

**ДРОГОБИЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ імені ІВАНА ФРАНКА**

Галина Клепач

ГЕНЕТИКА З ОСНОВАМИ СЕЛЕКЦІЇ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

до проведення лабораторних робіт

**для здобувачів бакалаврського та магістерського рівнів вищої освіти
біологічних спеціальностей**

Дрогобич, 2022

УДК 378.147.88

К 48

Рекомендовано до друку вченою радою Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка (протокол № 5 від 28. 04. 2022 р.)

Рецензенти: **Голуб Наталія Ярославівна**, кандидат біологічних наук, доцент кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка;

Філь Віталій Михайлович, кандидат біологічних наук, доцент кафедри анатомії, фізіології та валеології Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка;

Відповідальний за випуск: **Монастирська Світлана Семенівна**, кандидат біологічних наук, доцент, завідувачка кафедри біології та хімії Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка.

Клепач Галина.

К 48 **Генетика з основами селекції** : методичні рекомендації до проведення лабораторних робіт [для здобувачів бакалаврського та магістерського рівнів вищої освіти біологічних спеціальностей]. Дрогобич : Редакційно-видавничий відділ Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка, 2022. 68 с.

Методичні рекомендації написані відповідно до робочих програм навчальної дисципліни “Генетика з основами селекції” для підготовки здобувачів бакалаврського та магістерського рівнів вищої освіти спеціальностей 091 Біологія, 014 СО (Біологія та здоров'я людини, хімія), 014 СО (Біологія та здоров'я людини), 014 СО (Географія), затверджених вченою радою Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка. Посібник укладений відповідно до вимог програм навчальної дисципліни з метою забезпечення високого рівня сформованості знань, умінь і навичок у студентів. У матеріалах наведені короткі теоретичні відомості до кожної лабораторної роботи, контрольні питання, додатки.

Бібліографія 10 назв

З М І С Т

Вступ.....	4
Перелік лабораторних робіт.....	6
Інструкції до проведення лабораторних робіт.....	7
Лабораторна робота 1. Об'єкти генетичних досліджень. <i>Drosophila melanogaster</i> як об'єкт генетичних досліджень.....	7
Лабораторна робота 2. Аналіз успадкування ознак при моногібридному схрещуванні.....	14
Лабораторна робота 3. Аналіз зчепленого зі статтю успадкування ознак.....	20
Лабораторна робота 4. Каріотиби організмів. Дослідження політенних хромосом дрозофіли.....	25
Лабораторна робота 5. Визначення мітотичного індексу. Анафазно-телофазний аналіз.....	31
Лабораторна робота 6. Дослідження каріотипу людини. Каріотипування.....	37
Лабораторна робота 7. Статевий хроматин. Експрес-діагностика кількості x-хромосом.....	42
Лабораторна робота 8. Мутагенез. Відбір та ідентифікація мутантів мікроорганізмів.....	47
Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт та оформлення звіту.....	52
Зразок оформлення звіту лабораторної роботи	53
Довідково-інформаційні дані для проведення лабораторних робіт.....	56

ВСТУП

Генетика з основами селекції, що читається для здобувачів вищої освіти (ВО) біологічних спеціальностей, одна із сучасних біологічних наук, яка останніми десятиріччями активно розвивається і доповнюється новими знаннями, відкриттями, науковими напрямками та практичними здобутками.

Генетика вважається основою сучасної біології, оскільки універсальні закони спадковості та мінливості справедливі для усіх організмів. Її знання та методи є важливими у будь-яких біологічних дослідженнях, у вивченні біології організмів різних рівнів організації, а особливо, у селекційній практиці. У зв'язку з цим оволодіння класичними методами та науковими підходами до їх виконання, якими оперують генетика і селекція, є надзвичайно важливими у підготовці біологів як висококваліфікованих учителів.

Мета методичних рекомендацій – допомогти здобувачам ВО якісно, на належному рівні виконати завдання лабораторних робіт, закріпити набуті теоретичні знання, розширити і поглибити їх, а також сприяти засвоєнню нових знань і вмінь.

Методичні рекомендації знайомлять здобувачів ВО з облаштуванням і обладнанням генетичної лабораторії, правилами і технікою роботи з деякими об'єктами генетики; постановкою дослідів за їх використання. До кожної лабораторної роботи подаються короткі теоретичні відомості, теоретичні й практичні завдання, рекомендована література.

Лабораторні роботи передбачають освоєння здобувачами ВО класичних та сучасних генетичних підходів й методів генетичного аналізу при вивченні особливостей успадкування ознак у деяких об'єктів генетики, вмінь застосовувати певні наукові підходи до вивчення генетичної природи мутацій у досліджуваних об'єктів, а також критично оцінювати отримані результати із застосуванням статистичних методів, науково обґрунтовувати їх, враховуючи сучасні дані генетики.

На лабораторних роботах здобувачі ВО мають змогу освоїти техніку та методи роботи з такими класичними генетичними об'єктами, як *Drosophila melanogaster* і *Saccharomyces cerevisiae* (фенотиповий аналіз та гібридизацію ліній *D. melanogaster*, генетичний аналіз успадкування ознак у *D. melanogaster*, індукований мутагенез отримання мутантів *S. cerevisiae*), а також опанувати деякі методи цитогенетики (визначення мітотичного індексу меристеми у рослинного тест-об'єкта цибулі *Allium cepa*, анафазно-телофазний аналіз), генетики людини (каріотипування, експрес-діагностику статевого хроматину у людини), що сприятиме глибшому пізнанню генетичних основ та механізмів спадковості і мінливості.

Автор висловлює подяку за консультування при підготовці посібника викладачам кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка, а також за надання лабораторної та мутантних ліній *D. melanogaster*, що використовуються під час проведення лабораторних робіт.

ПЕРЕЛІК ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

1.	Об'єкти генетичних досліджень. <i>Drosophila melanogaster</i> як об'єкт генетичних досліджень
2.	Аналіз успадкування ознак при моногібридному схрещуванні
3.	Аналіз зчепленого зі статтю успадкування ознак
4.	Каріотиби організмів. Дослідження політенних хромосом дрозофіли
5.	Визначення мітотичного індексу. Анафазно-телофазний аналіз
6.	Дослідження каріотипу людини. Каріотипування
7.	Статевий хроматин. Експрес-діагностика кількості Х-хромосом людини
8	Мутагенез. Відбір та ідентифікація мутантів <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

ІНСТРУКЦІ ДО ПРОВЕДЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

ОБ'ЄКТИ ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Drosophila melanogaster ЯК ОБ'ЄКТ ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Мета: ознайомитись із деякими об'єктами класичної та молекулярної генетики; оволодіти технікою роботи з класичним генетичним об'єктом *Drosophila melanogaster*, ознайомитись з морфологією дикої та мутантних ліній дрозофіли, основними стадіями її розвитку.

Матеріали і обладнання: біноклярна лупа, пластинка-поле, гістологічна голка, пензлик, наркотизатор, ефір, вата, дика і мутантні лінії дрозофіли.

Теоретичні відомості. У лабораторних практикумах з генетики використовується багато рослинних, тваринних і мікробіологічних об'єктів (див. додаток Б). Найчастіше у генетичному аналізі застосовують різні мікроорганізми (бактерії, дріжджі, плісневі гриби), віруси (бактеріофаги), рослини (горох, кукурудзу, арабідопсис), тварини (дрозофіли, миші, кролики та ін.). Ці та багато інших організмів, які називають генетичними об'єктами, повинні відповідати певним вимогам: мати короткотривалий життєвий цикл; високий коефіцієнт розмноження (високу плодючість); значну кількість вивчених генів, які детермінують легко відрізними ознаки; невелику кількість хромосом; є зручними і дешевими у культивуванні [5]. Найбільш повно відповідає таким вимогам плодова (фруктова, або оцтова) мушка дрозофіла *Drosophila melanogaster*, яка вперше була введена в лабораторну практику американським генетиком А. Кестлем. Цьому сприяли й дослідження школи американського ембріолога та генетика Томаса Ханта Морганна. Досліди з використанням *D. melanogaster* було розпочаті Т.Г. Морганом у 190 р. У 1910 р. ним була виявлена перша спонтанна мутація у дрозофіли, а згодом – виділена перша мутантна лінія: white, w (білоокість очей). У подальшому, більшість законів класичної генетики були відкриті під час досліджень механізмів успадкування ознак саме на дрозофілі. Упродовж кількох десятків років,

дослідження за використання дрозозфіли домінували в генетичних лабораторіях світу. Однак, після введення у генетичну практику мікроорганізмів, а згодом й вірусів, дослідження за їх участю значно випередили усі інші [2].

Останніми роками, у багатьох напрямках біології: екологічній генетиці, генотоксикології, генетиці розвитку, нейробіології, геноміці та інших, *D. melanogaster* як модельний об'єкт знову набув значної популярності. Завдяки високій плодовитості (від однієї пари батьківських особин можна отримати від 100 до 175 нащадків), зручності розведення у лабораторних умовах, значній кількості спонтанних та індукованих мутацій, невеликій кількості хромосом (4 пари), вивченому геному, великій кількості вивчених генів, вона є зручним об'єктом при виконанні багатьох наукових досліджень [3].

Важливість досліджень за використання *D. melanogaster* як модельного об'єкта не тільки для біології, а й медицини, підтверджується важливими відкриттями, за які було присуджено ученим Нобелівські премії у галузі медицини та фізіології. Серед Нобелівських лауреатів, американський біолог-генетик Томас Хант Морган (за відкриття ролі хромосом у спадковості, 1933), американський генетик Герман Джозеф Мюллер (за відкриття мутагенності X-променів, 1946), американський генетик Едвард Баттс Льюїс разом з німецьким біологом Христіаною Нюслайн-Фольгард та американським біологом Еріком Вішаусом (за роботи по генетичному контролю раннього ембріонального розвитку дрозозфіли, 1995), американський біолог і генетик Майкл Уоррен Янг разом з американськими генетиками Джеффі Холлом та Майклом Росбашем (за відкриття молекулярних механізмів, які відповідають за циркадні ритми, 2017) [3].

D. melanogaster (представник родини *Drosophilidae*, ряду *Diptera* класу *Insecta*, підтипу *Tracheata* і типу *Arthropoda*) легко розмножується у лабораторних умовах, має короткий цикл розвитку, високу плодючість, невеликий розмір тіла (до 2–3мм), який дає змогу досліджувати її в лабораторних і аудиторних приміщеннях на достатньо обмежених площах, а, крім того, розмір особин є достатнім для візуального дослідження фенотипових мутацій. Харчується дрозозфіла збродженими фруктами, овочами, соком дерев, а тому в районах її проживання може бути легко виловлена поблизу фруктових садів та дерев. Улітку та восени на відкритому повітрі можна виловити представників природних популяцій дрозозфіли,

якщо на кілька годин залишити банку з фруктами, що розкладаються. Багато видів роду *Drosophila* живуть на рослинах, живлячись пилюком, деякі види оселяються на грибах. У лабораторних умовах дрозофіла харчується продуктами дріжджового бродіння [1].

D. melanogaster – невелика сіра муха, довжина тіла якої близько 3 мм, з червоно-коричневими фасетковими очима (у самок зазвичай кількість фасеток рівна 780, а у самців – 740) і перетинчастими крилами, вкриті дрібними волосками, які незначно перевищують довжину тіла. Самки дрозофіли відрізняються від самців величиною, вони переважно дещо більші від самців: кінець черевця у них загострений, у самців – заокруглений (див. Додаток В). Останні сегменти черевця у самок пігментовані значно слабше, ніж у самця. Крім того, у самців є статеві гребінці у вигляді міцних хітинових щетинок на першому членику передніх ніг. Грудна частина дрозофіли складається з трьох сегментів: передньо-, середньо та задньогрудей. На передньогрудях розміщені шийні склери, які сполучають голову дрозофіли з передньогрудьми. До них рухомо за допомогою виростів приєднана I пара ніг. Середньогруди – найбільш масивна частина тіла дрозофіли, до якої приєднані II пара ніг і крила. Задньогруди дрозофіли мають стінку та бокові частини, до яких прикріплені III пара ніг та дзижчальця. На грудях дрозофіли є щетинки (макрохети) [3].

Розвиток дрозофіл – це складний процес з метаморфозом, який включає стадії яйця, личинки, лялечки та імаго (див. Додаток В). Запліднення яйця та перші стадії розвитку протікають у статевих шляхах самки. Через дві доби після виходу, самка дрозофіли може почати відкладати яйця. В середньому, одна денна кладка дрозофіли налічує 50–70 яєць, і така плідність підтримується упродовж 7–10 діб. Кількість яєць, які відкладають самки, істотно залежить від щільності популяції та умов існування. Після набуття статевої зрілості і майже до кінця життя запліднена самка і незапліднена також, однак менш продуктивно, здатна відкладати яйця. Самки дрозофіли здатні зберігати сперму самців у своїх спермоприймачах упродовж всього життя, а тому відкладати запліднені яйця можуть навіть після одного спаровування [3].

Після вилуплення з яйця, личинки перебувають на поверхні середовища, а потім занурюються всередину. Перед заляльковуванням більшість личинок виповзають на стінки пробірки. Стадія лялечки триває близько 4–5 днів, упродовж яких з

імагінальних дисків формуються усі органи імаго. На останніх етапах розвитку лялечки крізь тонку оболонку можна детально роздивитись основні риси фенотипу дорослої особини (імаго). Мухи, які щойно вилупилися, позбавлені пігменту, а їх тіло має світло-сірий, не характерний для дорослих особин колір тіла. Терміни розвитку дрозофіли в умовах оптимальної температури (20 – 22 °С): яйце – I доба; личинки (I, II, III віку) – 5 діб; лялечки – 5 діб. При температурі нижче 20°C життєздатність мух знижується, а зростання вище 25°C веде до зменшення плідності. Виліт нового покоління відбувається через 10–12 діб після відкладання яєць мухами на середовищі. За таких умов культивування можна отримати близько 40 генерацій дрозофіли на рік, що є однією із переваг цього об'єкта. Тривалість життя дорослих особин дрозофіли з моменту вильоту із лялечки у лабораторних умовах складає 3–4 тижні, хоча у спеціальних умовах дрозофіла може жити до 135 діб. Життєздатність мутантних форм дрозофіли здебільшого знижена [2].

Знання особливостей дикого фенотипу *D. melanogaster* має суттєве значення для аналізу мутацій. У неї описано значну кількість спонтанних мутацій та ще більше індукованих. У генетичному аналізі *D. melanogaster* найчастіше використовують такі ознаки, як форма і колір очей, форма та тип розвитку крил, забарвлення тіла, будова щетинок та інші (див. таблицю 1) [3].

Таблиця 1

Мутантні лінії *D.melanogaster*

№	Назва мутації	Позначення	Фенотиповий прояв	Локалізація мутації в хромосомах (номер; відстань)
1	2	3	4	5
ЗА КОЛЬОРОМ ТІЛА				
1	<i>yellow</i>	<i>y</i>	Жовте	1; 0,0
2	<i>black</i>	<i>b</i>	Чорне	2; 48,5
3	<i>ebony</i>	<i>e</i>	Чорне	3; 70,7
ЗА КОЛЬОРОМ ОЧЕЙ				
1	<i>white</i>	<i>w</i>	Білі	1; 1,5
2	<i>white^a</i>	<i>w^a</i>	абрикосові	1; 1,5
3	<i>white^e</i>	<i>w^e</i>	Малинові	1; 1,5
4	<i>white^{ch}</i>	<i>w^{ch}</i>	Вишневі	1; 1,5
5	<i>prune</i>	<i>pn</i>	Сливові	1; 0,8
6	<i>vermilion</i>	<i>v</i>	Кіноварні	1; 33,0

7	<i>brown</i>	<i>bw</i>	ясно-коричневі	2; 104,5
8	<i>scarlet</i>	<i>st</i>	багряно-червоні	3; 44,0
9	<i>sepia</i>	<i>se</i>	темно-коричневі	3; 26,0
10	<i>cinnabar</i>	<i>cn</i>	яскраво-червоні	2; 57,5
ЗА ФОРМОЮ ОЧЕЙ				
1	<i>Bar</i>	<i>B</i>	смушковидні	1; 57,0
2	<i>ultra Bar</i>	<i>BB⁺</i>	вужкосмушковидні	1; 57,0
3	<i>Lobe</i>	<i>L</i>	зменшені, випуклі	2; 72,0
4	<i>eyelless</i>	<i>ey</i>	Безокий	4; 0,2
ЗА РОЗМІРОМ ТА ФОРМОЮ КРИЛ				
1	<i>Cat</i>	<i>ct</i>	обрізаний край крила	1; 20,0
2	<i>Cyrlly</i>	<i>Cy</i>	крила загнуті догори	2; 8,5
3	<i>Daechet</i>	<i>D</i>	крила розкинуті	3; 40,0
4	<i>vestigial</i>	<i>vg</i>	зачаткові крила	2; 67,0
5	<i>curled</i>	<i>cu</i>	загнуті крила	3; 50,0
ЗА ФОРМОЮ ЩЕТИНОК				
1	<i>singel⁸</i>	<i>sn⁸</i>	Звивисті	1; 21,0
2	<i>forked</i>	<i>f</i>	Обпалені	1; 56,7
3	<i>Stuble</i>	<i>Sb</i>	короткі, потовщені	3; 58,2

Для дрозофіли описані мутації, які змінюють форму тіла: *bitorax* (подвійні груди), обумовлюють відсутність крил (*apterous*), зменшення їх розміру (*miniature*), чи появу чотирикрилості (*tetraptera*), розтопиреність (*Dichaete*) або зазубреність (*Notch*) крил та інші [2].

У *D. melanogaster* описано серію мутацій (більше 20) гена (w^+), які змінюють колірність очей: w^+ (*wild type*, дикий тип, цегляно-червоні очі) $> w^{co}$ (*coral*, коралові) $> w^w$ (*wine*, винні) $> w^{ch}$ (*cherry*, вишневі) $> w^e$ (*eosin*, еозинові) $> w^{bl}$ (*blood*, кроваві) $> w^a$ (*apricot*, абрикосові) $> w^t$ (*tinged*, злегка забарвлені) $> w$ (*white*, білі). Причому ген w^+ домінує над усіма іншими алелями цієї серії, а у різних поєднаннях мутантних алелей між собою, домінує той ген (значок $>$ означає домінування), що у цій серії стоїть вище інших [3].

У світі існує кілька великих дрозофільних центрів, які надають для досліджень за помірну плату лінії *D. melanogaster*, зокрема *Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University* (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>) та лінії дрозофіл інших видів *Drosophila*, зокрема *Species Stock Center* (<https://stockcenter.ucsd.edu/info/welcome.php>). У наукових дослідженнях використовуються також дрозофіли, виловлені з природних популяцій [3].

