

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-биологический факультет

Кафедра Молекулярной биологии и генетики

РЕФЕРАТ

по дисциплине «Методы и объекты генетического анализа»

Тема: «Молекулярно-генетические маркеры и их использование для
картирования генов с неизвестной функцией.»

Студентка гр. 301 _____ Коскина Я.В.

Преподаватель _____ Замарин А.А.

Волгоград – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	2
1. Молекулярные маркеры.....	3
2. Маркеры на основе ДНК-зондов.....	4
3. Маркеры полимеразной цепной реакции.....	5
4. Использование ДНК-маркеров для картирования генов с неизвестной функцией.....	7
Список литературы	9

Введение.

Еще в первые десятилетия развития генетики стало ясно, что генетические маркеры могут быть полезными при анализе сложных признаков. Однако низкая встречаемость и ряд других недостатков не позволили классическим генетическим маркерам, а впоследствии и белковым маркерам широко войти в селекционную практику. Последнее поколение генетических маркеров (молекулярные, или ДНК-маркеры) характеризуется более высокой частотой встречаемости в геноме и основано на универсальных, а значит широко востребованных и постоянно развивающихся методах анализа. Это стало залогом бурного развития направлений генетики и селекции, связанных с использованием ДНК-маркеров.

1. Молекулярные маркеры.

Молекулярные маркеры (синоним – ДНК- маркеры) – это полиморфный признак, выявляемый методами молекулярной биологии на уровне нуклеотидной последовательности ДНК, для определенного гена или для любого другого участка хромосомы при сравнении различных генотипов, особей, пород, сортов, линий.

ДНК-маркеры являются третьим поколением генетических маркеров. Им предшествовали белковые маркеры, а еще ранее – классические генетические маркеры.

Классический генетический маркер соответствует гену, аллели которого имеют четко выраженные отличия на уровне фенотипа.

Белковый маркер соответствует гену, аллели которого имеют отличия (разную молекулярную массу) на уровне белкового продукта.

Молекулярный маркер соответствует гену или некодирующему участку генома, разные варианты (аллели) которого отличаются на уровне ДНК.

Отличия на уровне ДНК (полиморфизм ДНК) могут быть выявлены:

- с помощью гибридизации с известными нуклеотидными последовательностями;
- при секвенировании нуклеотидной последовательности;
- при сравнении длины фрагментов, полученных с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- в результате обработки ДНК эндонуклеазами рестрикции.

2. Маркеры на основе ДНК-зондов.

К маркерам на основе ДНК-зондов относят:

1. RFLP (ПДРФ-маркеры) — Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

Оценка полиморфизма длин рестриктных фрагментов ДНК может быть осуществлена разными способами, но наиболее традиционен метод с использованием блот-гибридизации. Этот метод включает в себя выделение ДНК, получение фрагментов рестрикции, их электрофоретическое разделение, перенос на фильтры с последующей гибридизацией специфических ДНК-зондов с полученными фрагментами ДНК. ДНК-зонд — относительно короткая последовательность клонированной ДНК с определенным уровнем гомологии и способностью гибридизоваться с соответствующим участком геномной ДНК. Комбинации рестриктаз и зондов дают высоко-воспроизводимые полиморфные спектры фрагментов ДНК, специфичные для каждого индивидуума. Различия между последними могут быть обусловлены, например, мутациями, меняющими сайт рестрикции. ПДРФ имеет ряд важных преимуществ, в числе которых высокая воспроизводимость спектров в разных лабораториях, кодоминантное «поведение» маркера.

ПДРФ эффективен при картировании генома, маркировании генов многих биологических и экономически важных признаков.

2. VNTR. Этот метод получил название ДНК фингерпринта (отпечатки пальцев). Тандемные повторы широко распространены в разных геномах и высокополиморфны. В результате высокой вариабельности этих участков ДНК ПДРФ-анализ с зондами к микро- и минисателитным последовательностям позволяет получать мультилокусные спектры с высоким разрешением на популяционном уровне. VNTR-аллельные варианты имеют кодоминантный характер наследования.

3. Маркеры полимеразной цепной реакции.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) предполагает использование специфических праймеров и получение дискретных ДНК-продуктов амплификации отдельных участков геномной ДНК. Большое количество родственных технологий построено на этом принципе.

SSR — (англ. Simple Sequence Repeats), ПЦР с флангирующими праймерами к короткому мини или микросателлитному повтору позволяет выявлять маркеры с кодоминантным наследованием и, соответственно, удобен для выявления гетерозигот по данному локусу.

RAPD — (англ. Random Amplified Polymorphic DNA), полимеразная цепная реакция с использованием единичного короткого, обычно, 10-членным праймеров, с произвольной нуклеотидной последовательностью. Последовательность праймеров не абсолютно любая, а ограничена в пределах 40-70 % GC-состав и 50-100 % лингвистической сложности нуклеотидной последовательности.

