

КАЗАНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ



Молекулярно- генетические основы эволюции

Практическое занятие

для студентов 1 курса,
обучающихся по специальности «Лечебное дело» (ИОП)

Кафедра медицинской биологии и генетики



Цель: Изучить вопрос исторического развития биологического вида и эволюционные взаимоотношения между биологическими видами. Познакомиться с молекулярно-генетическими методами, позволяющими доказать эволюционные изменения.

• **Задачи:**

1. Научиться применять методы сравнительной геномике.
2. Знать основные маркеры в сравнительной геномике.
3. Научиться применять метод построения филогенетического древа
4. Применять закон Харди-Вайнберга применительно к популяционной генетике.

МЕТОДЫ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ

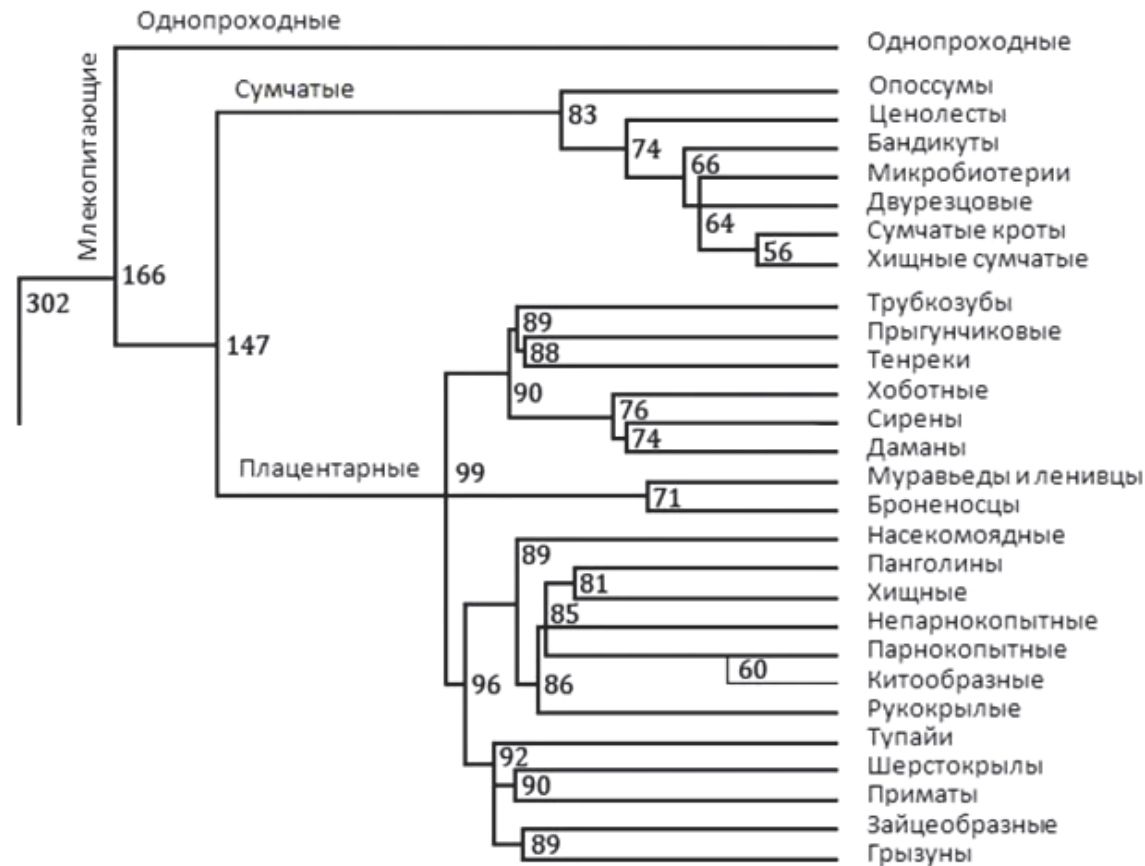
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕАЛОГИЯ

