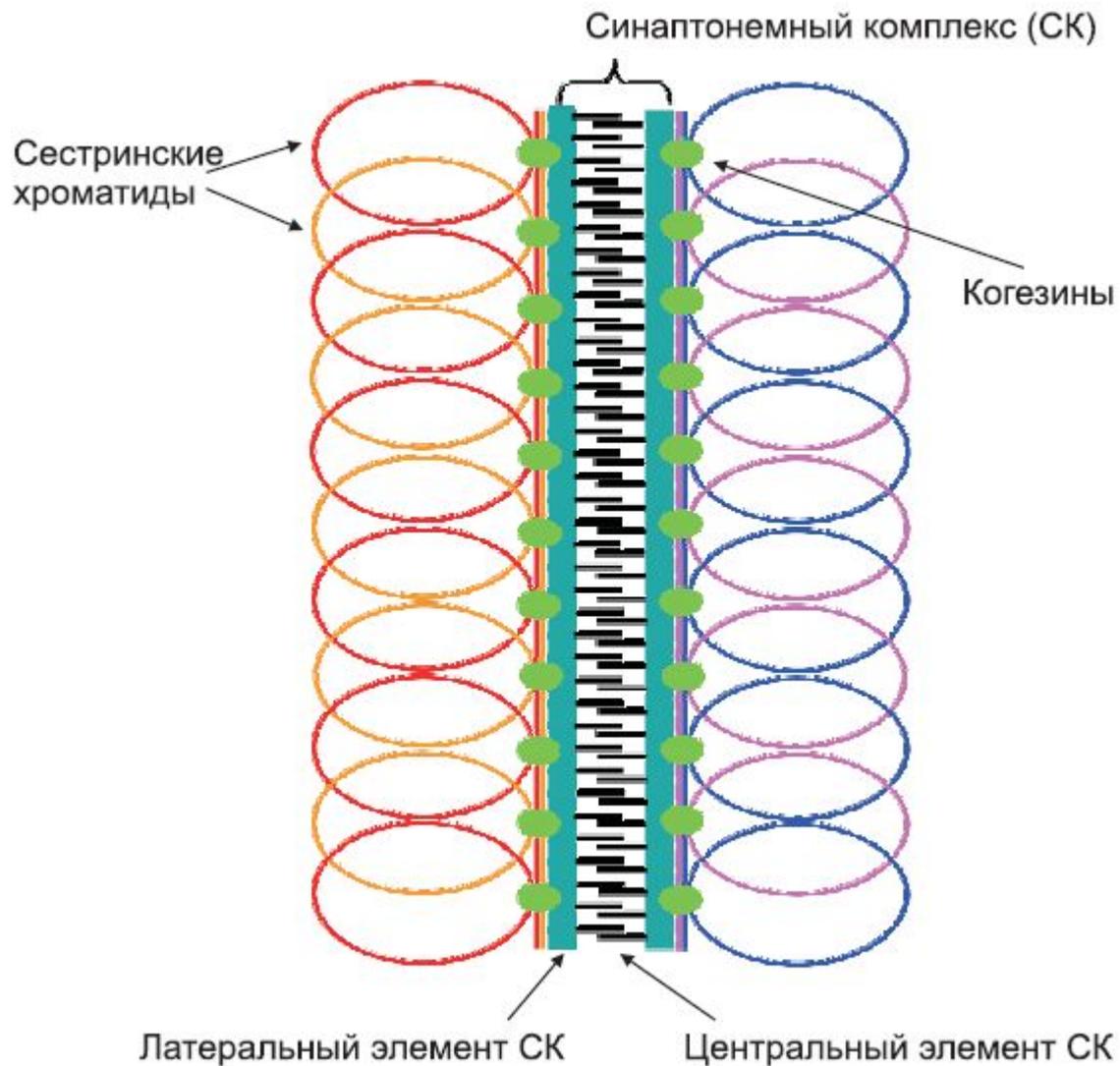


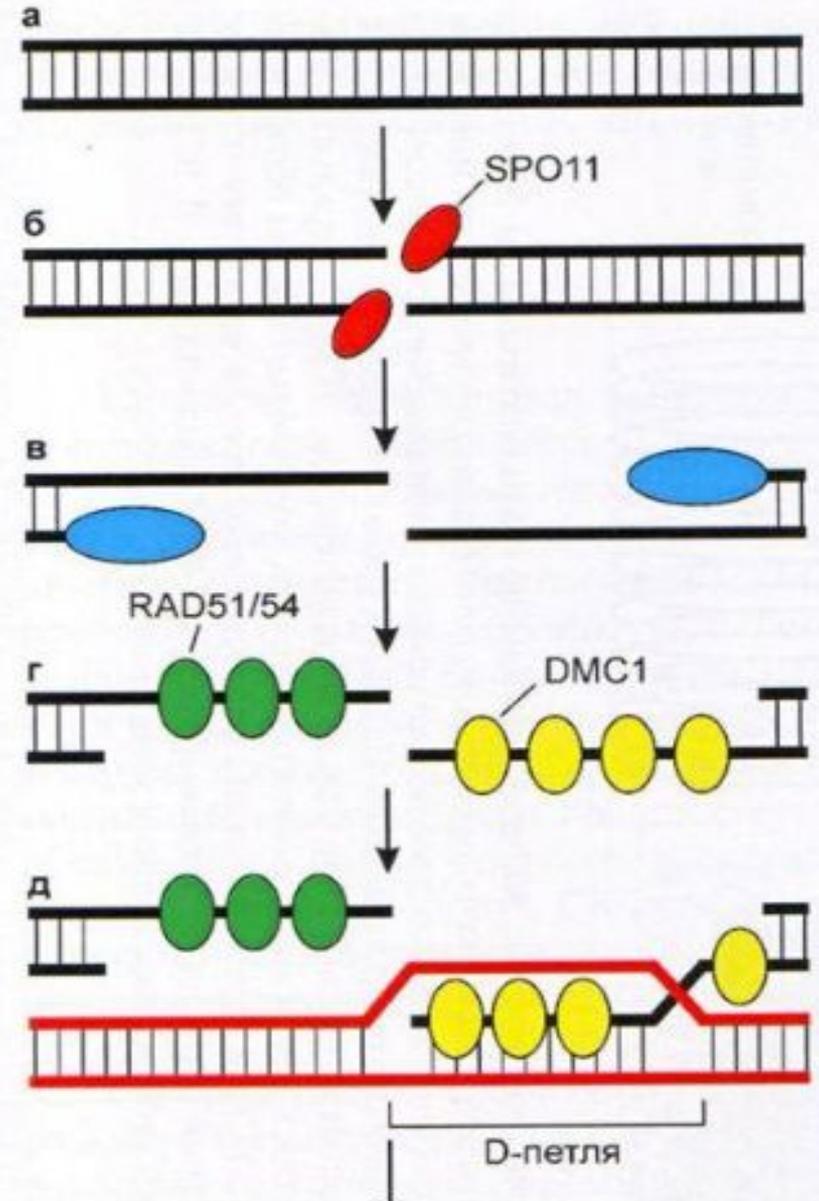
# Схема строения синаптонемного комплекса