ISSR — (англ. Inter Simple Sequence Repeats), специализированный вариант RAPD метода, в котором праймер состоит из микросателлитной последовательности. В этом методе, также как и в RAPD, используется один или несколько праймеров, длиной в 15-24 нуклеотида.

AFLP — (англ. Amplified Fragment Length Polymorphism), технология представляет собой комбинацию между ПДРФ и ПЦР методов. AFLP — сложный метод и состоит из нескольких этапов: геномная ДНК одновременно рестрицируется двумя рестриктазами (EcoRI и MseI). Затем рестрицированная геномная ДНК лигируется с адаптором, содержащим «липкие» концы для рестрикционных сайтов (EcoRI и MseI). После этого проводится две последовательные ПЦР. Разделение фрагментов ДНК выполняется в полиакриламидном геле, с радиоактивной или флюоресцентной меткой, соответственно.

SSAP — (англ. Sequence Specific Amplification Polymorphism) явился модификацией метода AFLP, для выявления полиморфизма как по сайту рестрикции, так и по вставки в геномную ДНК транспозона или ретротранспозона. Геномная ДНК исследуемых образцов расщепляется рестриктазами PstI и MseI, получают фрагменты с выступающими 3'-концами. Затем рестрицированная ДНК лигируется с PstI и MseI адапторами.

IRAP — (англ. Inter Retrotransposone Amplified Polymorphism), полимеразная цепная реакция между праймерами, комплементарными последовательностям двух рядом расположенных LTR ретротранспозона. Метод имеет несколько вариантов. В первом варианте IRAP используется единственный праймер из LTR. В другом варианте IRAP используются два разных праймера к инвертированным LTR: один праймер с 5'-конца, а другой с 3'-конца LTR, ориентированные в разные стороны от ретротранспозона.

REMAP — (англ. Retrotransposone Microsatellite Amplified Polymorphism), полимеразная цепная реакция между праймером к фрагменту LTR ретротранспозона и праймером из рядом расположенного, простого микросателлитного повтора (ISSR праймер). В данном случае позиция амплифицируемого фрагмента ретротранспозона «заякоривается» путём использования праймера к микросателлитному локусу.

RBIP — (англ. Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms), метод, основанный на использовании праймеров к последовательностям ретротранспозонов и выявляющий кодоминантные аллельные варианты. Его принцип основан на мультилокусной ПЦР, в которой используются пара праймеров, фланкирующих участок ДНК до ретротранспозиции и праймер к LTR ретротранспозона, который встроен в данный участок между первыми двумя праймерами.

iPBS — (англ. inter PBS amplification), метод, основанный на использовании праймеров к PBS (англ. Primer Binding Site, участок связывания тРНК) последовательностям ретротранспозонов.

4. Использование ДНК-маркеров для картирования генов с неизвестной функцией.

С внедрением ДНК-маркеров наибольший размах приобрели среди прочих такие направления, как построение молекулярных карт отдельных хромосом и геномов, картирование на них генов и локусов количественных признаков (QTL).

Картирование гена – определение группы сцепления и положения картируемого гена относительно других генов и маркеров данной хромосомы.

QTL (quantitative trait locus) – локус, связанный с определением количественного признака.

RFLP-маркеры, разработанные для одного вида, могут использоваться для анализа геномов родственных видов и родов. Таким образом, стало возможным сравнительное картирование геномов, благодаря которому внутри отдельных семейств удалось выявить ряды ортологичных генов и проследить преобразования структуры генома отдельных видов в ходе эволюции от общего предка. Результаты этих работ крайне важны для современных исследований в области сравнительной геномики.

Благодаря использованию RFLP-карт появилась возможность определять точное положение отдельных генов в геноме и клонировать их последовательности на основе картирования (map-based gene cloning – позиционное клонирование генов).

Среди ПЦР-маркеров наиболее подходящими и востребованными для картирования генов и геномов оказались микросателлитные (SSR) маркеры.

Именно с ПЦР-маркерами началось широкое внедрение ДНК-маркеров в селекционный процесс. С помощью молекулярных маркеров можно проводить отбор по генотипу, тогда как в традиционной селекции отбор индивидуумов для скрещиваний осуществляется на основе анализа фенотипа. Отбор по генотипу имеет ряд преимуществ по сравнению с отбором по фенотипу.

Образцы для генотипирования можно отобрать практически в любой удобный момент. Отбор проб для выделения необходимого количества ДНК на ранних стадиях развития селектируемых организмов позволяет своевременно изымать из селекционного процесса значительное количество

материала, не потратив на анализ и уход за ним лишних средств. Генотип не зависит от изменения условий среды. Так же с легкостью можно отличить доминантные гомозиготы от гетерозигот. При использовании ДНК-маркеров можно подобрать подходящие пары и осуществить гибридизацию в текущем поколении. Это также ускоряет селекционный процесс.

Список источников:

1. <https://vavilov.elpub.ru/jour/article/view/220/221>
2. <https://www.vegetables.su/jour/article/viewFile/547/456>
3. <https://scienceforum.ru/2017/article/2017038630>