Используя ДНК-маркёры позволяет получить информацию, которая передаётся неизменной от отца к сыну по прямой мужской линии через Y-хромосому, или от матери к детям обоего пола через мтДНК. Маркеры позволяют установить общего предка, а также установить или опровергнуть родственные связи между людьми. Поскольку нуклеотидная последовательность в микросателлитах (STR-маркёры -короткие tandemные повторы) одинакова, а количество повторов разное, то они удобны для обнаружения в геноме и подсчёта их количества. Совокупность STR-маркёров индивидуального генома образует его уникальный **гаплотип**. В спец. базах данных записаны образцы гаплотипов, позволяющие строить генеалогическое древо. Локусы Y-хромосомы не подвергаются кроссинговеру и мутации встречаются крайне редко, примерно одна мутация на 500 поколений, или за 10000 лет. Например, последовательность AGAT представлена 17 повторами. В маркере DYS393 число повторений может колебаться от 8 до 17 ([AGAT]-[AGAT]). Число повторов в маркёрах сына будет тем же самым, что и у его отца. Однако в результате мутации число повторов в одной мужской линии может увеличиваться или уменьшаться, отец может иметь DYS393 = 15, а его сын DYS393 = 16. Учитывая примерную частоту возникновения мутаций, можно высчитать приблизительное время, когда жил общий предок по мужской линии. Обычно, для построения родословного дерева анализируют результаты нескольких STR маркёров Y-хромосомы, образующих гаплотип пробанда. Таким образом, можно установить уникальный комплекс маркёров (**гаплогруппу**), характерный для определённой популяции людей, и проследить весь путь предков в течение тысячелетий.

Задача. Учитывая повторяемые гаплотипы определите гаплогруппу и национальность

Алгоритм: 1. Перейти на сайт Haplogroup Predictor, по адресу <http://www.hprg.com/hapest5/>; 2. Выберите 21-Haplogroup Program; 3. Выберите FTDNA order; 4. В графе Area Selection выберите нужное географическое положение; 5. Введите комбинацию маркёров из условия; 6. Нажмите “Submit” для проведения анализа; 7. По максимальному совпадению гаплотипа выберите гаплогруппу и установите национальность пробанда с помощью справочника на сайте <http://gentis.ru/info/ydna-tutorial/>.

STR-маркёр	DYS19	DYS388	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393
Повторы	TAGA(9-19)	ATT (7-18)	TCTA/TCTG(19-28)	TCTA(6-14)	TAT (7-17)	AGAT(8-17)
Задача	12	24	15	11	13	17