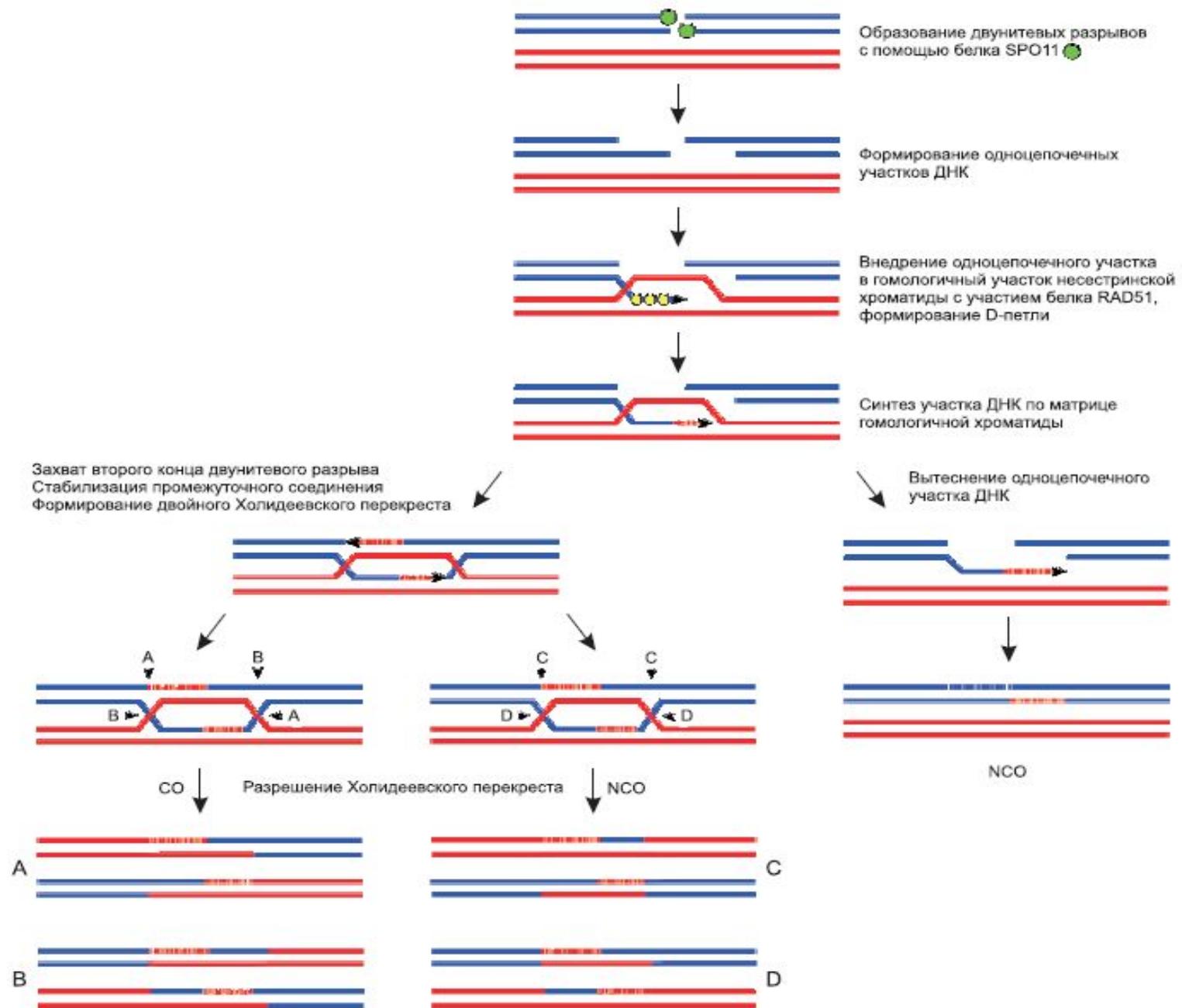


# Молекулярный механизм кроссинговера

Двунитевые разрывы вносятся в ДНК с помощью белка SPO11

В местах разрывов образуются одноцепочечные 3'-концы, которые с помощью RecA-подобных белков (у эукариот это RAD51 и DMC1) внедряются в неповрежденный гомологичный участок одной из двух несестринских хроматид. Именно этот контакт запускает сборку белков центрального элемента синаптонемного комплекса, они начинают накапливаться в местах первичного контакта гомологичных хромосом.





Белки мисматч репарации MLH1 и MLH3

# Картирование генов

## Построение генетических и цитологических карт



СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Толмачева Екатерина Николаевна  
Кандидат биологических наук,  
доцент кафедры биологии и генетики

- **Картирование генов** - определение положения данного гена на какой-либо хромосоме относительно других генов.

Используются три основных группы методов картирования генов

- **физическое** (определение с помощью рестрикционных карт, электронной и световой микроскопии).
- **Генетическое** (определение частот рекомбинаций между генами)
- **Цитогенетическое** (гибридизация *in situ*, получение монохромосомных клеточных гибридов, делеционной метод и др.)

# Генетические и физические карты хромосом

- **Генетическое картирование** основано на использовании генетических методов для построения карт, показывающих позиции генов и других последовательностей в геноме.
  - Генетические методы включают гибридологические эксперименты или, в случае с людьми, генеалогический метод (анализ родословных)

- Морган представлял себе гены упорядоченными по длине хромосом, как бусинки в ожерелье



- Экспериментальные данные привели его к идее создания **генетических карт хромосом**
- Очевидно, что *чем дальше находятся два гена друг от друга, тем больше вероятность разрыва нити, связывающей их, и получения новых сочетаний генов*
- Стало возможным *определить относительное расстояние между генами в хромосоме путем простого расчета процента кроссинговера*

- Частота кроссинговера (расстояние между генами):

$$= \frac{\text{число кроссоверных организмов}}{\text{общее число потомков}} * 100\%$$

- Эта частота строго пропорциональна расстоянию между сцепленными генами и измеряется в **морганидах**
- *1 морганида соответствует 1% рекомбинантных гамет или генотипов, полученных при анализирующем скрещивании*

# Частота рекомбинаций

$$\text{ЧР} = \frac{\text{Число рекомбинантов}}{\text{Общее число потомков}} \times 100$$

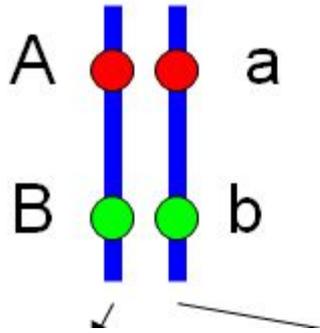
Серое тело, длинные крылья ( <b>BbVv</b> )	– 965 (41,5%)
Черное тело, короткие крылья ( <b>bbvv</b> )	– 944 (41,5%)
Серое тело, короткие крылья ( <b>Bbv</b> )	– 206 (8,5%)
Черное тело, длинные крылья ( <b>bbVv</b> )	– 185 (8,5%)
<b>Всего рекомбинантов</b>	<b>- 391 (17%)</b>
<b>Всего потомков</b>	<b>- 2300 (100%)</b>

$$\text{ЧР} = \frac{206 + 185}{2300} \times 100 = \mathbf{17\%} \quad \text{или} \quad \mathbf{17 \text{ морганид}}$$

