

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ПСИХОГЕНЕТИКА

Методические указания к лабораторным и
семинарским занятиям

для студентов-бакалавров биологического факультета,
обучающихся по направлению «Биология», профиль «Генетика»

Уфа
РИЦ БашГУ
2011

Составители: к.б.н., асс. БашГУ А.Х. Нургалиева;
д.б.н., проф. БашГУ И.М. Хидиятова
к.б.н, доц. БашГУ Р.И. Хусаинова
д.б.н., проф. БашГУ Э.К. Хуснутдинова

Методические указания предназначены для студентов-бакалавров дневного и заочного отделений биологического факультета, обучающихся по направлению «Биология», профиль «Генетика». Цель методических указаний – ознакомление с программой спецкурса «Психогенетика», содержанием семинарских и лабораторных занятий. Приведены вопросы к семинарским занятиям, а также вопросы для самостоятельной работы студентов. Даны методики выполнения лабораторных работ и научных исследований.

ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ «ПСИХОГЕНЕТИКА»

Направление подготовки – биология

Профиль подготовки – генетика

Квалификация (степень) выпускника - бакалавр

Цели освоения дисциплины

Целью освоения дисциплины «психогенетика» является изучение роли наследственности и среды в формировании психологических и психофизиологических свойств человека.

Задачи изучения дисциплины:

- усвоение основных положений генетики количественных признаков;
- понимание того, что любой фенотипический признак есть результат взаимодействия генотипа и среды;
- понимание того, что данные психогенетики носят популяционный характер;
- понимание того, что в полном согласии с законами генетики (и, в частности генетики развития), даже высокая доля генетических факторов в популяционной изменчивости не означает неизменности (или неизменяемости) признака;
- четкое осознание того факта, что интерпретация результатов, получаемых в психогенетических исследованиях, прямо зависит от валидности используемых психодиагностических методик, а большая или меньшая статистическая надежность последних может отразиться на количественных оценках генетической и средовой изменчивости признака.

Место дисциплины в структуре ООП бакалавриата

Цикл Б.3, вариативная (профильная) часть. Психогенетика - область знаний, пограничная между психологией и генетикой, предметом исследования в которой является соотношение и взаимодействие наследственности и среды в формировании межиндивидуальной вариативности психических черт человека. Перед изучением курса студент должен освоить следующие дисциплины: антропология, общая психология, статистические методы в биологии, анатомия ЦНС, физиология ЦНС, физиология ВНД и сенсорных систем, генетика, медицинская генетика, методы

молекулярно-генетического анализа. У студента должна быть сформирована общекультурная компетенция: «использует в познавательной и профессиональной деятельности базовые знания в области математики и естественных наук, применяет методы математического анализа и моделирования, теоретического и экспериментального исследования» (ОК-6).

Освоение основ психогенетика необходимо при изучении таких дисциплин, как биологическая и медицинская этика, медико-генетическое консультирование, цитогенетика.

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения дисциплины психигенетика: ОК-1, ОК-16, ПК-5, ПК-6, ПК-8, ПК-15

В результате освоения дисциплины обучающийся должен:

Знать:

- основные понятия и закономерности классической и молекулярной генетики;
- основные методы медицинской генетики и психогенетики человека;
- современные методы психогенетики, границы их использования;
- основные достижения современной генетики как науки о наследственности и наследственной изменчивости, истории и основных разделах психогенетики;
- молекулярно-генетические основы некоторых психологических характеристик.

Уметь:

- ориентироваться в широком диапазоне взглядов на проблему генетической детерминации поведения и психики человека и иметь собственное мнение по этому вопросу;
- использовать основные методы психогенетики (генеалогический, цитогенетический, близнецовый, электрофизиологические, биохимические, математические) в практической деятельности;
- анализировать данные литературы по психогенетике;
- применять психогенетические знания в профессиональной практике и в жизни;
- интерпретировать результаты исследований.

Владеть:

- основными методами психогенетических исследований

Структура и содержание дисциплины психогенетика

Общая трудоемкость дисциплины составляет 2 зачетные единицы
72 часа.

№ п/п	Раздел Дисциплины	Семестр	Виды учебной работы, включая самостоятельную работу студентов и трудоемкость (в часах)				Формы текущего контроля успеваемости и (по неделям семестра) Форма промежуточ ной аттестации (по семестрам)
			Лекции	Практические и лабораторные занятия	Сам. работа с преподавателем	Инд.сам. работа	
1	Общие вопросы психоген етики	6	6	4	8	12	Устный опрос, коллоквиум (27 неделя)
2	Психогенетика интеллекта, темперамента, личности, сенсорных способностей, аномального поведения. Генетика психических	6	8	18	6	6	Устный опрос, тестирование, коллоквиум (34 неделя)
3	Промежуточ ная аттестация	6					Зачет (41 неделя)
4	Всего часов		14	22	14	18	

Содержание дисциплины

Модуль 1. Общие вопросы психогенетики

Психогенетика как область науки. История психогенетики.

Психогенетика - наука на стыке психологии и генетики. Психогенетика как часть психологии. Предмет психогенетики. Психогенетика как часть генетики. Психогенетика и генетика поведения. Понятие поведения в психологии и психогенетике. Понятия наследственности и изменчивости. Наследственность и среда как основные источники межиндивидуальной вариативности. Проблема изучения индивидуальности. Зарождение психогенетики как части генетики. Ф. Гальтон - основоположник психогенетики и биометрической генетики. "Наследственный гений" Ф. Гальтона - первый научный труд по психогенетике. Психогенетика и общество. Ф. Гальтон и евгеническое движение. Позитивная и негативная евгеника. Критика крайних позиций. Общественная полемика по проблеме наследуемости интеллекта в связи с расовой политикой. Интерпретация межгрупповых различий. Психогенетика в проекте "Геном человека". Психогенетика и генетика поведения животных. Основные подходы к изучению генетики поведения животных. Основные этапы становления и развития психогенетики. Особенности развития психогенетики в России.

Элементарные основы общей генетики.

Видоспецифические и индивидуально-специфические особенности. Понятие признака. Понятие популяции в биологии и генетике. Популяция со случайным скрещиванием. Панмиксия. Нарушение панмиксии. Ассортативность. Процессы, идущие в популяциях. Особенности человеческих популяций. Виды человеческих популяций. Изменчивость в популяциях. Различные виды изменчивости. Классификация признаков в зависимости от характера изменчивости. Качественные признаки, их отличительные черты. Примеры качественных признаков человека. Качественные признаки человека, связанные с поведением. Количественные признаки, их отличительные черты. Примеры количественных признаков человека. Графическое изображение частоты встречаемости качественных и количественных признаков. Признаки с пороговым эффектом как разновидность количественных признаков. Примеры различных видов признаков.

Континуальный характер психологических признаков человека. Этапы исследования Г. Менделя. Дискретный характер наследственности. Законы Менделя. Моногибридное скрещивание и открытие закона расщепления (1-й закон Менделя). Дигибридное скрещивание и открытие закона независимого распределения (2-й закон Менделя). Количественные соотношения признаков в потомстве при моно- и дигибридном скрещивании. Решетка Пеннета для изображения процессов расщепления и независимого распределения признаков. Основные выводы Г. Менделя. Хромосомная теория наследственности. Два типа клеточного деления. Хромосомы человека. Понятие кариотипа. Рекомбинация хромосом в процессе образования половых клеток. Сцепление и кроссинговер. Генетическая уникальность индивида. Молекулярные основы наследственности. ДНК и ее строение. Основная функция гена. Генетический код. Понятия локуса и аллеля. Множественные аллели. Гомозиготность и гетерозиготность. Гены в хромосомах. Мутации. Хромосомные anomalies. Гены в популяциях. Закон Харди-Вайнберга.

Методы психогенетики.

Генеалогический метод. Метод приемных детей. Метод близнецов. История формирования метода. Разновидности метода близнецов. Молекулярно-генетические методы. Сопоставление результатов, полученных разными методами. Моделирование на животных. Количественные методы в психогенетике. Построение моделей. Выбор адекватной модели. Генетический анализ ковариационных структур. Структурное моделирование.

Генотип – средовые взаимодействия. Типы генотип-средовых корреляций.

Общая и индивидуальная среда. Ген-средовые эффекты: - генотип-средовые корреляции (ГС-корреляции), генотип-средовые взаимодействия (ГС-взаимодействия), ассортативность.

Генетическая психофизиология.

Генетика мозга: методические подходы и уровни анализа. Природа межиндивидуальной вариативности биоэлектрической активности мозга: электроэнцефалограмма, вызванные потенциалы. Генотип-средовые отношения в изменчивости показаний вегетативных реакций. Роль наследственности и среды в формировании функциональной асимметрии

Возрастные аспекты психогенетики.

Генотип-средовые соотношения в индивидуальном развитии.

