
4. Низкая воспроизводимость ряда методов (RFLP, RAPD, в меньшей степени - ISSR).

Основные методы мультилокусных маркеров делятся на две группы:

1. Методы, основанные на ПЦР: **RAPD-PCR** – Random Amplified Polymorphic DNA PCR (случайно амплифицированная полиморфная ДНК); **ISSR-PCR** – Inter Simple Sequence Repeat PCR (ПЦР на последовательности, ограниченные простыми повторами); **IRAP-PCR** – Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism PCR – ПЦР на последовательности, ограниченные ретротранспозонами (Williams et al., 1990; Ziejewicz et al., 1994).

2. Методы, основанные на рестрикционном переваривании: **RFLP** – Restriction Fragment Length Polymorphism (= ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов); **AFLP** – Amplification Fragment Length Polymorphism – полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (Zabeau, Vos, 1993).

Принцип методов, основанных на ПЦР – проведение полимеразной цепной реакции с одним праймером, имеющим множество сайтов посадки в геноме. При этом получается набор фрагментов разной длины – от 300 до 2,5 тыс. п.н. При RAPD-PCR используются короткие праймеры, со случайной последовательностью и длиной 10-15 нуклеотидов. При ISSR-PCR используются праймеры, фланкирующие концевые участки микросателлитных локусов, и состоящие из простых повторов и одного или нескольких оснований для «заякоривания» на конце микросателлитного блока; примером праймера для ISSR является олигонуклеотид состава (AG)₈C. При IRAP-PCR используются праймеры к участкам, фланкирующим ретротранспозоны.

При применении RFLP разрезают ДНК одной или несколькими рестриктазами, затем проводят электрофорез продуктов. Визуализация продуктов рестрикции в геле связана с окрашиванием геля бромистым этидием или другими веществами; применяется также визуализация с помощью радиоактивной метки. Метод RFLP – первый из разработанных методов мультилокусных маркеров и в настоящее время используется относительно мало. Один из вариантов RFLP – таксопринт – метод, используемый для разделения близких видов по повторённым последовательностям. При методе AFLP ДНК обрабатывают рестриктазой или их смесью, клонируют продукты в плазмиды, затем проводят ПЦР с праймером следующего состава: последовательность, комплементарная полилинкеру плазмиды + сайт рестрикции + ещё несколько нуклеотидов (для уменьшения числа продуктов) и, наконец, электрофорез продуктов амплификации.

2.1. Практические задания по теме «Принципы подбора праймеров»

1. Рассчитайте температуру плавления праймеров, используя правило Уоллеса.
 2. Возможно ли их использование в одной реакции с учетом предъявляемых к подбору пар праймеров требований?
 3. Какие проблемы могут возникнуть при совместном использовании этих праймеров.
 4. Посоветуйте температуру отжига праймеров при проведении ПЦР с их использованием.
- Задания выполняются по вариантам.

Вариант 1

5'-ACCGGATTGGGGCGGCTAT-3'

3'-ATCTAGGGCTAGTCACGATC-5'

Вариант 2

5'-ATTGGAGTACCGGCTAT-3'

3'-ATCTAGGGCGGCTACTGATC-5'

Вариант 3

5'-CTAGTCACACCGGCTATTCT-3'

3'-ATCTAGCGGCTAGGGGGAC-5'

Вариант 4

5'-TCAGGATCGGCGCTATATCT-3'

3'-AGGGCTACCGGCTATTGAGC-5'

2.2. Приготовление растворов и буферных смесей для ПЦР

Экстрагирующий буфер для выделения ДНК методом щелочного лизиса

- 5 M NaCl – 200 мкл
- сахароза – 0,68 г
- трис – 0,12 г
- 0,5 M ЭДТА (pH=8,0) – 1 мл
- диэтилпиноксикарбонат (DEPC) – 50 мкл
- 10 % SDS – 0,5 мл (добавлять в последнюю очередь)
- H₂O дистиллированная – до 10 мл

0,5 M ЭДТА (pH=8,0)

