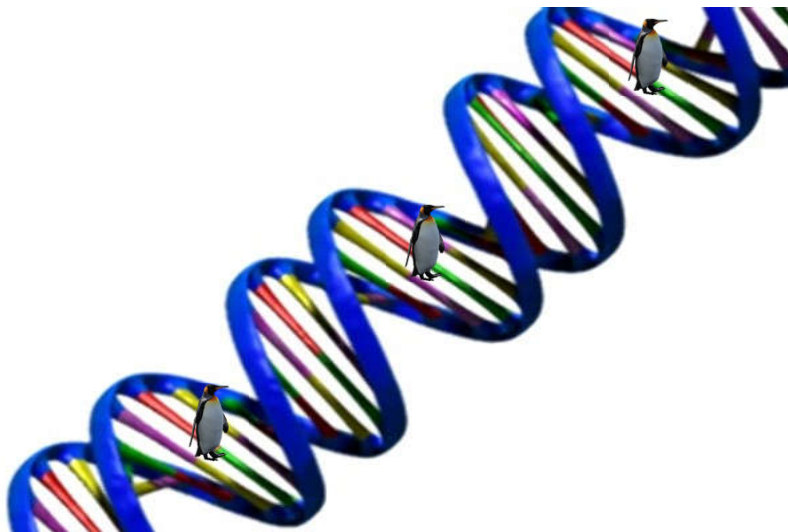


第八章 遗传图的制作和基因定位



Gene Numbers

Chromosome Numbers



主要内容

(1) 基本概念、原理与方法

(2) 遗传标记、物理图谱与遗传图谱

(3) 人类基因定位的基本方法

(4) 真菌类生物的遗传分析

(5) 有丝分裂交换与基因定位

(6) 细菌的基因定位

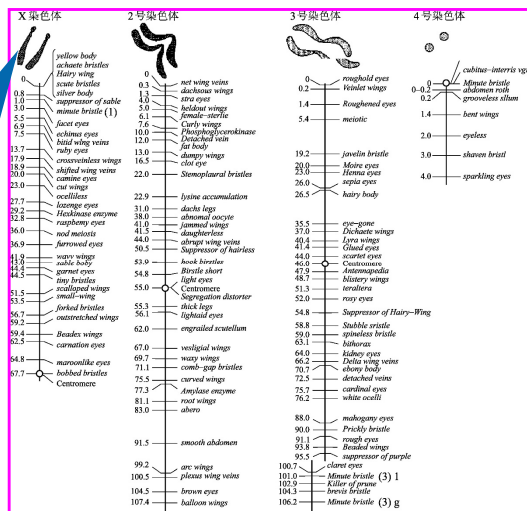
(7) 噬菌体的遗传分析与作图

3

中山大学生命科学学院
贺竹梅

基本概念

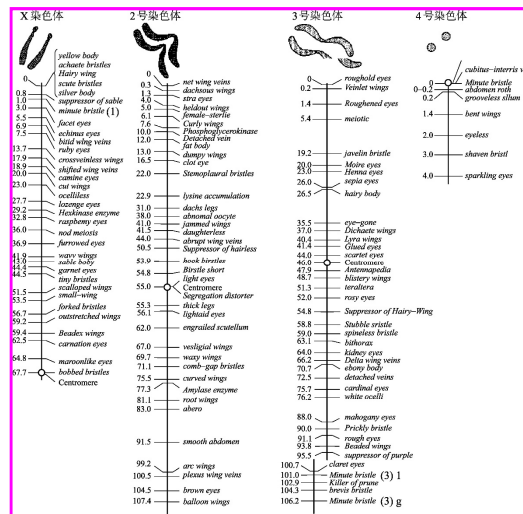
• **Gene mapping:** 将基因定位于某一特定染色体上, 以及测定基因在染色体上线性排列顺序与距离的过程。



4

贺竹梅

- 遗传图（Genetic map）：连锁图（linkage map），以遗传距离为单位，对基因或遗传标记在染色体上的相对位置进行排列所绘制的线性图。



- 科学史话：Sturtevant于1913年首次构建遗传图（P154）

5

中山大学生命科学院
贺竹梅

- 遗传距离即图距（map distance）：两个基因在染色体图上距离的数量单位，基因在染色体上的一个距离单位（map unit, mu）。
- 将图距单位称“厘摩”（centimorgan, cM）。