Возрастные аспекты генетической психофизиологии.

Психогенетические исследования психического дизонтогенеза.

Модуль 2. Психогенетика интеллекта, темперамента, личности, сенсорных способностей, аномального поведения. Генетика психических расстройств

Генотип-средовые соотношения в вариативности когнитивных функций.

Психогенетические исследования интеллекта. Воздействия среды и коэффициент интеллекта. Психогенетика одаренности. Эмергенез. Импрессинг. Когнитивные способности, когнитивные стили, креативность. Нарушение способности к обучению.

Генетика психических расстройств. Хромосомные аберрации и поведение человека.

Олигофрения. Аутизм. Болезнь Альцгеймера. Маниакально-депрессивные психозы. Шизофрения.

Психогенетика сенсорных способностей и двигательных функций.

Психогенетические исследования сенсорного восприятия. Вкусовая чувствительность и ее наследование. Наследственность и среда в слуховой и зрительной чувствительности, зрительном восприятии. Психогенетические исследования морфологии и физиологии мозга. Исследования электроэнцефалограммы и вызванных потенциалов в психогенетике. Основные результаты. Асимметрия и наследственность. Основные результаты психогенетических исследований движений.

Психогенетика темперамента и личности.

Понятие о темпераменте. Основные признаки темперамента. Психогенетические исследования черт темперамента: основные результаты. Неаддитивный характер наследуемости.

Психогенетика и факторно-аналитический подход к изучению личности. Факторы "Большой пятерки". Психогенетические исследования экстраверсии-интроверсии и невротизма. Психогенетические исследования черт личности: основные подходы и результаты. Средние коэффициенты наследуемости, роль общей и различающейся среды. Поиск конкретных генов личностных черт.

Психогенетика аномального и девиантного поведения.

Преступность. Алкоголизм. Наркомания. Суицидальное поведение.
Другие вредные привычки. Гомосексуальность.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

а) основная литература:

1. Александров А.А. Психогенетика.- СПб.: Питер, 2009.
2. Равич-Щербо И. В., Марютина Т. М., Григоренко Е. Л. Психогенетика. - М.: Аспект-Пресс, 1999.
3. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: В 3 т. — М: Мир, 1990.
4. Анохин А. П. Генетика, мозг и психика человека: тенденции и перспективы исследований. — М., 1988.
5. Малых С. Б., Егорова М. С, Мешкова Т. А. Основы психогенетики. — М., 1998

б) дополнительная литература:

1. Айзенк Г. Интеллект – новый взгляд // Вопросы психологии. 1995. №1.С. 111-113.
2. Алфимова М.В., Трубников В.И. Психогенетика агрессивности. // Вопросы психологии. 2000. №6.С. 112-122.
3. Алфимова М.В., Трубников В.И. Генные основы темперамента и личности // Вопросы психологии. 2000. №2.С. 128-137.
4. Валиев Р.Р., Валиев Р.Р. Основы полимеразной цепной реакции и методики ее проведения: Методические указания к лабораторным занятиям по генетике и биохимии.- Уфа, РИО БашГУ, 2010.
5. Гайсина Д.А. Анализ ассоциации генов нейромедиаторных систем с агрессивным поведением человека: автореф. дис. канд. биол. наук.- Уфа, 2004

6. Зайнеллина А.Г. Изучение ассоциаций полиморфных ДНК-локусов с параноидной шизофренией: автореф. дис. канд. мед. наук.- Уфа, 2002
 7. Казанцева А.В. Молекулярно-генетические основы черт темперамента и личности: автореф. дис. канд. биол. наук.- Уфа, 2008
 8. Левонтин Р. Человеческая индивидуальность: Наследственность и среда. М.,1993.
 9. Носкова Т.Г. Молекулярно-генетическое изучение предрасположенности к униполярной депрессии в Республике Башкортостан: автореф. дис. канд. биол. наук.- Уфа, 2010
 10. Фасхутдинова Г.Г. Молекулярно-генетическое изучение зависимости от психоактивных веществ: автореф. дис. канд. биол. наук.- Уфа, 2010
- в) программное обеспечение и интернет ресурсы:
1. <http://imp.rudn.ru/psychology/psychogenetic/index.html>
 2. www.ncbi.nih.gov

ПЛАН СЕМИНАРСКИХ ЗАНЯТИЙ

Семинар №1

Методы психогенетики:

1. Генеалогический метод. Задание: Составьте родословную любой семьи по какому-либо психологическому признаку.
2. Метод приемных детей.
3. Метод близнецов.
4. Молекулярно-генетические методы.
5. Моделирование на животных.
6. Количественные методы в психогенетике.

Семинар №2

Генетика психических расстройств:

1. Олигофрения.
2. Аутизм.
3. Болезнь Альцгеймера.
4. Маниакально-депрессивные психозы.
5. Шизофрения.

Семинар №3

Психогенетика темперамента и личности.

1. Понятие о темпераменте. Основные признаки темперамента.
2. Психогенетические исследования черт темперамента: основные результаты. Неаддитивный характер наследуемости.
3. Психогенетика и факторно-аналитический подход к изучению личности. Факторы "Большой пятерки".
4. Психогенетические исследования экстраверсии-интроверсии и невротизма.
5. Психогенетические исследования черт личности: основные подходы и результаты.
6. Средние коэффициенты наследуемости, роль общей и различающейся среды.
7. Поиск конкретных генов личностных черт.

Коллоквиум №1. Общие вопросы психогенетики (Рубежный контроль)

1. Психогенетика как область науки
2. История психогенетики.
3. Особенности развития психогенетики в России.
4. Видоспецифические и индивидуально-специфические особенности.
5. Количественные признаки, их отличительные черты.
6. Генеалогический метод.

7. Метод приемных детей.
8. Метод близнецов.
9. Молекулярно-генетические методы.
10. Сопоставление результатов, полученных разными методами.
11. Моделирование на животных.
12. Количественные методы в психогенетике.
13. Генотип – средовые взаимодействия.
14. Типы генотип-средовых корреляций.
15. Генетика мозга: методические подходы и уровни анализа.
16. Генотип-средовые отношения в изменчивости показателей вегетативных реакций.
17. Роль наследственности и среды в формировании функциональной асимметрии
18. Генотип-средовые соотношения в индивидуальном развитии.
19. Психогенетические исследования психического дизонтогенеза.

Коллоквиум №2. Психогенетика интеллекта, темперамента, личности, сенсорных способностей, аномального поведения.

Генетика психических расстройств (Рубежный контроль)

1. Психогенетические исследования интеллекта.
2. Психогенетика одаренности. Эмергенез. Импрессинг.
3. Когнитивные способности, когнитивные стили, креативность.
4. Нарушение способности к обучению.
5. Психогенетика Олигофрении.
6. Психогенетика Аутизма.
7. Психогенетика болезни Альцгеймера.
8. Психогенетика Маниакально-депрессивных психозов.
9. Психогенетика Шизофрении.
10. Психогенетические исследования сенсорного восприятия.
11. Вкусовая чувствительность и ее наследование.
12. Наследственность и среда в слуховой и зрительной чувствительности, зрительном восприятии.

13. Психогенетические исследования морфологии и физиологии мозга.
14. Психогенетика темперамента и личности.
15. Поиск конкретных генов личностных черт.
16. Психогенетики преступности и алкоголизма
17. Психогенетика суицидального поведения

ПЛАН ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ

Лабораторная работа №1

Методы молекулярно-генетических исследований, применяемые в психогенетике

Лабораторная работа №2

Молекулярно-генетические основы агрессивного поведения человека

Лабораторная работа №3

Молекулярно-генетические основы депрессивных расстройств

Лабораторная работа №4

Молекулярно-генетические основы черт темперамента и личности

Лабораторная работа №5

Молекулярно-генетические основы зависимости от психоактивных веществ

Лабораторная работа №6

Молекулярно-генетические основы параноидной шизофрении

Результаты лабораторных исследований отражаются в лабораторном журнале

Методические рекомендации к проведению лабораторных занятий

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1 Методы молекулярно-генетических исследований, применяемые в психогенетике

Задание №1

Выделить геномную ДНК из 2х пробирок с кровью человека. Кровь должна быть набрана в пробирки с консервантом, в качестве которого используется глюгицир или ЭДТА, в соотношении с кровью 1:4.

Выделение ДНК

ДНК может быть изолирована из любого типа тканей и клеток, содержащих ядра. Этапы выделения ДНК включают быстрый лизис клеток, удаление с помощью центрифугирования фрагментов клеточных органелл и мембран, ферментативное разрушение белков и их экстрагирование из раствора с помощью фенола и хлороформа, концентрирование молекул ДНК путем преципитации в этаноле. Из 1 г сырой ткани или из 10⁹ клеток обычно получают 2 мг ДНК.