# Расчёт расстояния между генами

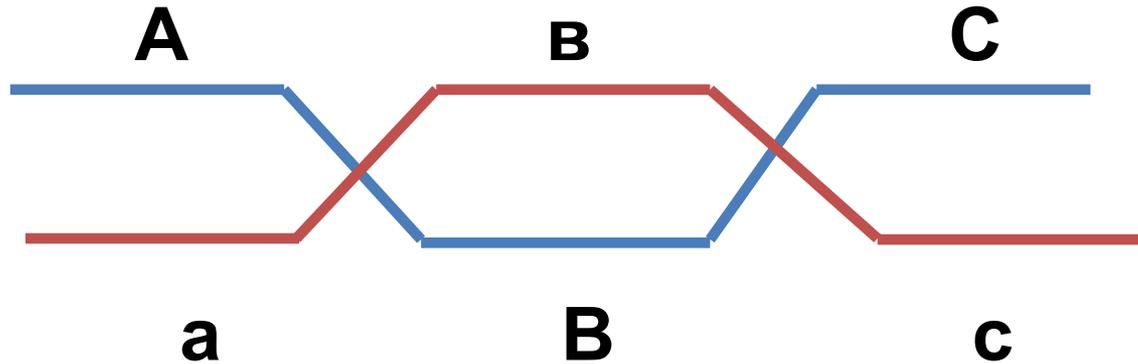
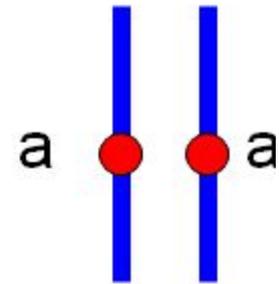
Гаметы	Генотип зигот	Число особей		%
Некроссоверы	ABC/abc	150		56,2
ABC	abc/abc	143	293	
abc				
Кроссинговер между А и В	Abc/abc	37	79	15,2
Abc	aBc/abc	42		
aBc				
Кроссинговер между В и С	Abc/abc	70	135	25,9
Abc	aBc/abc	65		
aBc				
Кроссинговер между А и В, между В и С	ABc/abc	8	14	2,7
ABc	aBc/abc	6		
aBc				

**P:** AaBb



**x**

aabb



**A и B – 79 + 14=93**

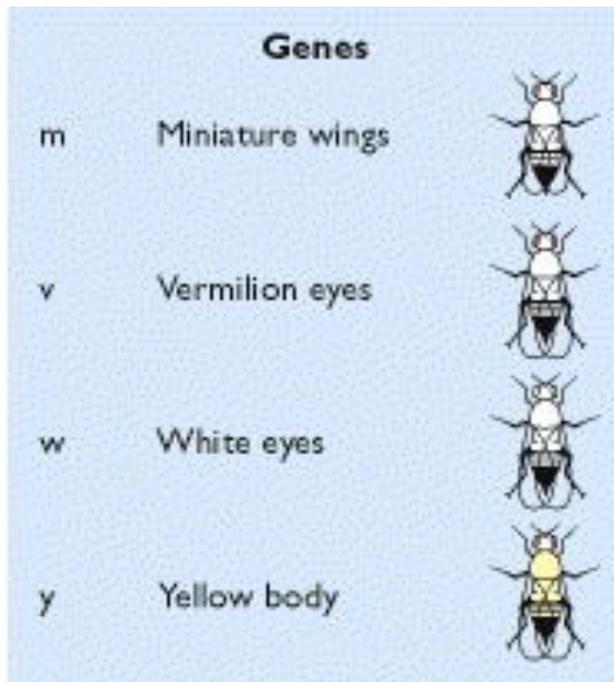
**93/521 = 17,9%**

**B и C – 135+14= 149**

**149/521=28,6%**

**A – C= 17,9% + 28,6%=46,5%**

- **А. Стертевант в 1913 г.** составил первую генетическую карту локализации генов в X-хромосоме дрозофилы
- Генетические карты уже разработаны для дрозофилы, мыши, нейроспоры; для высших растений: кукурузы, риса, ячменя и др.



**Recombination frequencies**

Between m and v = 3.0%

Between m and y = 33.7%

Between v and w = 29.4%

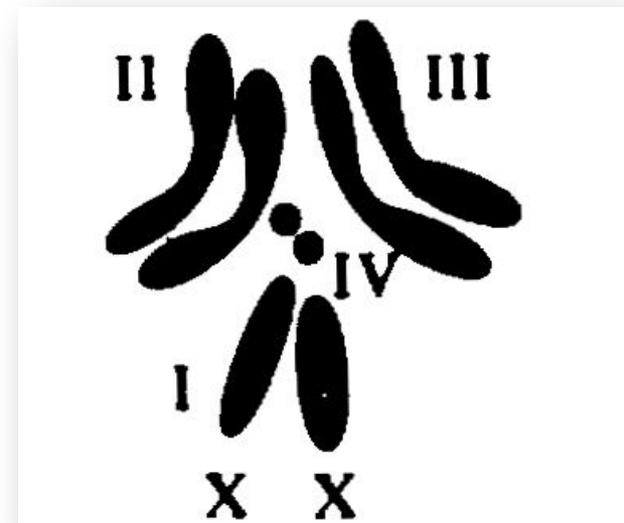
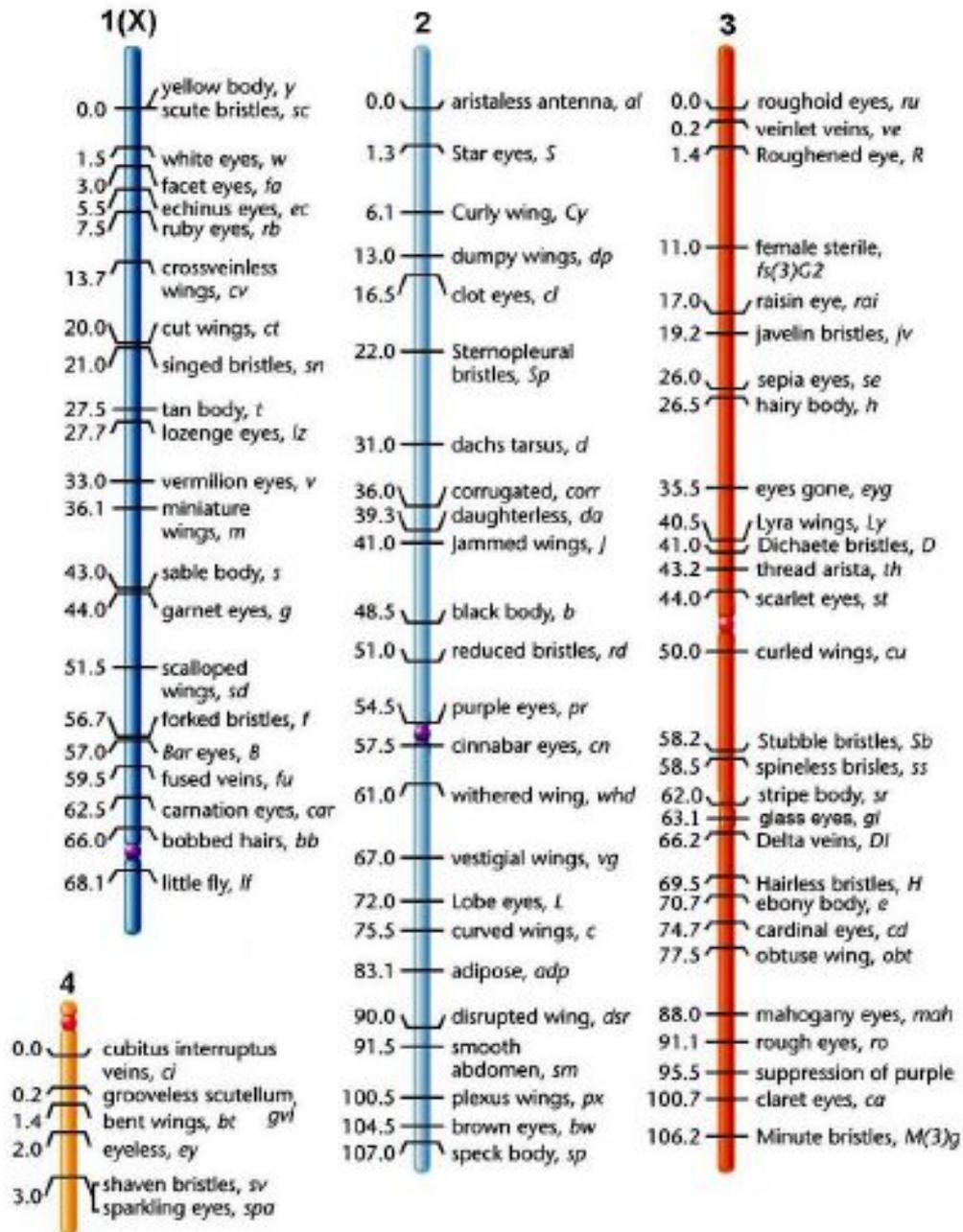
Between w and y = 1.3%

