**План**

1.Введение

2.Что же такое молекулярно-генетические маркеры?

3.Какие же бывают маркеры?

4.Как и для чего могут использоваться молекулярные маркеры?

5.Заключение

**ВВЕДЕНИЕ**

Со времён зарождения животноводства человек, волей-неволей, получал большое количество пород различных животных. Изначально селекция животных была процессом спонтанным, человек оставлял и разводил тех животных, которые меньше его боялись и давали необходимую ему продукцию. Со временем человек уловил некоторые закономерности в передаче каких-либо признаков от предков к потомкам, и селекция становилась всё продуманней и эффективней. К моменту зарождения генетики человек уже сам мог планировать отбор и подбор по фенотипическим признакам с достаточно большой эффективностью и уже мог целенаправленно выводить новые породы. Появление генетики означало новый виток в разведении животных, понятие глубинны принципов наследования поставило разведение на научный фундамент.

В настоящее время разведение животных это развитая наука, охватывающая широкий спектр задач и методов их решения в животноводстве. Как основные инструменты селекции можно выделить оценку животных, отбор и подбор. Наиболее сложный и важнейший процесс – это оценка животных, от точности оценки во многом зависит дальнейший успех селекционных мероприятий (ключевое слово здесь «во многом»). На данный момент пользуются оценкой животных по экстерьеру и по продуктивным качествам (надой молока за лактацию, скороспелость поросят и т.д.), в обоих случаях пользуются фенотипическими показателями, по этому, для использования этих признаков в расчётах, необходимо знать их коэфициэнт наследуемости, но даже в этом случае мы будем иметь дело с вероятностью генетического обоснования любого признака.

Наука не стоит на месте, а в последние десятилетия её прогресс достигает вообще колоссальной скорости, это не обошло стороной и животноводство. Развитие высоких технологий в оптике, электронике, математике и в других науках открыло огромные возможности в изучении молекулярной биологии, позволило в большой мере изучить глубинные механизмы жизни и наследуемости. Совокупность новых знаний послужила фундаментом для рождения новой науки – селекции при помощи маркеров (Marker Assisted Selection – MAS). У селекционера появилась возможность исключить факторы действия среды на признаки из оценки животного и пользоваться голой генетической составляющей фенотипа.

**2. Что же такое молекулярно-генетические маркеры?**

Молекулярными маркерами называют такие биохимические особенности обмена веществ и, непосредственно, структурные особенности генома организма животного, растения, бактерии или гриба, которые тесно коррелируют с какими либо физиологическими показателями организма (например, активностью ферментов), связанными с хозяйственно полезными признаками этого существа. Используя молекулярно-генетические маркеры селекционер может, с огромной точностью, выбирать из популяции только животных обладающих определённым аллелем, необходимого ему, гена, такого как, например ген устойчивости к лейкозу у коров, и создавать стада устойчивые к заболеваниям, с животными генетическим здоровыми и высоко продуктивными.

В селекции при помощи маркеров используются только природные комплексы генов, характерные для данного вида животных. Эти комплексы прошли через сито естественного отбора у предков домашних животных, поэтому их присутствие в геноме животных является естественным и безопасным как для самого животного, так и для человека потребляющего продукцию от него.

Используемые маркеры должны обладать определёнными свойствами и отвечать ряду требований, к ним относятся:

1. Фенотипические проявления аллельных вариантов должны быть доступны для идентификации у различных особей;
2. Аллельные замещения в одном локусе должны быть отличимы от аллельных вариантов в других локусах;
3. Существенная часть аллельных замещений в каждом изучаемом локусе должны быть доступна для идентификации;
4. Изучаемые локусы должны представлять случайную выборку генов в отношении их физиологических эффектов и степеней изменчивости;
5. Маркеры должны обладать равномерным распределением по локализации в геноме;
6. Маркеры должны обладать лёгкой выявляемостью и воспроизводимостью;
7. Получаемые данные должны быть сопоставимы в разных лабораториях;
8. Необходима возможность автоматизации их выявления;
9. Маркеры должны обладать относительной нейтральностью.[[1]](#footnote-1)

Очевидно, что не существует такого стандартного набора маркеров, который отвечал бы всем этим требованиям.

**3. Какие же бывают маркеры?**

Впервые идею применения маркеров в селекции теоретически обосновал А.С.Серебровский ещё в 20-х годах, тогда он говорил о морфологических моногенно наследуемых признаках.

На сегодняшний день известно уже немало различных по природе маркеров. Наиболее простые маркеры – это различия в морфологическом строении хромосом. Наличие каких-либо перетяжек на хромосоме, спутников или каких-нибудь других особенностей морфологического строения хромосом, может коррелировать с положением гена в определённой аллели. Идея неплохая, самое главное новая и достаточно достоверная, но проблема заключается в том, что очень незначительное количество признаков коррелирует с такими морфологическими особенностями хромосом, которые можно увидеть на метафазной пластинке через микроскоп. По этой причине морфологическими различиями хромосом, как генетические маркеры, используются мало.

Следующим шагом в MAS стало открытие значительной степени полиморфизма макромолекул в организмах, в основном белков. Т.е. один и тот же белок (имеется в виду отвечающий за одни и те же функции и имеющий одинаковое происхождение) может иметь различную электрофоретическую подвижность у разных животных (а иногда и у одного и того же животного) и обладать различной активностью в метаболической цепи. Такие варианты называются аллельными и происходят из-за аминокислотных замен в полипептидной цепи белка, приводящей к изменению длины или заряда белка, что в свою очередь является следствием нуклеотидной замены (или каких либо других точковых мутаций) в цепи ДНК гена, кодирующего этот белок. Сразу же после открытия высокой полиморфности белков между исследователями началась дискуссия по поводу адаптивного или нейтрального действия аллельных вариантов белков. Эта дискуссия продолжается и сейчас, но большинство исследований свидетельствуют о том, что полиморфные белки могут использоваться в качестве эффективных молекулярно-генетических маркеров в селекции организмов.

