

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ**

ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ

МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Кафедра молекулярной биологии и генетики

РЕФЕРАТ

по дисциплине «Методы и объекты генетического анализа»

ТЕМА: Тетрадный анализ независимого и сцепленного наследования.

Студентка гр. 301

Салова В.В.

Преподаватель

Антон Александрович
Замарин

Волгоград
2021

АННОТАЦИЯ

Цель: ознакомление с темой тетрадного анализа независимого и сцепленного наследования.

Мы рассмотрим, что представляет собой метод тетрадного анализа, последовательность действий и на каких организмах он обычно осуществим. Так же рассмотрим тетрадный анализ независимого и сцепленного наследования, выявим, в чем их отличительные особенности. Рассмотрим примеры решения задач на тетрадный анализ.

СОДЕРЖАНИЕ

	Введение	4
1.	Понятие тетрадного анализа	5
1.1	Разделение, проращивание спор и анализ.	5
1.2	Особенность тетрадного анализа – картирования центромеры	6
2.	Тетрадный анализ	10
2.1	Тетрадный анализ независимого наследования.	10
2.2	Тетрадный анализ сцепленного наследования	14
	Заключение	18
	Список литературы	19

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность.

Изолируя в ходе тетрадного анализа споры каждой отдельной тетрады, можно устанавливать генотип исходных диплоидных клеток, а также следить за поведением отдельных генов, центромер и целых хромосом в мейозе. Однако, открытие данного метода также позволило впервые непосредственно доказать, что менделевское расщепление является результатом закономерного хода мейоза, что оно представляет не статистическую, а биологическую закономерность.

1. Понятие тетрадного анализа.

Тетрадный анализ - метод генетического анализа низших эукариотных организмов, основанный на одновременном изучении генотипов всех четырёх гаплоидных продуктов мейоза отдельной диплоидной клетки.

Тетрадный анализ используется при изучении организмов, образующих стабильные, но в последствие распадающиеся тетрады (водоросли, грибы), которые остаются внутри оболочки родительской клетки.

Предпосылкой для использования тетрадного анализа в современной генетике служит то, что любая пара аллельных генов даёт в тетрадах расщепление 2:2. В некоторых экспериментах наблюдаются отклонения от подобного расщепления. В тех случаях, когда эти отклонения очень редки, обнаружить и изучить их можно практически только с помощью тетрадного анализа.

1.1. Разделение, проращивание спор и анализ.

Если происходит расщепление по одной аллельной паре (В и b), то соотношение аскоспор во всех асках должно быть 2В:2b (или 4В:4b, если аски восьмиядерные), что служит прямым доказательством закона чистоты гамет. В тетрадном анализе не сокращают коэффициенты, т.е. не пишут 1В:1b, (такая запись означает, что из 4 (или 8) аскоспор проросло только 2). Однако, такой анализ возможен только, когда при мейозе образуются четыре жизнеспособные гаплоидные клетки и когда эти клетки остаются какое-то время соединёнными, не распадаясь и не перемешиваясь со спорами иного происхождения.



Отклонения в расщеплении при моногенном контроле редки и могут быть связаны с конверсией гена. Появление значительного количества тетрад, имеющих отклонение от расщепления 2:2 по изучаемому признаку, например 4:0,3:1, свидетельствует об участии в расщеплении более одного гена. Другие причины отклонений – хромосомные перестройки, анеуплоидия и др., которые снижают жизнеспособность аскоспор и тем самым влияют на расщепление.

1.2. Особенность тетрадного анализа – картирования центромеры

Картирование центромеры, позволяет выступать этой части хромосомы в качестве генетического маркера.

Существует упорядоченные и неупорядоченные тетрады. Упорядоченные тетрады спор - аски, в которых споры лежат в том порядке, как происходило расхождение наборов хромосом в двух делениях созревания. Неупорядоченные - аски, где расположение спор случайно и не отражает порядка расхождения наборов. Упорядоченные тетрады свойственны тем аскомицетам, которые образуют линейные аски, в частности *Neurospora*, *Sordaria*, *Podospora*, у которых четыре пары спор располагаются в ряд.