- ЭДТА – 18,6 г
- NaOH – 2 г
- H₂O дистиллированная – до 100 мл

5 M NaCl

- NaCl – 29,75 г
- H₂O дистиллированная – до 100 мл

5 M/3M ацетат калия

- ацетат калия – 14,7 г
- ледяная уксусная кислота – 5,75 мл
- H₂O дистиллированная – до 50 мл

5 M хлорид лития

- LiCl* H₂O – 3,02 г
- H₂O дистиллированная – до 10 мл

x1 TE буфер (pH=8,0)

10мМ Трис-HCl буфер – 2 мл
1мМ ЭДТА – 0,4 мл
H₂O дистиллированная – до 200 мл

x1 TBE буфер

трис – 10,78 г
борная кислота – 5,5 г
ЭДТА (pH=8,0) – 4 мл (4,38 г)
H₂O дистиллированная – до 1000 мл

1% раствор агарозы

агароза – 1 г
0,5 TBE буфер – до 100 мл
этидиум бромид – 0,01 мл (вносить после нагревания)

x5 буфер для внесения образцов в гель

0,1 % бромфеноловый синий – 250 мкл
глицерин - 0,5 г
H₂O дистиллированная – 1 мл

2.3. Выделение ДНК методом щелочного лизиса

Получение и очистка нуклеиновых кислот из разных биологических образцов является необходимым предварительным этапом. Методики их выделения сильно варьируют в зависимости от источника. Так как ПЦР является очень чувствительным методом, в качестве источника генетического материала можно использовать не только биопсийный материал, кровь, срезы кожи и других тканей, мазки, сыворотку, но и пот, волосы, ногти, образцы почв, воду, смывы

с поверхностей. Образцы могут быть как свежие, так и фиксированные в 70 % этаноле. Образцы хранят при температуре – 20 °С или ниже (- 40 °С, в жидком азоте) в зависимости от срока хранения. Общий принцип всех методов выделения ДНК заключается в следующем. Структура образца разрушается и ДНК выходит из остатков образца в раствор. Затем с помощью добавления в раствор новых компонентов происходит химическое разрушение или удаление других веществ, перешедших из образца в раствор. В результате, получается раствор (или осадок), содержащий ДНК и некоторое количество сложноотделяемых и не мешающих работе с ДНК примесей (в основном, это углеводы и РНК).

2.3.1. Выделение ДНК из тканей беспозвоночных животных

1. Поместить образец в пробирку Эппендорфа, залить 200 мкл экстрагирующего буфера, растереть пестиком;
2. Инкубировать в микротермостате при 65 °С в течение 30 мин.;
3. Прилить 300 мкл 5М/3М раствора ацетата калия, перемешать, переворачивая пробирку, 15 раз;
4. Инкубировать на льду в течение 30 мин.;
5. Перемешать на шейкере;
6. Центрифугировать 10 мин. при 13 000 об./мин.;
7. Перенести супернатант в новую пробирку Эппендорфа;
8. Прилить 500 мкл 96 % этанола, перемешать на шейкере;
9. Выдержать при комнатной температуре 5 мин.;
10. Центрифугировать 10 мин. при 13 000 об./мин.;
11. Удалить супернатант пипеткой;
12. К осадку прилить 500 мкл 70 % этанола, перемешать на шейкере;
13. Выдержать при комнатной температуре 2-5 мин.;

14. Центрифугировать 2-3 мин. при 13 000 об./ мин.;
15. Удалить супернатант пипеткой;
16. Подсушить осадок при комнатной температуре или в микротермостате 20 мин. с открытой крышкой;
17. Прилить 50 мкл деионизированной стерильной воды;
18. Оставить на сутки при +4 °С (в холодильнике).