У мережі Internet існує значна кількість інформаційних матеріалів різного спрямування, присвячених дослідженню дрозофіл. Однак

“електронною повсякденною лабораторною книгою” вважається ресурс FlyBase (<http://flybase.org>). Використовуючи його, можна знайти не тільки всебічну інформацію про послідовності й гени ДНК дрозофіл, про персоналії та конференції, але й посилання на інші джерела інформації, пов’язані з дослідженнями на цьому модельному об’єкті [3].

Завдання роботи

Завдання 1. Розгляньте морфологію особин дикого типу дрозофіли (*wild type*). Для цього зарядіть ефіризатор, вкладіть у нього поліетиленову лійку і пересипте в ефіризатор мух, які підлягають наркотизації. Після знерухомлення останньої мухи, негайно висипте їх на пластинку-поле. Доки мухи перебувають під наркозом, користуючись лупою та пензликом, розгляньте колір і форму очей, форму крил та колір тіла (зі спинної сторони). Якщо під час роботи мухи почнуть оживати, їх можна підморити знову, зсипавши в ефіризатор.

Зарисуйте у зошиті особин (самок та самців) дикого типу дрозофіли та вкажіть назви їхніх частин тіла.

Завдання 2. Навчіться розрізняти стать дрозофіли. Для цього висипте на пластинку-поле наркотизованих мух дикого типу та розділіть їх на самок і самців за ознаками статевого диморфізму, користуючись ручною лупою та стереомікроскопом. Запишіть у зошиті основні зовнішні відмінності самок від самців у вигляді таблиці:

№з/п	Назва ознаки статевого диморфізму	Самець	Самочка
1			

Завдання 3. Розгляньте основні стадії розвитку дрозофіли в банках з культурою. Зверніть увагу на те, що личинки I та II віку містяться у верхньому шарі поживного середовища і активно харчуються; личинки III віку – виходять з поживного середовища на стінки банки, вони є найбільших розмірів, білі, рухомі, безголові; лялечки у вигляді коричневих коконів, прикріплені нерухомо до стінок банки. Часто можна побачити проміжну стадію між личинкою III віку та лялечкою, коли личинка стає нерухомою та заокруглюється.

Зарисуйте у зошиті схему життєвого циклу дрозофіли та вкажіть назви основних стадій її розвитку, їхню тривалість.

Завдання 4. Розгляньте представників виданих вам мутантних ліній дрозофіли, користуючись стереомікроскопом. Зверніть увагу на форму та забарвлення очей, морфологію і анатомію крил, колір тіла, будову щетинок.

Запишіть у зошиті ознаки розглянутих мутантних ліній дрозофіли та порівняйте їх з особинами лінії дикого типу.

Контрольні питання

- Що вивчає генетика? Дайте означення явищам спадковості та мінливості.
- Зазначте місце генетики у сучасній системі біологічних наук.
- Охарактеризуйте значення генетики в сучасній біології, народному господарстві та охороні здоров'я.
- Опишіть основні етапи розвитку класичної генетики.
- Охарактеризуйте основні напрями сучасної генетики.
- Зазначте роль вітчизняних та зарубіжних вчених у розвитку генетики.
- Назвіть об'єкти досліджень, що використовуються у класичній генетиці.
- Назвіть об'єкти досліджень, що використовуються у молекулярній генетиці.
- Опишіть дрозофілу *Drosophila melanogaster* як об'єкт досліджень.
- Вкажіть переваги *D. melanogaster* як об'єкта генетичних досліджень.
- Вкажіть сучасні наукові напрями, у яких використовується *D. melanogaster* як об'єкт модельних досліджень.
- Охарактеризуйте основні стадії розвитку дрозофіли та умови їх культивування.
- Назвіть основні види мутацій, притаманні для *D. melanogaster*.

Рекомендована література

1. Загальна та молекулярна генетика: практикум / С. В. Демидов, В. Ф. Безруков, А. В. Сиволоб та ін. Київ : Фітосоціоцентр, 2005. С. 5–44.
2. Методичні вказівки до практичних занять з курсу “Генетика дрозофіли” [для студентів третього курсу біологічного факультету] / упорядн. С. В. Серга, О. В. Жук, С. В. Демидов, І. А. Козерецька. Київ : Фітосоціоцентр, 2011. 28 с.
3. Генетика дрозофіли: великий практикум / І. А. Козерецька, О. В. Проценко, О. В. Жук та ін. Київ : В-во КНУ імені Т. Шевченка. С. 4–46.
4. Генетика : підручник / А. В. Сиволоб, С. Р. Рушковський, С. С. Кир'яченко та ін. / за ред. А. В. Сиволоба. Київ : Вид.-поліграф. центр: Київ. ун-т, 2008. С. 6–18.
5. Тоцький В.М. Генетика : підручник : вид. 3-ге, випр. та доп. Одеса : Астропринт, 2008. С. 301–304.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

АНАЛІЗ УСПАДКУВАННЯ ОЗНАК ПРИ МОНОГІБРИДНОМУ СХРЕЩУВАННІ

Мета: оволодіти технікою постановки генетичного експерименту – схрещування різних ліній дрозофіли; освоїти методологію гібридологічного аналізу та навчитися визначати тип успадкування ознаки за результатами схрещування.

Матеріали і обладнання: стереомікроскоп, лупа, наркотизатор, пластинка-поле, пензлик, вата, штатив та підставка для пробірок, пробірки із поживним середовищем для дрозофіли, дика і мутантні лінії дрозофіли.

Теоретичні відомості. Генетичний аналіз є можливим завдяки тому, що ознаки організмів стабільно відтворюються у низці поколінь. Особливо очевидно це демонструє вегетативне розмноження, широко поширене у рослин, властиве для мікроорганізмів, і зрідка зустрічається серед тварин. Стабільність елементарних ознак можна спостерігати у низці статевих поколінь на усіх рівнях організації живих організмів. Саме на властивості стабільності генетичного матеріалу базуються принципи гібридологічного аналізу, сформульовані ще Грегором Менделем [1]:

1) добір матеріалу (особин з чистих ліній; ознаки чи кількох ознак) для отримання гібридів;

2) отримання гібридів (чітке дотримання умов та правил поставки схрещування);

3) індивідуальний аналіз гібридів (передбачає ретельний облік та обов'язковий запис результатів схрещування з подальшою їх аналітичною обробкою);

4) застосування методів математичної статистики для оцінки достовірності припущених гіпотез, складання схем схрещування.

Гібридологічного аналіз – це сукупність методів, спрямованих на дослідження типу успадкування ознаки шляхом постановки системи схрещувань. З цією метою отримують гібриди та вивчають результати успадкування їхніх ознак у низці поколінь. При цьому ураховують взаємодії алелей та генів між собою, вплив умов середовища на фенотиповий прояв гена, внутрішні механізми мінливості та інш. Гібридологічний аналіз у поєднанні з молекулярно-генетичним та хромосомним аналізами є основними видами генетичного аналізу [4].

Гібридологічний аналіз дає змогу: а) визначити тип успадкування ознаки (визначити кількість генів, що беруть участь у прояві ознаки); виявити вид взаємодії генів та їхніх алелей; б) з'ясувати локалізацію генів у певній хромосомі (у негомологічній чи гомологічній, аутосомі чи гетеросомі); картувати гени у конкретній групі зчеплення й локусі для побудови генетичної карти хромосом та ін. [5].

Гібридологічний аналіз використовується не лише у генетиці, а й селекції в поєднанні з гібридизацією та оцінюванням плідників за нащадками, у генетичній інженерії – для отримання форм із бажаними ознаками та властивостями, у систематиці – для з'ясування філогенетичної спорідненості видів організмів між собою тощо [4].

У гібридологічному аналізі використовують різні види схрещувань: моно-, ди- й полігібридні, зворотні й реципрокні, споріднені й неспоріднені та ін. [5]

Моногібридне схрещування – це схрещування двох форм, які відрізняються однією парою альтернативних ознак, чи алельних генів. Якщо у результаті такого схрещування нащадки мають лише домінантні прояви ознаки, то вихідні форми є чистими лініями, або гомозиготними формами ($P \text{ ♀ AA} \times \text{♂ aa}$). Ця закономірність відома як **перший закон Менделя**, або **закон домінування**. Одне із сучасних визначень цього закону є таким: при схрещуванні двох форм, які відрізняються між собою однією парою ознак (альтернативними ознаками), гібриди першого покоління будуть одноманітними як за генотипом, так і фенотипом [5].

При схрещуванні гетерозиготних форм організмів (гібридів першого покоління) між собою у другому поколінні спостерігається розщеплення за генотипом у відношенні 1:2:1, а за фенотипом – 3:1 (при умові повного домінування). Ця закономірність відома як **II Закон Менделя**, або **закон розщеплення (сегрегації)**. Організм, гетерозиготний за парою алельних генів утворює у рівній пропорції два типи гамет. Одне із сучасних визначень цього закону є таким: половина гамет несуть один з пари алелів, інша половина – другий алель. В іншомовній літературі, закон розщеплення часто також називають законом (правилом) сегрегації (англ. *the rule of segregation*), оскільки він описує закономірності розходження (сегрегації) алелів у гамети. Моногібридне схрещування із неповним домінуванням ознаки, яке широко розповсюджене у живій природі, характеризується тим, що гетерозигота фенотипово відрізняється від

домінантної гомозиготи. Тому друге покоління буде розщеплюватися фенотипово не 3:1, як при повному домінуванні, а 1:2:1.

Обидва закони Менделя є справедливими для аутосомних моногенних ознак. Моногенні ознаки контролюються одним геном. Успадкування аутосомних ознак підпорядковується таким закономірностям: результат не залежить від внесення рецесивних і домінантних генів зі сторони батьків; ознаки однаково успадковуються особинами різної статі [5].

У генетичному аналізі часто використовують оборотне, аналізуюче та реципрокні схрещування. **Оборотне**, чи **беккрос** (від англ. *backcrossing*, від *back* – знову і *cross* – схрещувати) схрещування – це схрещування гібрида першого покоління з однією з батьківських форм. У генетичному аналізі це схрещування використовується для визначення генотипу особини (тоді його називають аналізуючим), у селекції – для посилення у нащадків прояву одного з батьківських генів, для подолання стерильності у віддалених гібридів, закріплення гетерозису у нащадків наступних поколінь та інш. [2].

Для визначення генотипу гібридів, типів гамет та їхнього співвідношення використовується **аналізуюче схрещування**. Це схрещування особини з невідомим генотипом (гомозиготи домінантної AA, чи гетерозиготи Aa), що має домінантну ознаку, з формою, що має рецесивну ознаку (рецесивною гомозиготою (aa)), генотип якої відомий [4].

Для визначення аутосомної чи гетеросомної локалізації гена використовують реципрокне схрещування. Це система двох схрещувань (прямого і зворотного), які відрізняються тим, хто з батьківських форм вносить рецесивний ген у генотип нащадків. У прямому схрещуванні (P ♀ AA x ♂ aa) носієм рецесивної ознаки є батьківська форма, у зворотному – материнська (P ♀ aa x ♂ AA).

У генетичному аналізі використовують різні математично-статичні методи, найчастіше метод χ^2 . Метод хі-квадрата дає змогу оцінити достовірність отриманого розщеплення на основі вихідних даних. Він показує з якою ймовірністю експериментальні дані та отримане розщеплення відповідають теоретично очікуваній гіпотезі [3].

Завдання роботи

1. Закладання прямого та зворотного схрещувань

Завдання 1. Підморіть у наркотизаторі особин лабораторної та мутантної лінії дрозофіли, перенесіть їх на пластинку-поле. Уважно

розгляньте особин, користуючись ручною лупою та стереомікроскопом. Розділіть їх за статтю, відберіть кілька неушкоджених самців та самок для подальших досліджень.

Завдання 2. Закладання прямого схрещування (дослід 1) особин дрозофіли, які відрізняються альтернативним проявом однієї ознаки (ген, який відповідає за цю ознаку, є аутосомним). У пробірку №1 помістіть 4–5 особин жіночої статі лабораторної лінії і 3–4 особини чоловічої статі мутантної лінії.

Пробірку закрийте ватним корком та підпишіть. На етикетці вкажіть дату закладання досліду, його номер, вид схрещування, своє прізвище.

Завдання 3. Закладання зворотного схрещування (дослід 2) особин дрозофіли, які відрізняються тією ж ознакою, що і у прямому схрещуванні. У пробірку № 2 помістіть 4–5 особин жіночої статі мутантної лінії і 3–4 особини чоловічої статі лабораторної лінії. Пробірку закрийте корком та підпишіть.

Увага! Пробірки № 1 та № 2 після закладання дослідів покладіть у підставку для пробірок у горизонтальному положенні задля попередження прилипання мух до поверхні середовища [2].

Завдання 4. Через 6–7 діб з обох пробірок видаліть батьківських особин.

Примітка. Для постановки схрещувань необхідно мати віргінних (не запліднених!!!) самок, яких відбирають через кілька годин після виходу із лялечки. Віргінність самок перевіряють, утримуючи їх у пробірках із свіжим середовищем 3–4 доби. Якщо на поверхні середовища за цей час яйця не з'явилися, це вказує на віргінність відібраних самиць.

Треба знати! У перші дні життя незапліднені самки яєць не відкладають!

Треба пам'ятати! Через 2 доби після виходу із лялечки, самка може почати відкладати яйця, якщо вона була запліднена. Після набуття статевої зрілості та майже до кінця життя, запліднена самка здатна відкладати яйця. Самки дрозофіли здатні зберігати сперму самців в своїх спермоприймачах упродовж всього життя і таким чином відкладати запліднені яйця навіть лише після одного спарування [2].

2. Генетичний аналіз нащадків першого покоління

Завдання 1. Підморіть у наркотизаторі особин першого покоління спочатку з пробірки № 1, а згодом, № 2 та перенесіть їх на пластинку-поле. Уважно розгляньте особин, користуючись ручною лупою та стереомікроскопом, розділіть за статтю, порахуйте та зазначте їхній фенотип.

Запишіть у таблицю (див. зразок звіту про виконання лабораторної роботи) результати аналізу нащадків першого покоління F_1 обох дослідів (число самок та самців кожного фенотипового класу). Проведіть аналіз F_1 дослідів № 1 та № 2 окремо з кожної пробірки.

Відберіть серед особин першого покоління з кожного дослідів окремо кілька неушкоджених самців та самок для подальших досліджень.

Завдання 2. Помістіть у дві нові пробірки зі свіжим поживним середовищем по 5–6 самок та самців F_1 на друге покоління, відповідно до дослідів № 1 та № 2. Пробірки підпишіть.

Завдання 3. Через 6–7 діб з обох пробірок дослідів № 1 та № 2 видаліть батьківських особин.

Примітка: Підрахунок нащадків доцільно розпочинати через добу після виходу перших особин нового покоління. Зазвичай, у перший день виходу у культурі дрозофіл налічується більше самок ніж самців. З кожною наступною добою чисельність самців збільшується у межах нормального співвідношення статей (1:1). Знерухомлювати й рахувати мухи доцільно щодня упродовж 10 діб. Після 10 діб підвищується ризик появи особин наступного покоління. Якщо це робити в більш короткий час, то можна не врахувати особин, які в силу тих чи тих причин затримались у розвитку. Після підрахунку, мух поміщають у пробірки зі свіжим середовищем, або видаляють їх [2].

3. Генетичний аналіз нащадків другого покоління

Завдання 1. Підморіть у наркотизаторі особин другого покоління обох дослідів, спочатку з пробірки № 1, а згодом, № 2, перенесіть їх на пластинку-поле. Уважно розгляньте особин, користуючись ручною лупою та стереомікроскопом, розділіть за статтю, порахуйте та зазначте їхній фенотип.

Завдання 2. Занесіть у протокол результати аналізу нащадків другого покоління F_2 обох дослідів (число самок та самців кожного фенотипового класу). Проведіть аналіз F_2 дослідів №1 та №2 окремо з кожної пробірки. Визначте, яка з ознак домінантна, а яка рецесивна. Встановіть розщеплення за фенотипом.

Завдання 3. Перевірте своє припущення про розщеплення в F_2 за допомогою методу χ^2 (див. додаток А). Порівняйте між собою результати обох (реципрокних) схрещувань. Встановіть тип успадкування ознак, що досліджувались. Запишіть схеми схрещувань та висновки у протокол.

Контрольні питання

- Що таке гібридологічний та генетичний аналіз? З якою метою їх застосовують у генетиці?
 - Дайте характеристику деяким методам формальної генетики.
 - З якою метою застосовується у генетичному аналізі метод χ^2 .
 - Що таке схрещування в генетиці? Назвіть основні види схрещувань.
 - Яке схрещування називається моногібридним, аналізуючим, зворотним, оберненим, реципрокним?
 - Дайте означення поняттям алель, ген, фен, генотип, фенотип.
 - Які ознаки називають моногенними?
 - Що таке гомо- і гетерозиготність, гомо- і гетерозигота, чиста лінія?
 - Сформулюйте закони Менделя, вкажіть умови їх виконання.
 - Сформулюйте правило чистоти гамет та вкажіть важливість цього правила для розуміння механізмів спадковості ознак.
 - Як називається місце положення гена на хромосомі?
 - Як називають феномен існування одного гена у багатьох альтернативних станах? Охарактеризуйте явище множинного алелізму.
 - Дайте характеристику видам взаємодії алельних генів: повному, неповному та локальному домінуванню, кодомінуванню, наддомінуванню.
 - Дайте характеристику явищу внутрішньомолекулярного (локального) домінування. Що таке міжалельна комплементация?
 - Як називають явище, за якого при об'єднанні у гібриді двох різних, належних за походженням, мутантних алелей одного гена відбувається відновлення норми?

Рекомендована література

1. Загальна та молекулярна генетика: практикум / С. В. Демидов, В. Ф. Безруков, А. В. Сиволоб та ін. Київ : Фітосоціоцентр, 2005. С. 5–44.
2. Методичні вказівки до практичних занять з курсу “Генетика дрізофіли” [для студентів третього курсу біологічного факультету] / упорядн. С. В. Серга, О. В. Жук, С. В. Демидов, І. А. Козерецька. Київ : Фітосоціоцентр, 2011. 28 с.
3. Генетика дрізофіли: великий практикум / І. А. Козерецька, О. В. Проценко, О. В. Жук та ін. Київ : В-во КНУ імені Т. Шевченка. С. 47–59.
4. Генетика: підручник / А. В. Сиволоб, С. Р. Рушковський, С. С. Кир'яченко та ін. / за ред. А. В. Сиволоба. Київ : Вид.-поліграф. центр: Київ. ун-т, 2008. С. 89–100.
5. Тоцький В.М. Генетика: підручник : вид. 3-ге, випр. та доп. Одеса : Астропринт, 2008. С. 185–207.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

АНАЛІЗ ЗЧЕПЛЕНОГО ЗІ СТАТТЮ УСПАДКУВАННЯ ОЗНАК

Мета: оволодіти методикою генетичного аналізу успадкування зчепленої зі статтю ознаки у *D. melanogaster* за результатами реципрокних схрещувань.