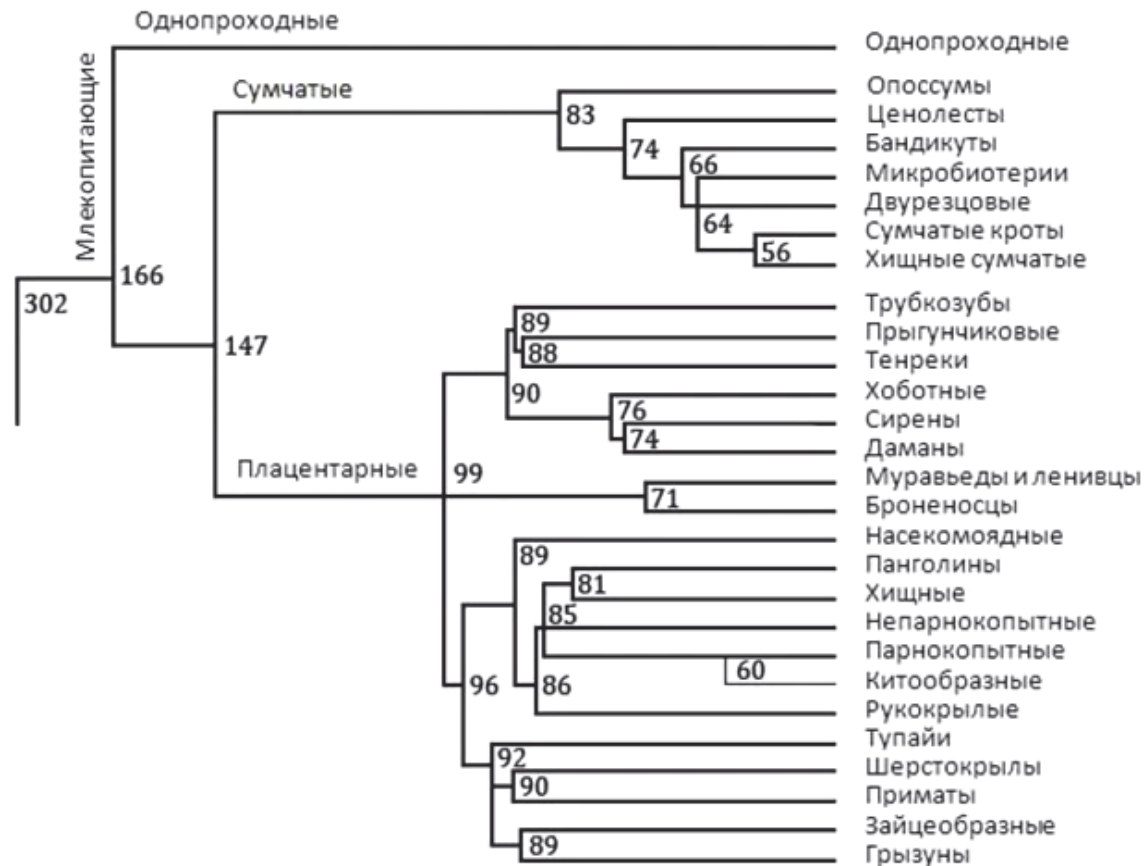
Эра		Период
Название и продолжительность, млн лет	Возраст (начало эры), млн лет	Название и продолжительность, млн лет
Кайнозойская, 66	66	Четвертичный, 2,58
		Неоген, 20,45
		Палеоген, 43
Мезозойская, 186	252	Меловой, 79
		Юрский, 56
		Триасовый, 51
Палеозойская, 289	541	Пермский, 47
		Каменноугольный, 60
		Девонский, 60
		Силурийский, 25
		Ордовикский, 41
		Кембрийский, 56

Выше приведено филогенетическое древо класса млекопитающие. В точках ветвления указано предположительное время расхождения соответствующих групп (в миллионах лет назад).

Животные какого отряда являются ближайшими родственниками китообразных?

По изображенному филогенетическому древу определите, когда примерно существовал ближайший общий предок бурого медведя и пятнистого оленя. Какой эре и какому периоду это время соответствует?

Почему в Австралии из плацентарных млекопитающих присутствует только человек и привезённые им животные?



Эра		Период
Название и продолжительность, млн лет	Возраст (начало эры), млн лет	Название и продолжительность, млн лет
Кайнозойская, 66	66	Четвертичный, 2,58
		Неоген, 20,45
		Палеоген, 43
Мезозойская, 186	252	Меловой, 79
		Юрский, 56
		Триасовый, 51
Палеозойская, 289	541	Пермский, 47
		Каменноугольный, 60
		Девонский, 60
		Силурийский, 25
		Ордовикский, 41
		Кембрийский, 56

Элементы ответа:

- 1) Парнокопытные;
- 2) 85 млн лет назад;
- 3) Мезозойская, Меловой;
- 4) из-за географической изоляции;
- 5) австралийский континент откололся от общего материка до того, как в ходе эволюции сформировались плацентарные млекопитающие

Для изучения эволюционной истории видов применяют **метод построения филогенетических древ.** Основой для этого является простое соображение: чем больше поколений прошло со времени расхождения филогенетических линий современных видов, тем больше эти виды отличаются друг от друга. Виды одного рода отделяет от их общего предка гораздо меньшее число поколений (и соответственно лет), чем виды, принадлежащие к разным отрядам. Филогенетическое древо строят, сравнивая современные виды по особенностям их морфологии, по последовательностям аминокислот в сходных белках, по последовательностям нуклеотидов в гомологичных генах.