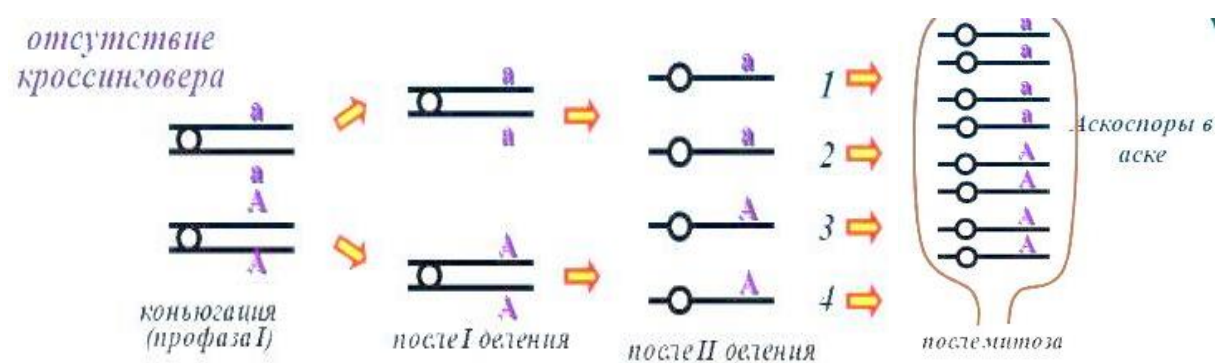
Такие аски иногда образуются и некоторыми штаммами дрожжей-сахаромицетов, которым, однако, более свойственны неупорядоченные тетрады. Последние характерны также и для *Aspergillus*, *Ascobolus*, базидиомицетов.

В упорядоченных тетрадах картирование центromеры можно сделать на основе расщепления по одному гену, анализируя порядок расположения спор разного генотипа (А и а) в аске.

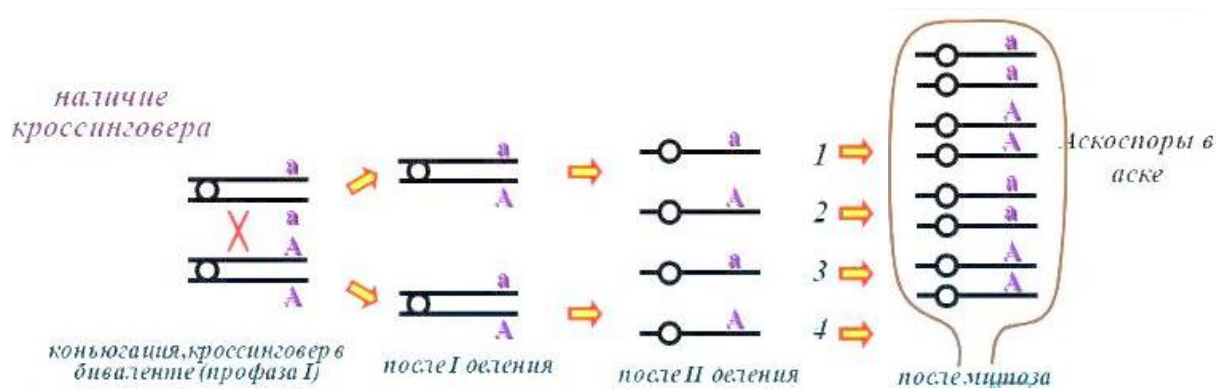
В неупорядоченных тетрадах картирование центromеры можно сделать на основе расщепления по трем генам, анализируя порядок расположения спор разного генотипа в аске.

Возможны два типа расхождения хромосом в мейозе, которые определяют порядок расположения спор в аске: расхождение в первом делении мейоза (pIд) и во время второго деления мейоза (pIIд).

Если в мейозе в гетерозиготной клетке не происходит кроссинговер между геном и центromерой, то расхождение аллелей идет в первом делении мейоза (pIд), если происходит - во втором делении мейоза (pIIд).



Расхождение аллелей в первом делении мейоза у нейроспоры. Порядок расположения спор в аске ааааАААА / ААААаааа зависит от ориентации хромосом бивалента в метафазе I деления.



Расхождение аллелей во втором делении мейоза у нейроспоры. Порядок расположения спор в аске определяется ориентацией хромосом бивалента в метафазе I деления хроматид в метафазе II деления. Может иметь 4 варианта: aaAaaAA / AAaaAAa / aaAAAAa / AAaaaaAA.