2.3.2. Выделение ДНК из фиксированных тканей позвоночных животных

1. Образец ткани, фиксированный 70 % этанолом, просушить на фильтровальной бумаге;
2. Растереть ткань в ступке с 200-600 мкл экстрагирующего буфера, перелить в пробирку Эппендорфа, встряхнуть на шейкере;
3. Инкубировать в микротермостате при 65 °С в течение 30 минут, через каждые 10 минут встряхивая на шейкере;
4. Прилить 450 мкл 5М/3М раствора ацетата калия, перемешать, переворачивая пробирку, 15 раз;
5. Инкубировать на льду в течение 30 мин.;
6. Перемешать на шейкере;
7. Центрифугировать 10 мин. при 13 000 об./ мин.;
8. Перенести супернатант в новую пробирку Эппендорфа;
9. Прилить 750 мкл 96 % этанола, перемешать на шейкере;
10. Выдержать при комнатной температуре 5 мин.;
11. Центрифугировать 10 мин. при 13 000 об./ мин.;
12. Удалить супернатант пипеткой;
13. К осадку прилить 200 мкл 5М хлорида лития, перемешать на шейкере;
14. Выдержать при +4 °С (в холодильнике) в течение 30 минут;
15. Центрифугировать 10 мин. при 13 000 об./ мин.;

16. Отобратить супернатант в новую пробирку (ДНК находится в растворе);
17. К супернатанту прилить 400 мкл 96 % этанола, перемешать на шейкере;
18. Выдержать при комнатной температуре 5 мин.;
19. Центрифугировать 10 мин. при 13 000 об./ мин.;
20. Удалить супернатант пипеткой;
21. К осадку прилить 500 мкл 70 % этанола, перемешать на шейкере;
22. Выдержать при комнатной температуре 2-5 мин.;
23. Центрифугировать 2-3 мин. при 13 000 об./ мин.;
24. Полностью удалить супернатант пипеткой;
25. Подсушить осадок при комнатной температуре или в микротермостате 20 мин. с открытой крышкой;
26. Прилить 50 мкл деионизированной стерильной воды;
27. Оставить на сутки при +4 °С (в холодильнике).

2.4. Оценка качества выделения ДНК методом электрофореза в агарозном геле

Электрофорез в агарозном геле – один из основных методов, применяемых при работе с ДНК. Электрофорез используется для приблизительной оценки количества (качества) выделенной ДНК, разделения продуктов ПЦР и рестрикции. Концентрация агарозы в геле может варьировать от 0,3 до 4 % (чаще применяются концентрации гелей от 1 до 2%). Гели с концентрацией менее 0,8-0,9% легко разрушаются под собственной тяжестью (для придания жёсткости в основание такого геля заливают слой 1,5-2% агарозы). Разрешающая способность геля определяется его концентрацией и напряжённостью поля. Чем ниже концентрация геля, тем меньше он

оказывает сопротивление движению и разделению, в первую очередь, крупных молекул. Поэтому, высокая разрешающая способность для коротких фрагментов ДНК (сотни п.н.) достигается электрофорезом в относительно концентрированном (1,5-2%) геле, а разделение высокомолекулярных фрагментов (тысячи п.н.) – в 1%-м геле.

Чем выше напряжённость поля (измеряется в Вольтах на сантиметр), тем быстрее идёт электрофорез, но меньше разрешающая способность геля. Для электрофореза в агарозном геле обычно используют напряжённость поля в интервале 2-4 (максимум – до 6) В/см. Для камеры длиной 30 см напряжение должно составлять 60-120 В.

Для выявления ДНК в геле, в него добавляют бромид этидия или другие вещества, избирательно связывающиеся с ДНК. Оценка длин фрагментов изучаемой ДНК при электрофорезе осуществляется с помощью маркеров молекулярных масс ДНК с известным числом нуклеотидов соответствующих выявляемым фракция ДНК. Так как размер фрагментов, визуализируемых при электрофорезе продуктов выделения ДНК составляет около 20 т.п.н., то для оценки качества выделения, применяется 1% гель и маркеры молекулярных масс с фрагментами ДНК большого размера (около 15-25 т.п.н.), например, маркер молекулярных масс *λHindIII*.