Deduced map positions



- **Построение генетической карты на основании частот рекомбинации.** Пример показывает реальные эксперименты, выполненные Артуром Стуртевантом на плодовой мушке. Все 4 гена находятся в X-хромосоме плодовой мушки. Показаны частоты рекомбинации между генами и относительное разморасположение генов на карте

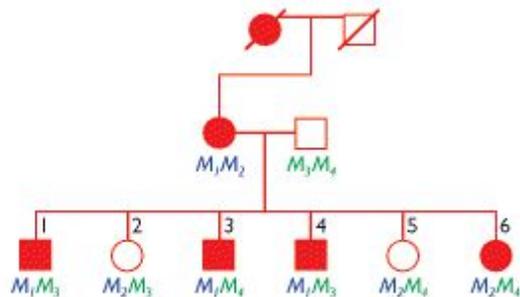
# Генетические карты (группы сцепления) дрозофилы.



# Генеалогический анализ в составлении генетических карт человека

- Для человека невозможно проведение экспериментальных браков с целью создания генетических карт
- Данные для расчета частот рекомбинации могут быть получены исследованием генотипов членов поколений существующих семей
- Это значит, что доступны только ограниченные данные и их интерпретация часто затруднена, так как браки людей редко приводят к нужным «скрещиваниям», а зачастую генотипы одного или более членов семей недоступны из-за их смерти или отказа от сотрудничества

(A) The pedigree



(B) Possible interpretations of the pedigree

		MOTHER'S CHROMOSOMES	
		Hypothesis 1	Hypothesis 2
		<u>Disease M<sub>1</sub></u>	<u>Healthy M<sub>1</sub></u>
		<u>Healthy M<sub>2</sub></u>	<u>Disease M<sub>2</sub></u>
CHILD 1	<u>Disease M<sub>1</sub></u>	Parental	Recombinant
CHILD 2	<u>Healthy M<sub>2</sub></u>	Parental	Recombinant
CHILD 3	<u>Disease M<sub>1</sub></u>	Parental	Recombinant
CHILD 4	<u>Disease M<sub>1</sub></u>	Parental	Recombinant
CHILD 5	<u>Healthy M<sub>2</sub></u>	Parental	Recombinant
CHILD 6	<u>Disease M<sub>2</sub></u>	Recombinant	Parental
	Recombination frequency	1/6 = 16.7%	5/6 = 83.3%

(C) Resurrection of the maternal grandmother



## Пример анализа родословной людей.

(А) Родословная показывает наследование генетической болезни в семье двух живых родителей и 6 детей, а также при наличии информации о родителях матери. Аллель болезни является доминантным по отношению к аллелю здоровья. Реальным является определение степени сцепления между геном заболевания и микросателлитом М типированием аллелей для этого микросателлита (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, и т.д.) у живых членов семьи.

(В) Родословная может быть интерпретирована двумя различными путями: Гипотеза 1 дает низкую частоту рекомбинации и свидетельствует, что ген заболевания сильно сцеплен с микросателлитом М; Гипотеза 2 подтверждает, что ген и микросателлит менее прочно сцеплены

(С) Реконструкция генотипа микросателлита бабушки подтверждает верность Гипотезы 1

### KEY

○ Unaffected female   ● Affected female   □ Unaffected male   ■ Affected male   / Dead

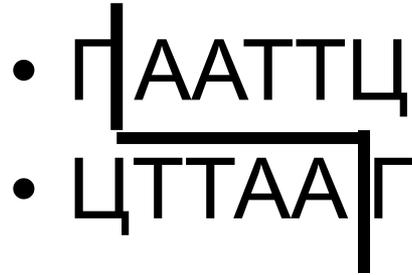
- **Физическое картирование** использует молекулярно-биологические методы для непосредственного исследования молекул ДНК и построения карт, показывающих позиции определенных последовательностей, в том числе генов

Последовательности,  
распознаваемые разными  
рестриктазами

Построение

рестрикционных карт

• EcoRI



• SmaI



ДНК разрезают рестриктазами и подвергают электрофорезу.

Рестрикционная карта - вид физической карты, на которой указаны расстояния между соседними сайтами расщепления ДНК определенной рестриктазой.

# Опорные точки карт хромосом – гены и ДНК-маркеры

- Гены – очень часто используемые маркеры, но они не идеальны. Одна из проблем (особенно для больших геномов позвоночных) состоит в том, что карты, основанные на генах, не очень детальные
- Поэтому нужны другие типы маркеров
- Опорные точки карт, не являющиеся генами, называются **ДНК-маркерами**
- Основные типы ДНК-маркеров:
  - полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (RFLPs)
  - полиморфизм длины простой последовательности (SSLPs)
  - однонуклеотидный полиморфизм (SNPs)

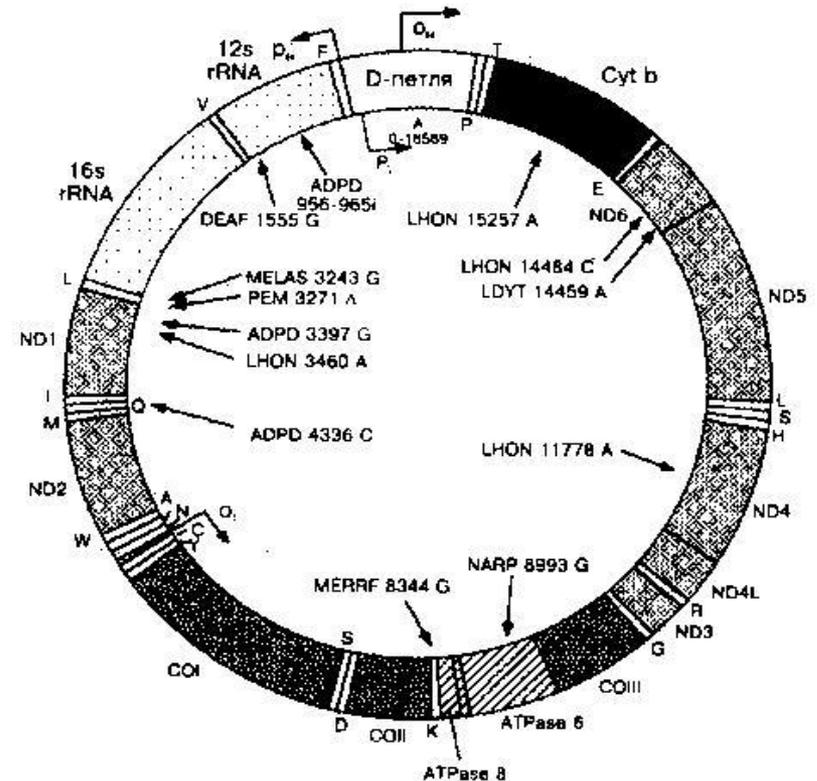
## Карта хромосомы 21 и митохондриального генома