Поскольку только некоторые варианты белков отличаются по размеру и/или электрическому заряду, то генетические вариации, которые могут быть выделены такими методами, представляют только 25% от общего количества вариантов на генном уровне.

В качестве молекулярных маркеров животных могут использоваться системы групп крови, существует множество работ по определению влияния групп крови на продуктивность животных и их устойчивость к заболеваниям, но об этом попозже.

Достижения в молекулярной генетике за последние 28 лет позволяют проводить оценку полиморфизма аллельных генов на уровне ДНК. ДНК полиморфизм может быть тестирован различными способами – это и непосредственное определение нуклеотидной последовательности интересующего гена (Сиквенирование, наиболее дорогой, долгий, сложный и точный метод), и составление рестрикционных карт организмов (ПДРФ), и амплификация различных участков ДНК (RAPD-PCR, ISSR-PCR), и гибридизация ДНК (FISH, GISH, блоттинги) и т.д. Эти методы являются наиболее чувствительными и достоверными, они позволяют выявить полиморфизм не только экспресирующих последовательностей, но и регуляторных, и неэкспресирующих (например, комплекс генов «молочности» быка).

Это было вполне научное вступление к моей работе, а теперь я предлагаю приступить к делу.

**4. Как и для чего могут использоваться молекулярные маркеры?**

Хочется, хоть это и немного несистематично, сделать небольшое вступление (предисловие). Откуда же вообще появляется полиморфизм ДНК и белков? На этот вопрос отвечает эволюционная теория, основы которой заложил ещё Чарльз Дарвин. Образование различных аллелей генов, новых генов и вообще видов животных процесс, большинством, медленный и постепенный, основная действующая сила это мутации и естественный отбор. Мутации могут появляться по различным причинам – это ионизирующее излучение, коротковолновый ультрафиолет, химические мутагены (к коим относится и обычный для нас анальгин!), ошибки ДНК-полимеразы (частота появления ошибки 1\*10-9 нуклеотидов, если не ошибаюсь) и по некоторым другим причинам. Мутации образуются в случайных местах на ДНК, и, чаще всего, оказываются вредными или бесполезными для организма, механизм «выживает сильнейший» постепенно (а иногда и сразу) исключает животных имеющих злокачественные мутации из популяции (конечно если это не рецессивная аллель, тогда всё сложнее, но это курсовая не по популяционной генетике). В случае же если в процессе мутагенеза появляются животные более приспособленные, мутация подхватывается отбором и число таких животных в популяции растёт. В данной работе мы будем говорить, преимущественно о генных мутациях – это мутации связанные с изменением в последовательности нуклеотидной цепи в пределах одного гена (ну и ещё немного о дупликации генов). Это может быть перестановка нуклеотидов местами, замена одного нуклеотида на другой и, самое страшное, потеря или вставка нуклеотидов (особенно их числа, некратного трём).

Так вот представим себе, что у нас имеется популяция животных (пусть это будут козы) с абсолютно идентичным геномом, гены не имеют аллелей (не аллельны). Наши козы пасутся на равнине под тёплы солнышком и щиплют сочную травку. Беды, как говориться, не чают. Геном наших животных настолько специализирован, для проживания в этих условиях, что если возникает какая-то мутация у любого животного, то его потомство становится очень плохо приспособленным и, неизбежно, гибнет (это мои условия). И вот они едят, плодятся и их популяция всё увеличивается и увеличивается, а, между тем, солнышко престаёт греть так хорошо как раньше, травки становиться всё меньше (в общем, говоря, изменяются условия среды обитания) и животным становиться уже не так хорошо как раньше, а в дальнейшем всё хуже и хуже. Наши козы оказались умнее, чем можно было предположить, и они не стали ждать у моря погоды, а разделились на несколько групп и начали мигрировать, но небольшая часть осталась на прежнем месте и сказала: «Будь, что будет!». Часть животных отправилась искать лучшей жизни в гористую местность, а другая, напротив, направилась в низину на берег моря, четвёртой группе повезло меньше всех, их блуждания завели в болото и про них нам больше ничего не известно. Так, что же происходило в пути с нашими животными?

Первая группа поднималась в горы всё выше и выше, атмосфера становилась всё разреженней и разреженней, а цель их – альпийские луга, находящиеся на высоте 3000 метров. И вот их, теперь уже, популяция постепенно мигрирует, постоянно возникающие мутации уже не отбрасываются, как раньше, а обрабатываются отбором и оставляются, но только те, которые позволяют козам выживать лучше. От прежнего генома мало что осталось в нетронутом виде: гены, кодирующие такие белки, как гемм и глобин размножились, образовав кластеры, это произошло у одного козлёнка в семенниках, в ядре одной из, приготовившихся к мейозу, клеток, из-за случайных перестроек участков ДНК и дупликации генов, в процессе репликации генетического материала. Сам козёл имеет обычное количество генов гемма и глобина в своём геноме, как в исходной популяции, но вот часть его многочисленных потомков унаследовала от него эту мутацию и они стали лучше выживать в условиях разряженной атмосферы в высокогорье, за счёт большего количества экспрессирующих одновременно генов, а, следовательно, и из-за большего количества гемоглобина (в виде, конечно, эритроцитов) в крови. Эти потомки лучше выживают и размножаются, оставляя в популяции всё больше животных имеющих этот признак. Общий обмен веществ у животных понижается, это происходит по средствам изменения множества ферментных механизмов. Вот, например, одна из молодых козочек, случайно, съела ядовитую траву, сок которой содержал канцерогены. Эти канцерогены вызвали в её яичниках ряд мутаций геномов яйцеклеток. Одна из мутаций привела к замене одного нуклеотида в кодирующем участке ДНК гена фосфофруктокиназы-1, из-за этого одна из аминокислот, а именно лейцин, поменялась на фенилаланин, замена произошла не в активном центре фермента, и привела только к незначительному изменению в третичной структуре белка, и немножко оттянула на себя общий электрический заряд. Из-за этой мутации активность фермента несколько снизилась, а, как нам известно, фосфофруктокиназа-1 главный ключевой фермент, катализирующий реакцию, лимитирующую скорость всего процесса гликолиза, следовательно, скорость этой реакции понизилась, как понизилась и скорость гликолиза. В наших условиях это положительный момент, и козлик, родившийся поколением позже, распространил мутацию дальше. Про подобные мутации можно печатать часами, но лучше я немного обобщу результат: в нашей новой популяции произошли изменения, на генетическом, а соответственно и на физиологическом уровне, которые повысили выживаемость наших коз в условиях высокогорья. Их геном поменялся, относительно равнинной популяции, вследствие чего шерсть их стала гуще, в ней стало больше пуховых шерстинок, обмен веществ замедлился, объём лёгких возрос, а кровь стала лучше переносить кислород. И теперь они пасутся на бугристом газоне альпики и радуются дуновению свежего встречного ветерка.