В таблице приведены последовательности нуклеотидов в генах митохондриальной ДНК человека, орангутана и ревуна. Постройте их филогенетическое древо, исходя из предположения, что чем больше замен нуклеотидов отличает пару видов, тем раньше они дивергировали. Реконструируйте последовательность нуклеотидов в гене последнего общего предка этих видов.

Орангутан	АТГТТЦГЦЦГАЦЦГЦТГГЦТАТТЦТЦАЦГ ААЦЦАЦАААГАТАТТГГА
Ревун	АТГТТЦАТАААТЦГЦТГАЦТАТТТТЦААЦТ ААЦЦАТАААГАТАТТГГТ
Человек	АТГТТЦГЦЦГАЦЦГТТГАЦТАТТЦТЦТАЦА ААЦЦАЦАААГАЦАТТГГА

Решение

Подчеркнем различия в последовательностях:

Орангутан	АТГТТЦГЦЦГАЦЦГЦТГГЦАТТЦТЦЦАЦГ ААЦЦАЦАААГАТАТТГГА
Ревун	АТГТТЦАТАААТЦГЦТГАЦТАТТТТЦААЦТ ААЦЦАТАААГАТАТТГГТ
Человек	АТГТТЦГЦЦГАЦЦГТТГАЦТАТТЦТЦТАЦА ААЦЦАЦАААГАЦАТТГГА

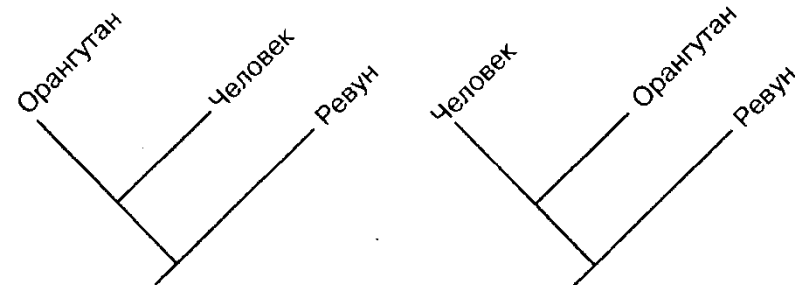
Построим матрицу различий:

	Человек	Орангутан
Орангутан	5	
Ревун	12	11

На основе матрицы различий построим филогенетическое древо. Т. к. между человеком и орангутаном мы обнаружили меньше различий, чем между ревуном и человеком и ревуном и орангутаном. Следовательно, эволюционные линии человека и орангутана (ветви древа) разделились позже, чем линии ревуна и общего предка человека и орангутана. Узлы ветвления обозначают точку дивергенции, т. е. время, когда на Земле жил последний общий предок двух или более разных эволюционных линий. Длина ветвей пропорциональна числу накопленных изменений. В филогенетических древах важно положение точек ветвления и длина ветвей, но не направление ветвей, два приведенных древа по смыслу идентичны.

Предковую последовательность восстанавливаем по позициям, сходным у большинства видов:

Предок	АТГТТЦГЦЦГАЦЦГЦТГАЦТАТТЦТЦ?АЦ? ААЦЦАЦАААГАТАТТГГА
--------	--



- **последовательности** в генах акулы, мыши и опоссума. Определите число различающих их замен, постройте филогенетическое древо и реконструируйте последовательность нуклеотидов в гене их последнего общего предка. Постройте филогенетическое древо по последовательностям аминокислот в соответствующем белке. Какое древо дает больше информации?