Приготовление 1 % агарозного геля

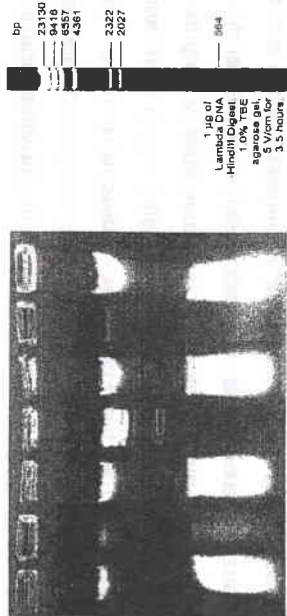
1. Приготовить навеску 1г агарозы на 100 мл 0,5 ТБЕ буфера;
2. Накрывать колбу крышкой из фольги;
3. Нагреть, постоянно помешивая, до кипения (пока раствор не станет прозрачным);
4. Остудить при комнатной температуре до 45 °С;
5. Добавить этидиум бромид в количестве 10^{-4} от объема геля;

6. Залить в предварительно собранную камеру для горизонтального электрофореза;

7. Оставить при комнатной температуре на 15 минут для полимеризации геля и еще на 30 минут при +4 °С (в холодоильнике);
8. Вынуть гребенки, увлажнив гель небольшим количеством буфера;
9. Перед проведением электрофореза выдержать в электродном буфере для выравнивания концентраций ионов в течение 30 минут.

Внесение проб в слоты геля и проведение электрофореза

1. Внести в лунки планшеты буфер для внесения образцов в гель в количестве 5 мкл по количеству образцов, а также для маркера молекулярных масс ДНК;
2. Добавить в каждую лунку образец ДНК в количестве 5 мкл; в одну из лунок внести маркер молекулярных масс ДНК *λHindIII* в количестве 1 мкл;
3. Внести образцы в слоты геля;
4. Подключить прибор. Электрофорез проводить при силе тока не более 100 мА, задав напряжение электрического поля в зависимости от длины гелевой пластины из расчета 4-6 В/см, наблюдая за продвижением метки (45 минут);
5. По окончании электрофореза отключить прибор, перенести гель на столик трансиллюминатора, зафиксировать наличие светящихся фракций, их размер, четкость, интенсивность свечения, которые указывают на качество и количество выделенной ДНК (рис. 5).



1 2 3 4 5 6 7 4

Рис. 5. Электрофореграмма тотальной ДНК дрозофилы: 1-3, 5-7 – особи, 4 – маркер молекулярных масс *HindIII*. Полоска на уровне около 20 т.п.н. – ДНК, относительно низкомолекулярная светящаяся область – РНК.

2.5. Определение концентрации и степени очистки препарата нуклеиновых кислот спектрофотометрическим методом

Для определения концентрации нуклеиновых кислот и степени очистки препарата ДНК от белков используют спектрофотометрический метод. Измерение концентрации нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) производят при длине волны 260 нм.

2.5.1. Измерение концентрации нуклеиновых кислот спектрофотометрическим методом

1. Развести препарат выделенной тотальной ДНК в 20 раз: 5 мкл препарата, 95 мкл деионизированной воды;

2. В спектрофотометрическую кювету на 100 мкл залить 100 мкл деионизированной воды, использовать в качестве контроля (blank);
3. Включить спектрофотометр;
4. Вставить кювету в спектрофотометр, соблюдая ориентацию;
5. Выбрать тип нуклеиновой кислоты: опции «DNA, RNA», «dsDNA (двухцепочечная ДНК), «enter»;
6. Измерить поглощение контроля: после появления на табло надписи «Ready to read absorbance» выбрать опцию «Read blank»;
7. Заменить в кювете контроль на образец (sample);
8. Вставить кювету в спектрофотометр, соблюдая ориентацию;
9. Измерить поглощение образца: после появления на табло надписи «Ready to read absorbance» выбрать опцию «Read sample»;
10. Записать показания прибора: оптические единицы и концентрацию;
11. Рассчитать концентрацию нуклеиновых кислот в препарате с учетом разведения.