То есть можно сделать вывод, что порядок расположения спор в асках нейроспоры позволяет выявить, в каких из них произошел кроссинговер между геном и центромерой, и вычислить, расстояние между ними. А также для определения частоты кроссинговера необходимо подсчитать число асков, в которых он произошел (pИд), и определить их долю среди всех проанализированных асков. Так как в кроссоверном аске только половина спор является кроссоверными. А расстояние между геном и центромерой определяют как $\frac{1}{2}$ от доли кроссоверных асков.

Пример.

В скрещивании между штаммом нейроспоры, продуцирующим черные споры, со штаммом, дающим споры рыжего цвета в поколении гетерозиготы обнаружены аски со следующим расположением спор (всего 146):

Число асков	Споры			
	1, 2	3, 4	5, 6	7, 8

58	черные	черные	рыжие	рыжие
62	рыжие	рыжие	черные	Черные
8	черные	рыжие	рыжие	Черные
6	рыжие	черные	черные	Рыжие
5	рыжие	черные	рыжие	Черные
7	черные	рыжие	черные	Рыжие

Соотношения спор разной окраски в каждом аске – 4:4, следовательно различия обусловлены аллелями одного гена. Порядок расположения спор в 26 асках свидетельствует о расхождении аллелей во втором делении, т.е. о прошедшем кроссинговере между геном и центромерой. Доля кроссоверных асков=17,8%; расстояние 8,9.

2. Тетрадный анализ.

Ход анализа.

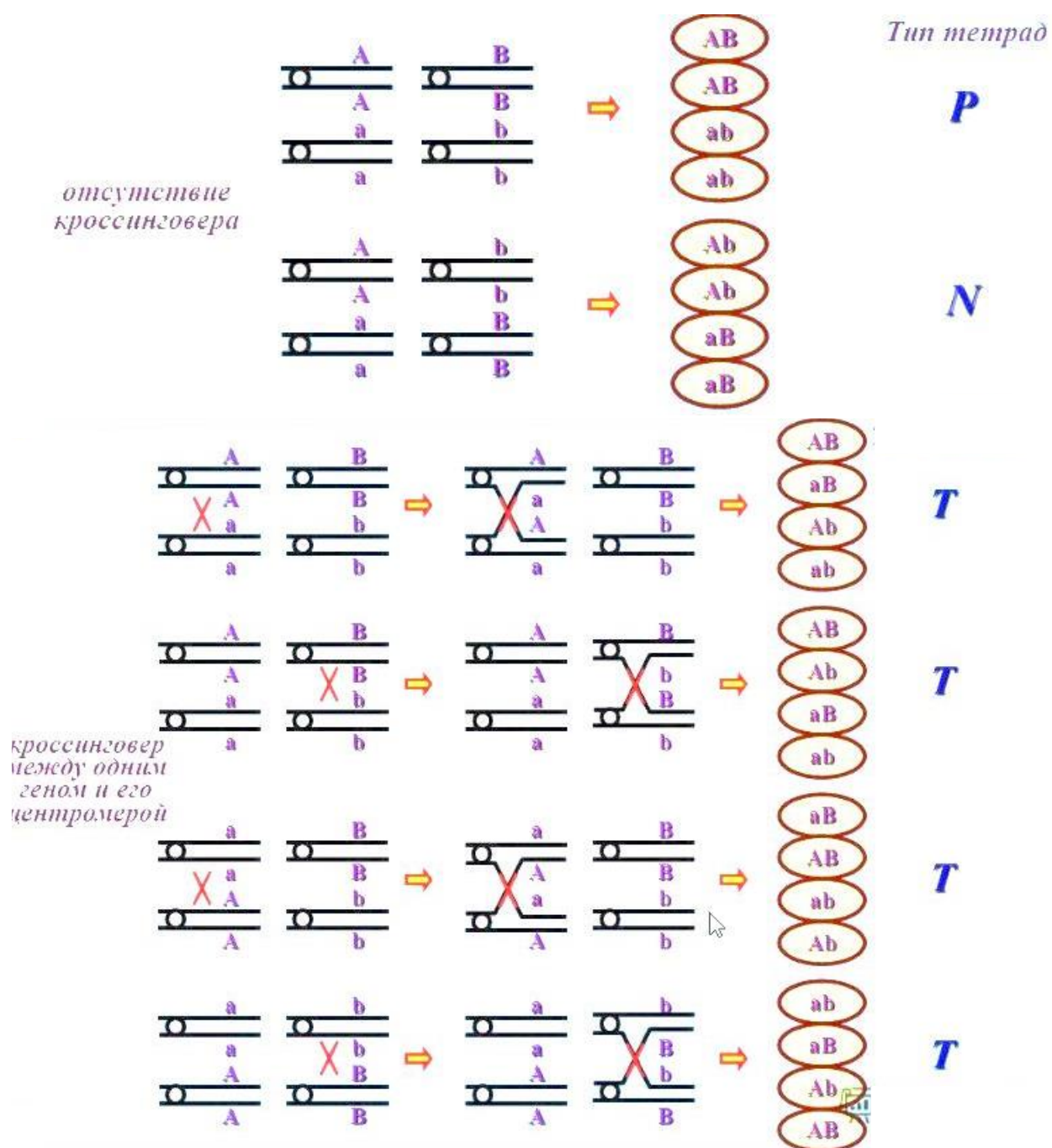
1. Из аска по порядку извлечь споры.
2. Прорастить их на питательных средах (полноценной, минимальной, селективных).
3. Определить фенотипические проявления признака.
4. Определить генотип анализируемого организма – генотип споры.
5. Определить тип тетрады.
6. Сформировать группы для асков с тетрадами определенного генотипа.
7. Определить соотношение асков с тетрадами разных типов (P, N, T).
8. Выдвинуть гипотезу о генотипах родительских организмах и характере наследования признаков.
9. Осуществить статистическую проверку соответствия выдвинутой гипотезы с полученными результатами.