Матеріали і обладнання: стереомікроскоп, лупа, наркотизатор, пластинка-поле, пензлик, вата, штатив та підставка для пробірок, пробірки із поживним середовищем для дрозофіли, дика (лабораторна лінія) і мутантна (жовтотіла) лінії дрозофіли.

Теоретичні відомості. Явище порушення закону незалежного комбінування та успадкування ознак у менделівській схемі ще на початку ХХ століття відзначив Т. Х. Морган серед багатьох ознак *D. melanogaster*. Таке відхилення він пояснив тим, що алелі генів, які детермінують дані ознаки, містяться в статевих хромосомах (**гетеросомах**). Виявлений ним тип успадкування отримав назву **зчепленого зі статтю**, а ознаки, які аналізуються – **зчепленими зі статтю**. Зчепленими зі статтю називаються ознаки, гени яких розташовані в статевих хромосомах. Походження терміна Х-хромосома пов'язане з виявленням у 1891 р. Х. Генкінгом у мейозі клітин деяких комах непарного тільця, що інтенсивно фарбувалося. Воно під час поділу рухалось до одного з полюсів дочірних клітин. Оскільки Х. Генкінг не знав призначення виявленого ним невідомого тільця, а тому позначив його літерою Х. У 1902 р. К. Мак-Кленг припустив, що роль цього тільця може бути пов'язане з визначенням статі. У 1905 р. Е. Вільсон запропонував назвати його Х-хромосомою. Згодом, другу непарну хромосому, що визначає у багатьох організмах чоловічу стать, назвали Y-хромосомою. Таким чином, для статевих хромосом закріпилось позначення Х- та Y-хромосоми. Відповідно до цього, стать, яка в каріотипі містить ідентичні статеві хромосоми (XX), називають **гомогаметною**, а якщо різні – **гетерогаметною** (XY). У гетеросомах зустрічаються гомологічні ділянки, які містять алельні гени, успадкування яких підлягає менделівським законам [5].

Для дрозофіли властивий сингамний механізм визначення статі за XY-типом (тип *Lygaeus*): самка є гомогаметною ($\text{♀} = \text{XX}$), самець – гетерогаметною ($\text{♂} = \text{XY}$) статтю. Однак К. Бріджес, співробітник Т.Х. Моргана, ретельно досліджуючи мутантних особин *D. melanogaster* за ознаками статевого диморфізму, цитологічно виявив, що деякі з них

відрізнялися від нормальних мух за кількістю статевих хромосом. На підставі подальших досліджень К. Бріджес прийшов до висновку, що стать у *D. melanogaster* детермінується відношенням кількості X-хромосом до загального набору аутосом (X/A), що стало основою його **балансової теорії визначення статі** (1922). Однак для більшості тварин ця закономірність не простежується. У дрозофіли К. Бріджес виявив, що якщо відношення (**статевий індекс**) $X/A=1$, то з такої зиготи розвивається самка, якщо $X/A=0,5$ – самець. За інших співвідношень: $X/A=1,5$ – розвиваються надсамочки (чи метасамочки), $X/A=0,33$ – надсамці (чи метасамці), $X/A=1 - 0,5$ – інтерсекси. З'ясувалось також, що Y-хромосома участі у визначенні статі дрозофіли не бере: особини з XO-набором статевих хромосом є самцями.

Оскільки Y-хромосома у дрозофіли порівняно з X-хромосомою майже генетично інертна, то гени X-хромосом, за невеликим винятком, не мають алельних копій в Y-хромосомі. У зв'язку з цим, успадкування генів, зчеплених зі статевими хромосомами, має свої закономірності: їх розподіл по гаметах і надходження до зигот відповідає поведінці генетично неоднозначних статевих хромосом у мейозі і в момент запліднення [3].

Присутність тільки однієї алелі певного конкретного гена у диплоїдного організму називається **гемізіготним** станом чи гемізіготою. Гени, зчеплені зі статевою Y-хромосомою, у гетерогаметних видів успадковуються **голандрично** (від батька до сина за XY-типу хромосомного визначення статі, чи від матері до дочки – за ZW-типу) [5].

Оскільки у гетерогаметної статі більшість генів X- і Y-хромосом знаходяться у гемізіготному стані, рецесивні ознаки, що кодуються генами статевих хромосом, у гетерогаметних особин виявляються у фенотипі (**явище псевдомінантності**). У гомогаметної статі рецесивні гени, у нормі, фенотипово не проявляються, бо у гетерозиготи їм протистоять домінантні алелі в гомологічній хромосомі [5].

У генетичному аналізі для визначення хромосомної локалізації генів (їх зчепленості) ставлять **реципрокні схрещування** (два схрещування, які відрізняються тим, хто з батьків вносить домінантну чи рецесивну алель). За реципрокних схрещувань у другому поколінні розщеплення за фенотипом є однаковим, коли гени досліджуваних ознак є аутосомної локалізації. Однак коли гени локалізуються у статевих хромосомах, у другому поколінні розщеплення за фенотипом у цих схрещувань є іншим. За зчепленого зі статтю

успадкування, сини успадковують ознаки матері, а дочки – батька, а закон одноманітності гібридів першого покоління в одному із реципрокних схрещувань не справджується: реципрокні схрещування дають відмінні результати. Це приклад **перехресного успадкування**, або успадкування крис-крос, від англ. *criss-cross* – навхрест [5].

До числа зчеплених зі статтю ознак у дрософіли належать: білоокість (*white, w*), жовтотілість (*yellow, y*), абрикосові очі (*white apricot, w^a*), смужкоподібні очі (*Bar, B*), розщеплені, потовщені щетинки (*forked, f*), обпалені (зігнуті) щетинки (*singed, sn*), обрізаний край крила (*cut, ct*), сильно зменшені крила (*miniature, m*) та інші. Усі названі ознаки у дрософіли виявляють перехресне успадкування. Під час аналізу ознак, зчеплених зі статтю, необхідно в запис схрещування, крім умовного позначення генів, вводити позначення статевих хромосом.

До основних особливостей успадкування ознак, зчеплених зі статтю, відносять такі: результати прямого та зворотного схрещувань є відмінними; жіночі та чоловічі особини по-різному успадковують ознаки; успадкування ознак, зчеплених зі статевими Х- і Y-хромосомами відбувається по-різному; ознаки, зчеплені з Х-хромосомою, у певних схрещуваннях передаються від матері синам, а від батька – дочкам, тобто перехресно; ознаки, зчеплені з Y-хромосомою, передаються по лінії гетерогаметної статі [5].

Завдання роботи

1. Закладання реципрокних схрещувань

Завдання 1. У досліді № 1 і № 2 схрещуються мухи, які відрізняються за альтернативним проявом однієї ознаки, причому ген, який відповідає за цю ознаку, локалізований в Х-хромосомі (зчеплений зі статтю). У досліді № 1 поставте пряме схрещування (самка – дикий тип, самець – мутант). У досліді № 2 поставте зворотне схрещування (самка – мутант, самець – дикий тип).

У кожен пробірку помістіть чотири – п'ять віргінних самок та три – чотири самці. Пробірки підпишіть. На етикетці вкажіть дату закладання дослідів, його номер, тип схрещування, своє прізвище.

Оформіть протокол дослідів для кожного виду схрещування.

Завдання 2. З пробірок дослідів № 1 та № 2 через кілька днів видаліть батьків.

2. Генетичний аналіз нащадків першого покоління реципрокних схрещувань

Завдання 1. Проведіть гібридологічний аналіз нащадків F₁ дослідів № 1 та № 2 окремо з кожної пробірки. Підморіть мух окремо з кожної пробірки, розділіть їх за статтю і фенотипом та підрахуйте.

Запишіть отримані результати аналізу F₁ (кількість самиць та самців кожного фенотипового класу) обох дослідів у таблицю:

Таблиця

Результати аналізу нащадків F₁ реципрокних (прямого і зворотного) схрещувань

№з/п	Пряме схрещування (запишіть схему схрещування)				Зворотне схрещування (запишіть схему схрещування)			
	фенотип самців		фенотип самиць		фенотип самців		фенотип самиць	
1								
	кількість самців		кількість самиць		кількість самців		кількість самиць	
	розщеплення за статтю				розщеплення за статтю			
	розщеплення за фенотипом				розщеплення за фенотипом			

Завдання 2. Порівняйте між собою результати реципрокних (прямого і зворотного) схрещувань.

Визначте, яка із досліджуваних ознак є домінантною, а яка – рецесивною.

Проведіть статистичний аналіз нащадків F₁ дослідів прямого і зворотного схрещувань окремо.

Встановіть тип успадкування досліджуваної ознаки.

Перевірте своє припущення методом хі-квадрату (χ^2) (див. додаток А).

Завдання 3. Запишіть схеми схрещувань обох дослідів та зробіть висновки.

Контрольні питання

- Які хромосоми називають статевими? Що таке гомо- та гетерогаметна стать?
- Опишіть механізми і типи формування статі у природі.
- Які ознаки є зчепленими та обмежені статтю, а які – контрольовані статтю. Наведіть приклади таких ознак у дрозофіли, тварин і людей.
- Яке успадкування називають перехресним?

• Чим відрізняється успадковування ознак, зчеплених зі статтю, від моногенного аутосомного успадковування?

• Які ознаки називають голандричними? Вкажіть особливості успадкування голандричних ознак.

• Як відбувається успадкування ознак при нерозходженні статевих хромосом?

• Охарактеризуйте балансову та фізіологічну теорію визначення статі.

• Опишіть яким буває співвідношення статей у природі та вкажіть проблеми його штучного регулювання у селекції.

Рекомендована література

1. Загальна та молекулярна генетика: практикум / С. В. Демидов, В. Ф. Безруков, А. В. Сиволоб та ін. Київ : Фітосоціоцентр, 2005. С. 191–201.

2. Методичні вказівки до практичних занять з курсу “Генетика дрозоділі” [для студентів третього курсу біологічного факультету] / упорядн. С. В. Серга, О. В. Жук, С. В. Демидов, І. А. Козерецька. Київ : Фітосоціоцентр, 2011. 28 с.

3. Генетика дрозоділі: великий практикум / І. А. Козерецька, О. В. Проценко, О. В. Жук та ін. Київ : В-во КНУ імені Т. Шевченка. С. 47–68.

4. Генетика: підручник / А. В. Сиволоб, С. Р. Рушковський, С. С. Кир'яченко та ін. / за ред. А. В. Сиволоба. Київ : Вид.-поліграф. центр: Київський ун-т, 2008. С. 89–100.

5. Тоцький В.М. Генетика : підручник : вид. 3-ге, випр. та доп. Одеса: Астропринт, 2008. С. 236–257.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

КАРІОТИПИ ОРГАНІЗМІВ. ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІТЕННИХ ХРОМОСОМ ДРОЗОФІЛИ

Мета: ознайомитись з каріотипами деяких видів організмів, видами хромосом, їх структурно-функціональною організацією; освоїти методику приготування тимчасових препаратів політенних хромосом слинних залоз дрозофіли та вивчити особливості їх будови, а також хромосом типу “лампових щіток” дрозофіли.

Матеріали і обладнання: світлові мікроскопи, готові препарати каріотипів різних видів організмів, політенних хромосом слинних залоз дрозофіли та хромосом типу лампових щіток, препаровані слинні залози личинок дрозофіли, розчин ацетоорсеїну, 45 % оцтова кислота, препарувальні голки, предметні і покривні скельця, фільтрувальний папір.

Теоретичні відомості. Генетичний матеріал організму – це сукупність носіїв його спадкової інформації – **хромосом**. Термін “хромосома” був введений німецьким морфологом **В. Вальдейєром** у 1888 р. для позначення внутрішньоядерних структур еукаріотичної клітини, які добре зафарбовуються основними барвниками (від грец. “хрома” – колір і “сома” – тіло) [3].

Кожний вид організм характеризується постійною кількістю хромосом певної організації та морфології, які формують його **каріотип**. Морфологію хромосом у еукаріот найчастіше вивчають на стадії метафазної пластинки. Каріотип певного виду визначають, досліджуючи десятки метафазних пластинок кількох особин даного виду. Тому певний систематичний хромосомний набір – суттєва характеристика виду [3].

Морфологія хромосом визначається насамперед розміщенням центромери, присутністю вторинних перетяжок, супутників, чергуванням еу- і гетерохроматинових ділянок. Основою їх класифікації є розміщення **центромери** (первинної перетяжки), яка ділить хромосому на два плеча. За цим принципом, розрізняють мета-, субмета-, акро- й телоцентричні хромосоми. Деякі з них мають вторинну перетяжку, яка може бути в різних ділянках плеча. Якщо вторинна перетяжка розміщена на дистальному кінці хромосоми, то відокремлює невелику її ділянку – **супутник**, що з'єднується з тілом хромосоми тонкою ниткою. Такі хромосоми називають **супутниковими** [5].

Найменше число хромосом серед еукаріот має нематода *Ascaris*

megalocephala univalens ($2n=2$). Найбільші числа хромосом зустрічаються у найпростіших і папоротей, для яких характерні високі рівні поліплоїдії. У них число хромосом досягає кілька сотень; диплоїдні набори представлені від одного десятка до кількох десятків хромосом. У деяких рослин, а також тварин поряд із постійними компонентами каріотипу – так званими **A-хромосомами**, в ядрах деяких особин містяться додаткові, чи **B-хромосоми**. Часто вони майже повністю складаються з гетерохроматину. Їх кількість варіює від одного до декількох десятків, зокрема у деяких видів роду рослин *Hymenocallis* [5].

У клітинах деяких диференційованих органів двокрилих виявлять так звані **гігантські (політенні)** хромосоми. Вперше їх описав Е. Бальбіані (у 1881 р.) в клітинах слинних залоз комара – дергуна (*Chiromonas plumosus*). Останні утворюються внаслідок ендомітозу (**політенії**) – явища, у якому хромосоми багатократно відтворюються без наступного розходження. Такі політенні хромосоми далі не відтворюються і перебувають у стані соматичної кон'югації гомологів, яка досягає високої точності. Термін політенія було запропоновано П. Коллером (P. Koller) у 1935 р., а остаточно його ввів у генетику С. Дарлінгтон у 1937 р. [3].

Найвищий ступінь політенії характерний для хромосом слинних залоз личинок дрозофіли III віку, які готові до переходу в лялечку, коли кожна хромосома складається з 1000–2000 нуклеопротейдних ниток. Середня довжина таких політенних хромосом у 150 разів перевищує довжину метафазних хромосом в ядрах інших органів. Політенні хромосоми мають характерну поперечносмугасту структуру, яка є чергуванням густо зафарбованих темних і світлих ділянок (відповідно, гетерохроматинових і еухроматинових зон). Ділянки і міждисккові ділянки гомологів розміщені строго паралельно і по всій довжині хромосоми тісно зближені. Така кон'югація не характерна для хромосом більшості соматичних клітин [5].

Ділянки більш щільної спіралізації хромосом – **хромомери** – на гігантських хромосомах візуалізуються у формі поперечних смуг – **дисків**. Вважається, що **хромомер** – це фрагмент хромосом, здатен до локальної компактизації. Довжина фрагмента ДНК хромомера є різною на різних етапах компактизації хромосом клітинного циклу – для кожного етапу характерні свої набори хромомерів. Тому вважається, що хромомер є змінною структурно-функціональною одиницею геному. Розрізняють чотири групи хромомерів:

а) лептотенні; б) пахітенні; в) хромосоми типу “лампових щіток”; г) хромомери інтерфазних політенних хромосом. Функціональна організація і генетичний вміст хромомерів у цих типах хромосом будуть різними [4].

Чіткі відмінності у особливостях будови політенних хромосом надалі було використано Т. Пайнтером для вивчення їх перебудов та особливостей кон'югації хромосом (див. Додаток Г, рис.1). Політенні хромосоми є зручним об'єктом для вивчення їх будови, локалізації генів, диференційної активності в онтогенезі і ін. На політенних хромосомах чітко візуалізуються транскрипційно активні гени у вигляді декомпактизованих ділянок, іменованих пуфами, пухкими дисками, кільцями Бальбіані (див. Додаток Г, рис. 2). Пуфи, особливої морфології, називають **кільцями Бальбіані**: хроматиди за їх активування утворюють петлі, а вони – муфтоподібну структуру див. Додаток Г, рис. 3). Для них властивий надзвичайно високий рівень транскрипції [4].

Розрізняють ДНКові та РНКові пуфи. ДНКові пуфи формуються внаслідок багатократної ампліфікації ДНК і візуалізуються як темні (за умови фарбування хроматину) компактизовані потовщення хромосоми. РНКовим пуфам – властива схожа морфологія, однак вони візуалізуються як максимально декомпактизовані ділянки. Особливості організації політенних хромосом були використані для побудови цитологічних карт. **Цитологічна карта** є зображенням політенних хромосом, маркованих по довжині дисками та між дисковими ділянками. Усі політенні хромосоми *D. melanogaster* поділені на 102 ділянки, які позначені арабськими цифрами, кожна з яких розділена на більш дрібніші – субділянки (позначені великими літерами латинського алфавіту). Розміри та межі цих ділянок визначаються цитологічними маркерами, тобто чіткими дисками. У межах кожної субділянки може міститися кілька дисків зазвичай не більше 10, кожен з яких також нумерується арабськими цифрами. Наприклад, X-хромосома *D. melanogaster* має 20 ділянок (з 1-ої по 20-ту) [3].

У 1878 р. В.Флемінгом і його студентом Wiebe у ході досліджень розвитку ооцитів у амфібій і риб виявили “дивні тонкі структури” у фарбованих зрізах ядер ооцитів аксолотля *Siredon pisciformis* (*Ambystoma mexicanum*) на ранніх стадіях розвитку, згодом названі **хромосомами типу лампових щіток (ТЛЩ)**. Рисунок цих хромосом був опублікований у 1882 р., на якому були зображені ядра, що містять товсті осьові тяжі, від яких відходять тонкі радіальні нитки [5].

Хромосоми ТЛЩ є довгими, тонкими, сильно деспіралізованими структурами, що характеризуються чергуванням конденсованих ділянок з деконденсованими подвійними петлями (див. Додаток Д). Візуалізуються у ростучих ооцитах більшості хребетних тварин, за винятком ссавців, на стадії тривалої диплотени мейозу I. Активна транскрипція багатьох послідовностей ДНК у бічних (латеральних) петлях хромосом веде до їх видозміни, що за формою нагадує щітки для чищення скла гасових ламп (див. Додаток Д, рис. 2 і рис. 3) (звідси й назва – хромосоми ТЛЩ) [5].