А что же произошло с группой, идущей к морю? Сейчас мы посмотрим! Будем называть и эту группу грозным словом – популяция. А популяция наша уходит в зону субтропиков, постепенно спускаясь в плодородную долину на берегу моря, покрытую густыми лесами. Климат здесь жарче, чем в их прошлом месте обитания, влажность выше, поражает обилие других животных, среди которых встречаются и пищевые конкуренты нашим козам, и кровожадные хищники. С нашей популяцией, как и с «горной», начинают происходить изменения, и возникающие мутации начинают фильтроваться через сито естественного отбора. Начинают выживать более мелкие животные, которые лучше проскальзывают между деревьями, шерсть редеет и, вместе с тем, грубеет кожа, чтобы было не так жарко, но ветки не так царапали тело. Наших коз подстерегают опасности, исходящие от хищников, на каждом шагу. Взрослые животные перемещаются по лесу небольшими группами, так проще заметить подкрадывающегося леопарда. Обоняние у животных, в этой популяции, обострилось и это помогает им быстрей заметить угрозу. Но одно дело взрослые животные, они могут заметить врага и быстро убежать из опасной зоны. А молодняк! Он очень уязвим для хищников, козлята в течение трёх месяцев должны пить молоко, и потом ещё пять месяцев пройдёт пока они станут самостоятельными. За первые три месяца жизни умирает больше всего молодняка, и передвинуть этот страшный, для популяции, порог получилось чисто случайно: кожа у коз ещё мало приспособилась к активному солнцу и большому количеству ультрафиолета, коротковолновый ультрафиолет является сильным мутагенным фактором. А один, нерадивый, козёл слишком долго загорал на опушке леса, ощипывая молодой куст. Ультрафиолет вызвал в его семеннике, у одной из клеток ещё не вступившей в сперматогенез, мутацию гена-регулятора, отвечающего за регуляцию экспрессии другого гена (у нас будет «LX»), экспрессирующегося в молочной железе у самок. Белок, экспрессирующийся геном LX, улучшает проницаемость мембран клеток железы для жиров. В результате у самок, получивших этот новый аллель гена-регулятора, молоко стало жирнее, и детёныши стали расти быстрее. Уменьшился период повышенного риска у потомства, конечно же, этот ген распространился и закрепился в популяции. И так мы имеем животных более мелких, по сравнению с равнинной популяцией, живут они небольшими группами в лесу, собираясь в большие стада только на период гона (где и происходит активный обмен генетической информацией), обмен веществ у них очень быстрый, шерсть редкая, молоко у самок очень жирное. Одним словом наши зверюшки отлично приспособились к жизни в своём новом доме.

Ну а теперь вернёмся к нашим приверженцам консервативного образа жизни, животным оставшимся «дома». А эти козы пережили немало невзгод, и их популяция очень сильно обмелела, холод и голод поглотили большинство животных, а вместе с ними и не родившихся у них козлят. Дошло до того что от всего стада осталось всего три самца и восемь самок, как вдруг (ну это конечно совсем из области фантастики), невзгоды отступили, солнышко засветило с прежней силой и зазеленела трава. Наша небольшая группа весело начала плодиться и бегать по родным просторам, родине их далёких предков. И, представьте себе, генотип у животных практически не изменился (сошлёмся на то, что стихийное бедствие продолжалось недолго), они остались такими же, какими всегда были эти животные на равнине.

И вот три наших популяции живут на разных территориях, в разных климатических зонах и прекрасно себя чувствуют. С первого взгляда можно даже не подумать, что они произошли от одной гомоморфной равнинной популяции, но это действительны было так.

Отступим немного от лирики и подведём небольшой, хладнокровный под итог: мы имели одну популяцию, у каждого животного гены, кодирующие одни и те же белки, одинаковые, да и белки у них тоже одинаковые, из этого следует, что каждый ген имел только одну аллель (сказать точнее, не имел не какую, был неаллельным). Но вот наша популяция разбилась на несколько частей, и части удалились друг от друга, образовав несколько популяций. Гены в этих популяциях мутировали, образовывали различные варианты, и отбирались такие варианты, какие были нужны (для каждой популяции свои). Появились различные аллели одного и того же гена, они отвечают за те же функции, что и в степной популяции (первоначальный тип), но с некоторыми особенностями. Возвращаемся обратно:

Как же вы думаете? Что произошло в этой истории дальше? Ну конечно!!! Появился человек!

Наши козочки паслись себе и не знали горя, как вдруг, в одно прекрасное солнечное утро (в горах, правда, лил дождь, но это опустим), откуда не возьмись, появилось в каждом стаде по двуногому. Наши козы даже ухом не повели и ничуть не испугались (даже не знаю почему, за своего, наверное, приняли – за козла)! И вот двуногий всё стадо построил (сложнее всего дело с «лесными» обстояло, пока всех собрал…) и сказал, что он теперь вожак, и все должны ему подчиняться! А козочки то, наши и оробели, подумали: «Пусть правит, а то, как бы чего не вышло». И ведь напрасно!