Оценку качества экстрагированной ДНК проводят на основании измерения оптической плотности раствора ДНК в области белкового и нуклеинового спектров поглощения. В чистых образцах ДНК соотношение $A(260)/A(280) > 1,8$; где $A(260)$ и $A(280)$ - оптическая плотность раствора при длине волны 260 и 280 нм, соответственно. В противном случае процедуру очистки необходимо повторять, так как для успешного использования и хранения ДНК белки должны быть полностью удалены.

ДНК хранится при температуре -20⁰С.

Методика выделения ДНК

ДНК выделяют из периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [Mathew С.С., 1984]. Для выделения ДНК к 5 мл крови добавить 30 мл лизирующего буфера (320мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5мМ MgCl₂, 10мМ трис-НСl, рН 7,6) и центрифугировать при 4⁰С и 4000 об./мин. в

течение 20 минут. Надосадочную жидкость слить, к осадку добавить 20 мл лизирующего буфера и центрифугировать при тех же условиях в течение 10 минут. К полученному осадку добавить 800 мкл буфера Soline ЭДТА (25 мМ ЭДТА, pH 8,0, 75 мМ NaCl). Затем ресуспензировать полученный раствор и перенести его в двухмиллилитровые стерильные пластиковые пробирки, добавить 80 мкл 10% SDS, 20 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубировать при 37⁰С в течение 16 часов. Экстракцию ДНК проводят в три этапа: раствором забуференного фенола (200 мкл меркаптоэтанола на 50 мл фенола – Трис-НСI, pH 7,8), смесью фенола – хлороформа (1:1) и хлороформом (2 мл изоамилового спирта на 48 мл хлороформа) в равных объемах (1000 мкл) с плавным перемешиванием на ротаторе в течение 10 мин., центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 минут и отбором водной фазы после каждого этапа. ДНК осаждали из раствора в стеклянных плоскодонных конических колбах объемом 50 мл 96% раствором охлажденного этанола в соотношении 1:3. Сформированную ДНК промыть 70% раствором этилового спирта, подсушить на воздухе, растворить в деионизированной воде и хранить при -20⁰С. Выделенную ДНК использовать для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Задание №2

Ознакомится с основами полимеразной цепной реакции синтеза ДНК, с методикой ее проведения, с основами работы с амплификатором.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) синтеза ДНК

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе). Полимеразная цепная реакция является эффективным методом, который за короткое время стал одним из самых широко распространенных в молекулярной биологии, поскольку он быстрый, недорогой и простой. Этот метод позволяет амплифицировать специфические фрагменты ДНК из

незначительных количеств материала, содержащего ДНК, даже тогда, когда этот источник ДНК имеет низкое качество.

Помимо амплификации (увеличения числа копий) ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, выделения новых генов. Содержание [показать]

Проведение ПЦР

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах, (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований (3 kbp). С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20-40 тысяч пар нуклеотидов.

Компоненты реакции

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.

Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.

Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза),

Pyrococcus furiosus (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.

Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

Ионы Mg²⁺, необходимые для работы полимеразы.

Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют *высококипящее масло*, например, вазелиновое. Если используется амплификатор с подогреваемой крышкой, этого делать не требуется.

Добавление пирофосфатазы может увеличить выход ПЦР-реакции. Этот фермент катализирует гидролиз пирофосфата, побочного продукта присоединения нуклеотидтрифосфатов к растущей цепи ДНК, до ортофосфата. Пирофосфат может ингибировать ПЦР-реакцию.

Праймеры

Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами, короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18—30 оснований. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка.

После гибридизации матрицы с праймером (отжиг), последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы.

Важнейшая характеристика праймеров — температура плавления (T_m) комплекса праймер-матрица. T_m это температура, при которой половина ДНК-матриц образует комплекс с олигонуклеотидным праймером. Температуру плавления можно приблизительно определить по формуле , где nX — количество нуклеотидов X в праймере. В случае неверного выбора длины и нуклеотидного состава праймера или температуры отжига возможно образование частично комплементарных комплексов с другими участками матричной ДНК, что может привести к появлению неспецифических продуктов. Верхний предел температуры плавления ограничен оптимумом температуры

действия полимеразы, активность которой падает при температурах выше 80 °С.

При выборе праймеров желательно придерживаться следующих критериев:

GC-состав ~ 40—60 %;

близкие T_m праймеров (отличия не более, чем на 5 °С);

отсутствие неспецифических вторичных структур — шпилек и димеров;

желательно, чтобы на 3'-конце был гуанин или цитозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной.

Амплификатор

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1 °С. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта» и последующего хранения амплифицированных молекул при 4 °С. Для ПЦР в реальном времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшет, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

Ход реакции

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20—35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий .

Денатурация

Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96°С (или до 98 °С, если используется особенно термостабильная полимеразы) на 0,5—2 мин., чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется денатурацией, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Иногда перед первым циклом (до добавления полимеразы) проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение 2—5 мин. для полной денатурации матрицы и праймеров. Такой приём называется горячим стартом, он позволяет снизить количество неспецифичных продуктов реакции.

Отжиг

Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется отжигом. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 4—5°C ниже их температуры плавления. Время стадии — 0,5—2 мин. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).

Элонгация

ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это — стадия элонгации. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72 °C. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7-10 мин.

Количество специфического продукта реакции (ограниченного праймерами) теоретически возрастает пропорционально 2^n , где n — число циклов реакции. На самом деле эффективность каждого цикла может быть меньше 100 %, поэтому в действительности $P \sim (1+E)^n$, где P — количество продукта, E — средняя эффективность цикла.

Число «длинных» копий ДНК тоже растёт, но линейно, поэтому в продуктах реакции доминирует специфический фрагмент.

Рост требуемого продукта в геометрической прогрессии ограничен количеством реагентов, присутствием ингибиторов, образованием побочных продуктов. На последних циклах реакции рост замедляется, это называют «эффектом плато».

Разновидности ПЦР

ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR(англ.)) — используется для амплификации, выделения или

идентификации известной последовательности из библиотеки РНК. Перед обычной ПЦР проводят на матрице мРНК синтез одноцепочечной молекулы ДНК с помощью ревертазы и получают одноцепочечную кДНК, которая используется в качестве матрицы для ПЦР. Этим методом часто определяют, где и когда экспрессируются данные гены.

Количественная ПЦР (Quantitative PCR, Q-PCR(англ.)) — используется для быстрого измерения количества определенной ДНК, кДНК или РНК в пробе.

Количественная ПЦР в реальном времени (Quantitative real-time PCR) — в этом методе используют флуоресцентно меченые реагенты для точного измерения количества продукта реакции по мере его накопления.

Методика проведения ПЦР

Аmplification изучаемых локусов проводят с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК на амплификаторе.

Для амплификации используют реакцию смесь объемом 25 мкл, которая содержит 2,5 мкл 10xTaq-буфера (67 мМ трис-НСl (рН 8,8), 16,6 мМ (NH₄)₂ SO₄, 2,5мМ MgCl₂, 0,01% Tween-20), 0,1 мкг геномной ДНК, смесь dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP по 200 мкМ каждого), 1 ед. ДНК-полимеразы *Terminus aquaticus* и 5-10 пМ локуспецифичных олигонуклеотидных праймеров. Режим амплификации: предварительная денатурация (94⁰С, 4 мин.), 27-30 циклов амплификации: денатурация – 94⁰С, 45 сек.; отжиг – t⁰С, 45 сек.; синтез – 72⁰С, 45 сек., завершающий синтез (72⁰С, 7-10 мин.). Конкретные показатели температуры отжига для каждого из исследованных локусов подбираются индивидуально.

Задание №3

Ознакомится с основами рестрикционного анализа, методикой его проведения

Рестрикционный анализ

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ, Restriction fragment length polymorphism, RFLP) — это способ

секвенирования геномной ДНК, путем разрезания ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов (рестриктов) путем гель-электрофореза (ДНК электрофореза).

При использовании данного способа секвенирования получаются различные результаты от различных образцов, и при помощи ПДРФ можно идентифицировать некоторые различия в последовательности нуклеотидов ДНК, в случае, когда они располагаются в сайте рестрикции. В виду того, что технологии секвенирования ДНК могут охарактеризовать ДНК очень точно, ПДРФ был разработан как первый и дешевый метод для массового применения. Анализ разнообразия ПДРФ является важным инструментом в картировании генома, локализации генов, ответственных за генетические заболевания, определения риска заболевания, получения генетических отпечатков (genetic fingerprinting) и определения родства.

Наличие сайтов рестрикции в геномной ДНК и их взаимное расположение однозначно определяются последовательностью нуклеотидов исследуемой ДНК, поскольку сам сайт рестрикции - не что иное, как строго определенная последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая и расщепляемая рестриктазами. Следовательно, любой полиморфный вариант, изменяющий последовательность нуклеотидов сайта рестрикции, уничтожает этот сайт. Полное расщепление анализируемой геномной ДНК отдельными рестриктазами приводит к образованию определенного набора фрагментов ДНК, число и размеры которых соответствуют расположению сайтов рестрикции.