Найбільш детально описана організація хромосом ТЛЩ у хвостатих і безхвостих амфібій, domestikованих видів птахів, деяких видів комах. Хромосоми ТЛЩ амфібій і птахів можуть бути ізольовані з ядра ооцита мікрохірургічним методом, їх можна легко спостерігати у світловий мікроскоп. При цьому видно, що хромосоми ТЛЩ організовані у вигляді серії хромомерів (містять конденсований хроматин), від яких виходять парні латеральні петлі (містять транскрипційно активний хроматин). Дві петлі, які виходять із однієї і тієї ж пари хромомерів, є двома хроматидами. Петля є міжхромомерним проміжком хромосоми. У них інтенсивно синтезується РНК, що пов'язано з активацією процесів росту і жовткоютворення. Кожна латеральна петля залишається у витягнутому стані упродовж росту ооцита, аж до початку конденсації хромосом. Вона може містити одну чи кілька транскрипційних одиниць з поляризованим рибонуклеопротеїновим (РНП)-комплексом, який облямовує дезоксирибонуклеопротеїнову (ДНП)-вісь петлі [2].

Завдяки гігантським розмірам і чітко вираженій хромомерно-петлевій організації, хромосоми ТЛЩ слугують зручною моделлю для вивчення організації хромосом, роботи генетичного апарату і регуляції експресії генів. Присутність петель із сильно відмінною морфологією дає змогу створювати маркери до певних ділянок хромосом, завдяки чому стало можливим ідентифікувати як хромосому загалом, так і окремі її ділянки. Хромосоми ТЛЩ також широко використовуються для картування послідовностей ДНК з високою роздільною здатністю, вивчення феномену транскрипції тандемних повторів ДНК, некодуючих білки, аналізу розподілу хіазм та ін. [5].

Завдання роботи

Завдання 1. Розгляньте та охарактеризуйте видані вам готові препарати каріотипів рослинних і тваринних організмів за допомогою

імерсійного об'єктиву (90×) мікроскопа. Порівняйте кількість і величину хромосом у різних видів. Зарисуйте у робочому зошиті два – три каріотиби різних видів, запишіть їхню кількість хромосом та визначте плоїдність.

Завдання 2. Розгляньте під великим збільшенням об'єктиву (90×) мікроскопа готові препарати хромосом типу лампових щіток овоцитів дрозофіли. Зарисуйте та позначте їхні структурно-функціональні ділянки: хромери, латеральні петлі та вісь хромосоми.

Завдання 3. Розгляньте під імерсійним об'єктивом (90×) готові препарати політенних хромосом слинних залоз дрозофіли. Зарисуйте та позначте їхні структурно-функціональні ділянки: хромоцентр, асинапсис, теломери, гетеро- та еухроматинові ділянки, пуфи, пухкі диски, кільця Бальбіані.

Завдання 4. Приготування тимчасового препарату політенних хромосом дрозофіли, фарбованих ацеторсеїном. Перенесіть препарувальною голкою заздалегідь виділені слинні залози личинок дрозофіли у розчин 1 % ацеторсеїну. Витримайте їх щонайменше 30 хв для фіксації й фарбування матеріалу для кращої візуалізації хромосом. Перенесіть залози у фарфорову чашку з розчином 45% оцтової кислоти (для подальшої фіксації препарату і відмивання) та витримайте їх щонайменше 5 хв.

Помістіть фрагменти слинних залоз на предметне скло у краплю з розчином 45 % оцтової кислоти. Обережно накрийте їх покривним скельцем. Зверху на препарат покладіть смужку фільтрувального паперу. Притримуючи краї покривного скельця, круговими рухами ручки препарувальної голки, легко постукуючи, натисніть на нього – внаслідок цього клітини матеріалу розходяться в моношар. На вдало приготовленому препараті, не повинно бути пухирців повітря, клітини залози мають рівномірно розподілитися в моношар, хромосоми повинні бути чітко зафарбовані.

Завдання 5. Мікроскопічне дослідження тимчасового препарату політенних хромосом. Розгляньте препарат слинних залоз спочатку під малими (8× і 40×), а потім великим (90×) збільшеннями світлового мікроскопа.

Знайдіть на препараті під середнім (40×) збільшенням об'єктива політенні хромосоми, уважно розгляньте їх структуру, зверніть увагу на структурно-функціональні ділянки.

Зарисуйте фрагмент політенної хромосоми під великим (90×) збільшенням об'єктива та позначте на ній гетеро- та еухроматинові ділянки.

Контрольні питання

- Що таке каріотип? Чим відрізняються між собою каріотипи організмів?
- Назвіть ознаки, за якими можна ідентифікувати певний набір хромосом.
- Яка фаза поділу клітини є оптимальною для опису каріотипу більшості організмів?
 - Опишіть морфологічні типи хромосом та вкажіть принципи їх класифікації.
 - Опишіть структурно-функціональні ділянки, притаманні для різних видів хромосом.
 - Які рівні просторової організації властиві хроматину?
 - Охарактеризуйте компоненти хроматину еукаріот: нуклеосоми, гістони та негістонові білки. Для чого необхідний гістон *H1*?
 - Які хромосоми називають політенними? Для яких клітин організмів вони притаманні?
 - Який процес є основою утворення політенних хромосом?
 - Опишіть структурно-функціональні елементи політенних хромосом. Які ділянки політенних хромосом називають пухкими дисками, кільцями Бальбіані.
 - Що таке хромосоми типу “лампових щіток”? Для яких клітин вони притаманні?
 - Опишіть методику приготування тимчасових ацетоорсеїнових препаратів політенних хромосом слинних залоз дрозофіли.
 - Вкажіть застосування політенних хромосом та хромосом типу “лампових щіток” як модельних об'єктів у генетиці.
 - Що таке генетичні та цитологічні карти хромосом? Як їх укладають?

Рекомендована література

1. Загальна та молекулярна генетика: практикум / С. В. Демидов, В. Ф. Безруков, А. В. Сиволоб та ін. К.: Фітосоціоцентр, 2005. С. 73–85.
2. Методичні вказівки до практичних занять з курсу “Генетика дрозофіли” [для студентів третього курсу біологічного факультету] / упорядн. С. В. Серга, О. В. Жук, С. В. Демидов, І. А. Козерецька. Київ : Фітосоціоцентр, 2011. 28 с.
3. Генетика дрозофіли: великий практикум / І. А. Козерецька, О. В. Проценко, О. В. Жук та ін. Київ : В-во КНУ імені Т. Шевченка. С. 90–112.
4. Генетика: підручник / А. В. Сиволоб, С. Р. Рушковський, С. С. Кир'яченко та ін. / за ред. А. В. Сиволоба. Київ : Вид.-поліграф. центр “Київський ун-т”, 2008. С. 23–38.
5. Тоцький В.М. Генетика : підручник : вид. 3-ге, випр. та доп. Одеса : Астропринт, 2008. С. 41–56.

ВИЗНАЧЕННЯ МІТОТИЧНОГО ІНДЕКСУ. АНАФАЗНО-ТЕЛОФАЗНИЙ АНАЛІЗ

Мета: ознайомитися з видами генетичних тест-систем, оволодіти технікою приготування тимчасового препарату метафазної пластинки корінців цибулі *Allium cepa* та навчитись визначати його мітотичний індекс, оволодіти методикою анафазно-телофазного аналізу та навчитись визначати частоту хромосомних мутацій.

Матеріали і обладнання: мікроскоп, предметні і покривні скельця, скальпель, гістологічна голка, вата, тигель з кришечкою, тиглетримач, електрична плита, склянка з водою, фіксовані у 70 % етанолі корінці цибулі, розчин ацетоорсеїну, 45 % розчин оцтової кислоти.

Теоретичні відомості. Мітоз є основою росту і вегетативного розмноження усіх організмів. Основне біологічне значення мітозу – ідентичне відтворення клітин, підтримання постійного числа хромосом і, відповідно, генетичної інформації. Під мітотичним циклом розуміють сукупність взаємозв'язаних та хронологічно детермінованих подій, які властиві клітині в період її росту та мітозу. Мітотичний цикл у різних організмів триває найчастіше 18 – 24 год. У ньому виокремлюють 4 періоди: власне мітоз, пресинтетичний період (G1), період синтезу ДНК (S) та постсинтетичний період (G2). Три останні періоди відбуваються в інтерфазі. Найважливішими процесами мітотичного циклу є подвоєння спадкового матеріалу клітини – реплікація ДНК та рівномірний розподіл його між дочірніми клітинами [2].

Тканини рослин і тварин характеризуються різною мітотичною активністю. У деяких тканинах є досить висока частка клітин, що активно ділиться – **проліферує**, а в інших (або в тій самій тканині, але за інших умов) основна маса клітин – інтерфазні. Тривалість кожної фази мітозу є мінливою, і залежить від низки чинників, з якими контактує тканина, організм [2].

Мітотичну активність тканини прийнято виражати **мітотичним індексом**, який є відношенням кількості мітотичних клітин (тобто суми клітин, що перебувають на різних стадіях мітозу) до загальної кількості врахованих клітин у проміле (тисячних частках цілого, ‰), або відсотках (%). Відносну тривалість кожної фази мітозу обчислюють як відношення кількості клітин на певній фазі мітозу до

загальної кількості врахованих мітотичних клітин у відсотках. Методи, що дають змогу визначити мітотичну активність тканини є важливими насамперед під час вивчення впливу різноманітних речовин на процеси поділу клітин і функціонування геному [2], а також у **екологічній генетиці** та генетичній токсикології. Остання вивчає дію речовин, насамперед хімічних, синтетичного та антропогенного походження на живі організми, розробляє методи і способи оцінки їх **генетичної активності**. Метою **генетичної токсикології** є звести до мінімуму ступінь ризику мутагенних впливів, зменшити генетичну небезпеку у різних галузях людської діяльності [5].

Екологічна генетика досліджує взаємодію організмів і популяцій з чинниками навколишнього середовища, особливо мутагенними. Виникла на межі досліджень мутаційних процесів, генетики популяцій та екології [5].

Одним із широко визнаних та рекомендованих Міжнародною комісією по захисту від мутагенних й канцерогенних сполук є **Allium-тест** для оцінки токсичності сполуки. Він є зручним, простим у виконанні, не потребує спеціальних знань у постановці і проведенні дослідження. До того ж, є більш об'єктивним у оцінці токсичності досліджуваної речовини порівняно з хімічними, особливо у тих випадках, коли йдеться про верхні межі гранично допустимих концентрацій речовин [3]. Поряд з постійним збільшенням кількості тест-об'єктів, *A. сера* залишається одним з найкращих для аналізу генотоксичності різноманітних чинників.

У *Allium*-тесті аналізується **ростова** й мітотична **активність** корінців цибулин *A. сера* [3]. Оскільки ріст є інтегральним показником фізіологічного стану рослин, тому на першому етапі *Allium*-тесту здійснюється оцінка ростової активності корінців цибулин *A. сера* упродовж усього часу експозиції, а також їх морфології. На основі отриманих показників ростової активності визначають **рівень фітотоксичності** досліджуваної речовини.

На другому етапі *Allium*-тесту оцінюється мітотична активність клітин меристеми корінців цибулин *A. сера*, експонованих за присутності досліджуваної речовини. На основі отриманих показників визначається **рівень цитотоксичності** речовини, під якою розуміють інгібування проліферації клітин. Водночас у *Allium*-тесті рекомендується аналізувати **мітозо-модифікуючу дію** речовини, під якою розуміють порушення проходження клітинами меристеми фаз

мітозу. З цією метою визначають **фазні індекси** меристеми тест-об'єкту та порівнюють їх із показниками контрольного зразка.

Для характеристики структурних і кількісних змін у клітинах тест-об'єктів, що індукуються досліджуваною речовиною використовують найчастіше такі **цитогенетичні методи**: визначення частоти хромосомних аберацій, сестринських хроматичних обмінів, мікроядер, ушкоджень ДНК (аддукти, розриви ланцюгів ДНК, *Comet*-тест), а також зміни флуоресценції при гібридизації *in situ* (FISH-метод) і кількісних параметрів ядерць та ядерцеутворюючих організаторів хромосом [5]. Достатньо надійним, зручним, чутливим, коректним та інформативним тестом для визначення генотоксичності деяких речовин є ана-телофазний метод у поєднанні з мікроядерним тестом [5]. Хоча анафазно-телофазний метод не виявляє усі можливі типи хромосомних мутацій, однак дає змогу встановити чи досліджувана речовина здатна спричиняти ушкодження хромосом, тобто чи є вона мутагеном [5].

Ана-телофазний метод – це генетичний тест, який дає змогу визначити частоту спонтанних та індукованих мутацій у клітинах меристеми корінчиків цибулин тест-об'єкта *A. sera*, шляхом обліку суми хромосомних мутацій і анафазних відставань хромосом до загальної суми усіх ана- й телофаз на цитопрепаратах. Різні види хромосомних мутацій, пов'язаних зі зміною структури хромосом, візуалізуються на цитопрепаратах меристеми тест-об'єкта *A. sera* у вигляді мостів і ацентромерних фрагментів – вони є наслідком делецій і транслокацій. Ана-телофазним методом можна виявляти також злипання хромосом, пов'язане зі зміною консистенції хромосом, багатоплюсні мітози (є наслідком структурно-функціональних змін веретена поділу). Відставання хромосом у анафазі можуть бути наслідком зміни поведінки хромосом на веретені поділу і можуть бути обумовлені як змінами структури самої хромосоми, так і веретена поділу [5].

Аналіз видів хромосомних перебудов, виявлених анафазно-телофазним методом, дає змогу зробити висновок про вплив речовини на генетичний апарат клітини. Зокрема, поява фрагментів і мостів свідчить про здатність речовини викликати розриви у ДНК, наслідком чого є делеції у хромосомах та нереципрокні транслокації. За необхідності деталізації видів виниклих хромосомних мутацій, рекомендується більш трудомісткий метафазний аналіз. Однак для первинної оцінки досліджуваної речовини на мутагенну активність анафазно-телофазний методом вважається цілком достатнім [5].

Завдання роботи

Завдання 1. Приготування тимчасового препарату корінців цибулі. Попередньо зафіксовані в 70 % спирті корінці цибулі *A. сера*, помістіть у стаканчик з дистильованою водою. Помішуючи скляною паличкою, дочекайтеся опускання корінців на дно стаканчика (в результаті цієї процедури спирт у тканинах корінців заміщується водою).

Корінці вийміть зі стаканчика, легко просушіть на фільтрувальному папері та помістіть їх у фарфоровий тигель з ацетоорсеїновим барвником (фарба повинна покрити корінці). Тигель накрийте кришкою та повільно нагрійте на електричній плиті до таємного кипіння. Переставте тигель за допомогою тиглетримача на фарфорову підставку та почекайте кілька хвилин для охолодження. Нагрівання матеріалу проведіть 2 – 3 рази для кращого фарбування матеріалу. При википанні барвника, необхідно додавати розчин ацетоорсеїну. У процесі фарбування досягається мацерація клітин.

Після охолодження, зварений корінець вийміть з барвника і помістіть його на предметне скло. Скальпелем акуратно відокремте від нього темно зафарбований кінчик (довжиною 2 – 3 мм) та нанесіть на нього краплю 45 % розчину оцтової кислоти, накрийте покривним скельцем. Зверху на препарат покладіть кілька смужок фільтрувального паперу. Притримуючи краї покривного скельця, круговими рухами ручки препарувальної голки натискайте на нього, водночас легко постукуючи, – внаслідок цього клітини корінчика розходяться в моношар. На вдало приготовленому препараті не повинно бути пухирців повітря, клітини мерисистеми мають рівномірно розподілитися в моношар, хромосоми повинні бути чітко зафарбовані. У разі підсихання препарату, по краям покривного скельця нанесіть краплі 45 % розчину оцтової кислоти.

Завдання 2. Мікроскопічне дослідження препарату меристеми корінців. За допомогою об'єктива 40× знайдіть та розгляньте мітотичні та інтерфазні клітини меристеми корінчика. Зарисуйте у зошиті кілька з них.

За допомогою імерсійного об'єктива 90× знайдіть метафазну пластинку, підрахуйте та запишіть число хромосом, розгляньте їх морфологію, зарисуйте у зошиті.

Завдання 3. Визначення мітотичного індексу мерисистеми корінця цибулі. Користуючись об'єктивом 40×, на тимчасовому

преператі мерисистеми корінця цибулі дослідіть не менше 100 клітин. Уважно розгляньте та підрахуйте клітини на стадіях профазі (П), метафазі (М), анафазі (А), телофазі (Т) і інтерфазі (І). Дані занесіть у таблицю 1.

Таблиця 1

Поле зору	Кількість клітин на стадії					Всього
	П	М	А	Т	І	

Дані підсумуйте і обчисліть мітотичний індекс (I_M в %) мерисистеми корінця цибулі за наведеною формулою:

$$I_M = \frac{(П+М+А+Т) \cdot 100 \%}{\text{всього клітин}}$$

Завдання 4. Анафазно-телофазний аналіз мерисистеми корінців цибулі. Користуючись об'єктивами (40× та 90×) світлового мікроскопа, на тимчасовому преператі мерисистеми корінців цибулі знайдіть та дослідіть не менше 100 клітин на стадіях анафазі та телофазі. Уважно розгляньте їх, порахуйте, дані занесіть у таблицю 2.

Користуючись об'єктивом (90×) мікроскопа, знайдіть та дослідіть серед них абератні анафазі (АбА) й телофазні (АбТ) клітини, які мають візуальні структурні зміни: хромосомні мости, ацентромерні фрагменти, дицентричні, відстаючі хромосоми, трьохполюсні мітози і ін. Дані занесіть у таблицю, конкретизуючи спостережувані зміни у аберантних клітинах:

Таблиця 2

Кількість клітин			
А	Т	АбА (зміна)	АбТ (зміна)
сума (А+Т) клітин		сума (АбА+АбТ) клітин	

Дані підсумуйте та обчисліть частоту хромосомних аберацій (\mathcal{C}_{AB} в %) у мерисистемі корінців цибулі за наведеною формулою:

$$\mathcal{C}_{AB} = \frac{\text{сума (АбА+АбТ) клітин} \cdot 100 \%}{\text{сума (А+Т) клітин}}$$

За показником частоти хромосомних аберацій (\mathcal{C}_{AB}) можна визначити мутагенність чинника, за присутності якого вирощували

корінці цибулин упродовж однієї доби. Рівень мутагенності (високий, середній, низький) чинника визначають відносно контрольного зразка.

Контрольні питання

- Охарактеризуйте мітотичний цикл клітин.
- Опишіть перебіг подій та явищ, властиві для кожної фази мітозу.
- Дайте характеристику субфазам профазі першого мейотичного поділу.
- Що таке мітотичний та фазні індекси клітини та як їх обчислюють.
- Яка фаза поділу клітини є оптимальною для опису каріотипу рослинних організмів?
 - У результаті якого поділу клітини кількість хромосом редукується вдвічі, а за якого – не змінюється?
 - Якщо соматична клітина має 24 хромосоми, то яка кількість бівалентів спостерігається у профазі I мейозу?
 - Якщо соматична клітина має 48 хромосом, то яка кількість хроматид сегрегує до кожного полюсу в анафазі другого мейотичного поділу.
 - Що вивчає екологічна генетика та генетична токсикологія?
 - З якою метою застосовують біологічні тест-системи у екологічній генетиці та генетичній токсикології?
 - Що таке фіто-, цито- та генотоксичність речовини?
 - Охарактеризуйте *Allium*-тест та зазначте особливості його проведення.
 - Що таке анафазно-телофазний аналіз, зазначте особливості його проведення.