Сделаем небольшое отступление и поговорим о наших троих. Это мужчины среднего роста характеры сдержанные, нордические, хотя и родом они из разных уголков Евразии. Так вот зовут их Серхио (тот, что в лес пришел), Иван (на равнине) и старик Джамбулат (горец, конечно же). Жить они у нас будут неопределённое количество времени. Друг про друга, до поры до времени, и знать не знают.

Представьте себе, что пришли они к нашим козам много лет назад (тысячи 3), и вот стали пасти стада и творить в них, что им вздумается.

Идут годы, наши молодцы и старик Джамбулат мирно пасут свои стада, растят детей (у Джамбулата их 12), и всё примечают: у более крупной козы и козла потомство крупнее, у больного-доходяги козлята слабые, а у белой козы и чёрного козла козлята и белые и чёрные рождаются. О как! И думают они: «Что за диво?!; почему?; зачем?; кто виноват? и что делать?» Старик Джамбулат даже колдовать пробовал, но кроме дождя ничего не вышло. Так и не решили они, по первой, кто виноват, зато, что делать поняли: стали крупных и сильных оставлять, а маленьких и слабых кушать. А потом Серхио свою любимую козу постриг, что бы ей не так жарко было, а на шерсти её стал спать. Даже не знаю, он ли первый догадался её прясть, но факт в том, что наши чабаны (надеюсь, что термин уместен) стали козлиные рубахи носить, а Джамбулат вообще в тулупе козлином ходить начал. Ну и по шерсти зверьё отбирать начали, и по шкуре, сложнее жить нашим чабанам стало: теперь зверьё по многим признакам отбирать надо! Зато шерсть да мясо с молочком лишние появились, и начали они потихоньку бартером торговать с земляками, а Серхио и за море плавал.

Так они и жили, а между тем Левенгук микроскоп изобрёл, и мух всяких под ним глядел. На Кавказе Российская Империя войну затеяла, а Иван и старик Джамбулат, тихо, мирно у себя коз пасли. Всё бы так и продолжалось, но вот только Серхио его экономическая позиция в конце 18 устраивать перестала, и начал он мудрить, как, же ему эффективность своего хозяйства повысить? И вот коллеги Серхио, учёные люди, всякие системы оценки и подбора стали придумывать, мудрёные, математические. Ванька, то и слов тогда таких не знал, а про Джамбулата и вообще говорить нечего, у этого на всё один ответ был: «У! Шайтан!». И вот вроде к 20 веку Серхио самый продвинутый стал, система у него оценочная сложная, отбор жёсткий, и думал он, что всех своих «коллег» (а про них он уже знал) за пояс заткнул, но не тут-то было! Русь то Матушка, оказывается, и не такие головы вынашивала! Как только наука новая, генетика, появилась, наши сразу имена загремели: Вавилов, Кольцов, Серебровский и многие другие. И поняли наши чабаны тогда, что не нечистая сила их коз окрашивает, а гены им от отца с матерью передаются всякие.

Так вот ближе к делу. Родилась у нашей троицы идея, создать общими усилиями новую породу овец, чтобы и молоко жирное было, и шерсти много и на равнине хорошо себя чувствовала. Для начала надо качественно оценить, какие животные «мелочнее», какие «шорстнее», и на основе Ванькиной степной вывести новую породу.

И вот думают, как оценить? Серхио то хорош, конечно, но он на оболочку только козью смотреть мастак, а земляк нашего Ваньки, А.С. Серебровский в 20-х годах 20-го же века, впервые теоретически обосновал идею применения маркеров в селекции, тогда он говорил о морфологических моногенно наследуемых признаках. Идея то Ваньке приглянулась, но только признаков он таких немного нашёл, да и те которые нашёл только двумя аллелями представлялись, а Ваньке хотя бы три хотелось. Но идея надолго в шкафу не задержалась, и в мире науки начались активнее поиски новых маркеров.

Ещё в 19-м веке Вейсман предположил, что наследственная информация находиться в хромосомах, в начале 20 это уже было всем точно ясно. Вот и попытались учёные использовать различия в морфологическом строении хромосом в качестве генетических маркеров. Наличие каких-либо перетяжек на хромосоме или каких-нибудь других особенностей морфологического строения хромосом, может быть связано (может коррелировать) с положением какого-либо гена в определённой аллели. Но и эти маркеры не подошли нашей троице (теперь уже – селекционерам), потому как очень незначительное количество признаков коррелирует с такими морфологическими особенностями хромосом, которые можно увидеть на метафазной пластинке через микроскоп (тут и Левенгук вспомнился). Хотя, в некоторых, случаях эти маркеры всё-таки могут использоваться.

И вот, наконец, в мире нашёлся герой (а может и не один), открывший значительный полиморфизм макромолекул, а именно белков. Метод идентификации этого полиморфизма был назван – электрофоретическое разделение белков. Это был настоящий прорыв в селекции растений и животных. Можно сказать, что именно в это время настоящее рождение пережила селекция при помощи маркеров (MAS). Внимание! научная справка:

Электрофоретическое разделение белков – это достаточно простой способ идентификации различных аллелей интересующих нас генов. Он не требует знать аминокислотную последовательность полипептидной цепи белка и для анализа не требуется сложного дорогостоящего оборудования (камеры для электрофореза раньше (в союзе) вообще своими руками делали). Метод способен дифференцировать различия белков по заряду и длине. Общий заряд молекулы белка может измениться посредством точковой мутации, приводящей к замене нуклеотида, в нуклеотидной цепи и, как следствие, к замене одной аминокислоты на другую. Мне, правда, с трудом представляется, что в белке, состоящем из сотни аминокислот, замена одной аминокислоты на другую, во многих случаях, может привести к глобальному изменению электрического заряда, это, на самом деле, происходит сравнительно редко. А удлинение полипептидной цепи может происходить из-за дублирования какой-либо нуклеотидной последовательности в гене (в экспресируещей части гена). Вообще укорочение белка на одну (а то и две) аминокислоты, или удлинение на такое же количество, часто не отражаются, или очень слабо отражаются, на его функциях (обратная корреляция с размером белковой молекулы), если конечно это не произошло в активном центре фермента или в некоторых других случаях. Но если удлинение или укорочение белковой цепи, вдруг, повлечёт за собой изменение заряда молекулы, то в этом случае, с большой вероятностью, может изменяться его активность (если, например, это фермент) и вообще функциональность в диапазоне от повышения активности, вплоть до полной дисфункции или вообще отрицательного воздействия на организм.