2.1. Тетрадный анализ независимого наследования

При независимом наследовании у аскомицетов с упорядоченными тетрадами (октадами) по каждому гену образуется 6 типов тетрад: ген А - ААаа, ааАА, АаАа, аАаА, АааА, аААа; ген В - ВВbb, bbВВ, VbVb, bVbV, VbbV, bVbV; образование равновероятностное при отсутствии сцепления с центромерой (более 33%). При этом образуется три типа тетрад с разным сочетанием генов А и В:

(I)	P	–	родительский	диплотип:	AB,	AB,	ab,	ab;		
(II)	N	–	неродительский	диплотип:	Ab,	Ab,	aB,	aB;		
(III)	T	–	тетратип,	содержит 4	разных	генотипа:	AB,	Ab,	aB,	ab.

Т-тип тетрад возникает только при кроссинговере между генами и их центромерами.



При независимом расщеплении двух генов, каждый из которых достаточно удален от центромера, ожидается соотношение типов тетрад $1P : 1N : 4T$. Его можно вывести из результатов, представленных в табл. 1.2. Типы тетрад P , N и T возникают при различных сочетаниях r_{II} и r_{I} по гену A с r_{II} и r_{I} по гену B . Обозначим f_{IA} и f_{IIA} частоты расщепления гена A при I и II делениях (f_{IB} и f_{IIB} соответственно для гена B). Если $f_{IA} = 0,33$; $f_{IIA} = 0,67$; $f_{IB} = 0,33$; $f_{IIB} = 0,67$, то по табл. 1.2 может быть легко вычислена вероятность возникновения тетрад P , N и T . Получаем

$$f_P = f_N, f_T = 0,67,$$

где f_P , f_N , f_T соответственно частота появления тетрад типов P , N , T . Хотя приводимые в табл. 1.2 расщепления по A - и B -генам различимы лишь в упорядоченных тетрадах, они происходят и при образовании неупорядоченных тетрад. В упорядоченных тетрадах при дигибридном скрещивании можно различить большое число типов тетрад (отличающихся порядком спор), в неупорядоченных - только три - P , N и T .

Тип расщепления гена B и его частота	Тип расщепления гена A и его частота					
	$AAaa$ 0,5 (1 — — f_{IIA})	$aaAA$ 0,5 (1 — — f_{IIA})	$AaaA$ 0,25 f_{IIA}	$aAAa$ 0,25 f_{IIA}	$aAaA$ 0,25 f_{IIA}	$AaAa$ 0,25 f_{IIA}
$BBbb$ 0,5 (1 — f_{IIB})	P	N	T	T	T	T
$bbBB$ 0,5 (1 — f_{IIB})	N	P	T	T	T	T
$BbbB$ 0,25 f_{IIB}	T	T	P	N	T	T
$bBBb$ 0,25 f_{IIB}	T	T	N	P	T	T
$bBbB$ 0,25 f_{IIB}	T	T	T	T	P	N
$BbBb$ 0,25 f_{IIB}	T	T	T	T	N	P