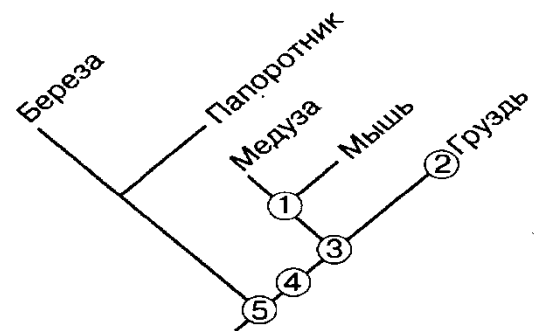
- **последовательности** в генах 3 видов приматов. Определите число различающих их замен, постройте филогенетическое древо и реконструируйте последовательность нуклеотидов в гене их последнего общего предка. В какой позиции триплетов – первой, второй или третьей — чаще наблюдаются замены? (Считывание начинается с первого нуклеотида.) Почему? Какой вероятностный аминокислотный состав предкового белка?

- **суммированы** данные о количестве замен в генах митохондриальной ДНК 9 видов приматов. На основе этой матрицы различий постройте филогенетическое древо. Совпадают ли выводы, которые можно сделать на основании этого древа, с выводами, основанными на сравнении ДНК ядерных генов?

- **определите**, какая из пяти точек указывает на последнего общего предка груздя и медузы.

Акула	ЦГЦТЦТТАГТЦЦЦАЦГТГГТАЦЦЦ ТЦАЦЦТТАГЦТААГАТЦАЦТАЦЦТА
Мышь	ЦЦЦТЦТТАЦТЦЦЦАЦГТГГТАЦЦЦ ТЦТЦЦТТАГЦТАТГАТЦАЦААЦЦТА
Опоссум	ЦЦЦТЦТТАЦТГГГТГЦАЦЦЦАЦЦЦ ТЦТЦЦТТАГЦТАТГАТЦАЦТАЦЦТА
Горилла	АТАТЦЦАТГТЦЦТААЦЦТТЦТАЦТЦЦАТТ ГТАЦЦТАТЦЦТААТЦГЦЦАТАГЦАТТЦЦТА
Резус	АТГАЦЦАЦАГТАААТЦТЦЦТАЦТТАТААТЦ АТАЦЦЦАЦАТТАГЦЦГЦЦАТАГЦАТТТЦТЦ
Человек	АТАЦЦЦАТГТГЦЦААЦЦТЦЦТАЦТЦЦЦАТТ ГТАЦЦЦАТТЦТААТЦГЦААТГГЦАТТЦЦТА

		2	3	4	5	6	7	8	9
1	Человек	90	95	99	141	152	177	192	189
2	Шимпанзе		44	111	156	157	190	205	194
3	Бонобо			116	154	153	196	217	201
4	Горилла				150	142	191	209	200
5	Орангутан					145	176	188	188
6	Гиббон						193	188	195
7	Верветка							128	119
8	Резус								128
9	Бабуин								



Постройте филогенетическое древо перечисленных видов.

ᠠ-цепь: Гис-Ала-Сер-Лей-Асп-Лиз-Фен-Лей-Ала-Сер-Вал-Сер-Тре-Вал-Лей-Тре-Сер-Лиз-Тир-Арг;

