

Генетика.

Лекция № 5.

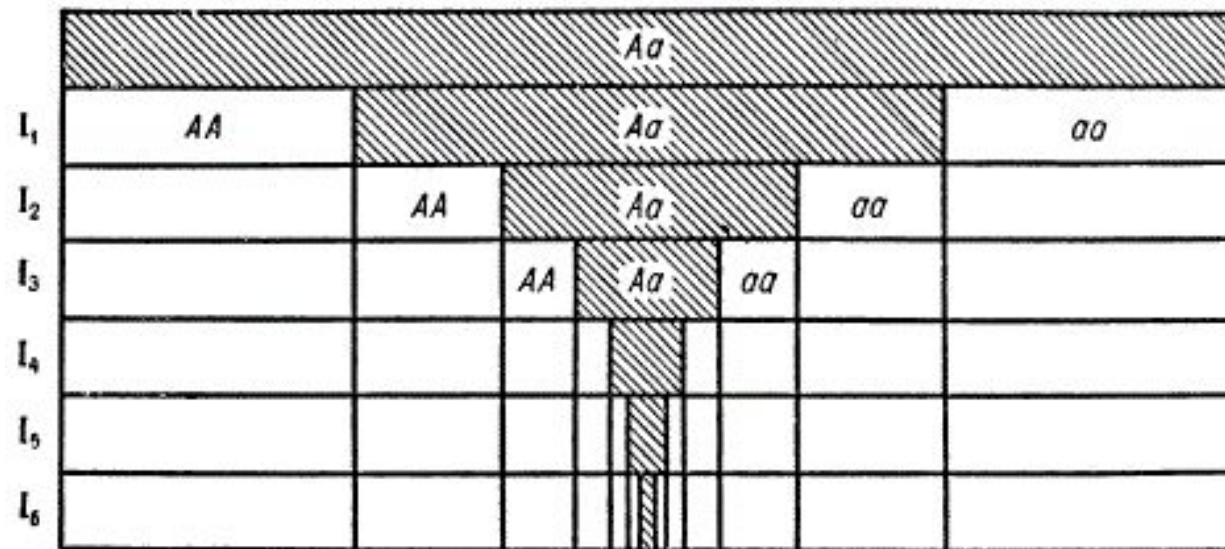
**ИНБРИДИНГ И ГЕТЕРОЗИС. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ
ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ.
ТОТИПОТЕНТНОСТЬ ГЕНОМА И ПОЛУЧЕНИЕ
КЛОНИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ В КРИМИНАЛИСТИКЕ И
ЭТНОГРАФИИ**

Инбридинг и аутбридинг

- ◆ **Аутбридинг – скрещивание особей, неродственных между собой. Аутбридинг соответствует перекрестному опылению, которое наблюдается у перекрестноопыляющихся растений: рожь, кукуруза, свекла, капуста, яблоня, слива и др.**
- ◆ **Инбридинг – скрещивание особей, находящихся между собой в близком родстве. У растений этот тип скрещивания называют также инцухт. Инбридинг – нормальный способ оплодотворения для самоопыляющихся растений: мягкая пшеница, рис, ячмень, горох, фасоль, сорго и др.**

Инбридинг

При инбридинге родители являются родственниками и поэтому имеют много одинаковых аллелей. В результате чего доля гетерозигот уменьшается в 2 раза, а доля гомозигот увеличивается.



I — поколения от инбридинга.

Инбредные линии и селекционные работы

- ◆ Инбридинг приводит к повышению постоянства фенотипических признаков в потомстве и, в конечном итоге, производится для получения линий генетически идентичных особей (инбредные линии), на которых удобно проводить биологические и медицинские эксперименты.
- ◆ Инбридинг широко используется селекционерами для усиления целевых характеристик породы или сорта. Наиболее распространённая разновидность инбридинга, которая используется при селекции, называется лайнбридингом. При лайнбридинге потомки спариваются с каким-либо своим предком.

Инбредная депрессия

- ◆ При близкородственном скрещивании (или самоопылении у растений) может возникать инбредная депрессия, объясняемая гомозиготностью по вредным рецессивным аллелям.

Вредные последствия инбридинга.

- Происходит снижение плодовитости животных (до бесплодия).
- Снижение жизнеспособность.
- Снижение продуктивности.
- Ухудшение развития животных, происходит измельчение потомства.
- Появление уродов.

Гетерозис (гибридная сила)

Гетерозис - это свойство помесей и гибридов первого поколения превосходить по биологическим и хозяйственно-полезным признакам исходные родительские формы.

Примеры: мул = лошадь + осел.

Этот межвидовой гибрид по сравнению с родительскими формами выгодно отличается долговечностью, выносливостью, большой работоспособностью, хотя и является бесплодным.