Рекомендована література

1. Генетика: підручник /А. В. Сиволоб, С. Р. Рушковський, С. С. Кир'яченко та ін. / За ред. А. В. Сиволоба. К.: Вид.-поліграф. центр "Київський ун-т", 2008. С. 125–141.
2. Загальна та молекулярна генетика: практикум / С. В. Демидов, В. Ф. Безруков, А. В. Сиволоб та ін. К.: Фітосоціоцентр, 2005. С. 45–69.
3. Петровська М. Екологічна токсикологія: навчально-методичний посібник. Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2014. 116 с.
4. Прохорова И.М., Ковалева М.И., Фомичева А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. Ярославль: ЯрГУ, 2005. С. 132 с.
5. Тоцький В.М. Генетика: підручник. Вид. 3-ге, випр. та доп. Одеса: Астропринт, 2008. С. 385–390.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

ДОСЛІДЖЕННЯ КАРІОТИПУ ЛЮДИНИ. КАРІОТИПУВАННЯ

Мета: ознайомитися із методом каріотипування, класифікацією та номенклатурою хромосом людини, оволодіти методикою побудови каріограми хромосом людини та навчитися визначати вид хромосомної хвороби за даними каріограм людей-носіїв цих хвороб.

Матеріали і обладнання: мікроскоп, готові препарати каріотипів людини, світлини каріотипів людей з нормальним та патологічними каріотипами.

Теоретичні відомості. Каріотип людини представлений 23 парами хромосом, із них 22 пари аутомосом і одна пара статевих хромосом (гетеросом). Запис каріотипу жінки виглядає так: 22A+XX, чоловіків – 22A+XY. Каріотипом людини ще називають візуальне представлення повного набору хромосом у вигляді **каріограми**. Геном людини зображають у вигляді **ідіограми** – схеми, на якій хромосоми розміщують у ряд в міру зменшення їх величини (див. Додаток Е) [1–3]. Ефективним методом дослідження каріотипу людини є **каріотипування** – цитогенетичний метод ідентифікації хромосом, їх кількості, стану, структури на основі метафазної пластинки. Цей метод дає можливість встановити чи виключити хромосомні аномалії, етіологію деяких спадкових захворювань, визначити каріотип наданого генетичного матеріалу. Розділ генетики, який вивчає та досліджує структуру та функції хромосом людини називається **цитогенетикою людини**. Вона активно почала розвиватися у середині 50-х рр. XX ст. після публікації Joe-Hin Tjio і Albert Levan у журналі “Hereditas”, у якій автори визначили загальну кількість хромосом у соматичних клітинах людини. У цьому ж році Charles Ford і John Hamerton підтвердили їхнє відкриття при аналізі сперматогоній і сперматоцитів [5].

Для вивчення каріотипу людини використовуються одноядерні лейкоцити, відібрані з проб крові, поділ яких на спеціальних середовищах індукується додаванням речовин – **мітогенів**, чи культури клітин, що активно проліферують у нормі (фібробласти шкіри, клітини кісткового мозку). Частіше за все препарати метафазних хромосом готують з лімфоцитів периферичної крові, які заздалегідь культивують за присутності фітогемагглютиніну (речовина, здатна індукувати мітоз). Цей метод був запропонований **Мурхедом у 1960 р.** Збагачення популяції культури клітин здійснюється зупинкою їх поділу на стадії

метафази мітозу додаванням **колхіцину** – алкалоїд, що перешкоджає утворенню веретена поділу, і як наслідок, сегрегації хромосом та нормальному завершенню мітозу [2]. Такі клітини використовують для приготування цитопрепаратів метафазних пластинок, які фотографують (див. Додаток Є, рис. 1). З набору отриманих фотографій укладають **систематизований каріотип** – нумерований набір пар гомологічних хромосом (аутосом). Зображення хромосом при цьому орієнтують вертикально короткими плечима вгору, їх нумерують у порядку зменшення розміру, а пару статевих хромосом (гетеросом) поміщають у кінці каріограми (див. Додаток Є, рис. 2) [2].

Історично перші каріотипи отримували фарбуванням за **Романовським-Гімзою**. Подальша деталізація структури хромосом у каріотипах стала можливою з появою методик диференційного фарбування хромосом. Класичний каріотип отримують, фарбуючи хромосоми різними барвниками або їх сумішами. Через відмінність у зв'язуванні барвника з різними ділянками хромосом, їх фарбування відбувається нерівномірно, в результаті чого утворюється характерна смугаста структура (комплекс поперечних міток – бендів, англ. *Banding*), що відображає лінійну неоднорідність хромосоми і є специфічною для пари гомологічних хромосом та їх ділянок (за винятком поліморфних районів, в яких локалізовані різні алелі генів) [4].

З метою систематизації цитогенетичних описів каріотипів людини розроблена **Міжнародна цитогенетична номенклатура** (International System for Cytogenetic Nomenclature, ISCN), що базується на диференційному фарбуванні хромосом. Перша офіційна версія ISCN була прийнята у 1978 р., у якій систематизовані усі поняття і терміни, уніфіковані записи результатів аналізу каріотипу, зміни чисел й структури хромосом. Наступні версії ISCN (1985, 1995, 2005, 2009, 2013, 2016) містили доповнення і уточнення. Запис має такий формат: *[номер хромосоми] [плече] [номер ділянки] [номер смуги]*. У записах використовують певні позначення: q – довге плече, p – коротке плече хромосоми; додатковими символами позначають хромосомні аберації. У науковій літературі використовують й такі позначення: FN – фундаментальне число (сумарна кількість плечей хромосом) та ін. [5].

Уперше спосіб фарбування хромосом високодеталізованого зображення, був розроблений шведським цитологом Касперсоном, відомий як **Q-фарбування**. До методів диференційного фарбування хромосом належать [4]:

Q-фарбування – метод фарбування акрихін-іпритом з дослідженням цитопрепаратів під флуоресцентним мікроскопом. Застосовується головню для дослідження Y-хромосом: виявлення транслокацій між статевими хромосомами, між Y-хромосомою та аутосомами, скринінгу мозаїцизму за участю Y-хромосом, визначення генетичної статі).

G-фарбування – модифікований метод фарбування за Романовським-Гімзою. Використовується як стандартний метод цитогенетичного аналізу каріотипу людини, оскільки його чутливість вище, ніж у Q-фарбування. Застосовується для вияву незначних аберацій і маркерних хромосом (сегментовані по-іншому порівняно з нормальними хромосомами).

R-фарбування – метод, що базується на застосуванні акридинового помаранчевого та схожих до нього барвників. Фарбуються ділянки хромосом, нечутливі до G-фарбування. Застосовують для вияву деталей гомологічних G-або Q-негативних ділянок сестринських хроматид або гомологічних хромосом.

C-забарвлення – метод, що застосовується для аналізу центромерних ділянок, що містять конститутивний гетерохроматин, та варіабельної дистальної частини Y-хромосоми.

T-фарбування – метод, що застосовують для аналізу теломерних ділянок хромосом.

Останніми роками для дослідження хромосом використовують методику **спектрального каріотипування (флуоресцентна гібридизація *in situ*, англ. *Fluorescence in situ hybridization, FISH*)**, у якій застосовується набір флуоресцентних барвників, що зв'язуються (гібридизуються) зі специфічними ділянками гомологічних хромосом. Останні набувають ідентичних спектральних характеристик, що полегшує їх ідентифікацію та виявлення різних змін, насамперед, міжхромосомних транслокацій. Транслоковані ділянки мають відмінний спектр, що відрізняється від спектру решти хромосом [5].

Класифікація і номенклатура рівномірно забарвлених хромосом людини була укладена на міжнародних нарадах ISCN, що скликалися в Денвері (1960), Лондоні (1963) і Чикаго (1966). Згідно з рекомендаціями цих конференцій, хромосоми розташовуються в порядку зменшення їх довжини [1–5].

Класифікація хромосом людини проводиться за Денверською системою, згідно з якою 23 пари хромосом розбивають на сім груп (див. Додаток Є), які позначені буквами англійського алфавіту від А до Г. Усі пари хромосом нумеруються арабськими цифрами [4, 5]:

Гр. А – хромосоми 1 – 3. Великі метацентрики з майже медіанними центромерами. Легко відрізняються.

Гр. В – хромосоми 4 – 5. Великі субметацентрики. Не відрізняються.

Гр. С – хромосоми 6 – 12. Середні субметрацентрики. Х-хромосома подібна до хромосоми 6. Найважча група щодо ідентифікації індивідуальних хромосом.

Гр. Д – хромосоми 13 – 15. Великі акроцентрики.

Гр. Е – хромосоми 16-18. Короткі хромосоми з медіанними (хр.16), субметадіанними (хр.17), і субметадіанними (хр.18) центромерами, 16 та 17 мають вторинну перетяжку.

Гр. F – хромосоми 19 – 20. Короткі метацентрики. Між собою не розрізняються.

Гр. J – хромосоми 21 і 22. Короткі акроцентрики. Мають супутників.

У-хромосома подібна за розмірами до 21 та 22 хромосом, не має супутника. Отже, каріотип чоловіка на відміну від жінки має 5 маленьких акроцентриків.

Завдяки цитогенетичним дослідженням, насамперед каріотипуванню, у людей визначають етіологію деяких спадкових захворювань, а також причину безпліддя. Зокрема, ідентифікують різні трисомії аутосом, наприклад синдроми Дауна (47,XX(XY)+21), Патау 47,XX(XY)+13), Едвардса (47,XX(XY)+18), а також хвороби, викликані зміною числа статевих хромосом. Наприклад, синдроми Шерешевського – Тернера (45,ХО), Клайнфельтера (47,XXУ), трисомію-Х (47,XXX), дипло-У (47,ХУУ) та низку інших [3 -5].

Крім зміни числа наборів хромосом, методом диференційного фарбування можна ідентифікувати різні хромосомні аберації: делеції, дуплікації, інверсії, транслокації. Прикладом такого захворювання може бути синдром “котячого крику”, який є наслідком дефішенсі короткого плеча п’ятої пари хромосом [2].

Завдання роботи

Завдання 1. Вивчіть та охарактеризуйте каріотипи людини, фарбовані рутинним (за Гімзою), дифереційним G- та FISH-методами.

Завдання 2. Розгляньте під імерсійним об’єктивом (x90) мікроскопа, метафазні пластинки готових препаратів каріотипів людини. Знайдіть та зарисуйте каріотип із чітким зображенням і розкидом хромосом, порахуйте їх та встановіть кому він належить – чоловічій чи жіночій статі.

Завдання 3. Розгляньте фотознімок каріотипу людини та розподіліть хромосоми у вигляді каріограми згідно з Денверською системою. Встановіть, кому належить виданий вам каріотип – чоловікові чи жінці.

Завдання 4. Розгляньте та зарисуйте каріограми людей-носіїв хромосомних синдромів: Дауна, Клайнфельтера та Шерешевського – Тернера, вкажіть їх генетичний запис.

Контрольні питання

- Що таке метод каріотипування?
- Що досліджує генетика людини?
- Опишіть види диференційного фарбування хромосом, що застосовуються у каріотипуванні.
 - Коли сформувалася міжнародна цитогенетична номенклатура?
 - Який каріотип називають систематизованим?
 - Скільки груп зчеплення є у каріотипі нормальних людей?
 - Який із методів диференційного фарбування використовують для візуалізації Y-хромосоми?
 - Який із методів диференційного фарбування використовують для візуалізації центромерних ділянок, а який – для теломерних ділянок хромосом)
 - Що є основою FISH-методу фарбування хромосом?
 - Охарактеризуйте каріотип людини згідно з Денверською системою.
 - Які хромосоми людини мають вторинні перетяжки?
 - Скільки бівалентів хромосом утворюється в диплотені профазі першого мейотичного поділу людини?
 - Опишіть клініко-генетичні вади людей з синдромом Дауна, Патау, Клайнфельтера, Шерешевського – Тернера.
 - Як називають генотипи з набором хромосом $2n-1$, $2n+1$, $2n+2$?

Рекомендована література

1. Генетика: підручник /А. В. Сиволоб, С. Р. Рушковський, С. С. Кир'яченко та ін. / за ред. А. В. Сиволоба. Київ: Вид.-поліграф. центр “Київський ун-т”, 2008. С. 199–200.
2. Загальна та молекулярна генетика : практикум / С. В. Демидов, В. Ф. Безруков, А. В. Сиволоб та ін. Київ : Фітосоціоцентр, 2005. С. 48–65; 181–198.
3. Помогайбо В. М., Петрушов А. В. Генетика людини: навч. посібник. Київ. Видав. центр Академія, 2011. С. 81–85, 147–155.
4. Тоцький В.М. Генетика: підручник. Вид. 3-ге, випр. та доп. Одеса: Астропринт, 2008. С. 624 – 631.
5. Трофимова И.Л. Малый практикум по цитогенетике: изучение кариотипа человека: учеб.-метод. пособие. СПб.: Изд-во СПбГЭТУ ЛЭТИ, 2018. С. 5–20.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

СТАТЕВИЙ ХРОМАТИН.

ЕКСПРЕС-ДІАГНОСТИКА КІЛЬКОСТІ Х-ХРОМОСОМ

Мета: оволодіти технікою виготовлення тимчасового препарату метафазної пластинки клітин людини, ознайомтесь з морфологією статевого хроматину епітеліальних клітин слизової оболонки порожнини рота та методом експрес-діагностики кількості конденсованих Х-хромосом на основі метафазної пластинки.

Матеріали і обладнання: мікроскоп, шліфовані, предметні і покривні скельця, гістологічна голка, вата, метанол, ацетоорсеїн.

Теоретичні відомості. У каріотипі людини при фарбуванні основними барвниками деяких клітин виявляється невеличке дископодібне тільце, яке називають **статевим хроматином**, або **тільцем Барра** (див. додаток Ж). Воно міститься під ядерною оболонкою інтерфазних ядер більшості (60 – 70 %) клітин жіночої статі. Вперше його виявили **Барр і Бертрам у 1949 р.** у ядрах нейроцитів кішки, яке назвали **сателіт ядра**. Згодом було встановлено, що таке тільце властиве тільки ядрам жіночих клітин, а тому його стали розглядати як діагностичну ознаку при визначенні статі [1–5].

Тільце Барра є скупченням гетерохроматину неактивної Х-хромосоми у соматичних клітинах самок плацентарних ссавців, включаючи людину. Є результатом спіралізації (гетерохроматизації) та інактивації однієї із Х-хромосом зародка жіночої статі на стадії бластоцисти (на 16 –19-ту добу ембріонального розвитку, стадія 100 клітин). Гетерохроматизація тієї чи іншої Х-хромосоми у клітинах є явищем випадковим. Гетерохроматизацію Х-хромосоми називають **лайнізацією** на честь британської дослідниці Мері Лайон, яка дослідила цей процес у мишей на прикладі успадкування плямистого забарвлення шерсті у гетерозиготних самок за генами забарвлення. У 1961 р. вона висунула гіпотезу про інактивацію однієї Х-хромосоми в клітинах самок ссавців, яка пояснювала водночас й те, що миші лише з однією Х-хромосомою мають фенотип самочок. Гетерохроматизація однієї з Х-хромосом (батьківської, чи материнської) здійснюється в ранньому ембріогенезі, в момент імплантації ембріону, випадковим чином. Інактивація охоплює майже усю Х-хромосому, за винятком невеликого фрагмента, та характеризується стійкістю, передаючись

клітинам-нащадкам. Тому, клітини жіночого організму за експресією генів Х-хромосоми є **мозаїчними**. Винятком є клітини зародкових оболонок миші, у яких інактивується тільки батьківська Х-хромосома. Друга Х-хромосома у жіночих клітинах залишається генетично активною. Гетерохроматизація розглядається як **механізм дозової компенсації генів** (вирівнювання дози генів, зчелених з Х-хромосомою, відповідно до чоловічих клітин, які мають лише одну Х-хромосому) у ссавців [5].

Класичним прикладом мозаїцизму є забарвлення черепахових кішок – половина їхніх клітин має активну Х-хромосому з “рудим”, а друга половина – з “чорним” алелем гена, що задіяний у синтезі меланіну. Котята-самці від таких матерів є або жовтими, або чорними. Коти з черепаховим забарвленням зустрічаються вкрай рідко, що пояснюється анеуплоїдією – присутністю у їхніх клітинах двох Х-хромосом замість однієї. Жінки, гетерозиготні за генами Х-хромосоми, є також мозаїками. Наприклад, зчеплена зі статтю мутація ектодермальної дисплазії, що викликає відсутність зубів і потових залоз, проявляється лише у деяких місцях щелеп та поверхні шкіри жінок-носієнок цього мутантного гену. Описані жінки з мозаїчним проявом генів деяких ензимів, факторів зсідання крові та ін., зчеплених з Х-хромосомою [4].

Гетерохроматизована Х-хромосома добре візуалізується в ядрах соматичних клітин жінок у вигляді темної, добре забарвленої грудочки. Тільця статевого хроматину з діагностичною метою виявляють в епітеліальних клітинах слизової оболонки щоби (букальному зішкрябу) чи нейтрофільних лейкоцитах периферичної крові. Виявляється він також у клітинах вагінального епітелію, клітинах волосяної цибулини [2].

В епітеліальних клітинах жінок тільця Барра виявляються під ядерною мембраною (див. додаток Ж). У нормі їх знаходять більше як у 20 % клітин, а у клітинах чоловіків вони у нормі відсутні. У нейтрофільних лейкоцитах жінок візуалізуються у вигляді барабанних паличок (у нормі виявляються у 1–2 % лейкоцитів, а у чоловіків вони відсутні). Локалізація тілець статевого хроматину у ядрі клітин певного типу тканин є відносно постійною [2].

У діагностуванні тілець Барра мають на увазі, що у клітинах нормальних чоловіків їх немає бути, а у жіночих – їх кількість має бути на одиницю менше, аніж кількість Х-хромосом, (тобто, за норми має бути тільки одне тільце Барра).

Метод експрес-діагностики статевого хроматину використовують для:

- постановки діагнозу хромосомних хвороб, спричинених зміною кількості Х-хромосом;
- визначення статі при різноманітних клінічних формах гермафродитизму;
- визначення статевої належності фрагментів трупа людини у судовій медицині (у хрящовій тканині тільця добре зберігаються);
- генетичної ідентифікації статі, яка є обов'язковою для жінок, що беруть участь у міжнародних спортивних змаганнях, Олімпійських іграх;
- генетичної статі майбутньої дитини (у пренатальній діагностиці, особливо при підозрі на наявність зчеплених зі статтю захворювань) [2].

У людей і тварин з анеуплоїдією, що мають у геномі менше чи більше як дві Х-хромосоми, число тілець Барра (N) в ядрі соматичної клітини обчислюється за формулою: $(N=2X - 1)$. Тому у клітинах жінок з синдромом Шерешевського – Тернера (45,ХО) не буде спостерігатись тілець Барра, а у чоловіків із синдромом Клайнфельтера (47,XXY) буде одне тільце [4–5].