6

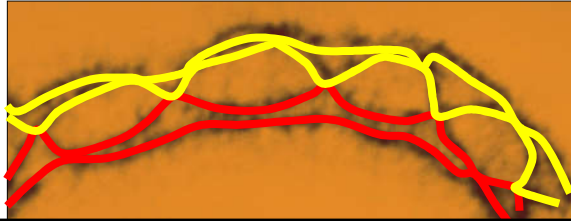
中山大学生命科学院
贺竹梅

基因定位的基本原理

回顾：什么叫不完全连锁？

Morgan的三条假设——交换（crossing over）

- 连锁的基因在染色体上呈线性排列
- 在任何两个基因之间都能发生交换
- 距离越远的基因之间发生交换的次数也越多



7

中山大学生命科学院
贺竹梅

摩尔根于1911年提出：

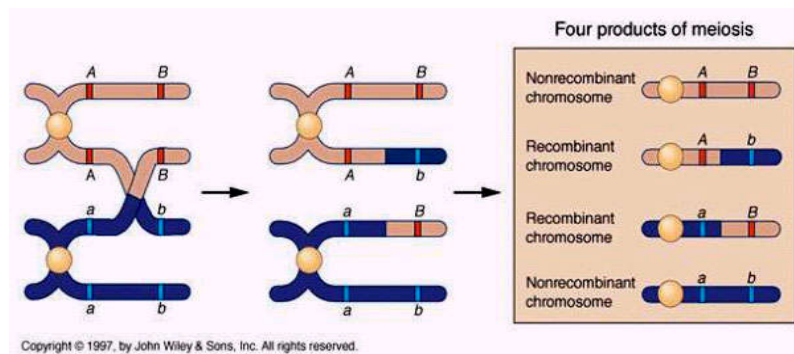
重组值大小反映基因座在染色体上距离的远近。

- 将交换的百分率确定为染色体上基因之间的相对距离单位，就可能根据交换率确定基因在染色体上的相对位置。
- 以重组值去掉%号表示基因在染色体上的一个距离单位（map unit, mu），即“厘摩”（cM）。
- 两基因 a - b 间重组率为17%，两个基因相距17个图距单位（17 cM）。

8

中山大学生命科学院
贺竹梅

- 基因定位的基础：遗传重组
- 遗传重组大多发生在减数分裂时同源染色体间的交换，但有丝分裂中也可发生遗传物质的交换——有丝分裂交换。



9

中山大学生命科学院
贺竹梅

基因定位的意义

以囊性纤维化 (cystic fibrosis , CF) 病为例

- 欧洲中世纪 (公元5世纪后期到公元15世纪中期) 有一个传说。



10

中山大学生命科学院
贺竹梅

- 直到1938年，美国医生安德森（Andersen）在解剖一些死于营养不良的儿童尸体时，发现有些儿童的胰腺存在很多胰管扩张呈囊状和广泛的纤维化，称其为“胰腺囊性纤维化”，“囊性纤维化”病名由此而来。

囊性纤维化病变导致 **肺** 和 **肠** 病变。还有肺部病变，导致反复的呼吸道感染；消化道病变，导致消化液分泌不足，吸收不良，进一步加重营养不良。



中山大学生命科学院
贺竹梅

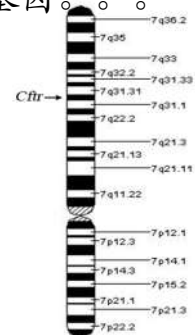
11

- 1949年，纽约市急救中心的圣依溺斯医生偶然发现了CF患儿的汗液比别的儿童盐分更高，相应的更容易发生脱水，死亡率也更高，证实了欧洲中世纪的那个传说。其所使用的汗液测试也成了CF诊断的最常用检查，沿用至今。（CF研究的第一大突破）
- 此后的二三十年里对解开囊性纤维化发病机制之谜进展缓慢。该病为常染色体隐性遗传病。
- 对CF研究的突破发生在1980年代。其中，加州大学洛杉矶分校生理学博士后保罗·昆顿发现自己长期的呼吸道疾病很像CF。被确诊后，他致力于CF研究。昆顿发现了CF患者汗腺上皮细胞的氯离子通道异常。（CF研究的第二大突破）