При отсутствии сайта узнавания в исследуемой области ДНК размеры амплифицированного фрагмента не изменятся после его обработки соответствующей эндонуклеазой, тогда как при полном соответствии полиморфной области сайту рестрикции образуются два фрагмента меньшей длины. У гетерозигот будут присутствовать 3 фрагмента, один из которых по длине будет соответствовать размеру амплификата до рестрикции, плюс 2 маленьких фрагмента с той же суммарной длиной.

Методика проведения ПДРФ-анализа

Для определения нуклеотидных замен проводят гидролиз амплифицированных фрагментов соответствующей рестриктазой согласно рекомендациям фирм-производителей. В пробирку 0,5 мкл добавить 6 мкл амплификата, 2 мкл соответствующей рестриктазы, 1 мкл прилагаемого буферного раствора и 1 мкл деионизированной воды. Провести инкубацию при указанной в рекомендации температуре.

Задание №4.

Ознакомится с основами гель-электрофореза, методикой его проведения

Метод электрофореза

это аналитический метод, применяемый для разделения фрагментов ДНК по размеру (длине). Силы электрического поля, прикладываемого к образцам, заставляют фрагменты ДНК мигрировать через гель (ПААГ или агарозный). Сахарофосфатный остов молекул ДНК заряжен отрицательно и поэтому цепи ДНК двигаются от катода, заряженного отрицательно, к положительному аноду. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в геле, более короткие молекулы двигаются быстрее.

После разделения (иногда краситель вносят в расплавленную агарозу) фрагменты ДНК разной длины визуализируют при помощи флюоресцентных красителей, специфично взаимодействующих с ДНК, например, бромистым этидием, который интеркалирует между азотистыми основаниями дуплекса и флюоресцирует в УФ-лучах.

Определение размеров производят путем сравнения коммерчески доступных фрагментов ДНК (DNA ladder, "линейка"), содержащий линейные фрагменты ДНК известной длины.

Для ДНК электрофорезов обычно используют агарозные (для относительно длинных молекул ДНК) и полиакриламидные (для высокого разрешения коротких молекул ДНК) гели.

Методика проведения гель-электрофореза

Разделение фрагментов ДНК размером менее 600 п.о. после амплификации и рестрикции проводят при помощи электрофореза в 7% полиакриламидном геле (ПААГ) (исходное соотношение акриламида и метиленабисакриламида – 29:1). Электрофорез проводили в 1×ТБЕ буфере (0,089 М трис-НСl; 0,089 М борная кислота; 0,002 М ЭДТА, рН=8,0) при напряжении 300В. Перед нанесением на гель пробы смешивают в соотношении 5:1 с краской, содержащей 0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксиленицианола и 15% фикола. Разделение фрагментов размером более 500 п.о. проводят в 2% агарозном геле.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2

Молекулярно-генетические основы агрессивного поведения человека

При изучении предрасположенности к агрессивному поведению особое внимание уделяется гену **рецептора 1В серотонина**. Ген *HTR1B*, лишенный интронов, локализован на хромосоме 6q13 и содержит 2 общих полиморфных маркера: *C129T* и *G861C*, которые находятся в полном равновесном сцеплении. (Sidenberg D. et al, 1993; Lappalainen J. et al., 1995; Huang Y. et al., 2003). Ряд исследований, проведенных на трансгенных мышах, лишенных гена *HTR1B* и рецептора, подтверждает возможное вовлечение функциональных вариантов гена *HTR1B* в этиологию таких психопатологий человека, как суицид, агрессия, алкоголизм и наркомания (Saudou F. et al., 1994; Brunner D. et al., 1999).

Катехол-0-метилтрансфераза (COMT) – фермент, участвующий в биосинтезе и обмене дофамина, норадреналина, адреналина. У человека ген *COMT* расположен на хромосоме 22 в области q11.1-q11.2 (Grossman M. et al., 1992). В гене *COMT* в 158 кодоне обнаружена мутация по типу транзиции (*158A→G*, или *Val158Met*), что выражается в сниженной активности аллеля – *COMT*L* (от английского “low” - низкий). Обнаружена ассоциация

гена *COMT* с попытками самоубийства насильственными способами у мужчин (Nolan K. et al., 2000), с униполярной депрессией у пациентов из Японии (Ohara K. et al, 1998), с паническими расстройствами (Rotondo A. et al., 2002; Woo J., 2002), с агрессивным и антисоциальным поведением (Strous R. et al., 1997), с шизофренией (Зайнуллина А., 2002).

Цель лабораторной работы: Провести в группах лиц с агрессивным поведением и в контроле оценку частот генотипов и аллелей полиморфных маркеров генов:

- рецептора 1В серотонина (*G861C*),
- катехол-*0*-метилтрансферазы (*Val158Met*)

Задание №1

Провести амплификацию участков, содержащих соответствующие полиморфные варианты, в генах рецептора 1В серотонина (*HTR1B*) и катехол-*0*-метилтрансферазы (*COMT*), согласно приведенной выше методике (см. лабораторная работа №1). Температура отжига праймеров для полиморфного варианта *G861C* гена *HTR1B* составляет 58⁰С, для полиморфного варианта *Val158Met* гена *COMT* – 60⁰С.

Использовать 20 образцов ДНК лиц с агрессивным поведением и 20 образцов ДНК контрольной группы.

Задание №2

Провести рестрикцию полученных амплификатов согласно описанной выше методике (см. лабораторная работа №1).

- 1) Для детекции полиморфного варианта *G861C* гена *HTR1B* используют рестриктазу *HincII*. Инкубацию проводят при 37⁰С, в течение 12 часов.
- 2) Для детекции полиморфного варианта *Val158Met* гена *COMT* используют рестриктазу *Hsp92II*. Инкубацию проводят при 37⁰С, в течение 12 часов.

Задание №3

По окончании рестрикции провести электрофорез исследуемых образцов в полиакриламидном геле. Определить генотипы исследуемых образцов.

1) Полиморфный вариант *G861C* гена *HTR1B* (рис.1.)
Аллелю *G* соответствуют фрагменты ДНК размером 452 и 96 п.о.
Аллелю *C* соответствуют фрагменты ДНК размером 142, 310 и 96 п.о.

2) Полиморфный вариант *Val158Met* гена *COMT* (рис.2.)
Аллелю *Val* соответствуют фрагменты ДНК размером 114, 36 и 35 п.о.
Аллелю *Met* соответствуют фрагменты ДНК размером 96, 36, 35 и 18 п.о.

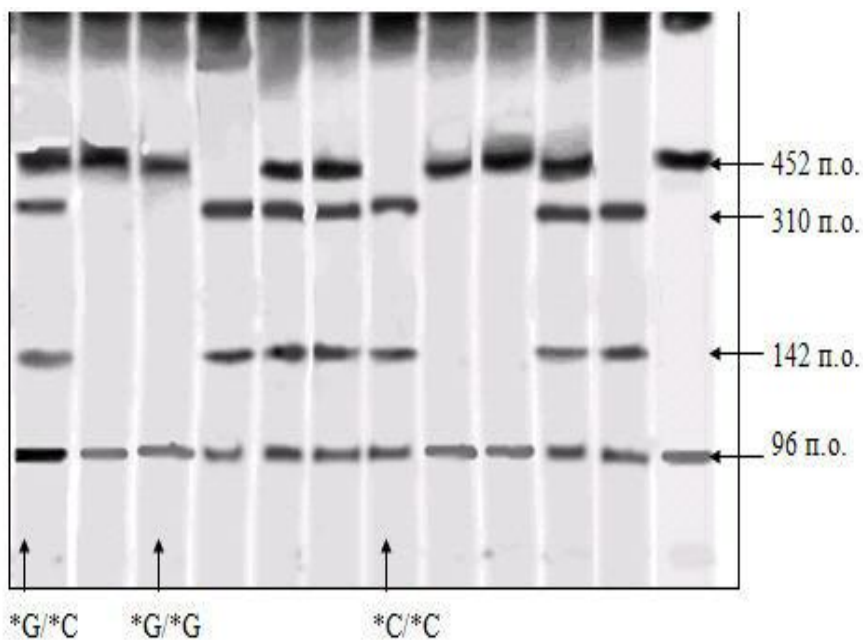


Рисунок 1. Электрофореграмма фрагментов ДНК полиморфного маркера *G861C* гена *HTR1B*