В нашем случае о удлинении полипептидной цепи мы не говорили, да и о изменении заряда только в скользь. Следовательно, используя этот, метод наши герои не могут разделить по аллелям, ни один из описанных мной генов. Небольшой шанс есть только у старика Джамбулата, белок фосфофруктокиназа-1, в его стаде, немного различается, по величине заряда, с белком фосфофруктокиназы-1 в Ванькином стаде. Для того, чтобы увидеть эти различия Джамбулату придётся изготовить очень длинную форезную камеру, сутки готовить полиакриламидный гель и гнать в нём белки часов 12, думаю, он вряд ли станет этим заниматься. Но не подумайте, что метод плох! Он не подошёл для нашего конкретного случая. Его активно используют сейчас повсеместно в семеноводстве, животноводстве, растениеводстве и в других областях сельского хозяйства.

Существуют, также, попытки использовать в качестве маркеров полиморфизм групп крови животных. Как известно сельскохозяйственные животные имеют сложные системы групп крови, ряд учёных попытался сопоставить различия этих систем с продуктивностью животных. Результаты изучения связи молочной продуктивности коров с их генотипическими особенностями — присутствием в крови тех или других факторов — позволили перейти к рассмотрению этой связи на уровне отдельных аллелей групп крови. Коровы — носи­тели некоторых аллелей крови имеют достоверное превосходство по удою и содержанию жира перед животными носителями некоторых других аллелей крови, но существуют и не коррелирующие с продуктивностью группы крови. Существуют, также, убедительные данные, полученные при сопоставлении молочной и жирномолочной продуктивности дочерей родительских пар, в различной степени сочетающихся между собой по генотипу. Но к сожалению, это очень мало исследованная зависимость и пока не позволяет на практике использовать группы крови у животных как маркеры.[[2]](#footnote-2) Поэтому я только упоминаю в этой курсовой о том, что такие работы ведутся, и даже не предлагаю попытаться, нашим троим «селекционерам», использовать данный метод.

Пришлось нашим героям ждать у моря погоды, и они дождались! Открылась новая эра в MAS – эра маркеров полиморфизма ДНК. Это работа не с продуктами экспрессии генов, а с сомой матрицей, она открывает почти безграничные возможности нашим селекционерам.

Первый открытый способ – это обработка геномной ДНК животного или растения сайтспецифичными рестриктазами. Ферменты делит цепочки ДНК по строго специфичным последовательностям, и получаются фрагменты ДНК различной длины. Они разделяются на электрофорезе по длине. Метод носит название полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Используется несколько разных рестриктаз. Для анализа необходимо достаточно большое количество геномной ДНК, её делят на порции и к каждой порции добавляют одну рестриктазу, создают условия для реакции и проводят электрофорез, причём каждая дорожка это продукт одной рестриктазы. Потом мы смотрим, какие длины фрагментов ДНК соответствуют аллелям исследуемого гена. Для того чтобы всё стало ясно нам придётся почитать мои дополнения[[3]](#footnote-3).

Дополнения: это дополнение касается не только ПДРФ метода, но относится и к последующим методам, и к полиморфизму электрофоретической подвижности белков, и к группам крови. На самом деле оно вообще много к чему относится. Попробую пояснить как раз на примере белков. Существует прямой способ определения аллелизма, т.е. сам фермент, разгоняемый на электрофорезе, имеет несколько аллельных вариантов подвижности и активности. А существует косвенный метод определения аллелизма по подвижности белков: например миоглобин имеет два аллельных варианта и различается по длине, а активность и все остальные свойства у них одинаковые, но его аллельные варианты сцеплены с аллельными вариантами какого-нибудь пепсина. Следовательно, разгоняя миоглобин, мы можем делать заключения о аллелизме этого пепсина! Такой же непрямой принцип маркирования мы видим в ПДРФ. В процессе мутаций могут либо образовываться новые сайты рестрикции, либо пропадать, а ещё могут дублироваться уже существующие. Эти сайты наследуются по законам Менделя, потому также могут называться аллелями. Необходимо, сначала, статистически установить, с какими другими аллельными признаками сцеплены сайты рестрикции, а потом, на основании результатов электрофореза, можно говорить об аллелизме какого-то гена. Для того чтобы это установить, нам необходимо большое количество проб геномной ДНК, выделенной у многих животных. Также необходимо знать, как между собой различаются аллели исследуемого признака, и какие животные обладают какой аллелью. Теперь мы «режем» наши пробы ДНК разными ферментами и сверяем продукты их электрофоретического разделения по длине. Для наглядности я решил привести электрофоретическое разделение, рестрикционных фрагментов ДНК коз. Сверху приведены названия рестриктаз, которыми гидролизовали пробы. Картинка из брошюры Селекция XXI века: использование ДНК-технологий.

Находим аналогию (математическую корреляцию) между какими либо длинами отрезков и аллелями интересующего нас гена. Надеюсь, что понятно объяснил, в противном случае спрашивайте напрямую, писать не мой конёк.

Наша троица не может воспользоваться и этим методом, потому, что установить какие длины фрагментов соответствуют каким аллелям, интересующих нас, генов мы не можем. У нас очень мало материала (мало разнообразия) для статистической обработки.

