

Лекция №1

ПРЕДМЕТ, МЕТОДЫ И ЗНАЧЕНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ГЕНЕТИКИ

План лекции

1. Предмет и значение экологической генетики
2. Задачи экологической генетики
3. Методы экологической генетики

В настоящее время экологическая генетика сформировалась как синтетическое научное направление, вобравшее в себя закономерности и постулаты двух базовых фундаментальных дисциплин – экологии и генетики.

Экологическая генетика это - отрасль знания, исследующая взаимодействие генетических процессов и экологических отношений. Она изучает влияние различных экологических факторов на наследственность животных, устойчивость к заболеваниям, сопряженную эволюцию микро- и макроорганизмов, генетическую обусловленность накопления или выведения из организма вредных веществ, генетически детерминированные реакции животных на лекарственные препараты.

Будучи частью генетики эта наука использует мощную методологию генетического анализа и включает все разнообразие методов экологии.

Выделяют два основных направления экогенетических исследований. Экологическая генетика изучает:

1. генетическую предопределенность экологических отношений.
2. воздействие экологических факторов на генетические процессы (в первую очередь, мутагенез)

Проблемы оценки генетического риска, обусловленного факторами окружающей среды - важнейшая задача экогенетики. Эти исследования сфокусированы на следующих вопросах:

- каким образом данный фактор действует на генетический материал
- насколько широко подвергается популяция воздействию этого фактора
- каково вероятное увеличение частоты мутаций по сравнению с частотой спонтанных мутаций
- каковы долговременные последствия увеличения частоты мутаций для популяции

Генетическая (прежде всего - мутагенная) активность факторов среды обитания может быть исследована на основе разнообразных критериев у широкого круга объектов: генные мутации у бактерий, дрожжей и водорослей; хромосомные aberrации и летальные мутации у животных и

растений; активация промутагенов метаболической системой у различных объектов и т.д. Таким образом, раскрывается содержание генетической токсикологии.

Генетический контроль самих экологических отношений исследуют у объектов, с генетически-детерминированными различиями в чувствительности к экологическим факторам - физическим и химическим воздействиям, в том числе и антропогенного происхождения, а также к факторам профессионального риска у человека. Выявление простых признаков (в частности признаков метаболизма), объединяющих различные организмы в общую экологическую систему, предоставляет возможности для изучения генетического контроля этих отношений на элементарных эколого-генетических моделях. Все эти подходы позволяют приблизиться к рассмотрению экологических отношений как фактора эволюции.

Одна из задач экологической генетики в животноводстве — селекция животных на устойчивость к вредным физическим, химическим и биологическим факторам.

Исследованиями установлено негативное влияние радиации и химических загрязняющих веществ на хромосомную нестабильность, иммунный ответ к некоторым антигенам, гормональный статус и накопление химических элементов в тканях крупного рогатого скота. Проводится цитогенетический, иммуногенетический, иммунологический, химический и биохимический мониторинг популяций сельскохозяйственных животных в экологически чистых и загрязненных районах Западной Сибири.

Неблагоприятная экологическая среда, характеризующаяся возрастанием уровня ионизирующей радиации, интенсивным ультрафиолетовым излучением и особенно действием токсических химических соединений, которыми сейчас в ряде регионов перенасыщены воздух, вода, почва и растения, повышенная контактность животных с ретровирусами приводят к снижению уровня иммунитета и увеличению нестабильности генетического аппарата животных. Это может проявляться в форме образования мобильных генетических элементов, способных к трансформации в вирусы иммунодефицита — СПИДа у человека и аналогичные им у животных.

Ученые подчеркивают, что проблема СПИДа (и родственных ему заболеваний, вызываемых ретровирусами — автономными генами, которые во многом сходны с вирусом иммунодефицита у человека) — это совершенно новая биологическая ситуация, с которой начинается широкое распространение приобретенной генетической патологии. При этом резкое ухудшение экологической ситуации можно считать ведущей причиной того,

что именно во второй половине XX в. стали выходить из-под контроля процессы образования подвижных генов.