Типы гетерозиса по А.Густаффсону

- **Репродуктивный гетерозис – повышение фертильности: большая продуктивность семян и плодов.**
- **Соматический гетерозис – более мощное развитие вегетативных частей растения.**
- **Приспособительный (адаптивный) – повышенная жизнеспособность гибридов (устойчивость к высоким и низким температурам, засухе, болезням и вредителям).**

Одновременное проявление всех типов гетерозиса практически не наблюдается.


Объяснения явления гетерозиса.

Теория доминирования


Теория доминирования, основывается на гипотезе, что в процессе эволюции гены благоприятно действующие на рост и развитие организма, становятся доминантными, а гены, действующие неблагоприятно – рецессивными. Гетерозис связан с многосторонним благоприятным взаимодействием доминантных генов.

Объяснения явления гетерозиса. Теория сверхдоминирования

отталкиваемся от того, что у гибридов высока гетерозиготность
(доля локусов, несущих разные аллели, среди всех локусов)



В этой ситуации невелика вероятность того, что нуль - аллели или аллели со сниженной активностью молекулярного продукта окажутся в гомозиготе. У гибридов в большинстве локусов оказывается как минимум один полноценный аллель и они тем самым как бы приближаются к «идеальной особи» своего вида.



Существуют локусы, гетерозиготность по которым ценна сама по себе, поскольку приводит к фенотипу, который «лучше», чем фенотип обеих гомозигот. В природных популяциях велика доля полиморфных локусов, и вероятно, что сбалансированный полиморфизм поддерживается именно благодаря превосходству гетерозигот.

Тотипотентность генома.

Тотипотентность — клеточная характеристика способности к формированию всех клеточных типов взрослого организма, или это - свойство соматических клеток растений полностью реализовать свой потенциал развития, то есть реализовать омнипотентность ядра с образованием целого организма.

Исходные предположения:

- Специализация клеток животных сопровождается утратой генов, которые далее не понадобятся для данного типа клеток.**
- Во всех клетках сохраняются все гены, однако в тех клетках, где их деятельность не нужна, они находятся в неактивном состоянии.**