2.5.2. Измерение концентрации белков по Бредфорду

1. Развести препарат ДНК в 20 раз: 5 мкл препарата, 95 мкл деионизированной воды;
2. Приготовить по 100 мкл стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина (BSA) путем разведения исходных в 10 раз: 10 мкл стандарта, 90 мкл деионизированной воды;
3. Добавить к растворам стандартов и препарату по 100 мкл реактива Бредфорда;
4. Выдержать в течение 5 минут при комнатной температуре;

5. В спектрофотометрическую кювету на 100 мкл залить 100 мкл деионизированной воды, использовать в качестве контроля (blank);
6. Включить спектрофотометр;
7. Вставить кювету в спектрофотометр, соблюдая ориентацию;
8. Построить калибровочную кривую для измерения концентрации белков: опции «Protein», «Bradford», «enter», «To make a new standard curve», «enter»;
9. Ввести количество повторностей: опции «1-3», «enter»;
10. Измерить поглощение контроля: после появления на табло надписи «Ready to read absorbance» выбрать опцию «Read blank»;
11. Ввести количество стандартов: опции «1-9», «enter»;
12. Выбрать единицы измерения концентрации: «mg/ml», «enter»;
13. Ввести концентрацию стандарта (начиная с наименьшей концентрации);
14. Заменить в кювете контроль на стандарт наименьшей концентрации (standard);
15. Измерить поглощение стандарта: после появления на табло надписи «Ready to read absorbance» выбрать опцию «Read sample»;
16. Повторить пункты 13-15 для всех концентраций стандартных растворов по нарастающей;
17. Сохранить стандартную кривую: опции «Save standard curve», «enter»;
18. Тщательно прополоскать кювету деионизированной водой, заменить в кювете стандарт на образец (sample);
19. Измерить поглощение образца: опция «Read sample»;
20. Записать показания прибора: оптические единицы и концентрацию;
21. Повторить пункты 18-20 по количеству образцов;

22. Рассчитать концентрацию белков в препарате с учетом разведения.

2.6. Постановка ПЦР

1. Включить ламинарный шкаф для стерилизации;
2. Простерилизовать руки, перчатки, пипетки, стол 70 % спиртом;
3. Расплавить реактивы и образцы ДНК при комнатной температуре, размешать на шейкере;
4. Поставить реактивы и образцы ДНК на лед;
5. Рассчитать объем реактивов на реакцию, исходя из количества образцов;
6. В ламинарном шкафу приготовить мастер-микс, смешав все реактивы в одной пробирке, за исключением образцов матрицы.

Реактивы смешиваются в последовательности:

H₂O (стерильная деионизированная для ПЦР)

Буфер

MgCl₂

dNTP

праймеры

ДНК-полимераза

7. Разлить мастер-микс по пробиркам в количестве 24 мкл;
8. В контрольную пробирку внести 1 мкл H₂O (специальной для ПЦР);
9. Внести образцы ДНК по 1 мкл в каждую пробирку;
10. Смешать на шейкере, затем в течение нескольких секунд центрифугировать на микроцентрифуге;
11. Наслить 20 мкл стерильного минерального масла (если требуется);

12. Поставить в амплификатор, подобрать соответствующий температурный режим;

13. По окончании ПЦР (через 2,5-3,5 часа) пробирки с продуктами ПЦР поставить в холодильник при -20 °С для последующего хранения или использовать для дальнейшего анализа.

ПЦР-протокол для ISSR-PCR

H₂O (специальная для ПЦР) – 16,25 мкл

X10 ПЦР-буфер – 2,5 мкл

25 мМ MgCl₂ – 1,5 мкл

8 мМ dNTP – 2,5 мкл

25 мМ праймер – 1 мкл

5 ед/мкл ДНК-полимераза – 0,25 мкл

Температурный режим для ISSR-PCR

104° С

94° С – 7 минут

94° С – 30 секунд

52° С (56° С) – 45 секунд

72° С – 2 минуты

72° С – 7 минут

2.7. Анализ продуктов амплификации методом электрофореза

Для анализа продуктов амплификации в зависимости от ожидаемой длины фрагментов ДНК используют гели разной концентрации, как правило, большей, чем при анализе тотальной ДНК. Размер продуктов, ожидаемых при RAPD-PCR или ISSR-PCR находится в интервале от 200 до 3000 п.н., при этом большое

значение имеет высокая разрешающая способность геля. Поэтому, для получения электрофореграмм продуктов ISSR-PCR подходит использование 2% агарозного геля.