Таким образом, можно выделить такие подразделы экологической генетики, как:

- 1) разработка элементарных эколого-генетических моделей;
- 2) исследование биологических факторов изменчивости;
- 3) изучение устойчивости организмов к абиотическим факторам окружающей среды;
- 4) генетическая токсикология, нацеленная на выявление генетически активных факторов среды и предотвращение их влияния, прежде всего на усугубление генетического груза

Дальнейшее развитие экологической генетики, несомненно, связано с расшифровкой механизмов модификационной изменчивости, на базе которых происходит взаимодействие организмов в конкретных экосистемах. Современное сельское

хозяйство и медицина в основном используют именно модификационную изменчивость сельскохозяйственных животных и растений, равно как и людей-пациентов в аспекте их реакции на внешние воздействия: кормление, удобрения, пестициды, медикаменты.

МЕТОДЫ ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

Увеличение частоты ранее известных или появление новых мутаций в последующих поколениях животных — показатель возрастающего действия мутагенов среды. В условиях конкретной экологической среды разведения животных важное значение имеет определение мутагенной активности как отдельных факторов, так и всего их комплекса. Здесь речь может идти о генетической активности лекарственных препаратов, применении нетрадиционных кормовых добавок, гормональных обработок животных. Главное внимание должно уделяться анализу влияния на стабильность генома того или иного уровня загрязнения окружающей среды.

В настоящее время рекомендуется использовать следующие тесты генетической активности веществ:

- 1) генные мутации;
- 2) хромосомные абберации;
- 3) обмены между сестринскими хроматидами;
- 4) микроядерный тест;
- 5) цитометрические тесты.

Методы идентификации мутаций

Базовые методы идентификации мутаций

Одним из основных и исторически первым методом идентификации мутаций был метод блот-гибридизации (Саузерн-блот), предложенный еще в 1975 г. [Southern, 1975]. Суть метода заключается в рестрикции геномной ДНК одной или несколькими эндонуклеазами, образовавшиеся фрагменты ДНК разделяют по их молекулярной массе путем электрофореза в агарозном геле. Затем ДНК переносят на целлюлозный фильтр или нейлоновую мембрану. Фиксированную на фильтрах ДНК гибридизуют с ДНК-мечеными зондами, позволяющими точно определить локализацию и, соответственно, размеры искомого геномного фрагмента ДНК.

Другим базовым методом ДНК-диагностики, безусловно, является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который позволяет избирательно синтезировать *in vitro* относительно небольшие фрагменты ДНК, длиной от нескольких десятков до нескольких сотен, реже до нескольких тысяч пар оснований .

Следует отметить, что ПЦР, безусловно, самый часто используемый молекулярный метод, позволяющий не только идентифицировать многие уже известные мутации, но и лежащий в основе более сложных современных методов изучения генома, в том числе и анализа неизвестных мутаций.

Первичная идентификация мутаций

Наиболее просто идентифицируют мутации, изменяющие длину амплифицированных фрагментов. Такие нарушения легко выявляются при электрофоретическом анализе. Протяженные делеции, захватывающие целые экзоны, могут быть выявлены по изменению длины рестрикционных фрагментов методом блот-гибридизации. Для выявления делеций в генах,

локализованных на половых хромосомах, разработана более простая и эффективная методика, которая основана на одновременной амплификации различных экзонов, мультиплексный вариант ПЦР.

При мутациях гена, представляющих собой замену одного или нескольких нуклеотидов, длина амплифицированных фрагментов остается постоянной, однако некоторые физико-химические свойства мутантных молекул ДНК меняются. С учетом этих особенностей разработаны различные варианты поиска и идентификации точечных мутаций. Ведущими из них являются:

- 1) метод анализа конформационного полиморфизма однострессовой ДНК — SSCP;
- 2) денатурирующий градиентный гель-электрофорез — DGGE;
- 3) метод гетеродуплексного анализа — HA;
- 4) метод химического расщепления некомплементарных сайтов — CMC;

Выявление мутаций этими методами должно обязательно подтверждаться результатами секвенирования изучаемого ДНК-фрагмента гена, так как только метод секвенирования дает полную информацию о типе и характере нуклеотидных изменений в последовательности ДНК.

Идентификация известных мутаций

В настоящее время идентифицированы сотни генов с мутациями.

Как упоминалось выше, мутации, изменяющие длину амплифицированных фрагментов, могут быть выявлены с помощью нативного электрофореза в полиакриламидном или агарозном гелях.

Из точечных мутаций наиболее просто диагностируются замены нуклеотидов, которые приводят к исчезновению или образованию сайта узнавания для какой-нибудь из рестриктаз (эндонуклеаз). Если естественных рестрикционных сайтов в месте мутации найти не удастся, то такие сайты могут быть созданы искусственно (*Метод ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза*).