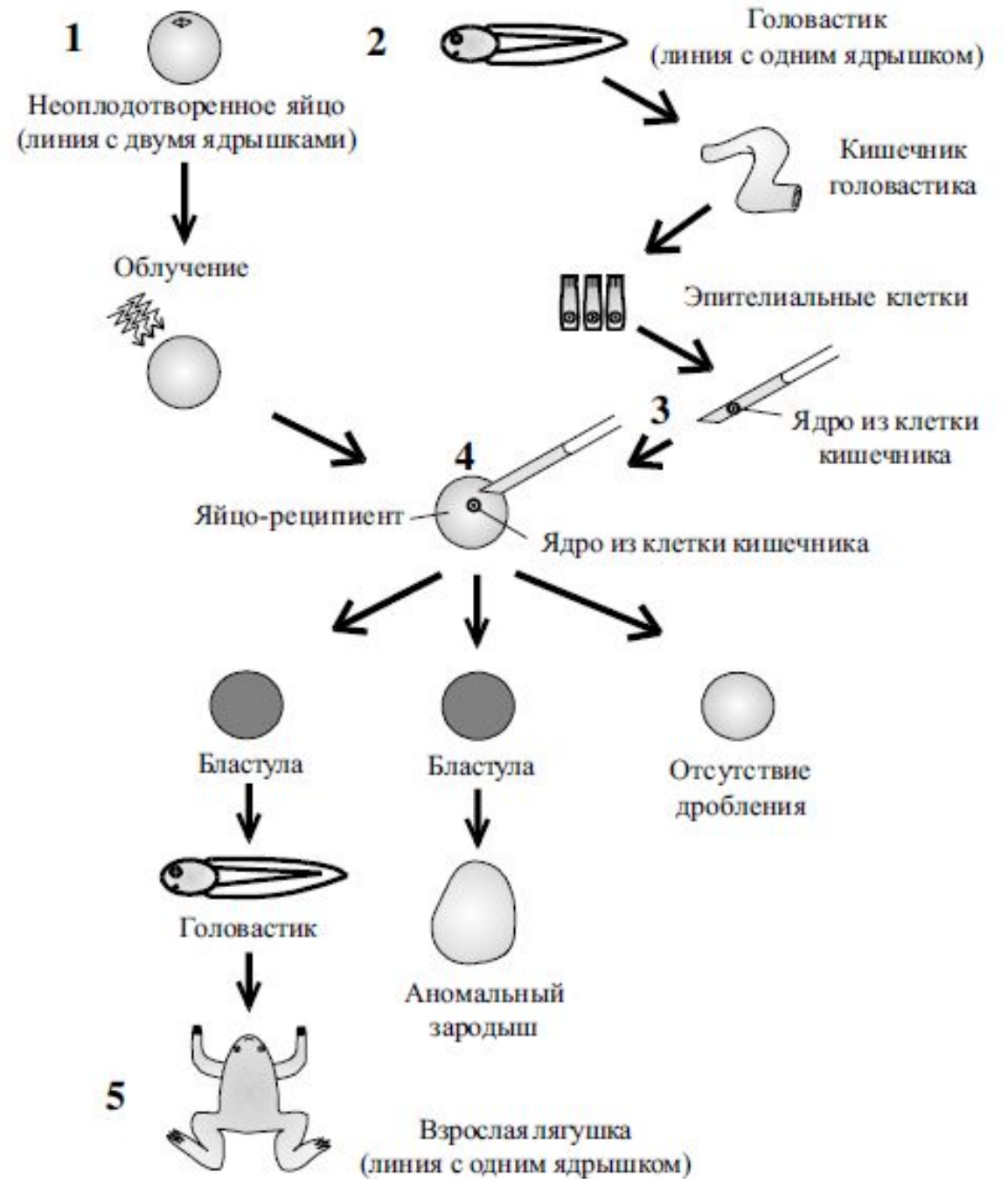
Тотипотентность генома растений

В исследованиях растений проблема тотипотентности не возникла, как как всем известно, что кусочки листа (т.е. соматические клетки) бегонии дают новые растения, точно также корневые побеги малины ежегодно дают начало новым растениям, а картофель размножается клубнями.



Опыт

Трансплантация ядра клетки эпителия кишечника головастика шпорцевой лягушки в неоплодотворенное яйцо этого же вида, из которого было удалено свое ядро. Из 1% яиц развились взрослые особи. Таким образом во всех клетках сохраняются все гены, однако в тех клетках, где их деятельность не нужна, они находятся в неактивном состоянии.



Опыты Ди Берардино и Хофнера

В данных работах использовали для трансплантации ядра неделящихся и полностью дифференцированных клеток крови - эритроцитов лягушки *Rana pipiens*. После пересадки ядер 10% яйцеклеток достигали стадии плавающего головастика.

Цитоплазма ооцитов амфибий содержит факторы, восстанавливающие тотипотентность ядер дифференцированных соматических клеток. Эти факторы реактивируют репрессированные участки генома.



Клонирование

- **появление естественным путём или получение нескольких генетически идентичных организмов путём бесполого (в том числе вегетативного) размножения.**
- **получение нескольких идентичных копий наследственных молекул (молекулярное клонирование).**
- **биотехнологические методы, используемые для искусственного получения клонов организмов, клеток или молекул.**

Группа генетически идентичных организмов или клеток — клон.

Эксперимент Яна Вилмута, 1997 г

В феврале 1997 прошла первая успешная трансплантация ядер из дифференцированных клеток в яйцеклетки овец. Маркерами служили масть овец и различные микросателлиты в составе ДНК. Ооциты выделяли из овец шотландской черномордой породы, а донорные клетки были выделены из вымени овец беломордой породы Финн Дорсепп.

Из 277 экспериментально полученных зигот только одна прошла все стадии развития вплоть до рождения ягненка, который был беломордым. Тот факт, что овечка выросла из яйцеклетки с ядром из взрослого животного, доказывает отсутствие необратимых модификаций генетическопо материала в ходе дифференцировки клеток.



Овечка Долли

История успешных клонирований

- 1970 - успешное клонирование лягушки
- 1985 - клонирование костных рыб
- 1996 — овечка Долли.
- 1997 — первая мышь.
- 1998 — первая корова.
- 1999 — первый козёл.
- 2001 — первая кошка.
- 2002 — первый кролик.
- 2003 — первые бык, мул, олень.
- 2004 — первый опыт клонирования с коммерческими целями (кошки).
- 2005 — первая собака (афганская борзая по кличке Снуппи).
- 2006 — первый хорёк
- 2007 - вторая собака

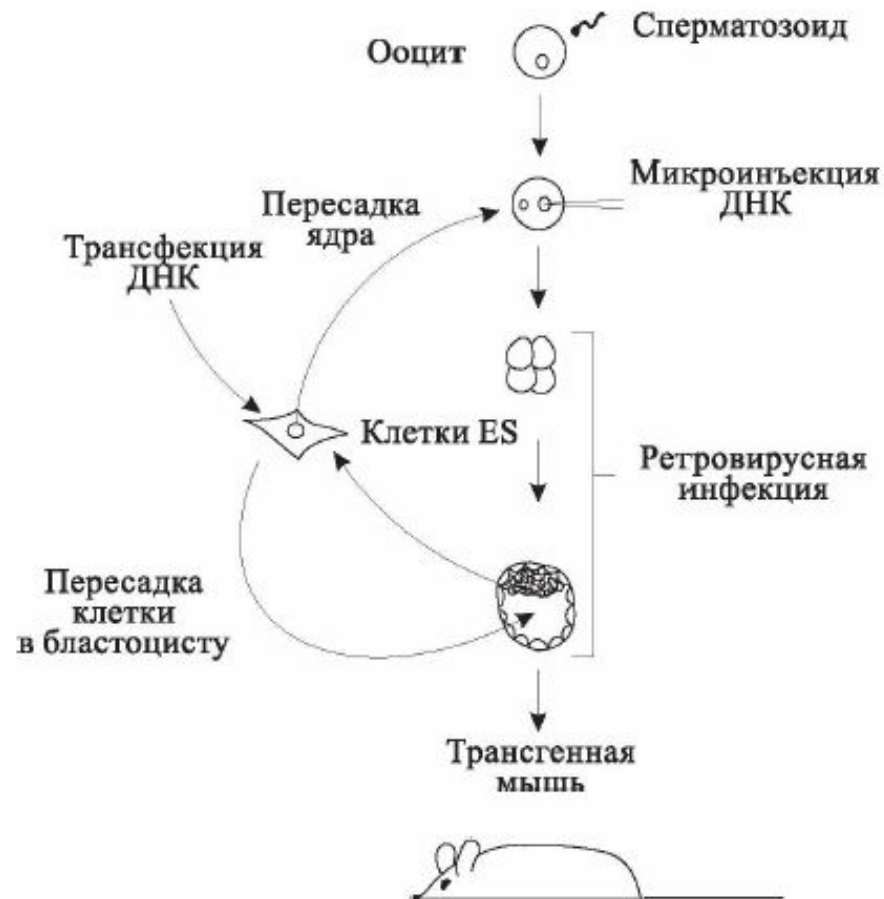
Методы получения трансгенных животных и растений