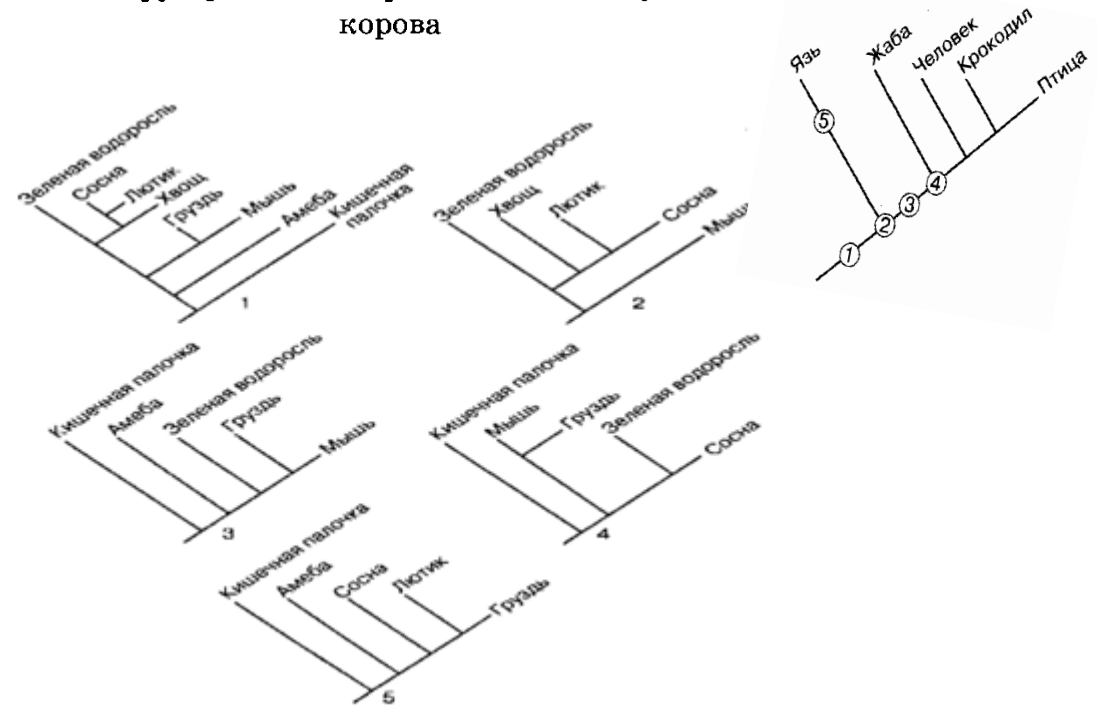
β-цепь: Гли-Ала-Ала-Тир-Гли-Лиз-Вал-Вал-Ала-Гли-Вал-Ала-Асп-Ала-Лей-Ала-Гис-Лиз-Тир-Гис.

Каково минимальное число нуклеотидных замен, произошедших с момента дупликации гена?

- **Определите**, правильно ли построено древо, изображенное ниже. К какому узлу следует добавить судака? К какому узлу следует добавить акулу?

- **Древо 1** построено на основе сравнения последовательностей ДНК. Какое из древ 2—5 изображено неверно?

Акула	Карп	Морской еж	Пчела
Амеба	Кишечная	Морской	Пшеница
Анаконда	палочка	конек	Рак
Бабочка	Коза	Муха	Синица
Береза	Корова	Мухомор	Скат
Волк	Кошка	Мышь	Слон
Воробей	Краб	Овес	Сорока
Гадюка	Крокодил	Окунь	Сосна
Дождевой	Кролик	Орел	Страус
червь	Крыса	Оса	Хвощ
Дятел	Лиса	Осетр	Хомяк
Еж	Лосось	Папоротник	Человек
Жук	Лошадь	Паук	Шимпанзе
Заяц	Лягушка	Подосиновик	Язь
Землеройка	Медведь	Полевка	Ящерица
Инфузория	Морская	Попугай	
	корова		