中山大学生命科学院
贺竹梅

12

- 离子通道就是细胞表面的特殊蛋白质，找基因。
- 1985年，通过家系连锁分析将CF相关基因定位于7q31~7q32约500kb区域。
- 1988年，在第7染色体上发现CF的第一个突变 $\Delta F508$ （三个核苷酸的缺失导致CFTR第508位的苯丙氨酸缺失），该突变占全球CF的2/3，在美国占到CF的90%。
- 1989年，J. M. Rommens等鉴定了CF基因*Cftr*，全长250 kb，编码一由1 480个氨基酸组成的蛋白质-囊性纤维化跨膜转运调节因子（CFTR）。基因突变使CFTR功能失活，导致具有外分泌功能的上皮组织出现结构缺陷或功能障碍。（第三大突破）



13

中山大学生命科学学院
贺竹梅

- 同年（1989），其基因突变谱立刻受到关注，基因突变分析立即被用于家系患者的诊断、产前诊断和携带者筛查。建立了*Cftr*基因突变数据库及其在不同种族中的分布频率。目前已报道1 200多种*Cftr*突变等位基因形式与疾病关联和700多种良性变异形式，包括外显子、内含子和启动子在内的整个基因。发现了CF临床异质性如影响胰腺功能和导致先天性无输精管（至少97%的CF男性患者不育）的遗传因素。
- 1992年，CF的胚胎植入前遗传学诊断成功；首次构建了携带*Cftr*突变基因的小鼠模型。

14

中山大学生命科学学院
贺竹梅

- 1994年，首次尝试将正常*Cftr*基因转入肺上皮细胞治疗CF病（**基因治疗**）。
- 1997年，在美国开展了对几十种*Cftr*杂合子的筛查。
- 2003年，根据*Cftr*突变图谱研制开发出治疗CF的药物取得初步进展。这些药物作用于CFTR蛋白表达和功能及由*Cftr*基因突变所引起的离子和水分子转运异常。

15

中山大学生命科学学院
贺竹梅

- 2019年10月，美国FDA批准Vertex制药公司的新药**Trikafta**用于年龄≥12岁人群治疗某些类型的CF，适用于*Cftr*基因至少携带1个拷贝F508del突变的CF患者。
- 2020年9月，Vertex制药公司宣布，美国FDA已批准**Kalydeco (ivacaftor)**，用于治疗4-6个月大的CF婴儿患者，具体治疗对象为：在*Cftr*基因中存在至少一个突变对Kalydeco治疗有反应的CF婴儿患者。

备注：Trikafta联合给药方案（elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor和ivacaftor）
Elexacaftor可与tezacaftor协同作用，增加细胞表面的成熟CFTR蛋白数量。
Ivacaftor被称为CFTR增效剂，促进CFTR蛋白跨越细胞膜运输盐和水的能力。
elexacaftor、tezacaftor和ivacaftor的药物配伍有助于水化和清除呼吸道的粘液。

16

中山大学生命科学学院
贺竹梅

科学家们在囊性纤维化疾病研究领域的新成果

- **【1】 Nat Commun:** 科学家有望利用CRISPR-Cas技术剔除囊性纤维化致病基因突变。
- **【2】 Science:** 揭示铰链状蛋白结构，为治疗囊性纤维化带来新思路
- **Science子刊:** 揭示囊性纤维化患者为何容易遭受铜绿假单胞菌感染
- **【4】 Nat Commun:** 新的检测方法可能助力囊性纤维化的个性化治疗
- **【5】 Nature:** 常用的抗真菌药物—两性霉素有望治疗囊性纤维化

17

中山大学生命科学学院
贺竹梅

仍存在的问题:

- 尽管引发囊性纤维化的原因很简单，但其治疗方法却不简单。大部分成功只限于特定种类基因突变的CF患者，许多其他患者仍未得到有效治疗。
- 导致大多数CF基因治疗失败的主要挑战是将治疗方法传送到肺部。对于肺，需要大量的病毒载体，特别是如果要将其雾化，可能有一半的载体会因为雾化而丢失。
- CRISPR/Cas9技术有可能直接恢复*Cfr*的突变。