Линии животных и растений, полученные введением чужеродных генов в организм, и способные передавать полученные чужеродные гены в потомстве (трансгены) принято называть трансгенными животными.

Первые трансгенные животные

В 1974 г. Р. Джениш и Б. Минтц описали первую схему эксперимента по введению чужеродной ДНК в эмбрионы мыши. ДНК вируса SV40 инъецировали в бластоцисты, которые помещали в матку специально подготовленных самок. Из таких эмбрионов развивались нормальные взрослые мыши, часть которых содержала в своем геноме множественные копии ДНК вируса SV40.

В дальнейшем были предложены более эффективные приемы создания трансгенных животных.



Использование ретровирусов

Инфицирование предимплантированных эмбрионов рекомбинантными ретровирусами - относительно несложная процедура, не требующая дорогостоящего оборудования. Эмбрионы инфицируют следующим образом: восьмиклеточную морулу освобождают от яйцевой оболочки и помещают в культуральную чашку с фибробластами, продуцирующими рекомбинантный ретровирус. После инфицирования эмбрионы, достигшие стадии бластоцисты, вводят в матку псевдобеременной самки; часть эмбрионов продолжает нормально развиваться и в положенный срок превращается в трансгенных детенышей. В результате использования данной схемы часто формируется организм, мозаичный по числу и локализации вирусных встроек в клетках.

Клетки тератокарциномы мыши (ТСС)

ТСС способны размножаться в культуре, а после инъекции в эмбрион нормально дифференцироваться в бластоцисте мыши и развиваться. Соматические и половые клетки таких мышей являются мозаичными, т.к. содержат смесь нормальных клеток и ТСС. Для селективного отбора можно использовать разные маркеры, но удобнее всего маркеры доминантного типа, в этом случае нет необходимости работать на мутантных линиях клеток, которые могут иметь кроме известной мутации и ряд неидентифицированных изменений в геноме. Таким образом, в стволовые клетки тератокарциномы мыши котрансформацией с селективным маркером можно ввести любой ген. После отбора и тщательного изучения клонов трансформантов некоторые из них можно использовать для инъекции в ранние эмбрионы в целях получения линий мышей с predetermined генетическими изменениями. Данная система позволяет анализировать *in vivo* регуляцию экспрессии различных генов в процессе эмбрионального развития организма.

Использование плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток

При создании трансгенных животных используют также плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки (ES-клетки). ES-клетки можно культивировать *in vitro* и после необходимых манипуляций вернуть в организм, инъецируя их в бластоцисту. Клетки колонизируют эмбрион и участвуют в его нормальном развитии, давая начало клеткам всех типов соматических тканей и нередко клеткам зародышевого пути. Прежде чем инъецировать ES-клетки в бластоцисту, в них вводят целевые трансгены - либо путем трансфекции, либо инфицируя их рекомбинантными ретровирусами. Обычно в результате получают мозаичные животные. Проблему мозаичности первичных трансгенных животных можно преодолеть, если использовать трансформированные и прошедшие селекцию ES-клетки в качестве доноров ядер. Ядра ES-клеток, несущие трансгены, способны колонизировать энуклеированные ооциты, которые затем продолжают свое нормальное развитие. В результате может получиться животное, в каждой клетке которого будет содержаться трансген.