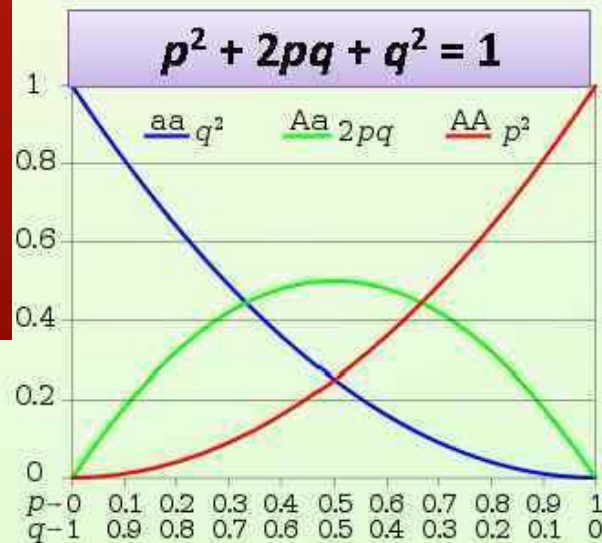


Закон Харди-Вайнберга



В 1908 Г. НЕЗАВИСИМО ОТ ДРУГ ДРУГА АНГЛИЙСКИЙ МАТЕМАТИК ХАРДИ И НЕМЕЦКИЙ ВРАЧ ВАЙНБЕРГ СФОРМУЛИРОВАЛИ СЛЕДУЮЩИЙ ЗАКОН:

Частота аллелей и генотипов в данной популяции будут оставаться постоянными из поколения в поколение при выполнении некоторых условий.



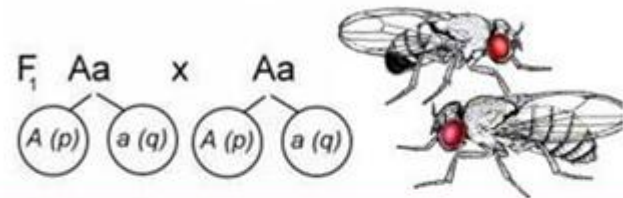
Закон Харди — Вайнберга для двух аллелей: по оси абсцисс показаны частоты аллелей p и q , по оси ординат — частоты генотипов. Каждая кривая соответствует одному из трех возможных генотипов.

Биологический смысл закона Харди — Вайнберга
Процесс наследования не влияет сам по себе на частоту аллелей в популяции, а возможные изменения её генетической структуры возникают вследствие других причин.

P AA x aa

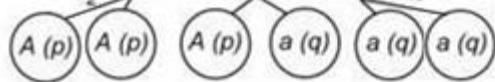


F₁



	A (p)	a (q)
A (p)	 AA (p ²)	 Aa (pq)
a (q)	 Aa (pq)	 aa (q ²)

F₂ AA + 2Aa + aa (p² + 2pq + q²)



Условия выполнения закона (идеальная (равновесная) популяция):

- большая численность,
- панмиксия – свободное скрещивание
- нет мутаций, или прямые и обратные, мутации имеют одинаковую частоту,
- нет отбора, все генотипы одинаково жизнеспособны,
- нет миграции – оттока и притока новых генотипов,
- отсутствует дрейф генов

Популяционно-статистический метод

Аллели гена «А»: А и а

Генотипы особей популяции: АА, Аа, аа

$$p(A) + q(a) = 1$$

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

где $p(A)$ – частота доминантного аллеля гена,

$q(a)$ – частота рецессивного аллеля гена,

$p^2(AA)$ – частота особей, гомозиготных по доминантному аллелю,

$2pq(Aa)$ – частота гетерозиготных особей,

$q^2(aa)$ – частота особей, гомозиготных по рецессивному аллелю, т.е. частота особей с рецессивным признаком,

$p^2(AA) + 2pq(Aa)$ – частота особей с доминантным признаком,

$2pq(Aa) + q^2(aa)$ – частота особей, в генотипе которых имеется рецессивный аллель.

Среди африканских пигмеев носители I группы крови составляют - 30,2%, II группы — 30,3%, III группы - 29,1 %, IV группы — 10,4%. Определите частоту встречаемости в популяции пигмеев аллелей гена группы крови по системе ABO.