Процедура каріотипування людини у деяких випадках доповнюється аналізом на наявність Y-статевого хроматину (F-тільця). Його визначають у букальному зішкрябі, а також лейкоцитах периферичної крові, фарбуючи акрихін-іпритом (флуоресцентним барвником). **Y-статевий хроматин** є інтенсивно флуоресціюючою ділянкою довгого плеча Y-хромосоми в інтерфазних ядрах клітин. Він виявляється у ядрі клітин люмінесцентним мікроскопом як яскрава пляма діаметром 0,3–1,0 мкм. У чоловіків за норми візуалізується одна грудка Y-хроматину, а за Y-полісомії – їх кількість відповідає кількості Y-хромосом, що й використовується у клініці для встановлення відповідного діагнозу [2].

Завдання роботи

Завдання 1. Приготування тимчасового препарату:

- 1) шліфованим стерильним скельцем чи металічним шпателем зробіть зішкряб зі слизової порожнини рота (з внутрішньої поверхні щік);
- 2) розподіліть зішкряб рівномірно посередині предметного скла і підсушіть;
- 3) зафарбуйте препарат, капнувши на мазок 1 – 2 краплі ацетоорсеїну, і витримайте 15 хв;
- 4) накрийте препарат покривним

скельцем і за допомогою фільтрувального паперу усуньте рештки барвника.

Завдання 2. Дослідження статевого хроматину на препараті розпочніть під мікроскопом із малого збільшення. Знайшовши ділянку з великою кількістю клітин, перейдіть до масляної імерсії. Розміщення ядер на цитопрепараті може бути таким, що статевий хроматин перебуватиме поза площиною поля зору, очевидно, що ця структура виявляється у ядрах не усіх клітин.

Зарисуйте спостережувані епітеліальні клітини, у ядрах яких присутній та відсутній статевий хроматин, позначте його

Завдання 3. Підрахуйте не менше 100 інтерфазних ядер, відмічаючи при цьому кількість ядер із статевим хроматином (Y_{CT}).

Результати занесіть у таблицю:

Таблиця

Поле зору	Кількість ядер		Сумарна кількість ядер (S)
	з тільцями (CT)	без тілець (C)	

Встановіть відсоток ядер ($T_{\%}$) зі статевим хроматином за формулою: $T_{\%} = (Y_{CT} \cdot 100 \%) / S$.

Контрольні питання

- Поясніть причину появи тілець статевого хроматину у клітинах особин жіночої статі плацентарних ссавців.
- Наслідком якого явища є поява тілець Барра в ядрах соматичних клітин?
- Хто вперше виявив та описав статевий хроматин у клітинах плацентарних ссавців?
- Хто вперше дослідив та пояснив механізм появи статевого хроматину у вигляді тілець?
- Опишіть механізм дозової компенсації генів у людини та дрозофіли.
- Що таке мозаїцизм за генами X-хромосоми? У чому воно проявляється. Наведіть приклади у тварин і людини.
- Чому черепаховими (за забарвленням) бувають тільки кішки, але не коти (вони є тільки чорними і рудими).
- Який біологічний матеріал людини використовують у методі експрес-діагностики статевого хроматину?
- Опишіть етапність виконання методу експрес-діагностики статевого хроматину у людей.
- Вкажіть діагностичне призначення методу визначення статевого хроматину у людей.

- Яка кількість тілець Барра в інтерфазній клітині особин з генотипами ХХХХУ? ХХХУ? ХХХ? ХХУУ? Якої вони будуть статі?
- Яким методом та з якою метою визначають У-статевий хроматин у осіб чоловічої статі?

Рекомендована література

1. Генетика: підручник /А. В. Сиволоб, С. Р. Рушковський, С. С. Кир'яченко та ін. / за ред. А. В. Сиволоба. Київ : Вид.-поліграф. центр "Київський ун-т", 2008. С. 199–200.
2. Загальна та молекулярна генетика: практикум / С. В. Демидов, В. Ф. Безруков, А. В. Сиволоб та ін. Київ : Фітосоціоцентр, 2005. С. 70–72.
3. Павлішко Г. Методичні вказівки для лабораторних і практичних робіт з Генетики з основами селекції для студентів біологічного факультету. Дрогобич : РВВ ДДПУ, 2006. С. 17–20.
4. Помогайбо В. М., Петрушов А. В. Генетика людини: навч. посібник. Київ . Видав. центр Академія, 2011. С. 81–85, 154–155.
5. Тоцький В.М. Генетика : підручник : вид. 3-ге, випр. та доп. Одеса : Астропринт, 2008. С. 624–631.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

МУТАГЕНЕЗ. ВІДБІР ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ МУТАНТІВ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета: ознайомитися із видами мутагенезу, оволодіти методикою отримання мутантів *Saccharomyces cerevisiae* методом хімічного мутагенезу та технікою відбору ауксотрофних мутантів на елективних середовищах.

Матеріали і обладнання: бінокулярна лупа, мікроскопи, камера Горяєва бактеріологічна петля, реплікатор, 70 % етанол, вата, чашки Петрі з повноцінним (Сабуро) і мінімальним культуральним середовищем, стерильні пробірки, шпателі, піпетки, 0,1 М натрію нітрит, 50 мМ фосфатний буфер, рН 7,0, дистильована (стерильна) вода.

Теоретичні відомості. До 1925–1927 рр. генетики працювали тільки зі спонтанними мутантами. Різні спроби підвищити частоту мутацій не приносили успіху, що стимулювало автогенетичні концепції, згідно з якими еволюцію організмів пов'язували тільки з дією внутрішніх чинників. Оволодіння методами індукованого мутагенезу з використанням різних фізичних й хімічних чинників, що значно підвищували частоту мутацій, мали значну роль у розробці методів боротьби з ними, що також розширило можливості генетичного аналізу. До їх числа належать методи, у яких використовувався вплив “променів радію” (Г. А. Надсон і Г. С. Філіппов, 1925), рентгенівських променів (Р. Меллер, Стадлер, 1928), хімічних сполук (В. В. Сахаров, 1932; М. Є. Лобашев, Ф. А. Смірнов, 1934), екзогенної ДНК (С. М. Гершензон, 1939) та інших агентів, які підвищували частоту мутацій у досліджуваних генетичних об'єктів. У 1946 р. І. А. Рапопорт виявив сильну мутагенну дію формаліну і етиленіміну, а англ. Ш. Ауербах – іприту. Згодом було відкрито багато інших хімічних мутагенів. Деякі з них посилюють мутаційний ефект у сотні разів порівняно зі спонтанним мутагенезом; їх називають **супермутагенами** (лат. super – зверх, над, понад). Багато з них, зокрема ті, що використовуються для одержання високоактивних штамів мікрорганізмів – продуцентів антибіотиків, відкрив І. А. Рапопорт. Із відкриттям мутагенного ефекту радіації і хімічних речовин розгорнулись роботи по отриманню індукованих мутантів [4].

Хімічні мутагени були використані для отримання мутантних форм цвільових грибів, актиноміцетів, бактерій, які продукують у

значних кількостях пеніцилін, стрептоміцин та інші антибіотики. Завдяки деяким хімічним мутагенам була покращена ферментативна активність грибів, які використовуються для спиртового бродіння. Розроблено десятки перспективних мутацій культурних рослин [2].

Результати експериментального хімічного мутагенезу, вказували на те, що у природних умовах є чинники, які подібно до хімічних речовин спричиняють появу спонтанних мутацій. Дослідженням взаємовпливу генетичних процесів і екологічних відносин займається екологічна генетика, яка опирається на методологію генетичного аналізу та використовує методологію досліджень екології. Уперше принципи екологічної генетики сформулював у 1960-х роках Е. Б. Форд як про генетику популяцій в природних умовах. Вивчення мутагенної дії фармакологічних речовин, пестицидів, ксенобіотиків та інших хімічних сполук, у тому числі й антропогенного походження, які *de novo* синтезуються та використовуються у медицині й сільському господарстві, є предметом вивчення генетичної токсикології [4].

Основний метод вивчення мутаційного процесу – визначення його частоти. При цьому експериментатор має дотримуватись правил, які були сформульовані Тимофєєвим-Рєсовським ще в 1934 р.: 1) робота можлива тільки з генетично чистим матеріалом, тобто з інбредними чи чистими лініями, гомозиготні по досліджуваних генах; 2) потрібно використовувати достатньо численний як у контролі, так і в обробленому мутагенами матеріал; 3) для виявлення мутацій слід використовувати надійні генетичні методи; 4) аналізувати будь-які отримані зміни для того, щоб встановити, чи вони є спадковими (цитоплазматичними чи ядерними, хромосомними чи генними); 5) потрібно знати механізм впливу мутагену на зародкові клітини обробленого організму. Ці правила справедливі при вивченні індукованого мутаційного процесу [1]. Його частоту обчислюють як різницю частоти мутацій контрольного (без обробки мутагеном) та дослідного варіантів (після обробки мутагеном) [3].

Saccharomyces cerevisiae (дріжджі-сахароміцети) – це мікроорганізми, які є важливою виробничою культурою та, водночас, модельним об'єктом експериментальних досліджень у теоретичній генетиці (див. додаток А). Як об'єкт теоретичної генетики, дріжджі мають низку переваг та унікальних особливостей: вони є одноклітинними мікроорганізмами, які ростуть на простих за складом середовищах; до них можна застосувати майже усі методи досліджень, розроблені для бактерій; вони є найпростішими еукаріотами, які мають статевий

процес, завдяки чому є зручним об'єктом для розробки проблем загальної і, особливо, молекулярної генетики еукаріот [5]. У дріжджів можна легко і, порівняно простіше, виділити гаплоїдні і диплоїдні штами; отримати поліплоїди і навіть октаплоїди. Оскільки дріжджова клітина може існувати, отримуючи енергію як у процесі дихання, так і під час бродіння. Останнє уможливорює отримання різноманітних цитоплазматичних, зокрема мітохондріальних *petit*-мутацій, і навіть таких, які повністю блокують здатність клітини дріжджів до дихання, що відкрило шлях для вивчення генетики мітохондрій. Усе це привело до того, що дріжджі зайняли одне із провідних місць серед мікроорганізмів (і, насамперед, серед грибів) як модельний об'єкт генетичних досліджень [5].

Завдання роботи

1. Летальна і мутагенна дія азотистої кислоти

Завдання 1. Триденну культуру гаплоїдного штама дріжджів *S. cerevisiae* змийте із чашки 5 мл 50 мМ фосфатного буферу, рН 7,0 і перенесіть отриману суспензію за допомогою піпетки у пробірку (усе повинно бути стерильно!).

Визначте концентрацію клітин у даній суспензії, користуючись камерою Горяєва. Для цього суспензію клітин дріжджів розведіть у 50, 100 і 500 разів робочим буфером і перенесіть краплю розведеної суспензії під покривне скло стерильною петлею. Переконавшись у моноклітинності культури, підрахуйте число клітин у 5 великих квадратах. Чисельність клітин у 1 мл суспензії визначають згідно з формулою: $C = n \cdot N / 20$, де n – число клітин у 5 великих квадратах камери Горяєва; N – розведення суспензії клітин; 20 – коефіцієнт перерахунку.

Завдання 2. Відберіть 0,5 мл розведеної буфером (до 10^3 клітин/мл) суспензії клітин (стерильно!) та перенесіть її у контрольну чашку, що містить повноцінне середовище. За допомогою скляного (стерильного) шпателя рівномірно розподіліть суспензію на поверхні середовища.

Завдання 3. Обробіть мутагеном вихідну суспензію дріжджів, яка містить до 10^6 клітин/мл: внесіть до 1 мл суспензії розчину натрію нітриту ($C_k = 15$ мМ) та інкубуйте суміш за кімнатної температури. З часу внесення мутагену кожні 10 хв (упродовж $\frac{1}{2}$ години) відбирайте по 0,1 мл суспензії (стерильно!) дріжджів та перенесіть її на чашки з

повноцінним середовищем (повторіть це тричі для кожного часу експозиції). Складним шпателем (стерильно) рівномірно розподіліть суспензію на поверхні середовища.

Помістіть усі чашки (контрольну та дослідні) у термостат (30 °C).

2. Відбір та ідентифікація мутантів мікроорганізмів

Завдання 1. Через кілька днів інкубації, підрахуйте чисельність клітин *S. cerevisiae* у контрольній та дослідних чашках з розчином натрію нітриту ($C_k = 15$ мМ).

Завдання 2. Проведіть статистичну обробку результатів, виражаючи чисельність клітин у контрольних і дослідних чашках як $M \pm m$. Обчисліть відсоток виживання клітин *S. cerevisiae* за різного часу експозиції культури з мутагеном, враховуючи вихідні розведення при посіві. Виживання у контрольних посівах прийміть за 100 %.

Побудуйте криву виживання клітин залежно від часу експозиції культури *S. cerevisiae* з мутагеном (розчином натрію нітриту ($C_k = 15$ мМ)).

Завдання 3. Методом реплік (відбитків) чи бактеріологічною петлею (у стерильних умовах) перенесіть колонії *S. cerevisiae*, що виростили на чашках із повноцінним середовищем на мініміальне середовище (не містить факторів росту).

Помістіть чашки з колоніями у термостат (30 °C) та інкубуйте їх кілька діб.

Завдання 4. Здійсніть аналіз чисельності та морфології колоній *S. cerevisiae*. Колонії дріжджів, які виростили на повноцінному середовищі і не виростили на мініміальному, ідентифікуються як ауксотрофи. Обчисліть відсоток ауксотрофності за різного часу експозиції культури *S. cerevisiae*, приймаючи чисельність колоній у контрольних посівах за 100 %.

Контрольні питання

1. Що таке мутагенез, мутагени, канцерогени, тератогени?
2. Опишіть види мутагенів та наведіть приклади супермутагенів.
3. Сформулюйте основні положення мутаційної теорії Гюго де Фріза-Коржинського.
4. Охарактеризуйте методи вивчення мутаційної мінливості.
5. Що таке генні мутації? Як їх класифікують?

6. Опишіть молекулярну природу виникнення генних мутацій (заміни азотистих основ, випадання або вставки азотистих основ, нонсенс- місенс- та фреймшифт- мутації).

7. Що таке хімічний мутагенез? Вкажіть особливості мутагенної дії алкілюючих сполук, аналогів азотистих основ, азотистої кислоти.

8. Що таке радіаційний мутагенез? Як проявляється мутагенна дія УФ випромінювання?

9. Що таке спонтанний мутаційний процес? Які механізми та причини виникнення спонтанних мутацій?

10. Як виявляють мутагени в оточуючому середовищі?

11. Як здійснюється охорона природи від забруднення генотоксичними агентами?

12. Що таке речовини-антимутагени та радіопротектори?

Рекомендована література

1. Генетика: підручник /А. В. Сиволоб, С. Р. Рушковський, С. С. Кир'яченко та ін. / за ред. А. В. Сиволоба. Київ : Вид.-поліграф. центр "Київський ун-т", 2008. С. 199–200.

2. Загальна та молекулярна генетика: практикум / С. В. Демидов, В. Ф. Безруков, А. В. Сиволоб та ін. Київ : Фітосоціоцентр, 2005. С. 70–72.

3. Павлішко Г. Методичні вказівки для лабораторних і практичних робіт з Генетики з основами селекції для студентів біологічного факультету. Дрогобич : РВВВ ДДПУ, 2006. С. 17–20.

4. Тоцький В.М. Генетика: підручник : вид. 3-ге, випр. та доп. Одеса : Астропринт, 2008. С. 375–390.

5. Федоренко В.О. Задачі та вправи з генетики : навч. посіб. / В. О. Федоренко, Я. І. Черник, Д. В. Максимів, Л. С. Боднар. Львів : Оріяна-Нова, 2008. С. 298–420.

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ ТА ОФОРМЛЕННЯ ЗВІТУ

1. Оформлення лабораторних робіт потрібно виконувати у вигляді звітів, у яких вказувати порядковий номер роботи, тему, мету, матеріали і обладнання, завдання і хід виконання роботи.

2. Досліджувані об'єкти у звіті зарисовувати графітовим олівцем (за необхідності, кольоровими олівцями). Підписують рисунки внизу, роблячи відповідні пояснення. Рисунки повинні бути чіткими, визначених розмірів, розміщуватися на сторінках раціонально.

3. Керуючись наведеними питаннями до лабораторної роботи, підготувати теоретичний матеріал для допуску, а потім до її захисту.

4. У кінці кожної виконаної лабораторної роботи після виконання усіх завдань, потрібно зробити висновок.

5. Під час захисту лабораторної роботи потрібно знати відповіді на контрольні питання, наведені у кінці роботи.

Примітка. Див. зразок звіту про виконання лабораторної роботи.

ЗРАЗОК ОФОРМЛЕННЯ ЗВІТУ ПРО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

Лабораторна робота № 2

Тема Успадкування ознак при моногібридному схрещуванні.
Генетичний аналіз нащадків другого покоління

Мета: оволодіти технікою постановки генетичного експерименту – схрещування різних ліній дрозофіли; освоїти методологію гібридологічного аналізу та навчитися визначати тип успадкування ознаки за результатами схрещування.

Матеріали і обладнання: стереомікроскоп, лупа, наркотизатор, пластинка-поле, пензлик, вата, штатив та підставка для пробірок, пробірки культурою дрозофіли.

Завдання роботи та результати їх виконання

Завдання 1. Підморили у наркотизаторі особин – нащадків другого покоління обох дослідів, спочатку з пробірки № 1 (пряме схрещування), а згодом, № 2 (зворотне схрещування) та обережно перенесли їх на пластинку-поле. Уважно розглянули особин під стереомікроскопом, розділили їх по фенотипу, а в межах кожного фенотипу – по статі. Порахували особин.

Завдання 2. Занесли результати F_2 обох дослідів у таблицю 1.

Завдання 3. Проведемо аналіз F_2 дослідів № 1 (прямого) і № 2 (зворотного схрещувань). Як бачимо, результати реципрокних схрещувань є однаковими: розщеплення за фенотипом серед нащадків другого покоління (F_2) є близькими до 3:1. Тому припустимо, що забарвлення тіла у дрозофіли успадковується як моногенна ознака (робоча гіпотеза), згідно з I та II законами Менделя.

Проведемо статистичну обробку результатів F_2 прямого і реципрокних схрещування методом χ^2 та перевіримо достовірність робочої гіпотези.