Микроинъекция ооцитов

Донорных мышей-самок с экспериментальной суперовуляцией скрещивают с самцами-производителями, через 12 ч после спаривания вскрывают яйцеводы, выделяют оплодотворенные яйцеклетки и помещают их в культуру. Далее в больший из двух пронуклеусов (обычно мужской) инъецируют очищенную клонированную ДНК. Ооциты, пережившие инъекцию, возвращают в естественную среду, пересаживая их в яйцевод псевдобеременной реципиентной самки. Часть трансплантированных ооцитов продолжает развиваться положенное время, и затем рождаются детеныши. После того как первичные трансгенные животные идентифицированы, проводят их скрещивание для получения трансгенных линий.

Трансгенная технология в фундаментальных научных исследованиях

- анализ цис-действующих контролирующих элементов, ответственных за тканевую специфичность - временную и физиологическую регуляцию экспрессии генов;
- анализ физиологических последствий (на уровне целого организма) различных отклонений в экспрессии генов, в том числе онкогенов;
- получение случайных новых мутантов, возникающих в популяции трансгенных мышей в результате внедрения трансгена в последовательность того или иного функционального гена (мутировавший ген можно выделить, используя трансген в качестве гибридизационной пробы);
- получение мутантов с направленно инактивированными генами — так называемых *нокаутных* (от англ. knock out — выбить) животных.

Трансгенные растения

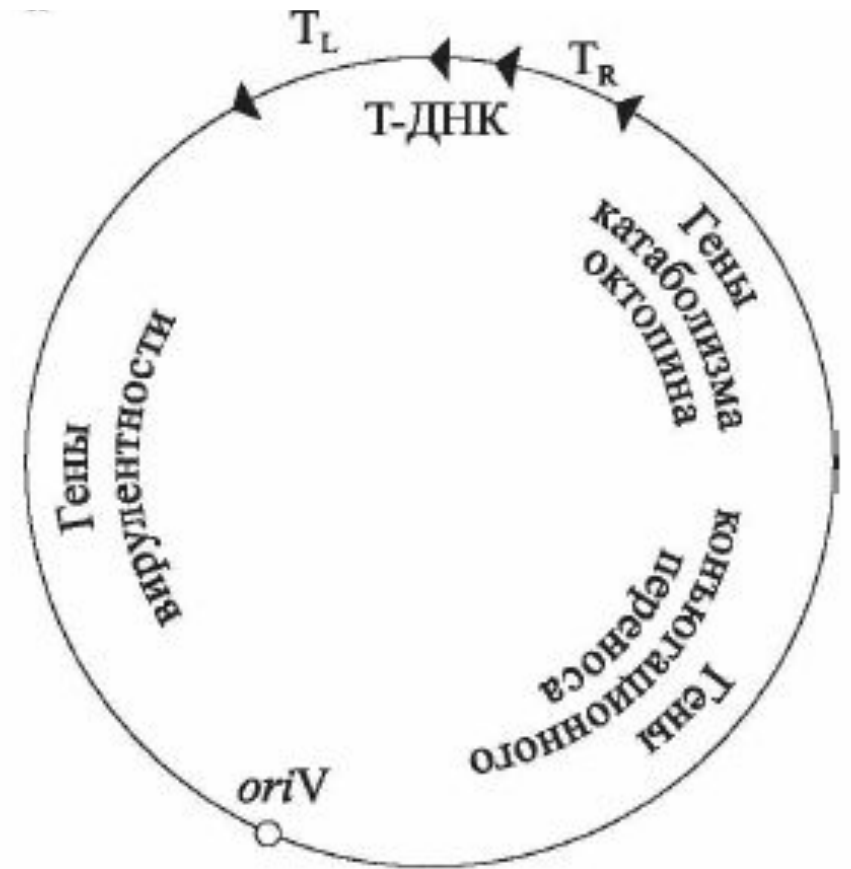
Растения имеют очень важное преимущество перед животными в экспериментальной биологии. Из недифференцированных соматических тканей, полученных из единичных клеток растения, возможна регенерация *in vitro* с образованием полноценных фертильных растений.

Ключевую роль в развитии генетической инженерии растений сыграло изучение механизмов переноса специфичных фрагментов плазмидной ДНК из бактерии *Agrobacterium tumefaciens* в ядро растительной клетки с последующей их интеграцией в хромосомную ДНК. Выяснение основных закономерностей этого процесса позволило создать относительно простую и надежную систему введения чужеродных генов в клетки растений с последующей селекцией растений, содержащих целевой трансген.

ПЕРЕНОС ГЕНОВ В РАСТЕНИЯ ИЗ БАКТЕРИЙ РОДА AGROBACTERIUM

A. tumefaciens являются грамотрицательными почвенными бактериями способны вызвать заболевание, называемое корончатым галлом. Клетки корончатых галлов во многих отношениях напоминают раковые клетки животных. Они приобретают способность к неограниченному нерегулируемому росту.