Секвенационные тесты, основаны на определении полной последовательности (секвенировании) участка генома или всего генома. Эти методы позволяют получать информацию не о некоторых, а обо всех нуклеотидах исследуемой последовательности РНК или ДНК, а значит,

обнаруживать не только ранее изученные, но и новые мутации генома.

Методы ДНК-чипов. Решающие успехи в идентификации и массовом сканировании однонуклеотидных замен (SNP) связывают с разработкой методов чипов (array based analysis). В обычном варианте чипы представляют собой серию коротких олигонуклеотидных последовательностей (различных по своему составу), зафиксированную на твердой поверхности (стекле или полимерной пластинке, разделенных на ячейки), так, что на 1 см² поверхности можно разместить до 10 000 таких последовательностей, различающихся между собой заменой одного нуклеотида, причем позиция каждого из них четко закреплена и хорошо идентифицируется в автоматическом режиме. Автоматическая регистрация результатов гибридизации производится с помощью системы сканирования флюоресценции и последующей компьютерной обработки. Этот подход весьма перспективен и используется не только в исследовательских целях. Он нашёл применение для анализа устойчивости ВИЧ к лекарственным препаратам, для определения маркеров онкологических заболеваний, генотипирования вирусов, так как представляет собой удачную альтернативу трудоемкому методу секвенирования.

Методы идентификации хромосомных aberrаций

Одним из самых доступных методов оценки хромосомных aberrаций является цитогенетический метод. С помощью рутинной и дифференциальной окрасок этот метод позволяет выявлять такие хромосомные aberrации, как хромосомные и хроматидные делеции, дупликации, инверсии, транслокации хромосом, а также пробелы, разрывы, фрагменты и ассоциативную способность акроцентрических хромосом.

Наиболее часто применяют метафазный метод, который дает возможность детально изучить широкий спектр aberrаций хромосом.

Обмены между сестринскими хроматидами

Анализ частоты сестринских хроматидных обменов в лимфоцитах крови дает возможность установить наличие генетической активности при воздействии на организм того или иного химического агента. Сущность его состоит в том, что в культивируемые *in vitro* лимфоциты, стимулированные для прохождения митозов фитогемагглютинином, вводят аналог тимидина 5-бромдезоксимуридин (БДУ). В зависимости от времени его добавки в среду (первый или второй клеточный цикл) он включается в одну или обе сестринские хроматиды. При соответствующей обработке препаратов и использовании красителя Гимзы под микроскопом можно видеть хромосомы

с одной окрашенной (БДУ включился) и с другой неокрашенной хроматидами. В отдельных хромосомах наблюдают дифференциальную окраску хроматид — чередование темных и светлых участков. Это значит, что произошли изменения, т. е. обмены между сестринскими хроматидами (СХО). Высокая частота СХО свидетельствует о мутагенном действии изучаемого вещества, с которым контактировали клетки крови.

Микроядерный тест

Чувствительный метод выявления мутагенности факторов среды — микроядерный тест. Дело в том, что дополнительные маленькие ядра (микроядра) в окрашенных мазках крови образуются за счет целых хромосом или их фрагментов, которые при делении не включаются в основное ядро из-за повреждений. Наблюдается возрастание числа микроядер в эритроцитах млекопитающих при воздействии мутагенов.

Цитометрические методы.

Метод оценки генотоксичности использует направление цитометрии (FCM). С его помощью содержание ДНК от десяти до нескольких тысяч клеток может быть обработано в течение одной минуты с высокой точностью при реальном обнаружении аномалий. С помощью этого метода образцы извлекаются из организма. Образцы крови рыб, рептилий и птиц подходят для использования, так как имеют ядерные эритроциты.

Литература:

1. Жимулёв И.Ф. Общая и молекулярная генетика: учеб пособие / И.Ф. Жимулёв. - Новосибирск : Изд-во НГУ, 2002, 2003. - 458 с.
2. Корзинников Ю.С. Основы экологической генетики: учеб. пособие / Ю.С. Корзинников, Н.Н. Шипилин.- Новосибирск : НГАУ, 2010 - 286 с.
3. Петухов В.Л. Генетика: учебник / В.Л. Петухов, О.С. Короткевич, С.Ж. Стамбеков и др.- Новосибирск: СемГПИ, 2007. – 628 с
4. Себежко О.И. Экологическая генетика: учеб. пособие / О.И. Себежко, В.Л. Петухов, О.С. Короткевич и др. - Новосибирск : Прометей, 2011 - 567 с.