Таблиця 1

Результати моногібридного схрещування двох ліній *D. melanogaster*

Дата	№ пробірки	Батьки	Аналіз потомства	Примітка
1	2	3	4	
xx.xx	1	♀ (сіре тіло) x ♂ (чорне тіло)	Аналіз F₁: Сіре тіло: 18 ♀, 19 ♂	Нашадки F ₁ – за фенотипом усі одноманітні. Розщеплення за статтю у обох схрещуваннях – 1:1
	2	♀ (чорне тіло) x ♂ (сіре тіло)	Сіре тіло: 17 ♀, 20 ♂	
xx.xx	1	на F₂: 5 ♀ x 5 ♂ з пробірки № 1	Аналіз F₂: Сіре тіло: 23 ♀, 25 ♂ Чорне тіло: 9 ♀, 10 ♂	Серед нашадків F ₂ – розщеплен-ня за фенотипом – 3:1 у обох схрещуваннях
	2	5 ♀ x 5 ♂ з пробірки № 2	Сіре тіло: 20 ♀, 24 ♂ Чорне тіло: 8 ♀, 9 ♂ Всього: сіре тіло: 43 ♀, 49 ♂; чорне тіло: 17 ♀, 19 ♂	
				Розщеплення у F ₂ за статтю у обох схрещуван- нях у межах кожного фенотипу – 1:1

Робоча гіпотеза: розщеплення за фенотипом 3:1Проведемо статистичну обробку результатів F₂ методом χ^2

Таблиця 2

Статистична обробка результатів F₂ методом χ^2

Класи	Фактичне розщеплення (Ф)	Теоретичне розщеплення (Т)	Відхилення (Ф – Т)	(Ф – Т) ²
Сіре тіло	92	96	-4	16
Чорне тіло	36	32	4	16

Відповідно,

$$\chi^2 = \frac{(\Phi - T)^2}{T} = 0,167 + 0,5 = 0,667$$

Визначимо імовірність отриманого результату, керуючись таблицею «Значення χ^2 при різних ступенях вільності».

Обчислимо ступінь вільності (ν) за формулою:

$$\nu = n - 1, \text{ де } n - \text{кількість фенотипових класів.}$$

У нашому досліді маємо два фенотипові класи: сіре і чорне забарвлення тіла дрозофіли. Отож, $\nu = 2 - 1 = 1$

Згідно з таблицею, імовірність буде: $0,5 > P > 0,2$.

Висновок: розщеплення у досліді відповідає очікуваному розщепленню за фенотипом 3:1 з імовірністю $0,5 > P > 0,2$, що свідчить про менделівський тип успадкування ознаки забарвлення тіла у дрозофіли *D. melanogaster*: аутосомно-домінантний – сіре, аутосомно-рецесивний – чорне забарвлення тіла.

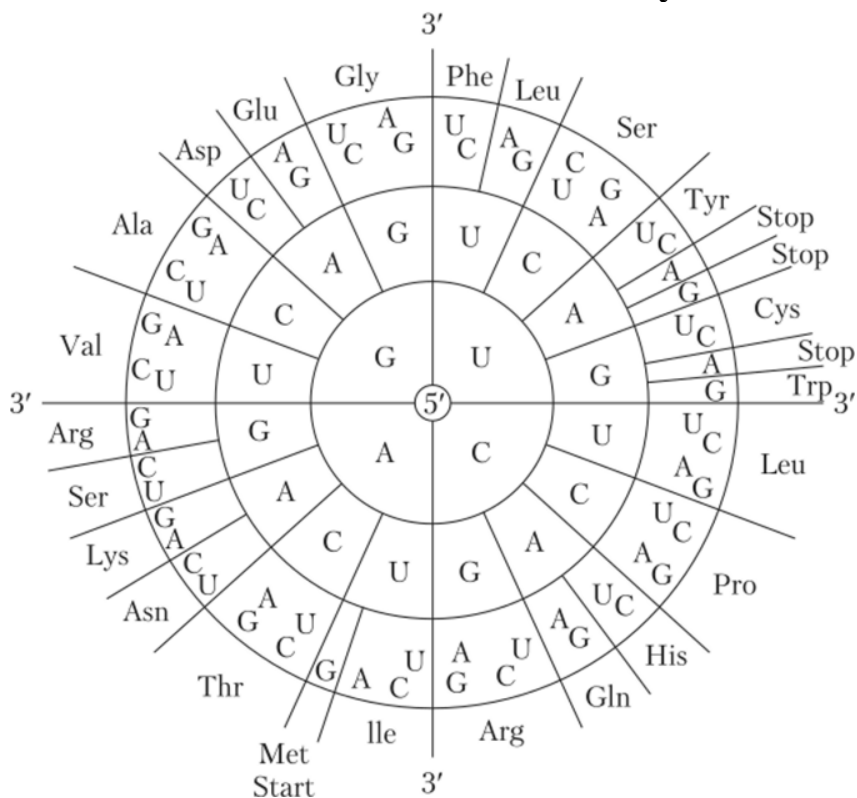
ДОВІДКОВО-ІНФОРМАЦІЙНІ ДАНІ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Додаток А

Значення χ^2 при різних ступенях вільності

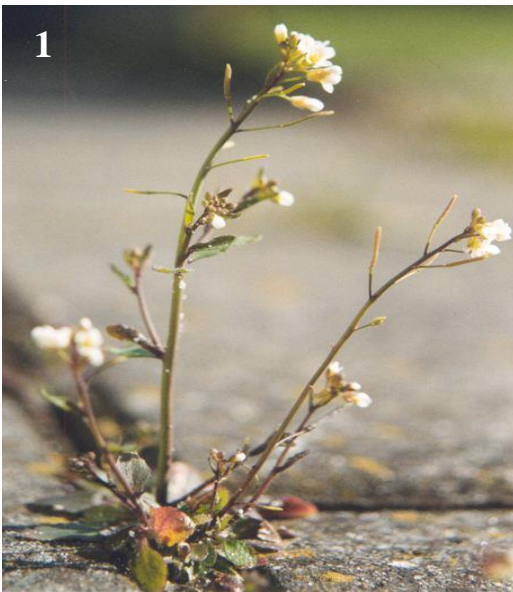
Число ступенів вільності <i>i</i> №	Імовірність (P)								
	0,99	0,95	0,90	0,80	0,50	0,20	0,10	0,05	0,01
1	0,0001	0,004	0,016	0,064	0,455	1,642	2,706	3,841	6,635
2	0,0201	0,103	0,211	0,446	1,386	3,219	4,605	5,991	9,210
3	0,115	0,352	0,584	1,005	2,366	4,642	6,251	7,815	11,343
4	0,297	0,711	1,064	1,649	3,357	5,989	7,779	9,488	13,277
5	0,554	1,145	1,610	2,343	4,351	7,298	9,234	11,070	15,086
6	0,872	1,635	2,204	3,070	5,348	8,558	10,645	12,592	16,812
7	1,239	2,167	2,833	3,822	6,346	9,803	12,017	14,067	18,475
8	1,646	2,733	3,490	4,590	7,344	11,03	13,362	15,507	20,090
9	2,088	3,325	4,590	7,344	8,343	12,24	14,684	16,919	21,666
10	2,558	3,940	4,865	6,179	9,342	13,44	15,987	18,307	23,209

Таблиця генетичного коду*



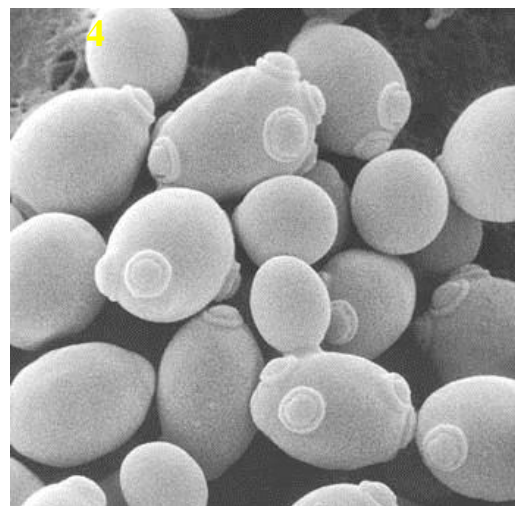
*із <https://studme.org/htm/img/33/2095/177.png>

МОДЕЛЬНІ ОБ'ЄКТИ ГЕНЕТИКИ



Світлина 1. *Arabidopsis thaliana* (Різушка Таля, або гусимка звичайна) із https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6f/Arabidopsis_thaliana.jpg

Світлина 2. *Oenothera lamarckiana* із <https://www.applewoodseed.com/wp-content/uploads/2016/11/OLAM-803.jpg>



Світлина 3. *Caenorhabditis elegans* із https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSYLk7LRxbx-BafqbAmJqiW_VhYMJqLlqbqkQ&usqp=CAU

Світлина 4. *Saccharomyces cerevisiae* із http://2.bp.blogspot.com/_207DNiAL-gc/TNrwiMk-7II/AAAAAAAAAU/gzlgMa3etfU/s1600/YeastCellsforWine.jpg

Drosophila melanogaster ЯК ОБ'ЄКТ ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. РОЗВИТОК ДРОЗОФІЛИ

Рис. 1

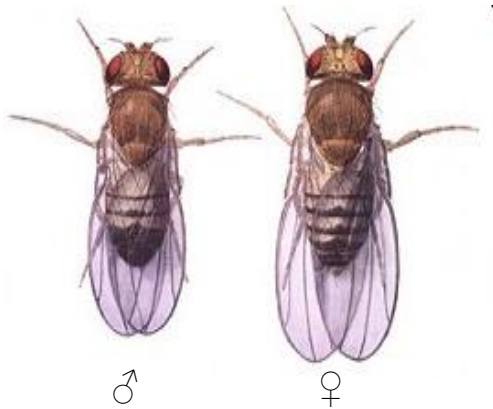


Рис. 2

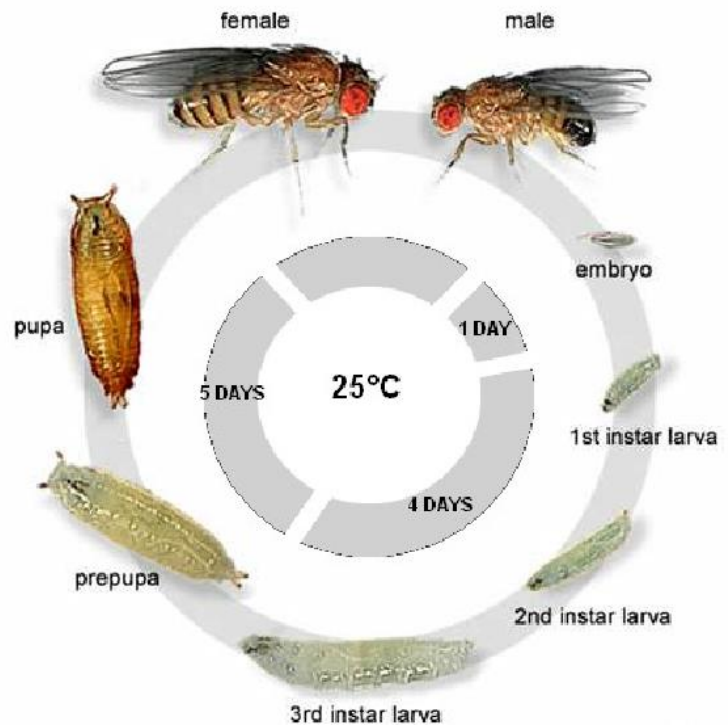


Рис. 1. Зовнішній вигляд самця (зліва) і самки (справа) *Drosophila melanogaster* (фото із сайту https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTu31LPD2YqZqtrFTjgSZ_ikIJGrKxBikEl2g&usqp=CAU).

Рис. 2. Життєвий цикл розвитку *Drosophila melanogaster* (схема Evely Vridolin із сайту <https://www.semanticscholar.org/paper/Identification-and-characterisation-of-the-fruitfly-Vridolin/dc3b47233b80f135e7ca0fae4ee30c7dff3f37f>): female – самка, male – самець, embryo – яйце, 1st instar larva – личинка I віку, 2st instar larva – личинка II віку, 3st instar larva прерупа – передлялечка, рупа – лялечка.



Рис. 1. Організація політенних хромосом *Drosophila melanogaster* (фото із Peinter, 1934).

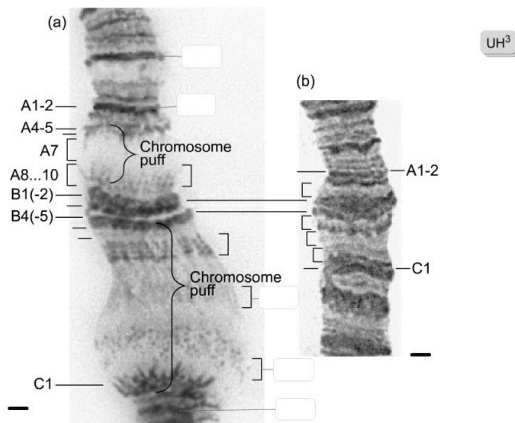


Рис. 2. Пуфи політенної хромосоми *Drosophila melanogaster* під електронним мікроскопом (фото Д. В. Новікова із сайту <https://www.numerade.com>).

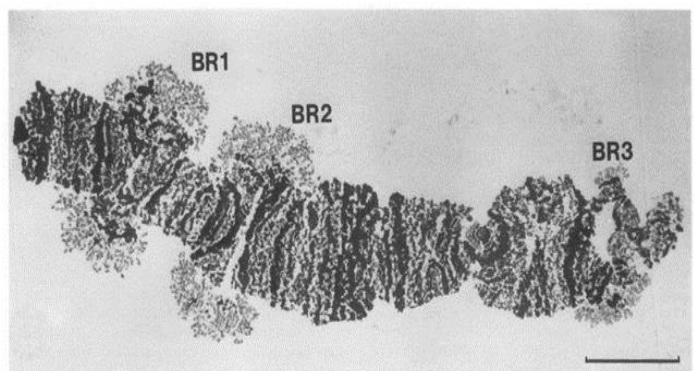


Рис. 3. Електронна мікрофотографія ізольованої хромосоми IV *Drosophila melanogaster*. Показано три гігантські пуфи, кільця Бальбіані (BR) 1, 2 і 3 (фото С. Ericsson, 1988 із сайту <https://www.researchgate.net>).

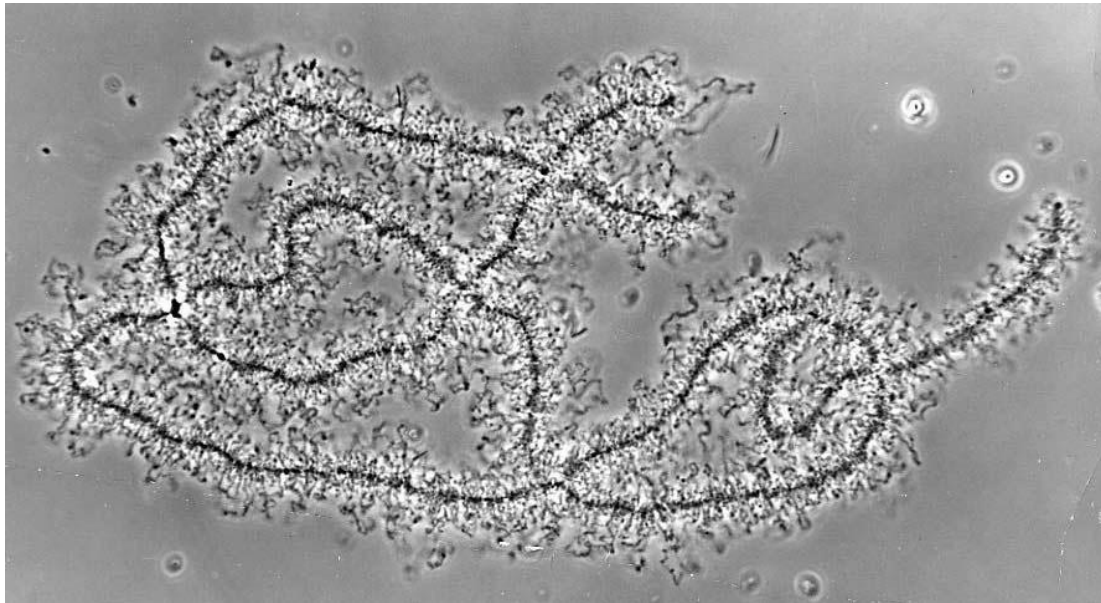


Рис. 1. Фото хромосом типу "лампових щіток" ооциту тритона, $\times 900$ (фото J.Gall із сайту www.cellbiol.ru).

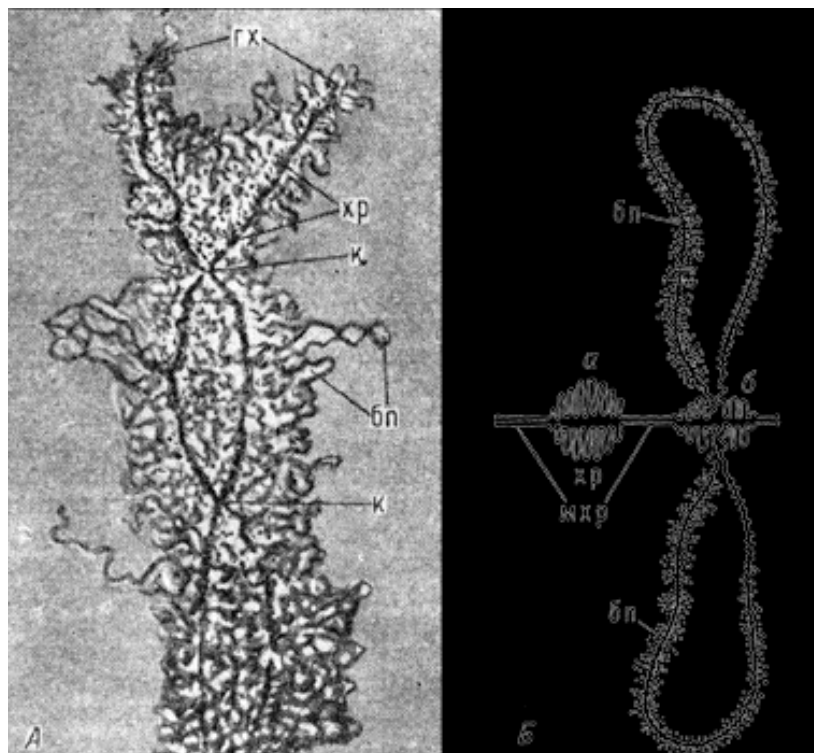


Рис. 2. А – структура хромосом типу лампових щіток (із жіночих статевих клітин тритона) у профазі мейозу: гх – гомологічні хромосоми, які зберігають в окремих місцях кон'югацію (к); хр — хромомери; бп – латеральні петлі хромомер (у них синтезується РНК);
 Б – неактивна (а) і функціональна (б) хромомери. Остання утворює бокові (латеральні) петлі (бп); мхр – міжхромомерні ділянки хромосоми (із сайту: <https://meduniver.com>).