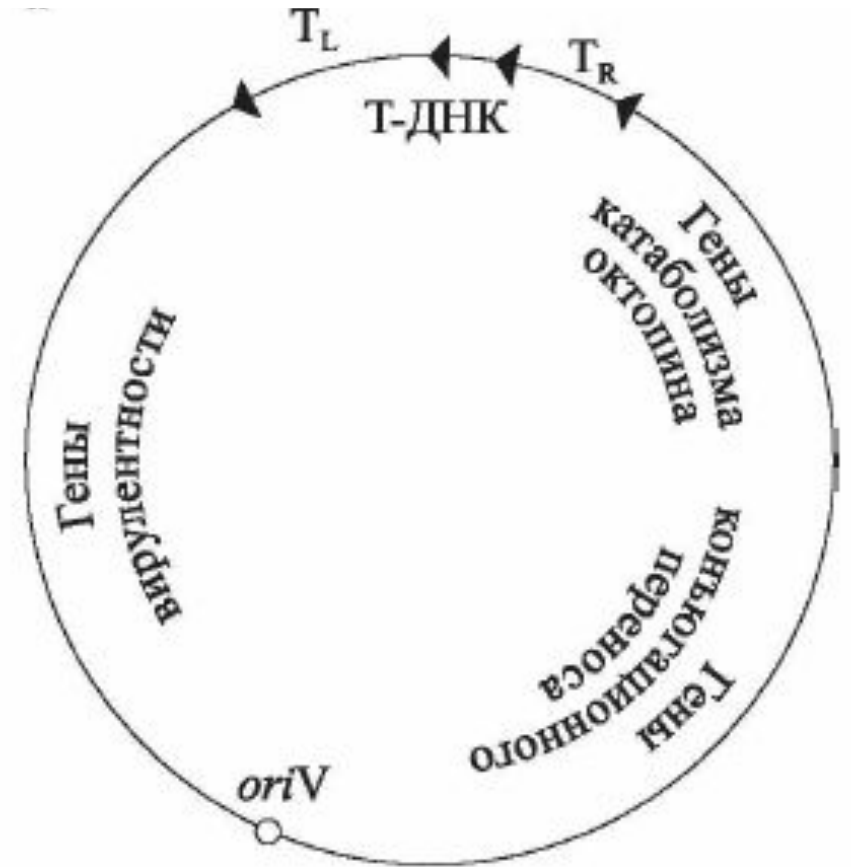
Вскоре была выдвинута гипотеза о том, что растительные клетки трансформируются в результате того, что бактерия вводит в них некий агент, индуцирующий опухоль. Изучение природы индуктора опухолей *A. tumefaciens* позволило установить, что опухолеродным агентом у этой бактерии является плазмида Ti.



ПЕРЕНОС ГЕНОВ В РАСТЕНИЯ ИЗ БАКТЕРИЙ РОДА AGROBACTERIUM

Т-ДНК, способна передаваться в растительную клетку с последующей встройкой в хромосомы ядра. Она кодирует ферменты синтеза фитогормонов, индуцирующих опухоловое разрастание трансформированных тканей растения, а также ферменты синтеза необычных аминокислот и сахаров (опинов).

Экспериментально установлено, что последовательность ДНК, заключенная между T_L и T_R, никак не влияет на эффективность переноса Т-ДНК из агробактерии в клетку растения. Это позволило предположить, что Т-ДНК можно использовать для переноса чужеродных генов из *A. tumefaciens* в геном растительных клеток.



Прямой метод введение трансгена в растения

Метод бомбардирования микрочастицами. Современные варианты приборов для бомбардирования микрочастицами называют обычно генными пушками. Для бомбардирования наиболее удобны химически инертные частицы золота, на которые адсорбируют молекулы ДНК. Этими частицами заряжают генную пушку, и после выстрела частицы пробивают клеточные стенки, ДНК попадает внутрь клетки и в конечном итоге - в ядро (или пластиды). Для многих исследований можно использовать более дешевый «носитель» ДНК – вольфрамовые микрочастицы, однако иногда они проявляют фитотоксичность.

Вводимые методом бомбардирования плазмиды обычно содержат гены, необходимые для размножения и селекции гибридных плазмид в бактериальных клетках, а также селективный и целевой гены, находящиеся под контролем промоторов и терминаторов транскрипции, функционирующих в растениях.

Использование трансгенных растений

- Синтез в растениях чужеродных белков медицинского назначения
 - ◆ Терапевтические и диагностические антитела
 - ◆ Съедобные вакцины
- Получение трансгенных растений с новыми биотехнологическими свойствами (устойчивость к гербицидам, к насекомым, к вирусам, к неблагоприятным природным факторам, изменение окраски в декоративных целях)
- Трансгенные растения в сельском хозяйстве (генетически модифицированные источники пищи).

Применение методов молекулярной генетики в криминалистике

В криминалистике практические идентификационные исследования предполагают выявление и признаков, которые можно считать индивидуальными. В роли индивидуальных признаков человека традиционно выступали биохимические маркеры (антигенные характеристики крови и тканей организма, а также изоформы ряда ферментов, определяемые при изучении следов на вещественных доказательствах, выделений или тканей тела человека).