18

中山大学生命科学学院
贺竹梅

- 从上面的CF研究历史可以看出，通过对CF相关基因的定位，推动了*Cftr*的克隆和功能研究，进而促进了对CF的基础病理生理学、致病途径、动物模型、药物开发、治疗方案的研究和遗传咨询的分子诊断、产前诊断、携带者筛查及种族间CF发病率差异和不同种族基因组的特点的临床应用等。

19

中山大学生命科学院
贺竹梅

遗传图或基因定位的意义

- 通过遗传连锁将一种性状的遗传与另一种性状或标记相联系，因此基因图有助于理解生物性状的遗传性质。
- 将表型差异与染色体改变相联系，可用于改良动植物性状、定位和克隆人类及动植物的相关基因等。
- 遗传连锁图也是结构基因组学研究不可缺少的技术平台。从生物性状的遗传改良到功能基因组学研究，基因定位和遗传连锁图的制作都发挥着不可替代的作用。

20

中山大学生命科学院
贺竹梅

基因定位的基本方法

基因定位的基础或原理是什么？

遗传重组

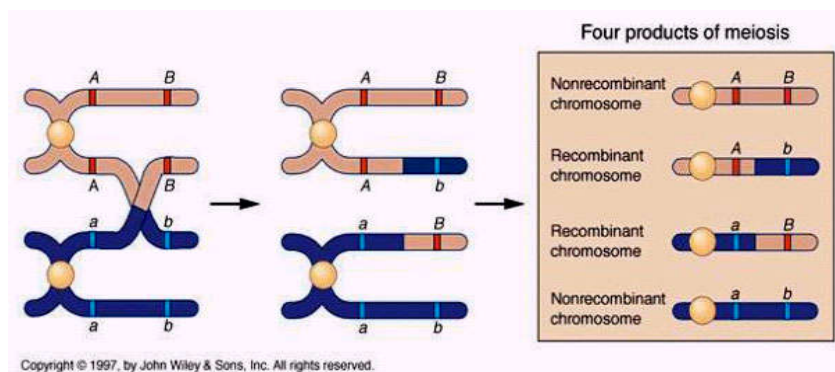
21

中山大学生命科学学院
贺竹梅



要获得可观察到的重组后代，需要注意什么？

杂合体

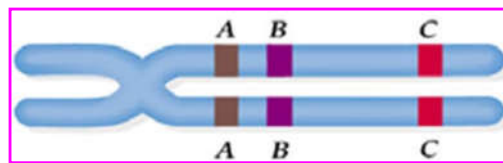


22

中山大学生命科学学院
贺竹梅

基因定位有两种基本方法：**两点测交**和**三点测交**。

- **两点测交 (two-point testcross)**：每次测定两个基因间遗传距离而进行基因定位的方法。
- **三点测交 (three-point testcross)**：通过一次测交，同时确定三对等位基因的排列顺序和它们之间遗传距离的方法。是基因定位的常用方法。



23

中山大学生命科学院
贺竹梅

• **两点测交**

- 玉米粒  糊粉层有色 *C* (无色 *c*)、胚乳饱满 *Sh* (凹陷 *sh*)，胚乳非糯性 *Wx* (糯性 *wx*)，连锁遗传。

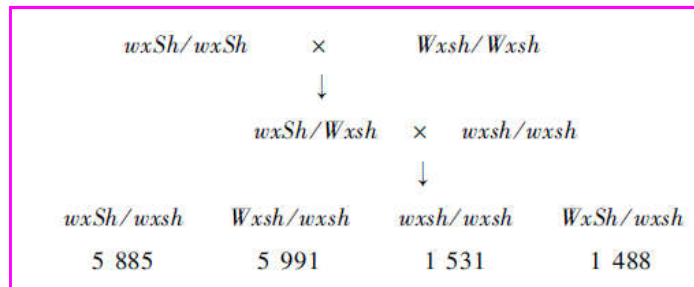
CSh/CSh	×	csh/csh		
	↓			
CSh/csh	×	csh/csh		
		↓		
CSh/csh		csh/csh	Csh/csh	cSh/csh
4 032		4 035	149	152

- 重组率=
- $[(152+149) / (4032+4035+149+152)] \times 100\% = 3.6\%$
- *C*与*Sh*之间的图距为3.6 cM。