Таблица 1.2. Образование различных типов тетрад в дигибридном скрещивании в зависимости от типа расщепления первого и второго генов

(Примечание Частота расщепления при втором делении - f_{II} , четыре возможных при этом порядка спор возникают с равной вероятностью; частота расщепления при первом делении - $f_I = 1 - f_{II}$ два возможных при этом порядка спор возникают с равной вероятностью)

В упорядоченных тетрадах генотип каждой споры и тип тетрады определяют по росту колоний, выросших из спор, извлеченных из аска по порядку, на полной, минимальной и селективной средах. Число селективных сред зависит от числа маркеров, используемых в скрещивании. Затем суммируют аски с одинаковым типом тетрад,

определяют соотношение асков с тетрадами разных типов (P, N, T) и по χ^2 проверяют соответствие опытного расщепления с теоретически ожидаемым – 1P: 1N: 4T. Применение метода χ^2 возможно лишь в том случае, когда количество проанализированных тетрад не менее 30. Практически опытные данные сравнивают с теоретически ожидаемым отношением при независимом наследовании с помощью статистического метода χ^2 . Специально для тетрадного анализа соответствующие формулы были выведены Н. Н. Хромовым-Борисовым:

$$\chi_{1:1:4}^2 = \frac{4(P-N)^2 + (T-4P)^2 + (T-4N)^2}{4(P+N+T)} = \frac{3(P-N)^2}{P+N+T} + \frac{|2(P+N)-T|^2}{2(P+N+T)} = \chi_{1:1}^2 + \chi_{2:4}^2.$$

Здесь P, N и T - число соответствующих тетрад, проанализированных в эксперименте. Вычисленное по этой формуле значение χ^2 сравнивается с данными таблицы при числе степеней свободы $df = 2$.

Можно проверять отдельно соответствие соотношений P : N и (P + N) : T ожидаемому. С поправкой на дискретность формула

$$\chi_{1:1}^2 = \frac{3(|P-N|-0,5)^2}{P+N+T},$$

применима уже при $(P - N) \geq 8$, а формула

$$\chi_{2:4}^2 = \frac{|2(P+N)-T|^2}{2(P+N+T)},$$

при $[2(P+N) - T] \geq 30$ (поправка на дискретность в этом случае не является постоянной и поэтому не используется).

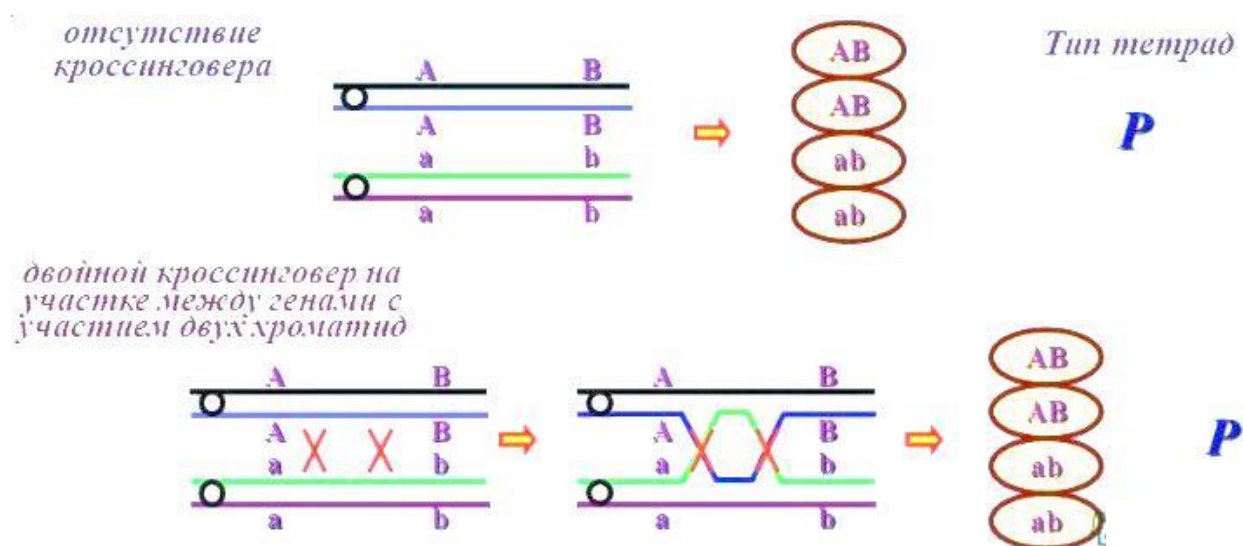
Эти формулы применимы при определенном значении разности P - N и (P + N) - T. Если в эксперименте значение разности оказалось меньше