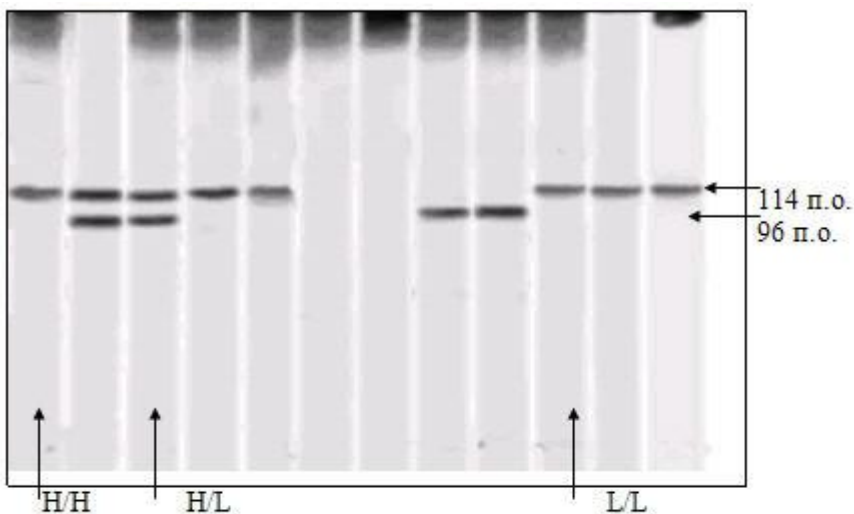


Рисунок 2. Электрофореграмма фрагментов ДНК полиморфного маркера *Val158Met* гена *COMT*

Задание №4

Определить количество людей с различными генотипами по каждому исследованному локусу в группе лиц с агрессивным поведением и в контрольной группе. Определить имеются ли различия между этими группами. Результаты зафиксировать в лабораторном журнале.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3 Молекулярно-генетические основ депрессивных расстройств

При изучении предрасположенности к депрессивным расстройствам уделяется внимание гену **рецептора 1А серотонина**. Для гена рецептора 1А серотонина (*HTR1A*)

идентифицирован ряд полиморфных локусов, которые изменяют аминокислотную последовательность белка (*Ile28Val (rs1799921)*, *Arg219Leu (rs1800044)* и *Gly22Ser (rs1799920)*)[Drago et al., 2008]. Данные ряда авторов подтверждают ассоциацию полиморфных локусов гена *HTR1A* с депрессией и суицидальными попытками [Lemondet et al., 2003], а также с чертами личности тревожного ряда [Strobel et al., 2003].

Фермент **5,10-метилентетрагидрофлатредуктаза (MTHFR)** является одним из ключевых ферментов цикла фолата в организме. Полиморфный локус *C677T* (замена в аминокислотной последовательности *Ala222Val*) в гене *MTHFR* вовлечен в развитие шизофрении, депрессии и маниакально-депрессивного психоза.

Цель лабораторной работы: Провести в группах лиц с униполярной депрессией и в контроле оценку частот генотипов и аллелей полиморфных маркеров генов:

- рецептора 1А серотонина (*C-1019G*),
- метилентетрагидрофлатредуктазы (*C677T*)

Задание №1

Провести амплификацию участков, содержащих соответствующие полиморфные варианты, в генах рецептора 1А серотонина (*HTR1A*) и метилентетрагидрофлатредуктазы (MTHFR), согласно приведенной выше методике (см. лабораторная работа №1). Температура отжига праймеров для полиморфного варианта *C-1019G* гена *HTR1A* составляет 60⁰С, для полиморфного варианта *C677T* гена MTHFR – 62⁰С.

Использовать 20 образцов ДНК лиц с униполярной депрессией и 20 образцов ДНК контрольной группы.

Задание №2

Провести рестрикцию полученных амплификатов согласно описанной выше методике (см. лабораторная работа №1).

- 3) Для детекции полиморфного варианта *C-1019G* гена *HTR1A* используют рестриктазу *BseGI*. Инкубацию проводят при 55⁰С, в течение 6 часов.
- 4) Для детекции полиморфного варианта *C677T* гена MTHFR используют рестриктазу *HinfI*. Инкубацию проводят при

37⁰С, в течение 12 часов.

Задание №3

По окончании рестрикции провести электрофорез исследуемых образцов в полиакриламидном геле. Определить генотипы исследуемых образцов.

- 1) Полиморфный вариант *C-1019G* гена *HTR1A* (Рис.3.)
Аллелю *C* соответствуют фрагмент ДНК размером 163 п.о.
Аллелю *G* соответствуют фрагменты ДНК размером 146 и 17 п.о.

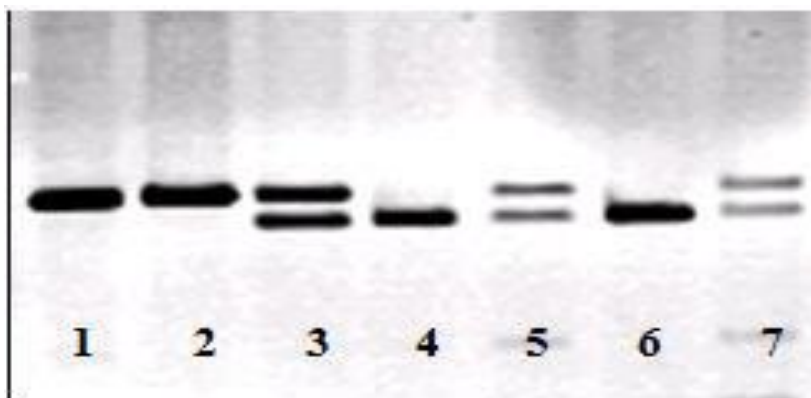


Рис. 3. Электрофореграмма, демонстрирующая генотипирование полиморфного локуса *rs6295* гена *HTR1A*. Дорожки 1, 2, – генотип **C/*C*, 3, 5, 7, – генотип **C/*G*, 4, 6 – генотип **G/*G*.

- 2) Полиморфный вариант *C677T* гена *MTHFR* (Рис.4.)
Аллелю *C* соответствуют фрагменты ДНК размером 175 и 23 п.о.
Аллелю *T* соответствуют фрагмент ДНК размером 198п.о.



Рис. 4. Электрофореграмма, демонстрирующая фрагменты генотипирования полиморфного локуса *rs1801133* гена *MTHFR*. Дорожки 1, 6 – генотип **C/*C*, 2, 5 – генотип **C/*T*, 3, 4 – генотип **T/*T*.

Задание №4

Определить количество людей с различными генотипами по каждому исследованному локусу в группе лиц с униполярной депрессией и в контрольной группе. Определить имеются ли различия между этими группами. Результаты зафиксировать в лабораторном журнале.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4

Молекулярно-генетические основы черт темперамента и личности

При изучении молекулярно-генетических основ черт личности и темперамента исследуются полиморфные варианты генов триптофангидроксилазы 1 (*218A>C*), рецептора D4 дофамина (*VNTR* в промоторном регионе). Повышение активности

фермента *TPH*, увеличение концентрации серотонина и 5-ГИУК отмечены у крыс и у серебристых лис, которые проявляли пониженную агрессивность [Porova et al., 1991]. Аллели *TPH1*А* и *TPH1*С* локуса *218A>C* были обозначены *TPH1*U* (от англ. Upper) и *TPH1*L* (от англ. Lower) соответственно; причем, аллель *TPH1*U* (*TPH1*А*) ассоциирован с повышенным содержанием 5-ГИУК в спинномозговой жидкости [Nielsen et al., 1997; Jonsson et al., 1997] и с увеличенным пролактиновым ответом на D-фенфлурамин (что характеризует повышенную серотонинергическую активность) [Manuck et al., 1999]. Молекулярно-генетические исследования, вовлекающие полиморфный маркер *218A>C* в формирование личностных черт, свидетельствуют об ассоциации генотипа *TPH1*А/*А* и/или аллеля *TPH1*А* с повышенным «избеганием ущерба» и пониженной «настойчивостью» [Anghelescu et al., 2005], повышенной тревожностью [Du et al., 2001], агрессивностью и враждебностью [Manuck et al., 1999, Rujescu et al., 2002], в то время как другие авторы указывают на снижение агрессивности у носителей данного аллеля [Evans et al., 2000, Staner et al., 2002].

Плотность рецепторов D4 в мозге коррелирует с развитием психических заболеваний, в частности с шизофренией [Stefanis et al., 1998]. Полиморфный локус, представляющий дубликацию участка 120 п.о. в промоторном регионе гена (1,24 кб от иницирующего кодона) содержит сайты связывания транскрипционных факторов GR, MECP-1, Rad-1, Zeste, Sp-1 и MBF-I [Seaman et al., 1999; McCracken et al., 2000]. Исследования транскрипционной активности гена *DRD4* с различным числом повторов 120 п.о. в промоторном регионе, проведенные на клеточных линиях нейробластомы и ретинобластомы, показали дозо-зависимый эффект (уменьшение экспрессии гена в ряду: 1 повтор>2повтора>4 повтора) [D'Souza et al., 2004; Kereszturi et al., 2007].