Приготовление 2 % агарозного геля

1. Приготовить навеску 2 г агарозы в 100 мл X0,5 TBE буфера;
2. Накрыть колбу крышкой из фольги;
3. Нагреть, постоянно помешивая, до кипения (пока раствор не станет прозрачным);
4. Остудить при комнатной температуре до 45 °С;
5. Добавить этидиум бромид в количестве 10⁻⁴ от объема геля;
6. Залить в предварительно собранную камеру для горизонтального электрофореза;
7. Оставить при комнатной температуре на 15 минут для полимеризации геля и еще на 30 минут при +4 °С (в холодильнике);
8. Вынуть гребенки, увлажнив гель небольшим количеством буфера;
9. Перед проведением электрофореза выдержать в электродном буфере для выравнивания концентраций ионов в течение 30 минут.

Внесение проб в слоты геля и проведение электрофореза

1. Внести в лунки планшеты буфер для внесения образцов в гель в количестве 5 мкл по количеству образцов, а также для контроля и маркера молекулярных масс ДНК;
2. Добавить в каждую лунку образец амплифицированной ДНК в количестве 12 мкл; в контрольную лунку внести 12 мкл H₂O; в одну

из лунок внести маркер молекулярных масс ДНК 100 bp в количестве 1 мкл;

3. Внести образцы в слоты геля;
4. Подключить прибор. Электрофорез проводить при силе тока не более 100 мА, задав напряжение электрического поля в зависимости от длины гелевой пластины из расчета 4 В/см, наблюдая за продвижением метки (около 1 часа);
5. По окончании электрофореза (метка находится на расстоянии около 1,5 см от края гелевой пластины) отключить прибор, перенести гель на столик трансиллюминатора, сфотографировать электрофореграмму (рис. 6).

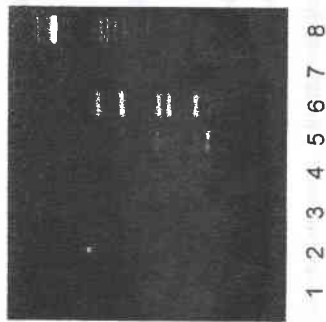


Рис. 6. Электрофореграмма ISSR-PCR-продуктов цестод – паразитов грызунов: 1- контроль, 2-7 – особи, 8 – маркеры молекулярных масс 100 bp + λ HindIII.

2.8. Расшифровка и анализ электрофореграмм ПЦР-продуктов

1. Перенести изображение электрофореграммы на компьютер;

2. Открыть изображение в компьютерной программе «Photoshop», обработать изображение, используя опции «Grey scale», «Brightness/Contrast», добиваясь наилучшего результата (рис. 7).

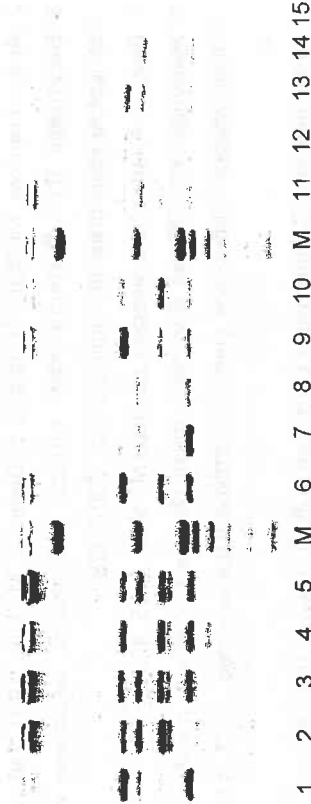


Рис. 7. Электрофореграмма продуктов ISSR-PCR (полученных с помощью праймера состава (AG)_nG) *D. melanogaster*. 1-14 – особи, M – маркеры молекулярных масс 100 bp+1,5kb и λ HindIII, 15 – отрицательный контроль.

3. Подсчитать минимальное, максимальное и среднее количество фрагментов ДНК на дорожку;
4. Определить длины фрагментов ДНК, ориентируясь на расположение маркерных полос на электрофореграмме;
5. Расшифровать электрофореграмму, переводя графические данные в данные типа «1/0», при этом «1» обозначает наличие полосы в определенном локусе, «0» – ее отсутствие (рецессивная гомозигота);
6. Рассчитайте долю полиморфных локусов, генетическое расстояние GD между выборками 1 (№№ 1-5) и 2 (№№ 6-15).