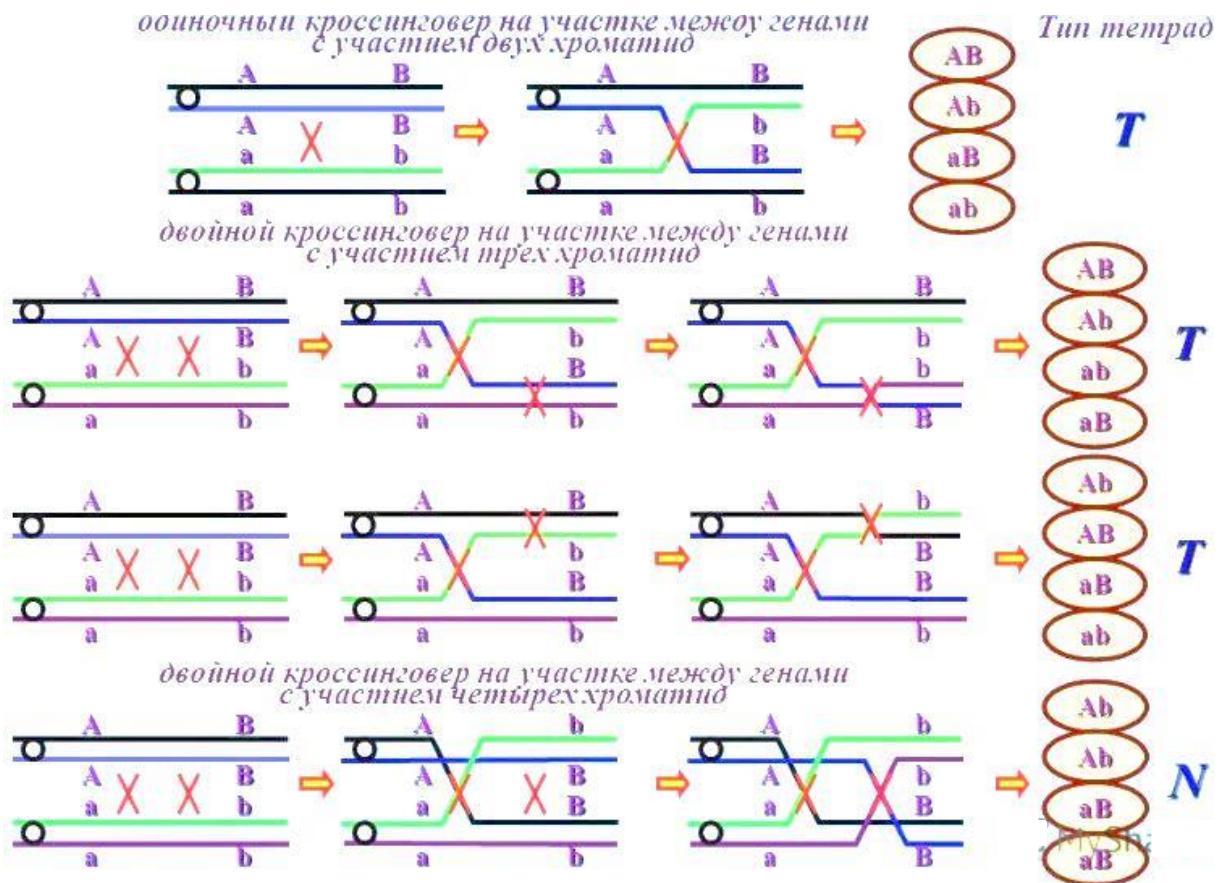
требуемой, а увеличить число анализируемых тетрад затруднительно, то следует обратиться к специальным таблицам, составленным Н. Н. Хромовым-Борисовым и М. И. Рахманом, которые приведены в работе И. А. Захарова и соавт.