### Хромосома 21



Эпилепсия, прогрессирующая миоклоническая

- 21q11.2 Миелопролиферативный синдром, транзиторный
- 21q22.3 Глухота, аутосомно-рецессивная 8
- 21q22.3 Синдром Дауна, критический регион



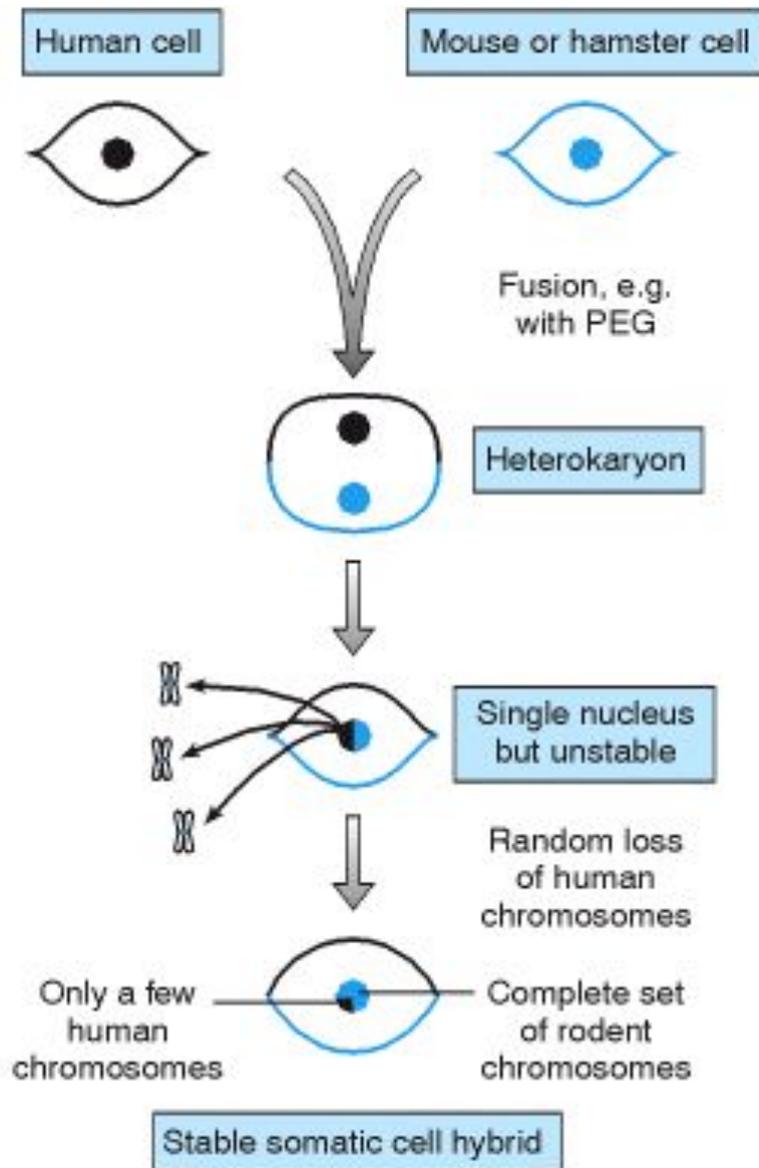
- ADPD - Болезнь Альцгеймера/болезнь Паркинсона
- DEAF - Нейросенсорная потеря слуха
- LHON - Наследственная нейроофтальмопатия Лебера
- LDYT - LHON и дистония
- MELAS - Митохондриальная миопатия, энцефалопатия, молочнокислый ацидоз и приступы судорог
- MERRF - Миоклональная эпилепсия в сочетании с необычно красными мышечными волокнами
- NARP - Нейропатия, атаксия и пигментный ретинит
- PEM - Летальная прогрессирующая энцефаломиопатия

## Метод генетики соматических клеток

- При гибридизации соматических клеток двух разных линий образуются гетерокарионы — клетки, которые содержат оба родительских ядра. Затем в результате митоза образуются две одноядерные клетки — синкарионы, имеющие хромосомы обоих родительских клеток.

# Методы картирования хромосом человека

- *метод гибридизации соматических клеток грызунов и человека в культуре ткани*
- Если изолировать из тела и смешать клетки мыши и человека в культуре, то в результате их слияния можно получить *гибридные клетки, содержащие хромосомы одного и другого вида.*
- Клетки мыши имеют 40 хромосом, а клетки человека - 46. Суммарное число хромосом гибридных клеток должно быть 86, но обычно этого не происходит и чаще всего гибридные клетки содержат обычно от 40 до 50 хромосом.



- Пример показывает как стабильные человек-мышь гибридные соматические клетки могут получаться применением ПЭГ
- По непонятным причинам хромосомы человека избирательно утрачиваются первичным продуктом слияния
- Происходящая случайно утрата человеческих хромосом приводит к образованию большого разнообразия гибридных клеток по набору хромосом человека
- Эти клетки могут быть клонированными для получения отдельных клеточных линий со специфическим набором хромосом человека
- Идентификация хромосом человека может проводиться методами, базирующимися на ПЦР с использованием хромосом-специфических маркеров

- В гибридных клетках человек-мышь, полученных в результате слияния анеуплоидных клеток мыши и диплоидных эмбриональных фибробластов человека, 75-95% человеческих хромосом утрачиваются в процессе культивирования, причем их утрата носит случайный характер
- Среди множества разнообразных гибридов всегда найдется клетка, сохранившая ту или иную хромосому человека
- В гибридных клетках хромосомы функционируют, регулируя синтез соответствующих белков

- После размножения этой клетки можно провести **анализ ферментов**, активность которых связана с наличием именно данной хромосомы
- Использование **методов дифференциального окрашивания** хромосом позволяет связать гены с определенными локусами хромосом, так как в гибридных клетках довольно часты хромосомные разрывы, перестройки, присутствие не целых хромосом, а отдельных фрагментов

- В настоящее время для картирования генов хромосом человека используются также другие методы:
  - *Биохимические методы* — сравнение аминокислотных последовательностей белков и нуклеотидной последовательности ДНК отдельных хромосом
  - *Цитологические методы* — сопоставление изменения морфологии хромосомного участка с характерным фенотипом, анализ «ломких» участков хромосом
  - *Молекулярно-генетические методы* и др.