Список литературы

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях: Учебное пособие. М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. 431 с.
2. Анализ генома. Методы. / Под ред. К. Дейвиса. М.: Мир, 1990. 246 с.
3. Васильева Л.А. Статистические методы в биологии, медицине и сельском хозяйстве. М.: Новосибирск, 2007. 128 с.
4. Вейр Б. Анализ генетических данных. М.: Мир, 1995. 400 с.
5. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика, Учебное пособие. Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. 479 с.
6. Кирличников В.С. Генетика и селекция рыб. Л.: Наука, 1987. 520 с.
7. Клаг У., Каммингс М. Основы генетики. М.: Техносфера, 2007. 896 с.
8. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 278 с.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
10. Маурер Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в ПААГ. М.: Мир, 1971. 243 с.
11. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1981.
12. Пудовкин А.И. Использование аллозимных данных для оценки генетического сходства // Биохимическая и популяционная генетика рыб. Л.: Инст-т цитол. АН СССР, 1979. С. 10-17.
13. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985. 272 с.
14. Хедрик Ф. Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 592 с.
15. Nei M. The genetic distance between populations // Amer. Natur. 1972. V. 106. P. 283-291.
16. Slatkin M., Barton N.H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow // Evolution. 1989. V. 43. No. 7. P. 1349-1368.
17. Smithies O. Biochem. J. 1955. N 61. P. 629-641.
18. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 6531-6535.
19. Zabeau M., Vos P. Selective restriction fragment amplification. A general method for DNA fingerprinting. // European Patent Application No. 924026297. 1993. Publication No. 0534858.
20. Zietjewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. V. 20. P. 176-183.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
БЛОК 1. ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА БЕЛКОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ.....	4
1.1. Приготовление растворов и буферных смесей для электрофореза белков в ПААГ.....	8
1.2. Экстрагирование белков скелетных мышц позвоночных животных и подготовка проб для электрофореза.....	10
1.3. Разделение белков тканей позвоночных животных методом вертикального электрофореза в ПААГ.....	11
1.4. Гистохимическое выявление белков.....	12
1.4.1. Гистохимическое выявление неспецифических эстераз.....	12
1.4.2. Гистохимическое выявление аспартатамино-трансфераз.....	13
1.4.3. Гистохимическое выявление супероксиддисмугтаз.....	14
1.4.4. Гистохимическое выявление миогенов.....	15
1.4.5. Гистохимическое выявление лактатдегидрогеназы.....	16
1.4.6. Гистохимическое выявление изоцитратдегидрогеназы	17
1.4.7. Гистохимическое выявление малатдегидрогеназы.....	18
1.5. Расшировка электрофореграмм белков.....	20
1.6. Задание для практической работы по теме «Расшировка электрофореграмм белков».....	22
1.7. Расчет популяционно-генетических параметров.....	24
1.8. Задачи по теме «Расчет популяционно-генетических параметров».....	35
БЛОК 2. ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ДНК В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ЖИВОТНЫХ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ	

ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ.....	41
2.1. Практические задания по теме «Принципы подбора праймеров».....	50
2.2. Приготовление растворов и буферных смесей для ПЦР.....	51
2.3. Выделение ДНК методом щелочного лизиса.....	52
2.3.1. Выделение ДНК из фиксированных тканей позвоночных животных.....	53
2.3.2. Выделение ДНК из тканей беспозвоночных животных	54
2.4. Оценка качества выделения ДНК методом электрофореза в агарозном геле.....	55
2.5. Определение концентрации и степени очистки препарата нуклеиновых кислот спектрофотометрическим методом.....	58
2.5.1. Измерение концентрации нуклеиновых кислот спектрофотометрическим методом.....	58
2.5.2. Измерение концентрации белков по Бредфорду.....	59
2.6. Постановка ПЦР.....	61
2.7. Анализ продуктов амплификации методом электрофореза...	62
2.8. Расшифровка и анализ электрофореграмм ПЦР-продуктов..	64
Список литературы.....	66