2.2. Тетрадный анализ сцепленного наследования

При сцеплении между генами нарушается соотношение разных типов тетрад, свойственное независимому наследованию: увеличивается доля тетрад (I) P – родительского дитипа (AB, AB, ab, ab) и уменьшаются доли (II) N – неродительского дитипа (Ab, Ab, aB, aB) и (III) T – тетратипа (AB, Ab, aB, ab).

P-тип тетрад возникает при мейотическом делении в отсутствие кроссинговера и при наличии двойного кроссинговера на участке между генами с участием двух хроматид.





Закономерности

и

выводы:

- при сцепленном наследовании резко уменьшается доля N-тетрад, так как они возникают только при двойном кроссинговере между генами с участием четырех хроматид;
- доля T-тетрад зависит от расстояния между генами и от расстояния между каждым из них и центромёрой;
- Если частота P-тетрад больше, чем частота N-тетрад, а частота T-тетрад меньше чем, то это однозначно свидетельствует о сцеплении генов.

Так как N-тетрады содержат четыре, а T-тетрады только две кроссоверные хроматиды (споры), то расстояние между генами A и B (D_{AB}) можно определить по частоте N- и T-тетрад:

$$D_{AB} = f(N) + \frac{1}{2}f(T), \text{ в \% кроссинговера или сМ.}$$

Так как наблюдаемая частота рекомбинантов не всегда равна истинной частоте произошедших обменов (в случае, когда гены расположены далеко

друг от друга), так как множественные обмены по своим последствиям не отличаются от одиночных, а некоторые из них не проявляются фенотипически, вводят поправку. При этом для определения расстояния используют формулу:

$$D_{AB} = -33,33 \ln(1 - 1,5f(T)), \text{ в стрейнах (Стертевант и Холдейн).}$$

Если гены локализованы в разных хромосомах, но тесно сцеплены со своими центромерами, то $f(P)=f(N)$, а $f(T) < 2/3$, так как для появления Т-тетрад необходимо прохождение кроссинговера между геном и центромерой. Чем ближе ген расположен к центромере, тем реже появляются Т-тетрады. Следовательно, возникновение Р и N тетрад при тесном сцеплении генов с центромерами не связано с кроссинговером, поэтому их соотношении остается равным 1:1.

Пример.

При скрещивании двух штаммов дрожжей, различающихся по трем генам (а) s, t, u X (А) +++ в потомстве гетерозигот, выращенных на соответствующих селективных средах, получили следующие результаты тетрадного анализа:

Число тетрад	Тип тетрад			
59	stu	Stu	STU	STU
53	sTu	STu	StU	StU
26	stU	StU	sTu	STu
30	sTU	STU	stu	Stu
32	Stu	StU	sTu	STU
Всего: 200				

Анализ.

Определяем тип тетрад и расщепление по каждой паре отдельно:

Расщепление s-t:

59P:53N:88T, 1:1:4 $\chi^2=32,9$ $p < 0,01$.

P=N, $T < 2/3$,

-гены в разных хромосомах,

-тесно сцеплены со своими центромерами.

Расщепление s-u:

144P:56T,

P>N, T < 2/3, N=0,

-гены сцеплены

$D_{su} = \frac{1}{2} * 56 / 200 = 14\%$

$D_{su} = -33,33 \ln(1 - 1,5 * 56 / 200) = 18.1\%$

Расщепление t-u:

89P:79N:32T,

P=N, T < 2/3,

-гены в разных хромосомах,

-тесно сцеплены со своими центромерами.

Тип тетрад для каждой пары генов			Число тетрад
s – t	s - u	t - u	
P	P	P	59
N	P	N	53
T	T	N	26
T	T	P	30
T	P	T	32

Вывод:

Гены s и u локализованы в одной хромосоме на расстоянии 14 % кроссинговера.

Ген t локализован в другой хромосоме и тесно сцеплен со своей центромерой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ознакомились с темой тетрадного анализа независимого и сцепленного наследования.

Выявили, что данный метод используется на водорослях и грибах. При помощи него устанавливается генотип исходных диплоидных клеток, а также исследуется поведение отдельных генов, центромер и целых хромосом в мейозе.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Генетика микроорганизмов/ сост. Захаров И. А., Квитко К. В., 1967.
2. Генетические карты микроорганизмов/ Захаров И.А., Мацелюх Б.П. -
Киев: Наукова думка, 1986
3. <https://studfile.net/preview/6859410/page:8/>
4. mod_asp_gen_analysis_03.pps