# FISH

FISH – fluorescence in situ hybridization –

цитогенетический метод, используемый для детекции и локализации специфических последовательностей ДНК на хромосомах, мРНК и др. В основе методики лежит гибридизация флюоресцентно меченого ДНК/РНК зонда с комплементарной последовательностью ДНК/РНК. Выявление метки происходит с помощью флюоресцентного микроскопа.

Метод FISH был введен более 30 лет назад (в 1980-х гг.). Он широко распространился как метод физического картирования генов на хромосомах.

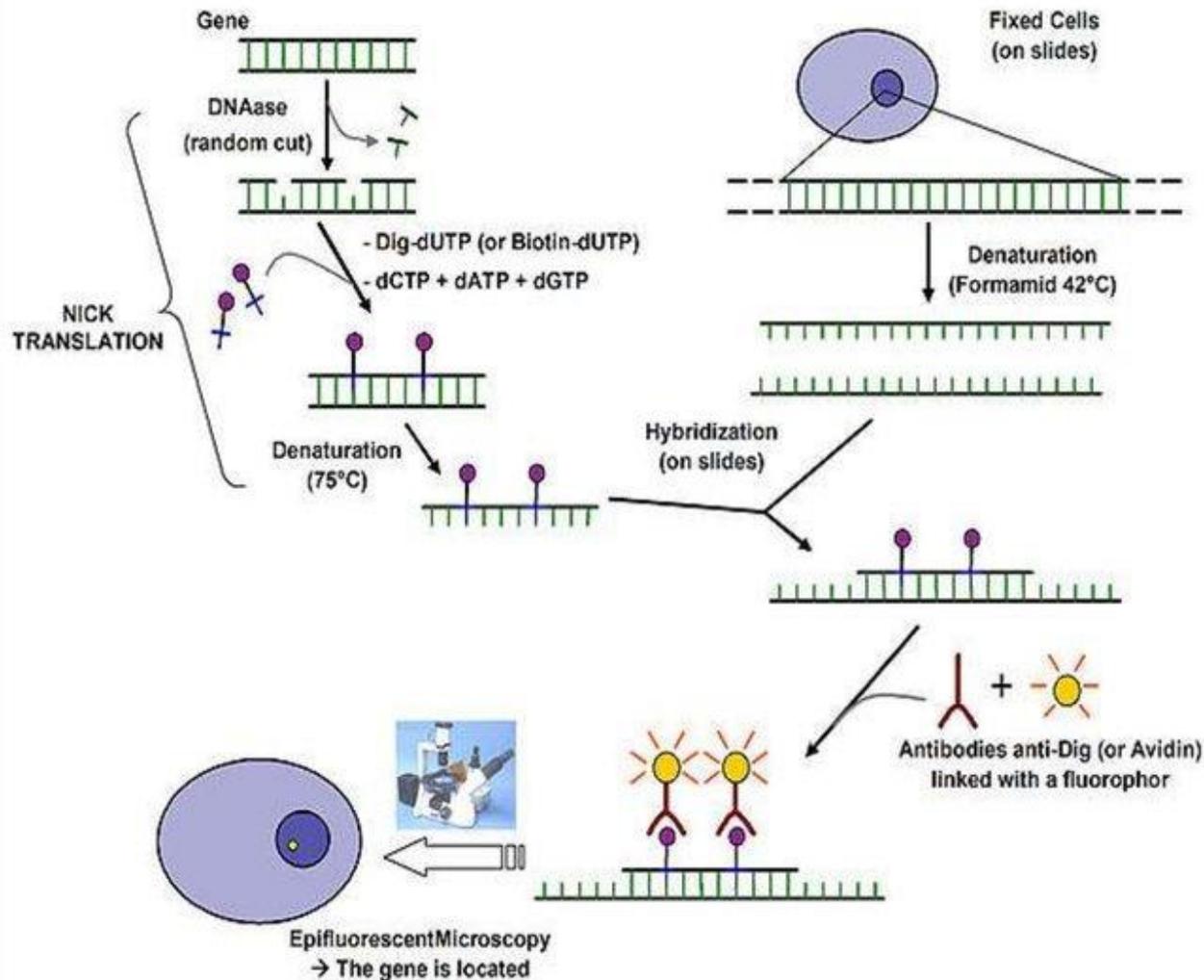
Позднее он стал применяться в других областях исследований (в областях клинической генетики, нейронауки, репродуктивной медицины, токсикологии, микробной экологии, эволюционной биологии, сравнительной геномики, клеточной геномики и хромосомной биологии).

На данный момент FISH преимущественно используется для построения физических и генетических карт хромосом, для выявления структурных перестроек, транслокаций, микроделеций, генных амплификаций в интерфазных и метафазных хромосомах.

В результате развития науки (лучшего понимания химических и физических свойств нуклеиновых кислот и хроматина), а также развития флюоресцентной микроскопии и цифровой визуализации, метод постоянно совершенствовался (произведено улучшение чувствительности, специфичности, разрешения), и было разработано много вариаций данного метода.