Индивидуализирующие возможности маркерных систем зависят от степени их вариабельности и количества вариантов в популяции. Чем эти величины больше, тем выше специфичность маркера, а значит, его способность выделять конкретный объект среди других, даже сходных по иным признакам.

У всех известных биохимических маркеров индивидуализирующий потенциал оказывается недостаточно высок для точной идентификации. Например, некоторые биологические характеристики, выявляемые классическими серологическими маркерами - эритроцитарными антигенами системы АВО, встречаются у каждого третьего или четвертого индивидуума.

Генетическая дактилоскопия

1985 статья профессора Лестерского университета в Англии А. Джеффриса «Индивидуально-специфичные "отпечатки пальцев" ДНК человека»

“Судебно-экспертное использование "отпечатков пальцев" ДНК”

- Генетическая дактилоскопия или ДНК-дактилоскопия - система научных методов биологической идентификации индивидуумов на основе уникальности последовательности чередования нуклеотидов в цепочке ДНК каждого живого существа (за исключением однойцевых близнецов), своеобразного «генетического отпечатка», остающегося индивидуальным и неизменным на протяжении всей жизни индивидуума (организма).

Открытие феномена локального генетического гиперполиморфизма высокоэффективных молекулярных зондов типа минисателлитной ДНК предоставили новые возможности для решения проблемы индивидуализации человека и установления кровнородственных связей.

Анализ полиморфизма длины рестриктазных фрагментов ДНК

В результате различных мутаций в молекулах ДНК появляются новые или утрачиваются существовавшие ранее сайты рестрикции, что обуславливает изменение длины получающихся рестриктазных фрагментов ДНК. Интересующие фрагменты ДНК можно визуализировать путем молекулярной гибридизации с соответствующим зондом по методу блот-гибридизационного анализа. С его помощью полиморфные участки генома обнаруживаются в виде имеющих разную длину гомологичных фрагментов ДНК, которые образуются после гидролиза.

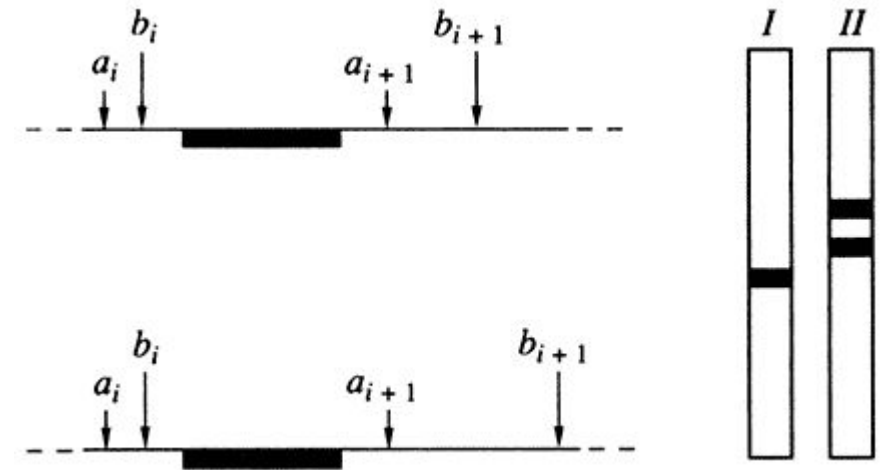
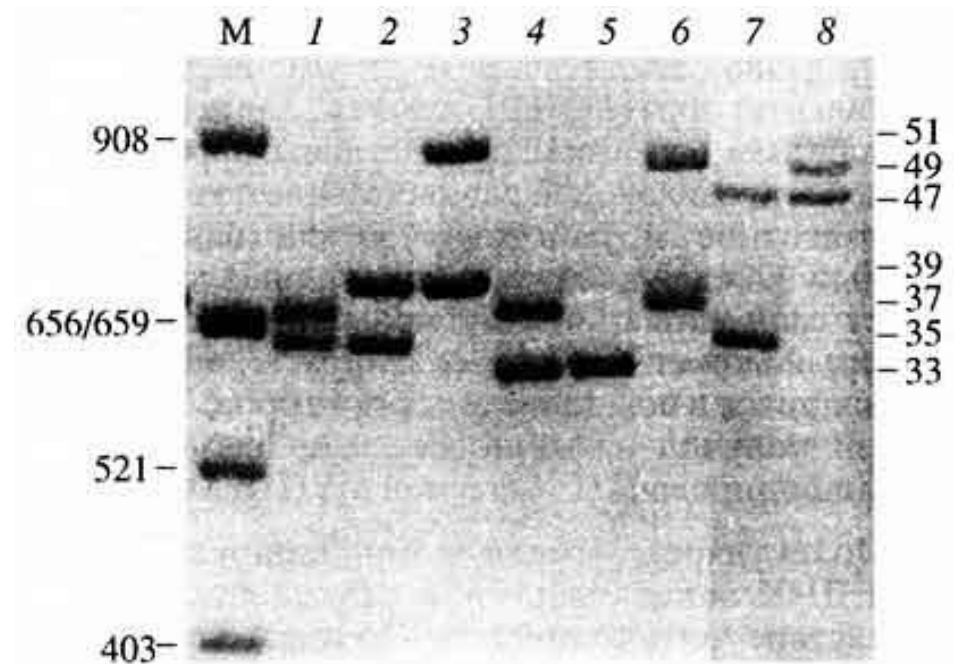