Следующий родившийся метод это прямое определение полной нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК – сиквинирование. Метод очень точный, если конечно применять современный сиквинатор, но долгий и прибор очень дорогой. Нам необходимо изначально знать точные последовательности нуклеотидов в различных аллелях генов или некодирующих последовательностей, сцепленные с аллелизмом какого-нибудь признака. Зная это, мы берём пробу ДНК у животного и сиквенируем её, не правда ли просто в двух словах!? Но на самом деле сиквенирование – это гениально сложный, в техническом исполнении, процесс, основанный на гениально простом принципе. В настоящее время известные последовательности ДНК многих генов можно узнать в интернете при помощи программы BLAST, многого я о ней не расскажу, но подведу к тому, что BLAST пользуется электронной библиотекой сиквенсов генов, о них моя следующая справка:

Справка: Появление глобальной сети «интернет» облегчила жизнь большинству исследователей (не будем трогать учёных таких стран как Северная Корея, им ничуть не облегчила), теперь они имею возможность быстро и дёшево общаться между собой и проводить научные работы совместно, иногда даже будучи незнакомыми людьми. Создание электронных библиотек генов в интернете – это, на мой взгляд, яркий тому пример. Электронная библиотека содержит в себе сиквенсы различных генов существ нашей планеты, и она постоянно пополняется новым материалом. Если бы я, например, занимался генетикой клопа, а именно его устойчивостью к ионизирующим излучениям, и мне удалось бы выделить ген, отвечающий за белок, который определяет эту устойчивость. То я бы, во первых стал миллионером, а во вторых отсиквенировал бы этот ген, кодирующий этот белок, и запустил бы сиквенс в электронную библиотеку под именем «Родоназа клопа» (может быть я бы его так назвал). Теперь всякий учёный, выделивший аналогичный ген, у какого-либо другого существа, в анонимном виде и отсиквенировавший его, запускает в BLAST свою последовательность и получает процент его аналогии с Родоназой клопа, всем хорошо, ну а мне лучше всех!

В настоящий момент в нашей стране (да и во многих других странах) существуют электронные библиотеки генетических маркеров. Возьмём для примера электронную библиотеку генетических маркеров в различных популяциях домашней свиньи (Sus skrofa domesticus) института цитологии и генетики СО РАН. Библиотека состоит из большого числа генетических и количественных признаков, представляющих первичную информацию. Это позволяет пользователю по своему усмотрению организовывать математическую обработку данных, строить и проверять новые модели и гипотезы. В настоящее время библиотека представлена отдельными базами данных по свиньям пород крупная белая, кемеровская, скороспелая мясная и семиреченская. Селекционно-генетическая информация представлена символьными (в случае генетических маркеров) и числовыми (для описания количественных признаков) полями. Формат баз данных позволяет проводить статистическую обработку стандартными методами в среде FoxPro.

Созданные базы данных позволяют проводить поиск и фильтрацию данных по конкретным параметрам (например, возможно составление подвыборок с заданным комплексным генотипом и оценка количественных признаков в определенных группах). Молекулярно-генетический сервер поддерживает различные функции, такие как прием и передача данных пользователю; поддержка пользовательских проектов; статистическая обработка; формирование запросов и получение данных из базы и т.д. Сами данные хранятся в объектно-реляционном представлении под управлением SQL сервера. Выходные результаты могут быть представлены в различном виде, который пользователь определяет при формировании запроса. Например, таблицы первичных данных, таблицы результатов статистической обработки, графики, диаграммы и т.д.[[4]](#footnote-4) Авторство последних полутора абзацев принадлежит какому-то энтузиасту из авторов статьи «Электронные библиотеки – 1999 – Том 2 – Выпуск 3», я решил оставить этот кусок без изменения, на самом деле он нужен не только чтобы увеличить объём моей работы (а это имеет место быть), но и как современный пример работы с маркерами. Допустим мы имеем хряка (будущего производителя), которого на наш взгляд нужно оставить на племя. Мы оцениваем его при помощи определённого набора маркеров и вводим данные в анализирующую систему нашей библиотеки, она выдаёт, насколько этот хряк соответствует стандарту и чем он лучше или хуже уже имеющихся в библиотеке хряков. Если мы принимаем решение о случке нашего хряка с племенной свиноматкой, то достаточно дать компьютеру команду и система автоматически подберёт нам оптимальных свиноматок.

Самое главное, что я хотел донести в этой справке это то, что в случае с Сиквенированием и многими другими методами легче всего работать, уже зная конкретные маркеры, а вот не знать, и находить новые маркеры это уже совсем другая тема, вскользь я пытался объяснить про это в «Дополнении». Так вот наш продвинутый селекционер Серхио имеет доступ к электронным библиотекам генетических маркеров различных популяций коз и интернету (на дворе у нас уже 21 век, а наши чабаны всё со своей новой породой возятся, видимо ещё не клюнул). Так что же будут теперь делать наши молодцы и старик Джамбулат?

К прямому сиквенированию они также решили не прибегать (ещё в начале 80-х), чтобы не разориться и не влезать в долги. А поиски их продолжались и, к величайшей их радости, в 1983 году Кари Маллис, одиночный гений, произвёл революцию в научном мире, открыв полимеразно-цепную реакцию (ПЦР, по английский PCR). На базе ПЦР придумано множество методик для работы с ДНК в различных сферах науки и жизни. Огромное распространение они получили и в сельском хозяйстве, в частности в MAS. Возможностями некоторых новых методов и решили воспользоваться наши чабаны. Расскажу, для начала, про то какие же это методы, хотя бы про часть из них:

Не будем вдаваться в подробности о том, что же такое ПЦР и как она происходит, как говорит моя мама: «Это и ежу понятно!», хотя вопрос спорный, вряд ли эта информация как-то поможет ему лучше выжить. И снова к делу! Первый метод, о котором я хочу рассказать, чем-то напоминает мне ПДРФ, но только по видимым результатам, а называется он RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA). Метод заключается в том, что геномную ДНК, изучаемого объекта, амплифицируют с декануклеотидными, вырожденными праймерами (универсальными праймерами). Праймеры гибридизуються с комплементарными последовательностями на молекуле ДНК, эти комплементарные участки располагаются на молекуле в случайном порядке (не знаю насколько в данном случае уместно такое изречение, по крайней мере, эти праймеры иногда называют случайными). В процессе ПЦР амплифицируються участки, фланкированные этими праймерами. Потом ПЦР-продукт разгоняется на электрофорезе, и мы видим картинку, можем сверить её с «форезом» другого животного. Чем-то напоминает ПДРФ, не правда ли? Расположение, комплементарных праймерам, последовательностей имеет видовые различия, а также может иметь и внутривидовые различия, и наследуется по законам Менделя. При помощи RAPD-PCR можно устанавливать происхождение чёрной икры (пример взят из книги «ДНК технологии в развитии агробиологии»), а можно (наверное) связать полиморфизм ПЦР-продуктов с аллелями каких-либо генов, как при ПДРФ (моё личное предположение).

Зная нуклеотидную последовательность интересующего нас гена, можно подобрать специфичные ему праймеры. Как правило, минимум 18-ти нуклеотидные (в некоторых источниках минимум 17-ти нуклеотидные), и амплифицировать сам интересующий нас ген. Таким образом, мы можем идентифицировать наличие или отсутствие гена устойчивости к заболеваниям, устанавливать пол у животных на любой стадии развития, в случае если это затруднено, определять наличие инфекционных возбудителей во внутренне среде организма, вирусных инфекций и т.д. Существует множество вариантов ПЦР: это и якорная ПЦР, и гнездовая, и инвертированная ПЦР и т.д. Имеются, также, и совмещённые методы анализа, такие как ПЦР-ПДРФ,

ПЦР-ПДРФ – метод, при котором продукт амплификации подвергают рестрикции и разгоняют на электрофорезе (часто на полиакриламидном геле, так как он обладает большей разрешающей способностью). В данном случае все используемые принципы мной уже описаны, амплифицируемый фрагмент ДНК проверяется на наличие точковых мутаций, приводящих к появлению или исчезновению в нём сайтов рестрикции. Используя этот метод можно распознавать аллелизм исследуемого гена и определить его гомозиготность или гетерозиготность (если, конечно, это эукариот). Опять же говоря метод, даёт результат не во всех случаях. У этого метода имеются модификации, но подробно говорить о них не будем, причины я объясню ниже.

Про различные варианты использования ПЦР, для идентификации полиморфизма можно говорить неделями, а уже 6, через два часа мне надо идти гулять с собакой и ехать в университет, а ещё хочется про гибридизацию рассказать и итоги подвести. Да и в общем-то принципиальных различий в множестве методов амплификации нет, такое огромное количество методов обусловлено невероятной сложностью устройства генома. Как небольшой итог хочу обратить ваше внимание на наличие двух основных принципов использования ПЦР, в одном случае мы не знаем последовательность исследуемого гена и проводим аналогию между сцеплением «аллелей амплификации» и аллельным положением исследуемого гена (или какой-либо иной последовательности), а в другом случае мы знаем сиквенс нашей последовательности (в частности гена) и работаем с ним непосредственно.

Необходимо обратить внимание на то, что методы полиморфизма ДНК позволяют рассуждать не только о наличии или аллельности экспрессирующих последовательностей, но и о генах-регуляторах, и о неэкспрессрующих последовательностях, а также устанавливать гомо- или гетерозиготность организма и ещё кучу всего интересного[[5]](#footnote-5).

А теперь поговорим немного о гибридизации. Гибридизация, в данном случае, это образование водородных связей между комплементарными нуклеотидами двух одноцепочечных молекул нуклеиновых кислот (ДНК-ДНК; ДНК-РНК; РНК-РНК). Этот метод может использоваться для картирования генома (FISH), определения гомологии геномов различных организмов (GISH), для идентификации генетических маркеров и многого другого. Чтобы использовать гибридизацию в качестве молекулярного маркера нам необходимо изготовить зонд (ну или купить его). Зондом называют известную нам одноцепочечную последовательность ДНК либо РНК, комплементарную искомой нами последовательности (например, гену), обладающую какой-либо меткой. Зонд может содержать от 15 до 1000 нуклеотидов. В качестве метки можно использовать флюрохромы или радиоактивные нуклеотиды. Кстати говоря, часто ДНК-зонды получают при помощи ПЦР в присутствии меченых нуклеотидов или ещё рядом методов.

Один из вариантов гибридизации – блоттинг. Например, Саузерн-блоттинг (Southern-blotting, Southern-transfer) – это метод обнаружения специфических нуклеотидных последовательностей путем переноса, электрофоретически разделенных, фрагментов ДНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр за счет капиллярного эффекта (blotting – «промокание») и гибридизации ДНК- или РНК-зондом, комплементарным искомой последовательности; образование гибридов обнаруживают в основном методом авторадиографии. Метод разработан Э.Саузерном и Р.Дэйвисом в 1975. Если изучаемую геномную ДНК гидролизовать какими-либо рестриктазами, разогнать полученную смесь фрагментов на электрофорезе, перенести фрагменты на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовать их с ДНК-зондом исследуемой последовательности, можно убить сразу двух зайцев: выявить имеется ли определяемая последовательность у исследуемого существа и, если имеется, то в каком из рестрикционных фрагментов она находиться. Подобный метод работы с РНК называется Нозерн-блоттинг, а с белками Вестерн-блоттинг. При помощи Нозерн-блоттинга можно выявить экспрессируется или молчит какой-либо ген в исследуемой клетке, для этого надо провести гибридизацию соответствующего ДНК-зонда с молекулами РНК, выделенными из клетки. При помощи блоттинга возможно идентифицировать и различные аллельные варианты генов, для этого необходимо изготавливать минисателитные ДНК-зонды (длиной 15-20 нуклеотидов), комплементарные участку точечной мутации на молекуле ДНК[[6]](#footnote-6).