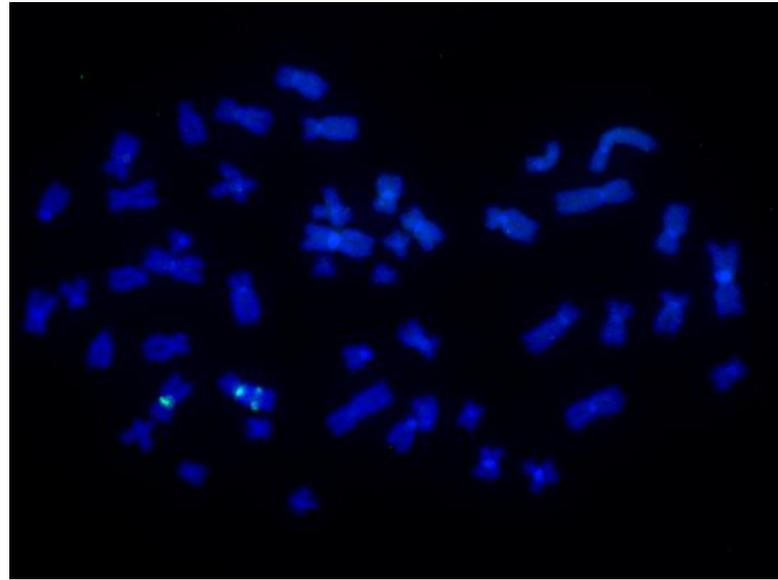
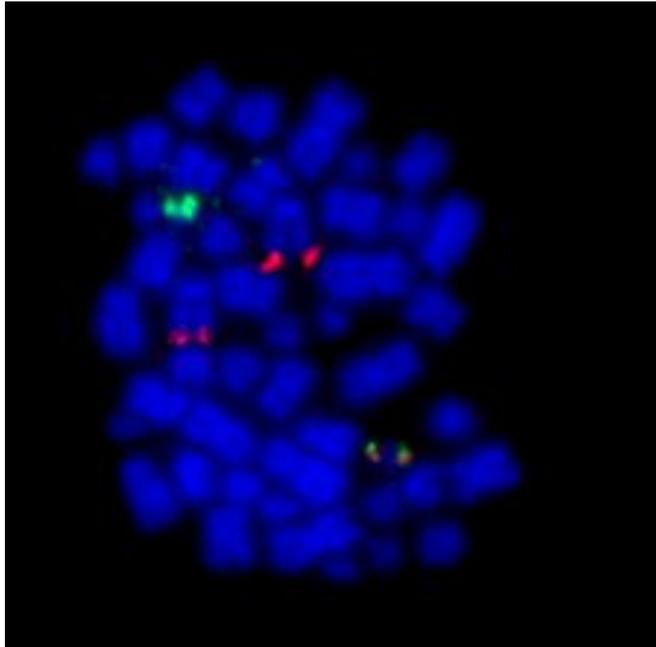
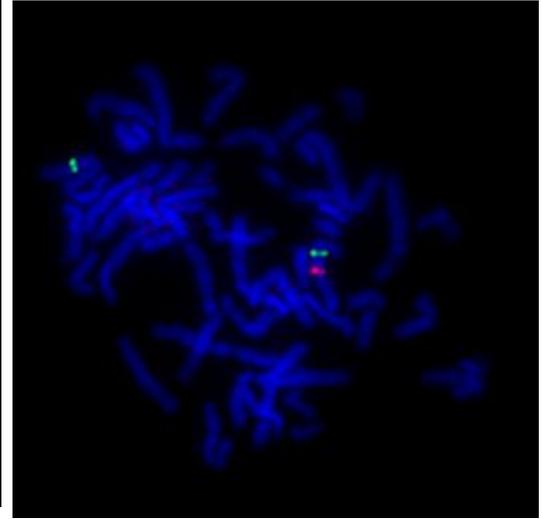
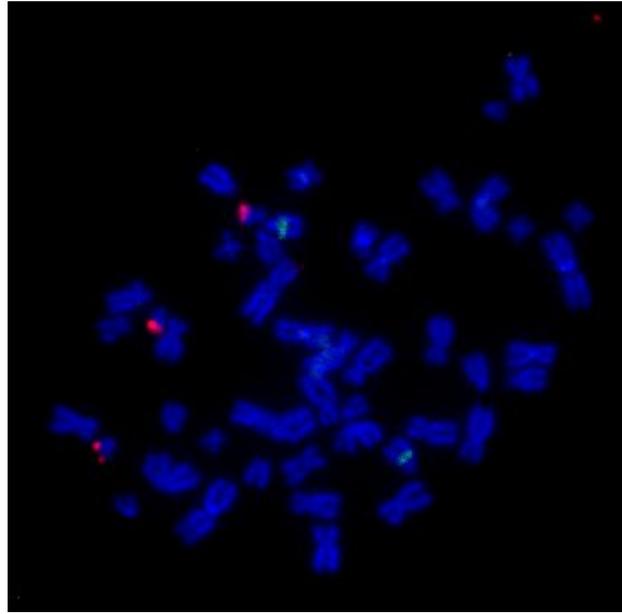
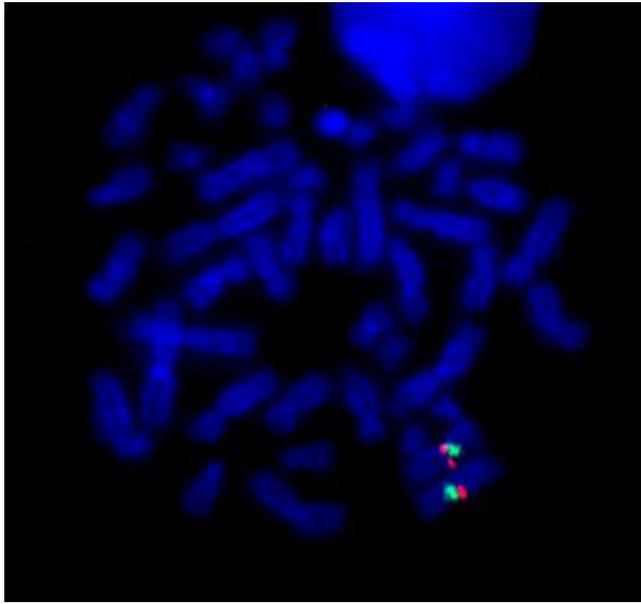
# Этапы FISH - метода

## FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)



Суть метода заключается в приготовлении коротких последовательностей ДНК, называемых **зондами**, которые являются комплементарными по отношению к последовательностям ДНК, представляющим объект изучения.

Зонды гибридизуются (связываются) с комплементарными участками ДНК и благодаря тому, что они помечены **флуоресцентной меткой**, позволяют видеть локализацию интересующих генов в составе ДНК или хромосом.



# Секвенирование ДНК

- определение первичной нуклеотидной последовательности (от англ. sequence — последовательность).
- В результате секвенирования получается линейное символьное описание, которое сжато резюмирует атомную структуру молекулы ДНК.

# Секвенирование ДНК

- Для секвенирования применяются методы Эдмана, Сэнжера и другие;
- в настоящее время для секвенирования нуклеиновых кислот обычно применяется метод Сэнжера с дидезоксинуклеозидтрифосфатами (ddNTP).
- Обычно до начала секвенирования при помощи ПЦР производят амплификацию участка ДНК, последовательность которого требуется определить.

# Секвенирование ДНК по Сэнжеру

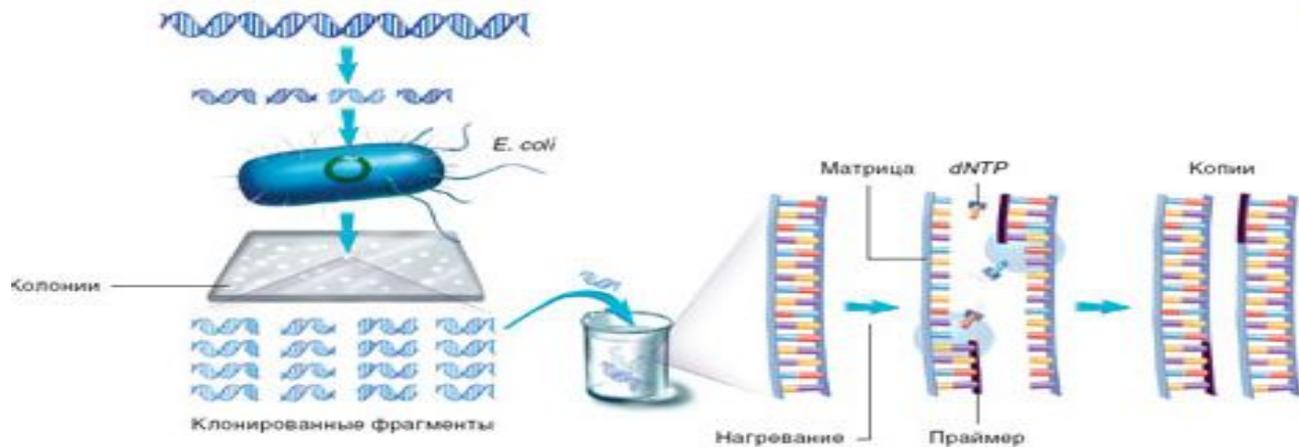
- Методология секвенирования была разработана в конце 1970-х гг. английским биохимиком Фредериком Сэнжером.