Решение. Воспользуемся формулами закона Харди—Вайнберга для множественного аллелизма:

$$p + q + r = 1,$$

$$p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr = 1.$$

Тогда частота встречаемости аллеля 0:

$$r^2 = 30,2 \% = 0,302,$$

$$r = \sqrt{0,302} = 0,549 = 54,9 \ \%.$$

Теперь найдём частоту встречаемости остальных групп крови — II ($p^2 + 2pr$), III ($q^2 + 2qr$), IV ($2pq$).

$$p^2 + 2pr = 30,3 \% = 0,303 \text{ (генотипы AA и AO)}, \quad q^2 + 2qr = 29,1 \% = 0,291 \text{ (генотипы BB и BO)}, \quad 2pq = 10,4 \% = 0,104 \text{ (генотип AB)}.$$

Скомбинируем эти цифры в два варианта:

$$p^2 + 2pr + r^2 = (p+r)^2,$$

$$q^2 + 2qr + r^2 = (q+r)^2.$$

Теперь определим p: по условию задачи первая величина $(p+r)^2$ равна 30,3% + 30,2 %, т. е. 60,5 %, или же 0,605. тогда находим $p + r = \sqrt{0,605} = 0,778$,

$$p = 0,778 - r = 0,778 - 0,549 = 0,229 = 22,9 \ \%.$$

аналогично определяем q:

$$(q + r)^2 = 29,1 + 30,2 = 59,3 \% = 0,593, \quad q + r = \sqrt{0,593} = 0,770$$

$$q = 0,770 - r = 0,770 - 0,549 = 0,221 = 22,1 \ \%.$$

осуществляем проверку суммированием полученных значений p, q и r

$$p + q + r = 22,9 + 22,1 + 54,9 = 99,9 \ \%. \text{ отклонение от } 100 \% \text{ объясняется приближением в вычислениях}$$

:В популяциях пигмеев частоты встречаемости аллелей гена группы крови системы ABO составляют: A — 22,9 %, B — 22,1%, O — 54,9 %.

Численность популяции зависит не только от рождаемости, но и от других факторов. В общем виде численность популяции в некое время n обычно оценивается по следующей формуле:

$$N_n = N_t + B - D + C - E,$$

где N_n - количество особей в момент n ,

N_t - количество особей в предыдущий момент времени t ,

B - число особей, родившихся в промежуток $t-n$ (рождаемость),

D - число погибших за это же время (смертность),

C - количество иммигрантов (особей, вселяющихся из других мест обитания) и

E - количество эмигрантов (особей, покидающих популяцию) за этот же временной промежуток.

Количество мигрирующих особей, как правило, в меньшей степени влияет на изменение численности по сравнению с величинами рождаемости и смертности.

Задача:

В опыт взяли 50% растений, гомозиготных по доминантному гену (AA) и 50% - по рецессивному (aa). Они начинают размножаться с помощью перекрестного опыления. Гомозиготы aa обладают пониженной приспособленностью, только половина из них способна участвовать в размножении и оставлять потомство. Какова будет частота гаметы a через 2 поколения? Через 5 поколений? Через 10 поколений?

- Имелось две популяции одного вида с одинаковыми численностью и генофондом, находящихся в одинаковых условиях. В одной из них появился ген, который приводит к резкому снижению численности потомства, в среднем до двух особей на одну родительскую пару за все время репродуктивного периода. В другой популяции численность потомков одной пары превышает пятьдесят особей. Как вы думаете, какова судьба этих популяций? Обоснуйте свой вывод.

Существует исходная популяция, в которой все особи гетерозиготны (Aa). Гомозиготы по рецессивному аллелю имеют пониженную приспособленность по сравнению с гетерозиготами и доминантными гомозиготами. Какой будет частота аллелей A и a через 5 поколений, если в каждом поколении половина особей с генотипом aa погибает, не давая потомства?

Литература

1. Биология: учебник: в 2 т./ под ред. В.Н. Ярыгина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – Т.2. – 736 с.
2. Биология. Руководство к лабораторным занятиям: учебное пособие/Под ред. Н.В. Чебышева. – 2-е изд., М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 284 с.
3. Биология: руководство к практическим занятиям: учебное пособие/ под ред. В.В. Маркиной. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 448 с.



Благодарю
за внимание!