Цель лабораторной работы: Провести в исследуемых группах оценку частот генотипов и аллелей полиморфных маркеров генов:

- триптофангидроксилазы 1 (*218A>C*),
- рецептора D4 дофамина (*VNTR* в промоторном регионе)

Задание №1

Провести амплификацию участков, содержащих соответствующие полиморфные варианты, в генах триптофангидроксилазы 1 *TPHI* (*218A>C*) и рецептора D4 дофамина *DRD4* (*VNTR* в промоторном регионе), согласно приведенной выше методике (см. лабораторная работа №1). Температура отжига праймеров для полиморфного варианта *218A>C* гена *TPHI* составляет 60⁰С, для *VNTR* в промоторном регионе гена *DRD4* – 60⁰С.

Использовать 20 образцов ДНК мужчин татарской этнической принадлежности и 20 образцов ДНК женщин татарской этнической принадлежности из выборки здоровых индивидов, прошедших тестирование по опроснику С.Р. Клонинджера.

Задание №2

Провести рестрикцию полиморфного варианта *218A>C* гена *TPHI* согласно описанной выше методике (см. лабораторная работа №1). Для детекции полиморфного варианта *218A>C* гена *TPHI* используют рестриктазу *NheI*. Инкубацию проводят при 37⁰С, в течение 12 часов.

Задание №3

Провести электрофорез исследуемых образцов в полиакриламидном геле. Определить генотипы исследуемых образцов.

1) Полиморфный вариант *218A>C* гена *TPHI* (Рис.5.)
Аллелю А соответствуют фрагмент ДНК размером 291 п.о.
Аллелю С соответствуют фрагменты ДНК размером 209 и 82 п.о.

2) *VNTR* в промоторном регионе гена *DRD4* (Рис.6.)
Аллелю S соответствуют фрагмент ДНК размером 274 п.о.
Аллелю L соответствуют фрагмент ДНК размером 394 п.о.

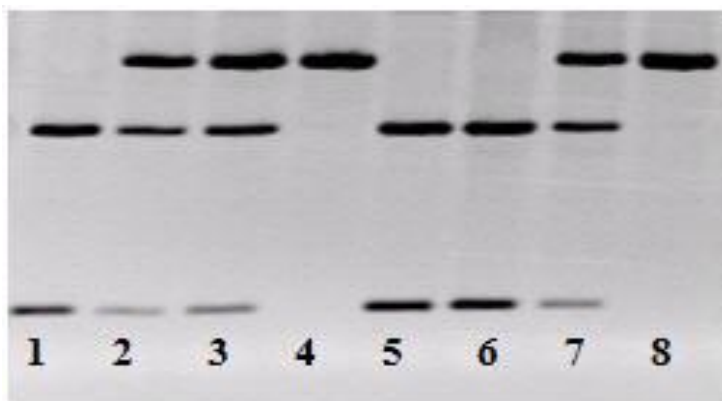


Рис. 5. Электрофореграмма, демонстрирующая фрагменты генотипирования полиморфного локуса *rs4537731* гена *TPH1*. Дорожки 1, 5, 6 – генотип **A/*A*, 2, 3, 7 – генотип **A/*G*, 4, 8 – генотип **G/*G*.

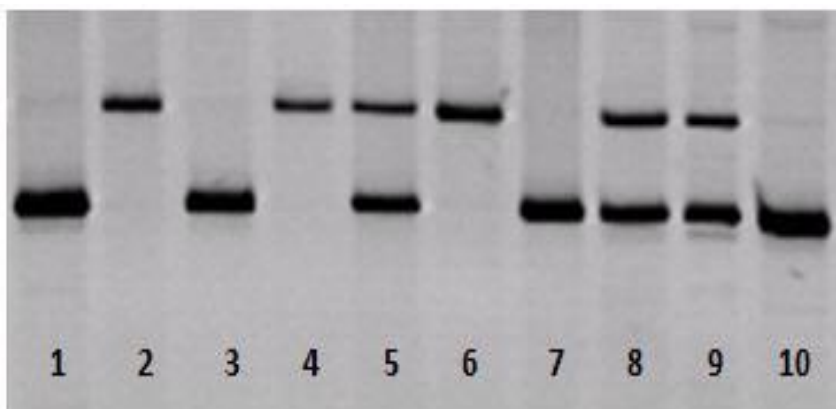


Рис. 6. Электрофореграмма, демонстрирующая генотипирование полиморфного *VNTR* маркера в 5'-UTR гена *DRD4*. Дорожки 1, 3, 7, 10 – генотип **S/*S*; 2, 4, 6, – генотип **L/*L*; 5, 8, 9 – генотип **S/*L*.

Задание №4

Определить количество людей с различными генотипами по каждому исследованному локусу. Определить имеются ли

различия между этими группами. Результаты зафиксировать в лабораторном журнале.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5

Молекулярно-генетические основы зависимости от психоактивных веществ

При изучении молекулярно-генетических основ зависимости от психоактивных веществ активно изучаются полиморфные варианты генов ферментов метаболизма этанола *ADH1B* (rs1229984, rs2066701), *ADH1C* (rs 1789920, rs1693425, rs698) и полиморфные варианты гена опиоидного рецептора *M1 OPRM1* (rs3823010).

Один из генов алкогольдегидрогеназы класса I - *ADH1B* содержит функциональные полиморфные локусы *Arg47His* и *Arg369Cys*, которые являются результатом транзиций *G143A* и *C1108T*, соответственно. Фермент, кодируемый *ADH1B*His47* обладает повышенной активностью, обеспечивает более быстрое накопление ацетальдегида, который оказывает токсическое действие на многие ткани организма [Oroszi, Goldman, 2004]. Аллель *ADH1B*47His* и соответствующая ему атипичная ADH реже встречаются у алкоголиков, чем среди здоровых индивидов. Среди страдающих алкоголизмом носители аллеля употребляют меньшие дозы этанола, чем индивиды, у которых он отсутствует [Oroszi, Goldman, 2004]. Таким образом, данный аллель может рассматриваться как протективный в отношении алкоголизма [Rivera et al., 2010].

Гены опиоидной системы – одни из новых генов, ассоциация с наркоманиями которых в последние годы активно изучается. Ген μ -опиоидного рецептора (*OPRM1*) был выбран как кандидатный ген для генетических исследований зависимости от ПАВ по нескольким причинам. *OPRM1* широко распространён в мозге человека. μ -опиоидный рецептор является молекулярной мишенью действия продуктов биотрансформации героина, и большинства анальгетиков опиатного происхождения: оксикодона,

гидроморфона, фентанила. Вещества неопиатного происхождения, такие, как кокаин или алкоголь, также могут опосредованно взаимодействовать с μ -опиоидным рецептором [Zhang et al., 2006]. Особый интерес представляет однонуклеотидная замена *A118G* в экзоне 1, в результате которой происходит замена аминокислоты (*Asn40Asp*) в молекуле белка.

Цель лабораторной работы: Провести в группах больных с зависимостью от ПАВ и в контроле оценку частот генотипов и аллелей полиморфных маркеров генов:

- алкогольдегидрогеназы *ADH1B* (*G143A*),
- μ -опиоидного рецептора *OPRM1* (*A118G*)

Задание №1

Провести амплификацию участков, содержащих соответствующие полиморфные варианты, в генах алкогольдегидрогеназы *ADH1B* (*G143A*) и μ -опиоидного рецептора *OPRM1* (*A118G*), согласно приведенной выше методике (см. лабораторная работа №1). Температура отжига праймеров для полиморфного варианта *G143A* гена *ADH1B* составляет 56⁰С, для полиморфного варианта *A118G* гена *OPRM1* – 59⁰С.

Использовать 20 образцов ДНК больных хроническим алкоголизмом, 20 образцов ДНК больных наркоманией и 20 образцов ДНК здоровых индивидов контрольной группы.

Задание №2

Провести рестрикцию полученных амплификатов согласно описанной выше методике (см. лабораторная работа №1).

- 1) Для детекции полиморфного варианта *G143A* гена *ADH1B* используют рестриктазу *Smi*MI. Инкубацию проводят при 65⁰С, в течение 4 часов.
- 2) Для детекции полиморфного варианта *A118G* гена *OPRM1* используют рестриктазу *Zsp*2I. Инкубацию проводят при 37⁰С, в течение 12 часов.

Задание №3

Провести электрофорез исследуемых образцов в полиакриламидном геле. Определить генотипы исследуемых

образцов.

1) Полиморфный вариант *G143A* гена *ADH1B* (Рис.7)
Аллели А соответствуют фрагменты ДНК размером 443 и 242 п.о.
Аллели G соответствует фрагмент ДНК размером 685 п.о.