Методы гибридизации с использованием ДНК-зондов очень хороши и несложны. Они дают точную информацию о интересующем нас объекте, но имеет и недостатки, например необходимость знать точную последовательность нуклеотидов в исследуемом фрагменте ДНК либо РНК. В настоящее время разработан метод анализа с использованием чипов. Чипы представляют собой пластинки с иммобилизованными ДНК-зондами. Каждая такая пластинка может содержать несколько десятков тысяч зондов, расположенных в определенной последовательности. Метка проявляется только в спаренных двухцепочечных фрагментах. Если в исследуемом образце есть последовательности, комплементарные последовательностям зонда, то гибридизацию можно определить визуально или с помощью специальных приборов. Как правило, детекторы соединены с компьютером, то есть процедура считывания, и обработки информации автоматизирована.

Такие ДНК-чипы можно применять для комплексной диагностики инфекционных заболеваний, наследственных дефектов, установления экспрессии тех или иных генов (в этом случае идет гибридизация с мРНК), то есть отслеживания нарушений обмена веществ. Они дешевы, очень надежны, просты в обращении и могут многократно использоваться. Недостаток – дорогая аппаратура для детекции.

Вернёмся к нашим козам и посмотрим, какой же метод использовали для детекции наши чабаны:

А пользоваться они стали самым распространённым и универсальным – ПЦР диагностикой. Серхио в интернете нашёл библиотеку генетических маркеров коз, сделанную каким-то исследователем до них, Ванька проанализировал какие гены им нужны, а Джамбулат праймеры нужные на всех заказал (наверное ему сын помог). И начали они коз своих оценивать при помощи маркеров. Отобрали каждый нужных коз и Ваньке привезли, начал он их скрещивать. После каждого скрещивания всё потомство снова при помощи маркеров оценивалось и так пока абсолютной однородности по исследуемым признакам не добились. Получили наши чабаны новую породу, жирномолочную, густошерстную, равнинную. Стали жить-поживать и добра наживать!

**Заключение**

Селекция при помощи маркеров это новая, развивающаяся наука. В настоящее время она получает распространение на все виды сельскохозяйственных животных и растений. MAS уже используют в селекции свиней, лошадей, КРС, овец и других животных. В настоящее время вклад MAS в общую селекцию не велик, но будущее именно за маркерами. Проблема продовольствия во всём мире уже даёт о себе знать и это только начало. Экстенсивное развитие сельского хозяйства приводит к глобальному уничтожению природы, а еды всё равно начинает не хватать. Применение новых методов селекции позволит, со временем, перейти на интенсивное хозяйство, получить растения и животных гораздо большей продуктивность и более устойчивых к различным факторам среды. Если действовать с умом, то в будущем перестанут уничтожать природу, бешеный рост населения земли прекратиться, уровень населения стабилизируется, с, сравнительно, небольших территорий можно будет получать необходимое количество продуктов питания и сырья для промышленности. Есть небольшая надежда, что человек наконец заживёт в гармонии с природой.

Как я уже говорил, MAS безопасна с точки зрения экологии и потребления продуктов питания. Это один из реальных, с моей точки зрения, путей спасения планеты.

Будущее за селекцией при помощи маркеров!

В своей работе я постарался своим языком объяснить своё собственное понимание применения селекции при помощи маркеров. Механизмы адаптации и мутирование генов, которые я приводил в работе, придуманы мной, но я старался максимально приблизиться к реальным эволюционным механизмам. Все личности и названия генов, исключая учёных и фосфофруктокиназу-1, являются также вымышленными, любые аналогии проведённые с реальными людьми будут являться чистым совпадением.

**Список использованной литературы**:

1. П.Н. Харченко, В.И. Глазко. ДНК-технологии в развитии агробиологии. М: «Воскресенье», 2006, — 480 стр. с илл.
2. Деева B.C., Сухова Н.О. Группы крови крупного рогатого скота и их селекционное значение / РАСХН. Сиб. отд-ние. Сиб-НИПТИЖ. — Новосибирск, 2002. — 172 с.
3. Л.А. Калашникова, И.М. Дунин, В.И. Глазко Селекция XXI века: использование ДНК-технологий / Минсельхоз РФ. ВНИИПлем. -- Московская область, Лесные Поляны, 2001 – 50 с.
4. www.elbib.ru/index.phtml?page=elbib/rus/journal/1999/part3/orlova - 36k -
5. www.biotechnolog.ru/ge/ge7\_1.htm - 10k
1. **П.Н. Харченко, В.И. Глазко.** ДНК-технологии в развитии агробиологии. М: «Воскресенье», 2006, — 480 стр. с илл. стр. 55-56. [↑](#footnote-ref-1)
2. **Деева B.C., Сухова Н.О. Группы крови крупного рогатого скота и их селекционное значение** / РАСХН. Сиб. отд-ние. Сиб-НИПТИЖ. — Новосибирск, 2002. — 172 с. стр. 133-150. [↑](#footnote-ref-2)
3. **Л.А. Калашникова, И.М. Дунин, В.И. Глазко** Селекция XXI века: использование ДНК-технологий / Минсельхоз РФ. ВНИИПлем. -- Московская область, Лесные Поляны, 2001 – 50 с. стр. 5-15. [↑](#footnote-ref-3)
4. www.elbib.ru/index.phtml?page=elbib/rus/journal/1999/part3/orlova - 36k - [↑](#footnote-ref-4)
5. **П.Н. Харченко, В.И. Глазко.** ДНК-технологии в развитии агробиологии. М: «Воскресенье», 2006, — 480 стр. с илл. стр. 101-108. [↑](#footnote-ref-5)
6. 1. www.biotechnolog.ru/ge/ge7\_1.htm - 10k [↑](#footnote-ref-6)