(из <http://www.internet-school.ru>)

# Секвенирование ДНК по Сэнжеру

- Перед секвенированием молекулу ДНК разрезают на фрагменты и клонируют в *Escherichia coli*. Выделенные из бактериальных клеток фрагменты многократно амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)



(из <http://wsyachina.narod.ru>)

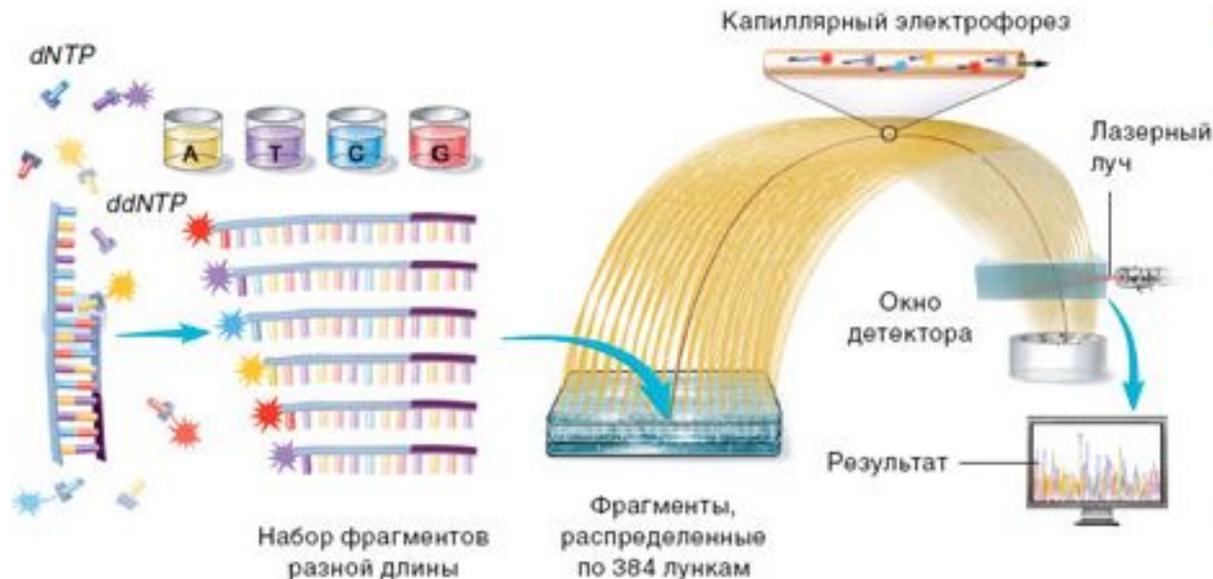
# Секвенирование ДНК по Сэнжеру

- Раствор с одноцепочечными фрагментами и праймерами распределяют по четырём пробиркам, в каждую из которых добавлены четыре разные dNTP и один из флуоресцентно меченных дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddNTP). Удлинение гибридизовавшегося с ДНК-фрагментом праймера происходит до тех пор, пока в цепь не включится ddNTP. В этом месте синтез останавливается, и в результате в каждой из пробирок образуется уникальный набор отрицательно заряженных фрагментов разной длины, оканчивающихся одним из меченых ddNTP.

# Секвенирование ДНК по Сэнжеру

- Фрагменты разделяют по размеру с помощью капиллярного электрофореза. Когда фрагменты определённой длины проходят через окно детектора, освещаемое лазерным лучом, ddNTP начинают флуоресцировать. Длина волны флуоресценции зависит от того, какой именно ddNTP находится у них на конце, так что на выходе получается цветная картинка, которую можно трансформировать в нуклеотидную последовательность.

(из  
<http://wsyachina.narod.ru>)



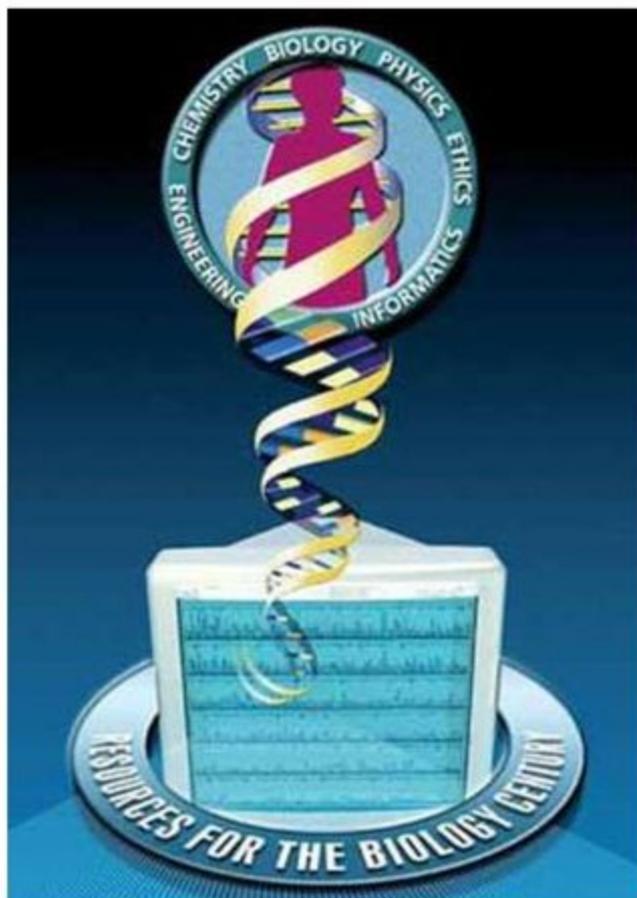
## Автоматическое секвенирование ДНК

- Особенно перспективным для массового секвенирования в автоматическом режиме оказалось применение меченых различными флуорохромами дидезоксинуклеотидов. В этом варианте секвенирования каждому из нуклеотидов соответствует свой цвет полосы в геле, что хорошо распознается в автоматическом режиме.
- Этот метод нашел широкое применение в реализации программы «Геном человека».

# Расшифровка генома человека

Основной метод расшифровки геномов – секвенирование (определение нуклеотидных последовательностей ДНК)

**Метод был разработан в 1977 году, а сегодня - это уже технологичная рутина.**



**В 1990 г.** при поддержке США, а также ряда других стран, был запущен 3 млрд. проект **«Геном человека»**. Возглавил его Фрэнсис Коллинз, глава International Human Genome Sequencing Consortium

**Целями проекта являлись:**

- **определение последовательности 3 млрд. пар оснований, составляющих ДНК гаплоидного набора хромосом человека – 22 аутосом + X-хромосомы + Y-хромосомы), и сохранение этой информации в базе данных;**

- **идентификация генов человека;**

- **усовершенствование приборов для анализа данных;**

- **исследование этических, правовых и социальных вопросов, возникающих при расшифровке генома.**

## Проект «Геном человека» (Human Genome Project)

1988 г.	Появился Национальный институт исследования генома человека (National Human Genome Research Institute, NHGRI)
1995 г.	NHGRI публикует первую полную последовательность ДНК живого организма — бактерии <i>Haemophilus influenzae</i>
1996 г.	Определен первый геном эукариотической клетки клетки дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1998 г.	Опубликована первая последовательность ДНК многоклеточного организма — плоского червя <i>Caenorhabditis elegans</i>
июнь 2000 г.	Проведена первая реконструкция полного генома человека
2003г.	Осуществлена полная расшифровка ДНК, оставалась только первая хромосома человека — последняя из нерасшифрованных хромосом.
17 мая 2006 г.	Секвенирована самая большая, первая хромосома.

Число генов у человека оценено в 20 - 25 тысяч