2) Полиморфный вариант *A118G* гена *OPRM1* (Рис.8)
Аллели А соответствует фрагмент ДНК размером 272 п.о.
Аллели G соответствуют фрагменты ДНК размером 182 и 90п.о.

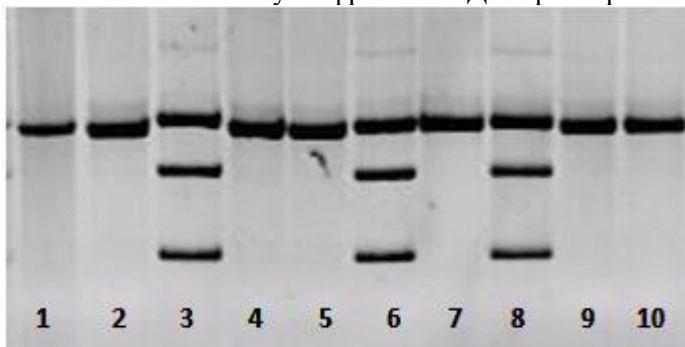


Рис. 7. Электрофореграмма, демонстрирующая генотипирование полиморфного локуса *Arg47His* гена *ADH1B*. Дорожки 1, 2, 4, 5, 7, 9, 10 – генотип - **A/*A*; 3, 6, 8 – генотип **A/*G*.

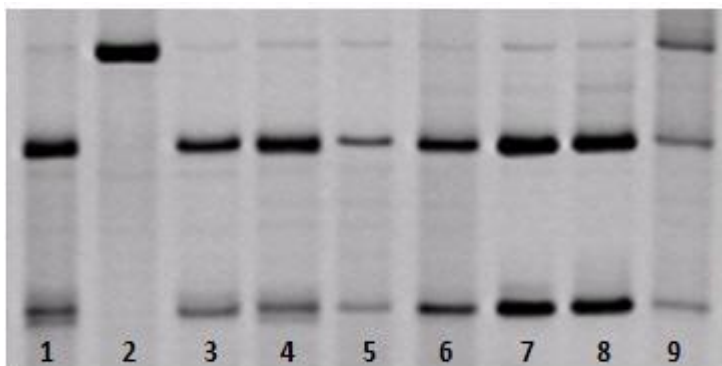


Рис. 8. Электрофореграмма, демонстрирующая генотипирование полиморфного маркера rs3823010 гена *OPRM1*. Дорожки 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 – генотип **G/*G*; 2 – генотип **A/*A*; 9 – генотип **A/*G*.

Задание №4

Определить количество людей с различными генотипами по каждому исследованному локусу. Определить имеются ли различия между этими группами. Результаты зафиксировать в лабораторном журнале.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6

Молекулярно-генетические основы параноидной шизофрении

При изучении молекулярно-генетических основ параноидной шизофрении исследуются полиморфные варианты генов переносчика серотонина (*5-HTT*), переносчика дофамина (*DAT1*).

Прекращение действия серотонина в мозге после освобождения из нейронов осуществляется путем его активного обратного всасывания с помощью переносчика серотонина (*5-HTT*) (Lesch et al., 1993). У человека ген *5-HTT* расположен на хромосоме 17 в области q11.1-q12. В этом гене интенсивно изучается инсерционно-делеционный полиморфизм в промоторной области (*5-HTTLPR*), расположенный приблизительно на 1 т.п.о. выше первого экзона (Lesch K.P. et al., 1996). Показана функциональная значимость данного локуса в развитии шизофрении (Nollie et al, 1996; Hranilovic et al., 2000; Shcherlatykh et al., 2000; Frisch et al., 2000), тревожных и депрессивных состояний (Lesch et al, 1996), неврозов (Sirota L.A. et al., 1999), анорексии (Fumeron F. et al., 2001), биполярных расстройств (Nollie et al, 1996; Lin et al., 2002), аутизма (Nollie et al, 1996; Klauck et al, 1997), сезонных аффективных расстройств (Rosenthal et al., 1998), алкоголизма (Sander et al, 1997; Parsian et al., 2001), алкогольного психоза (Горбунова, 2002), суицидальных попыток при расстройствах настроения (Ogilvie et al, 1996; Bellivier et al., 2000; Courtet et al., 2001).

Важную роль в дофаминергической нейротрансмиссии играет переносчик дофамина (*DAT1*). У человека ген *DAT1*

локализован на 5 хромосоме в области p15.3, содержит 12 экзонов и имеет длину 4.2 т.п.о. (Vandenberg et al., 1992). Heinz с соавт. (2000), Jacobsen с соавт. (2000) показали взаимосвязь и корреляцию различного числа копий *VNTR*-повтора в отношении связывания с психотропными препаратами. Ранее были выявлены ассоциации между *VNTR*-полиморфизмом в гене *DAT1* и шизофренией (Banon et al., 1998; Persico, Macciardi, 1999; Vandenberg et al., 2000; Georgieva et al., 2001), с гиперактивными состояниями с нарушением внимания (Waldman et al., 1998; Daly et al., 1999; Winsberg et al., 1999; Barr et al., 2001; Miller et al., 2001), с иллюзорными расстройствами (Persico et al., 1998), с депрессивными расстройствами (Аксёнова, 2001), с алкоголизмом (Ueno et al., 1999) и с острым алкогольным психозом (Юрьев, 2001), с опийной наркоманией (Гареева, 2002), с курением (Sabol et al., 1999).

Цель лабораторной работы: Провести в группах больных параноидной шизофренией и в контроле оценку частот аллелей и генотипов:

- 1) полиморфного маркера инсерция/делеция (*I/D*) в гене переносчика серотонина (*5-HTT*);
- 2) полиморфного маркера *VNTR* в гене переносчика дофамина (*DAT1*)

Задание №1

Провести амплификацию участков, содержащих соответствующие полиморфные варианты, в генах переносчика серотонина *5-HTT* (*I/D*) и переносчика дофамина *DAT1* (*VNTR*), согласно приведенной выше методике (см. лабораторная работа №1). Температура отжига праймеров для полиморфного варианта *I/D* гена *5-HTT* составляет 57⁰С, для *VNTR* полиморфизма гена *DAT1* – 59⁰С.

Использовать 20 образцов ДНК больных параноидной шизофренией и 20 образцов ДНК здоровых индивидов контрольной группы.

Задание №2

Провести электрофорез исследуемых образцов в полиакриламидном геле. Определить генотипы исследуемых образцов.

1) Инсерционно-делеционный полиморфизм гена *5-HTT*
(Рис.9)

Аллелю *S* («короткий аллель») соответствует фрагмент ДНК размером 480 п.о.

Аллелю *L* («длинный аллель») соответствует фрагмент ДНК размером 520 п.о.

2) *VNTR*-полиморфизм гена *DAT1* (Рис.10)

Число копий от 3 до 11 – длина одной копии 40 п.о. (от 200 и до 520 п.о.)

Для электрофореза *VNTR*-полиморфизма гена *DAT1* использовать большие стекла

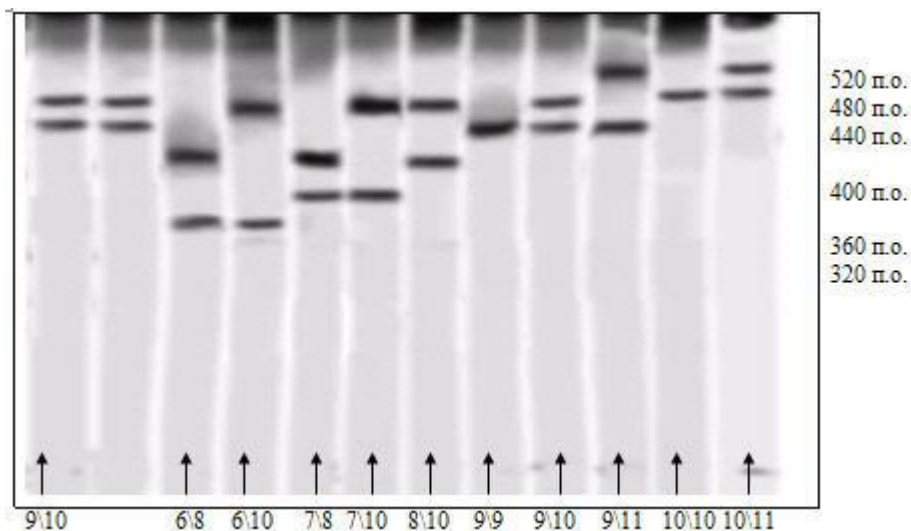


Рисунок 9. Генотипы *VNTR*-полиморфизма гена переносчика дофамина *DAT1*.