ІДІОГРАМИ ХРОМОСОМ ЛЮДИНИ

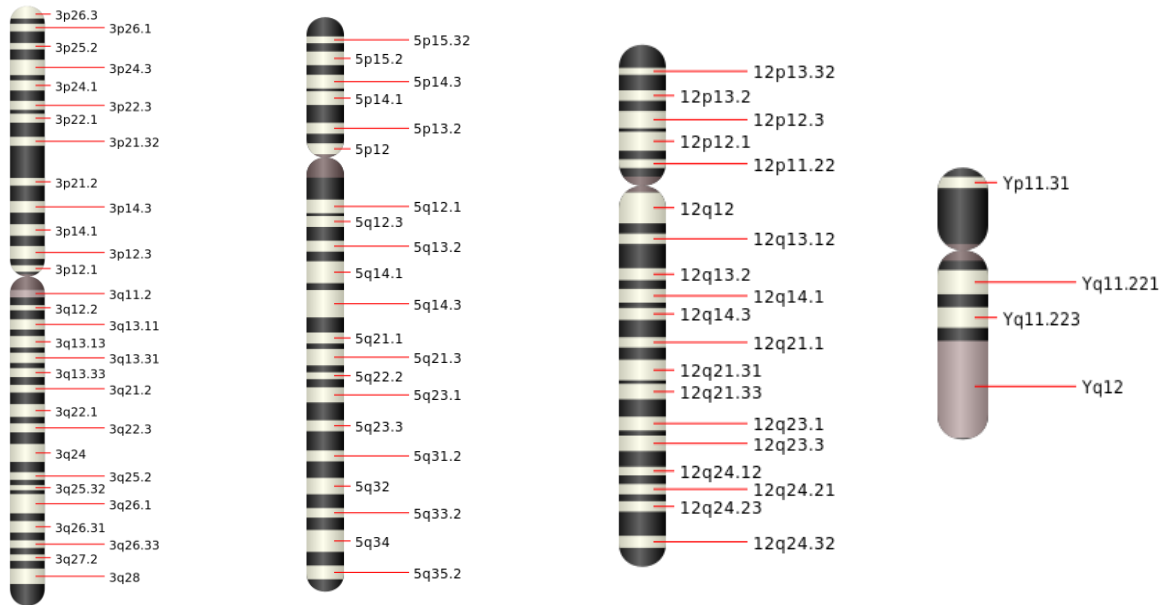


Рис. 1 А. Ідіограми 3, 5, 12 і Y-хромосом людини (із сайту: <http://ghr.nlm.nih.gov/chromosome=3> (National Library of Medicine);

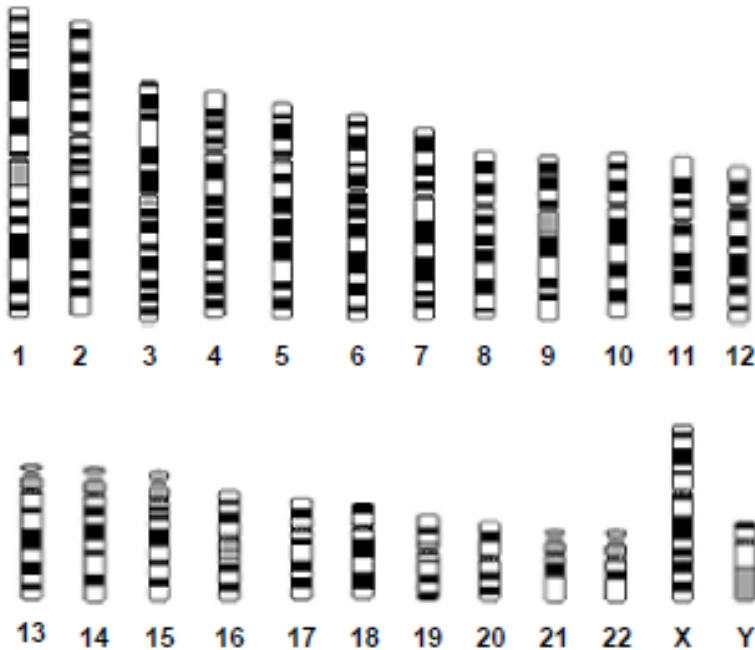


Рис. 2. Ідіограма хромосом людини (із сайту: <https://ramneetkaur.com/wp-content/uploads/2016/10/IdiotGram.gif>)

КАРІОТИПИ І КАРІОГРАМА ХРОМОСОМ ЛЮДИНИ

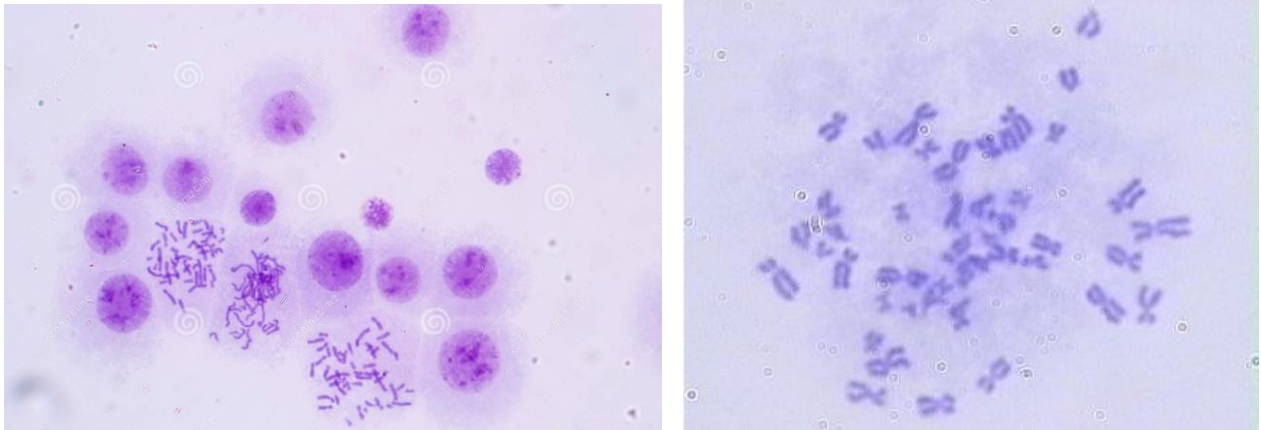


Рис. 1. Каріотиби людини: зліва – світлина каріотибу (із сайту <https://thumbs.dreamstime.com/z/chromosomes-human-under-microscope-education-lab-chromosomes-human-under-microscope-education-134111845.jpg>); справа – світлина метафазної пластинки хромосом у мітозі (із сайту

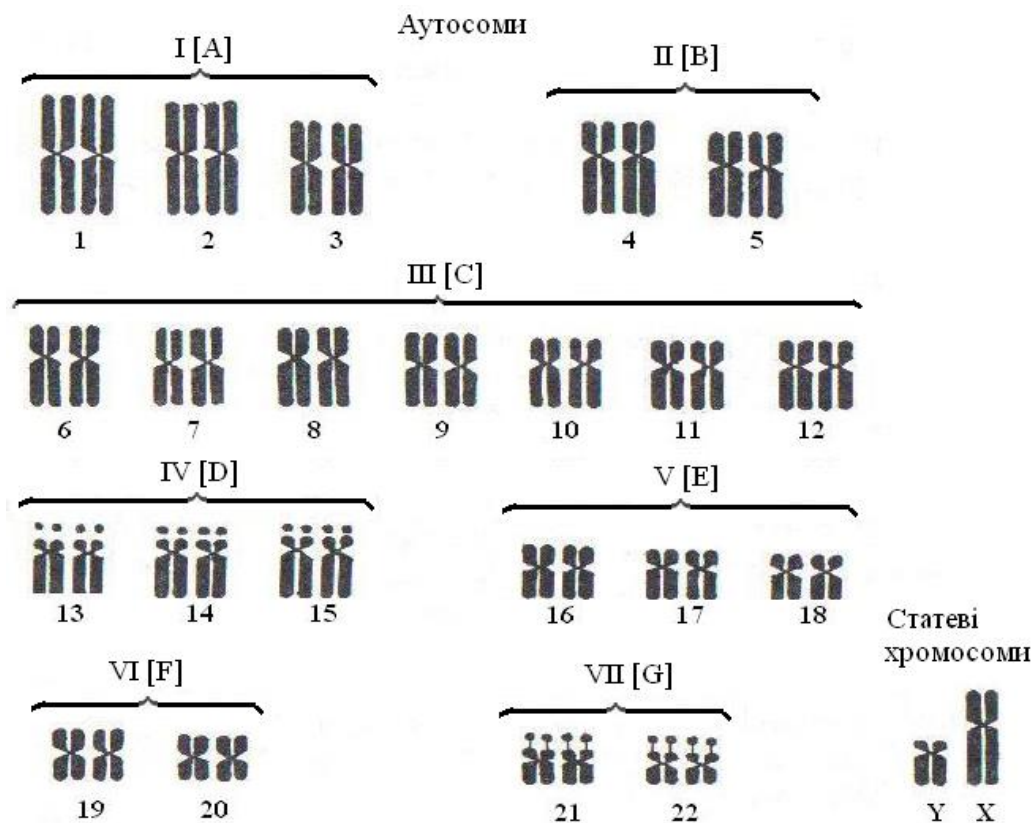


Рис. 2. Каріограма хромосом чоловіка (із сайту: https://studfile.net/html/2706/444/html_gBCprRTV9g.ZI9j/htmlconvd-mEuMy6_html_15dcf050cf7e3c59.png)

СТАТЕВИЙ ХРОМАТИН (ТІЛЬЦЯ БАРРА)

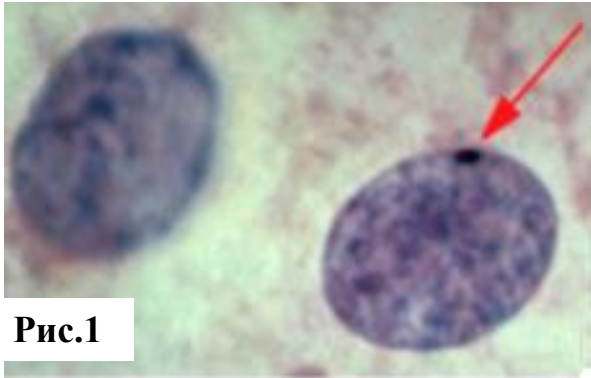


Рис.1

The Barr body is the condensed, inactive member of a pair of X chromosomes in the cell. The other X is not condensed and is active in transcription.

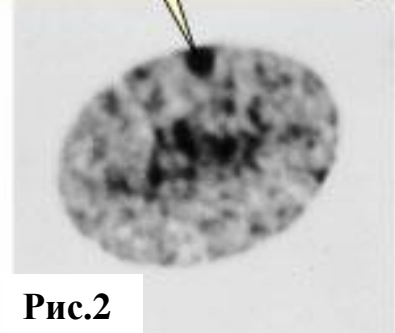


Рис.2

Рис. 1-2. Клітини букального епітелію із тільцем Барра (світлина із сайту: http://vlabs.iitb.ac.in/vlabs-dev/labs/zoology_lab/labs/exp1/result.php; <https://www.tekportal.net/barr-body/>)

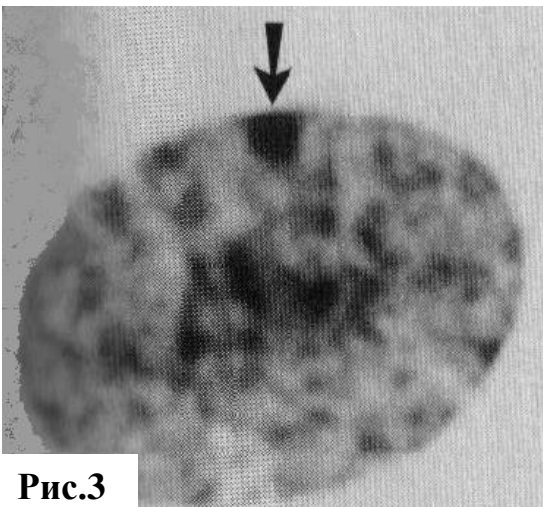


Рис.3

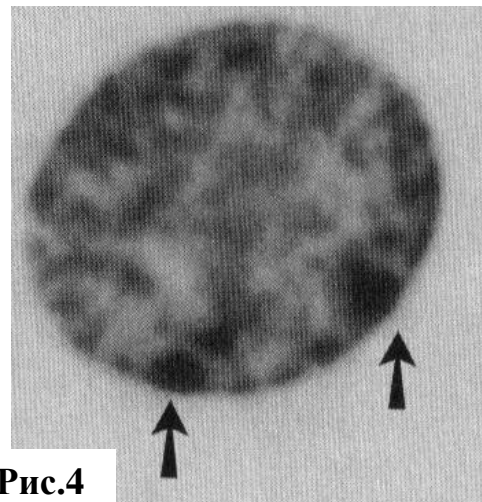


Рис.4

Рис. 3. Статевий хроматин (тільце Бара) у клітинах жінки з нормальним каріотипом: 46,XX

Рис. 4. Статевий хроматин у клітинах жінки з каріотипом: 47,XXX (синдром трисомії-X).

РЕЦЕПТИ ДЕЯКИХ СЕРЕДОВИЩ І БАРВНИКІВ

Середовище для культивування дрозофіли: до 0,75 л води внести 25 г цукру (3 ст. ложки), 0,25 г дріжджів, 0,5 г агару. Отриману суміш кип'ятити 45 хв, після чого додати 50 г манки і варити 15 хв. До середовища бажано додати 0,25 г бананів чи сухофруктів (сухофрукти перед внесенням манки вибирають). Отримане середовище розливають у чисті стерильні пробірки (10x2 см) із розрахунку $\frac{1}{4}$ об'єму і закривають стерильними ватними чи поліуретановими корками. На поверхню середовища після остигання наносять 3-5 гранул сухих дріжджів.

Задля уникнення грибкової контамінації в культуральне середовище для дрозофіли вносять антигрибкові агенти (ніпагін, пропіонова кислота). У випадку інфікованості лінії дрозофіли бактерійною інфекцією у поживне середовище вносять 0,5% пеніцилін G або 0,1% тетрациклін.

У випадку виявлення кліщової інфекції, інфіковану культуру мух негайно потрібно видалити з лабораторії та простерилізувати посуд.

Для культивування дрозофіл спеціалізованими фірмами (зокрема, www.carolina.com) продаються готові середовища, які не потребують спеціального приготування та стерилізації. Готове середовище може бути кремового або блакитного кольору, що полегшує візуалізацію личинок дрозофіли.

Пробірки (ємності) з лініями (культурами) дрозофіли, потрібно зберігати у чистоті та інкубувати у термостаті чи приміщенні при температурі +20 – 25°C за відсутності впливу прямих сонячних променів. При підвищеній температурі цикл розвитку дрозофіли скорочується, а за температури понад 31°C (особливо за недостатньої вологості) може розвинути стерильність самців, бактеріальна та грибкова контамінація та зараження кліщами. Зниження температури веде до подовження тривалості життєвого циклу дрозофіл.

У роботі з дрозофілою важливим є і підтримання робочих місць у належній чистоті. Регулярне протирання робочих поверхонь 70% етанолом є достатньо надійним захистом від зараження культури дрозофіли, особливо кліщами.

Середовище (повноціне) для культивування *S. cerevisiae*. Компоненти повноцінного середовища розчиняють у дистильованій воді у визначених кількостях, (г/л): 5 г дріжджового екстракту, 10 г пептону, 20 г глюкози, 20 г агару. Середовище стерилізують при 0,5 атм. 40 хв. Після остигання до 1 л середовища вносять (стерильно) 1 мл 10 % розчину ампіциліну.

Середовище (мінімальне) для культивування *S. cerevisiae*. Компонентами мінімального середовища є мінеральні солі, які розчиняють у дистильованій воді у визначених кількостях, (г/л): 1 г KH_2PO_4 , 3,5 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 г CaCl_2 . Розчин CaCl_2 готують окремо і вносять у кінці до готового середовища. У разі необхідності вносять агар у кількості 20 г/л. Середовище стерилізують при 0,5 атм. 40 хв.

Приготування матеріалу для вивчення каріотипу цибулі. Невелику цибулину помістити у ємність, яка містить вату змочену водою. Через кілька днів після появи перших корінців, їх відокремлюють та поміщають у 75 % розчин етанолу. У такому вигляді матеріал можна зберігати у холодильнику при $+5\text{ }^\circ\text{C}$ упродовж року.

Виділення слинних залоз із личинок *D. melanogaster*. Для виділення слинних залоз найкращим матеріалом є личинки дрозофіли, вирощені при температурі $17\text{ }^\circ\text{C}$, які перебувають на стінках культуральної пробірки за умови ще не потемніння їхніх хітинових покривів (стадія 0 годинної передлялечки). Вони мають найбільший ступінь політенії хромосом. Виділення слинних залоз проводять під стереомікроскопом. Личинку розміщують на предметному скельці з лункою, де є крапля фізрозчину. За допомогою препарувальної голки личинку фіксують всередині тіла, а другою голкою головний відділ личинки притискають до скла та повільно висмикують його. Далі залози обережно відокремлюють від глотки та жирової тканини препарувальною голкою, слідкуючи, щоб крапля фізіологічного розчину не пересихала. Якщо слинна залоза є однорідною за будовою з чіткими клітинами з великими ядрами, то її можна використовувати для приготування препарату політенних хромосом [3].

Підготовка предметних і покривних скелець. Предметні і покривні скла вважаються чистими, коли крапля води вільно розтікається по їхній поверхні. Нові скла, як правило, кип'ятять в 1 %

розчині соди, далі промивають дистильованою водою, слабим розчином соляної кислоти і знову дистильованою водою. Скла, які були у використанні, кип'яють у мильній воді, а потім не менше доби витримують у розчині хромової суміші. Від калій біхромату скла відмивають дистильованою водою. Чисті скла зберігають у 96%-ному етанолі.

Приготування 1% розчину ацетоорсеїну. 1 г орсеїну розчиняють у 45 мл льодяної оцтової кислоти, розчин доводять до кипіння, охолоджують і фільтрують. До отриманого розчину додають 55 частин дистильованої води і знову нагрівають до кипіння. Перед використанням фільтрують. Зберігають при кімнатній температурі (у витяжній шафі) у посудині з темного скла.

Приготування фіксуючого розчину Карнуа: змішують у рівних об'ємних пропорціях (1:1) льодяну оцтову кислоту і 98 % етанол.

Навчальне видання

Галина Клепач

ГЕНЕТИКА З ОСНОВАМИ СЕЛЕКЦІЇ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

до проведення лабораторних робіт
для здобувачів бакалаврського та магістерського рівнів вищої освіти
біологічних спеціальностей

Редакційно-видавничий відділ
Дрогобицького державного педагогічного
університету імені Івана Франка

Головний редактор
Ірина Невмержицька

Технічний редактор
Кізима Наталія

Здано до набору 20. 05. 2022 р. Підписано до друку 23. 05. 2022 р. Формат 60x84/16. Папір офсетний. Гарнітура. Times. Наклад 50 прим. Ум. друк. арк. 4,25. Зам.28.

Редакційно-видавничий відділ Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка. (Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до державного реєстру видавців, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції ДК № 5140 від 01.07.2016 р.). 82100, Дрогобич, вул. І. Франка, 24. к. 42.