Схема расположения на гомологичных хромосомах соседних участков узнавания (a_i и a_{i+1} ; b_i и b_{i+1}) двух рестриктаз (I и II), зачерненный участок - область гомологии зонда; справа - схематическая картина результата блот-гибридизации с данным зондом суммарной ДНК, гидролизованной рестриктазами I и II

Анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов ДНК

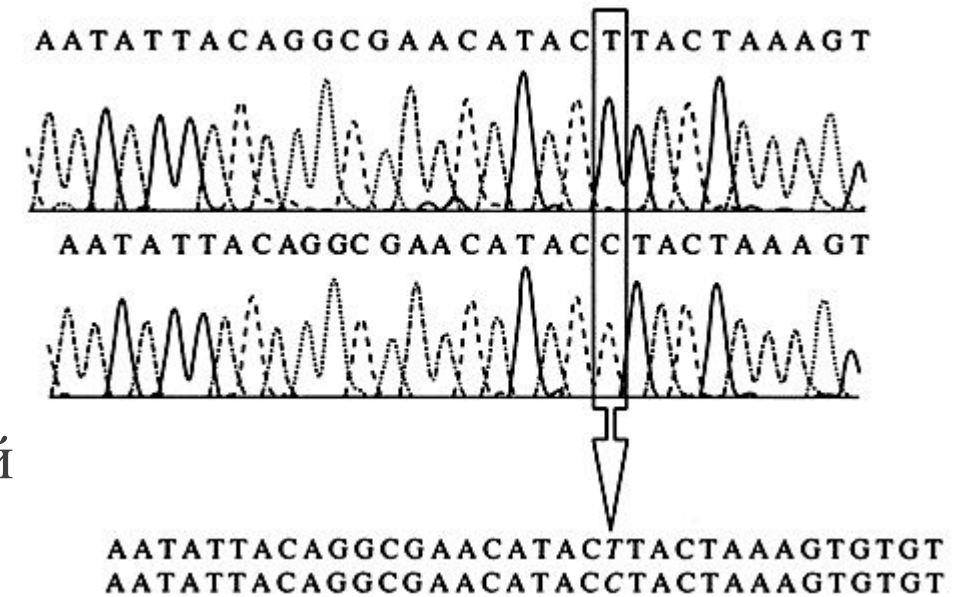
Гипервариабельные локусы VNTR-типа содержат различное число повторяющихся элементарных звеньев. При амплификации с праймерами, расположенными по краям такого локуса, образуются фрагменты ДНК различной длины, причем их длина пропорциональна числу повторов. Таким образом, в данной аналитической системе любой индивидуальный образец ДНК человека характеризуется наличием двух амплифицированных фрагментов разной или одинаковой длины (соответственно, гетерозиготное и гомозиготное состояние).



Электрофореграмма (окрашивание серебром) амплифицированных фрагментов ДНК - аллелей хромосомного локуса ApoB-3'VNTR (2p24-p23) восьми неродственных индивидуумов

Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей ДНК

В результате различных мутаций ряд локусов имеют варианты (аллели), которые на молекулярном уровне одинаковы по длине, но в той или иной степени различаются последовательностью нуклеотидов. Наиболее радикальный путь - секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК, то есть определение первичной структуры полинуклеотидной цепи. В настоящее время единственной молекулярно-генетической индивидуализирующей системой, основанной на секвенировании сайт-полиморфных амплифицированных фрагментов ДНК, являются полиморфные локусы митохондриальной ДНК (мтДНК).



Выявление нуклеотидных замен в митохондриальной ДНК методом прямого флуоресцентного секвенирования

ПЦР в этнографии

В середине 80-х годов был предложен ещё один метод клонирования ДНК – метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Он позволяет синтезировать необходимые фрагменты ДНК и затем многократно увеличивать число их копий. Этот метод даёт возможность из незначительных количеств ДНК нарабатывать количества, необходимые для биохимического анализа. Используя ничтожные количества ДНК, содержащиеся на саркофагах и покрывалах мумий или костях предков человека, оказалось возможным наработать объемы ДНК, после анализа которых были сделаны интересные выводы о формировании, эволюции и миграциях предков современных людей.

Секвенирование в этнографии

Важной вехой в развитии палеогенетики стало создание методов секвенирования ДНК, позволявших получать большой объем генетической информации из минимального количества исходного ДНК-содержащего материала, что снимает проблему разрушения уникального образца при анализе. Эти методы практически уравнили потенциальную информативность образцов древней и современной ДНК