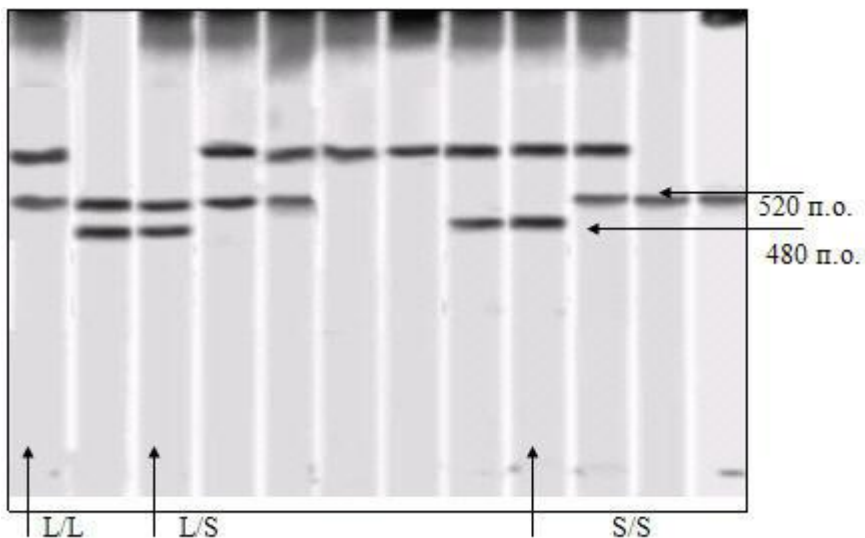


Рисунок 10. Генотипы инсерционно-делеционного полиморфизма гена переносчика серотонина 5-НТТ.

Задание №4

Определить количество людей с различными генотипами по каждому исследованному локусу. Определить имеются ли различия между этими группами. Результаты зафиксировать в лабораторном журнале.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

Вопросы:

Элементарные основы общей генетики.

1. Видоспецифические и индивидуально-специфические особенности. Понятие признака. Понятие популяции в биологии и генетике.
2. Процессы, идущие в популяциях. Особенности человеческих популяций.
3. Различные виды изменчивости. Классификация признаков в зависимости от характера изменчивости.
4. Качественные признаки, их отличительные черты. Примеры качественных признаков человека. Качественные признаки человека, связанные с поведением.
5. Количественные признаки, их отличительные черты. Примеры количественных признаков человека.
6. Признаки с пороговым эффектом как разновидность количественных признаков. Примеры различных видов признаков.
7. Этапы исследования Г. Менделя. Законы Менделя.
8. Хромосомная теория наследственности.
9. Сцепление и кроссинговер.
10. Молекулярные основы наследственности. ДНК и ее строение.
11. Основная функция гена. Генетический код.
12. Понятия локуса и аллеля. Множественные аллели. Гомозиготность и гетерозиготность. Гены в хромосомах.
13. Мутации. Хромосомные аномалии. Гены в популяциях. Закон Харди-Вайнберга.

Генетическая психофизиология.

1. Генетика мозга: методические подходы и уровни анализа.
2. Природа межиндивидуальной вариативности биоэлектрической активности мозга: электроэнцефалограмма, вызванные потенциалы.
3. Генотип-средовые отношения в изменчивости показаний вегетативных реакций.

4. Роль наследственности и среды в формировании функциональной асимметрии

Возрастные аспекты психогенетики.

1. Генотип-средовые соотношения в индивидуальном развитии.
2. Возрастные аспекты генетической психофизиологии.
3. Психогенетические исследования психического дизонтогенеза.

Психогенетика сенсорных способностей и двигательных функций.

1. Психогенетические исследования сенсорного восприятия.
2. Вкусовая чувствительность и ее наследование.
3. Наследственность и среда в слуховой и зрительной чувствительности, зрительном восприятии.
4. Психогенетические исследования морфологии и физиологии мозга. Исследования электроэнцефалограммы и вызванных потенциалов в психогенетике.
5. Асимметрия и наследственность. Основные результаты психогенетических исследований движений.

Реферат

Формами самостоятельной работы студентов при освоении курса фармакогенетики также являются реферат и заполнение лабораторного журнала.

Реферат выполняется на листах бумаги формата А4 (шрифт Times New Roman, размер 14, интервал между строк полуторный). Титульный лист оформляется в соответствии с принятыми в БашГУ нормами.

Реферат должен иметь содержание, введение, основную часть, разбитую на несколько глав, заключение и список литературы. Во введении автору нужно объяснить причину выбора данной темы, подчеркнуть ее актуальность, коротко охарактеризовать использованную литературу. В заключении сделать выводы по основной части, дать авторские оценки той проблемы, которая рассматривалась в реферате.

Объем реферата –18-25 стр. машинописного текста. Особо ценится практическая направленность работы.

Примерная тематика рефератов:

1. Ф. Гальтон как основоположник генетики поведения.
2. Евгеника – было ли у нее будущее?
3. Специфика развития близнецов.
4. «Трудный темперамент» – предопределены ли сложности?
5. Соотношение результатов исследований, проведенных различными психогенетическими методами (на примере исследований интеллекта).
6. Исследования среды в генетике поведения.
7. Исследования групповых различий.
8. Наследственность и среда – неотделимые факторы в развитии.
9. Проблема исследования девиантных форм поведения.
10. Алкоголизм и наследуемость.
11. Преступность и наследуемость.
12. Психические заболевания и наследственность.
13. Умственная отсталость и наследственность.
14. Расовые различия и наследуемость интеллекта.
15. Экстраверсия - интроверсия - невротизм: история исследования и наследуемость.
16. Генетические аспекты суицидального поведения

Промежуточной аттестацией по итогам освоения дисциплины является **зачет**.

Примерные вопросы к зачету:

1. Психогенетика, предмет, задачи.
2. Истории развития психогенетики.
3. Понятие генетической изменчивости.
4. Генетические признаки: количественные и качественные, моногенные и мультифакторные.
5. Дисперсия (изменчивость) количественных признаков. Генетическая и средовая дисперсия.

6. Фенотипическая изменчивость и фенотипическая популяционная дисперсия признака.
7. Генотип-средовое взаимодействие. Три типа генотип-средовых ковариаций, их влияние на оценку наследуемости.
8. Молекулярно-генетические методы, применяемые в психогенетике.
9. Близнецовый метод и его применение в генетике поведения. МЗ и ДЗ близнецы. Разновидности и возможности близнецового метода.
10. Метод приемных детей, его возможности.
11. Генеалогический метод. Генеалогическое древо, генограмма. Правила составления родословных и генограмм. Применение генеалогического метода в медицинской и популяционной генетике.
12. Соотношение генотип-средовых показателей в вариативности интеллекта и когнитивных способностей.
13. Влияние генотипа и фенотипа на проявление основных признаков темперамента.
14. Роль генотипа и фенотипа в вариативности свойств личности.
15. Генетика психических расстройств. Хромосомные aberrации и поведение человека (олигофрения, аутизм, болезнь Альцгеймера).
16. Генетика психических расстройств. Хромосомные aberrации и поведение человека (маниакально-депрессивные психозы, шизофрения)
17. Психогенетика сенсорных способностей
18. Психогенетика двигательных функций.
19. Психогенетика аномального и девиантного поведения (Преступность. Алкоголизм. Наркомания)
20. Психогенетика аномального и девиантного поведения (Суицидальное поведение, вредные привычки. Гомосексуальность).
21. Генетическая психофизиология.
22. Возрастные аспекты психогенетики.
23. Молекулярно-генетические основы агрессивного поведения человека.

24. Молекулярно-генетические основы суицидального поведения человека.
25. Молекулярно-генетические основы депрессивных расстройств.
26. Молекулярно-генетические основы черт темперамента и личности.
27. Молекулярно-генетические основы зависимости от психоактивных веществ.
28. Молекулярно-генетические основы параноидной шизофрении.

Использованная литература

1. Александров А.А. Психогенетика.- СПб.: Питер, 2009.
2. Гайсина Д.А. Анализ ассоциации генов нейромедиаторных систем с агрессивным поведением человека: дис. канд. биол. наук.- Уфа, 2004
3. Зайнеллина А.Г. Изучение ассоциаций полиморфных ДНК-локусов с параноидной шизофренией: дис. канд. мед. наук.- Уфа, 2002
4. Казанцева А.В. Молекулярно-генетические основы черт темперамента и личности: дис. канд. биол. наук.- Уфа, 2008
5. Носкова Т.Г. Молекулярно-генетическое изучение предрасположенности к униполярной депрессии в Республике Башкортостан: дис. канд. биол. наук.- Уфа, 2010
6. Равич-Щербо И. В., Марютина Т. М., Григоренко Е. Л. Психогенетика. - М.: Аспект-Пресс, 1999.
7. Фасхутдинова Г.Г. Молекулярно-генетическое изучение зависимости от психоактивных веществ: дис. канд. биол. наук.- Уфа, 2010