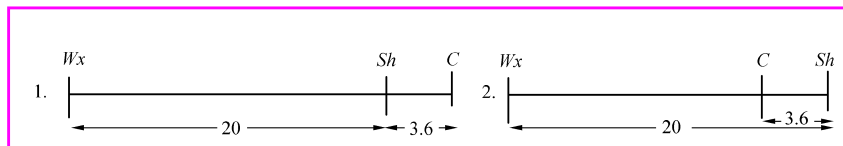
24

中山大学生命科学院
贺竹梅

- 同理： W_x 和 Sh



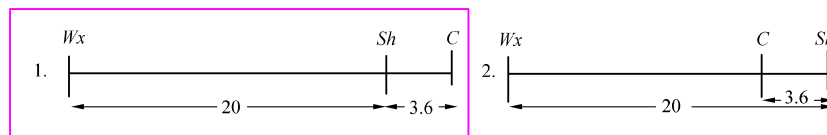
- 交换率为20%， W_x 与 Sh 间的距离为20 cM。
- 根据上述两个实验，三个基因可有两种排列方式：



25

中山大学生命科学院
贺竹梅

- 还需第三次杂交和测交。
- $WxC/wxc \times wxc/wxc$
- WxC/wxc (2 542) , wxc/wxc (2 716) ,
- Wxc/wxc (739) , wxC/wxc (717) 。
- 交换率为22%。
- W_x 和 C 之间的距离22“接近” 23.6，故认为第一种排列顺序更符合实际。

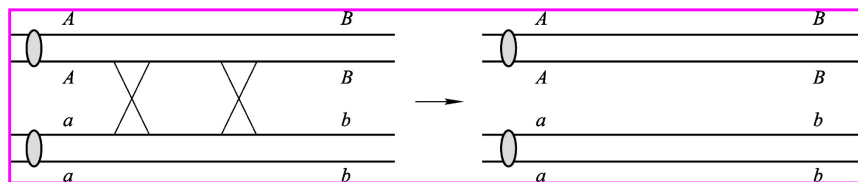


26

中山大学生命科学院
贺竹梅

两点测交法的弊端：

1. 繁琐复杂。如测定3对或3对以上基因位点间的距离和顺序，需分别进行3次或多次杂交和3次或多次测交。
2. 结果不稳定。由于环境和基因间的影响，结果会发生偏差。
3. 双交换或偶数次交换无法检出。在两个基因之间双交换的结果等于没有发生交换。



27

中山大学生命科学学院
贺竹梅

三点测交

P: $+++ / +++$ × $c\ sh\ wx / c\ sh\ wx$

F1: $+++ / c\ sh\ wx$ × $c\ sh\ wx / c\ sh\ wx$

F1配子的基因型	实得籽粒数
$+$ $+$ $+$	2238
$c\ sh\ wx$	2198
$c\ +\ +$	98
$+ sh\ wx$	107
$+ +\ wx$	672
$c\ sh\ +$	662
$c\ +\ wx$	39
$+ sh\ +$	19
总数	6033

28

生命科学学院
贺竹梅

三点测交-距离计算

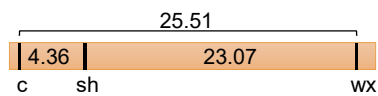
F1配子的基因型	实得籽粒数
+ + +	2238
<i>c sh wx</i>	2198
<i>c</i> + +	98
+ <i>sh wx</i>	107
+ + <i>wx</i>	672
<i>c sh</i> +	662
<i>c</i> + <i>wx</i>	39
+ <i>sh</i> +	19
总数	6033

29

中山大学生命科学院
贺竹梅

三点测交-距离计算

F1配子的基因型	实得籽粒数	c-sh	sh-wx	c-wx
+ + +	2238			
<i>c sh wx</i>	2198			
<i>c</i> + +	98	√		√
+ <i>sh wx</i>	107	√		√
+ + <i>wx</i>	672		√	√
<i>c sh</i> +	662		√	√
<i>c</i> + <i>wx</i>	39	√	√	
+ <i>sh</i> +	19	√	√	
总数	6033	263	1392	1539
重组/总数		0.0436	0.2307	0.2551
距离cM		4.36	23.07	25.51

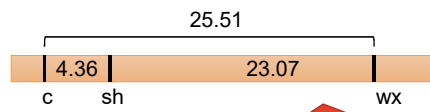


$$4.36 + 23.07 = 27.43 \neq 25.51$$

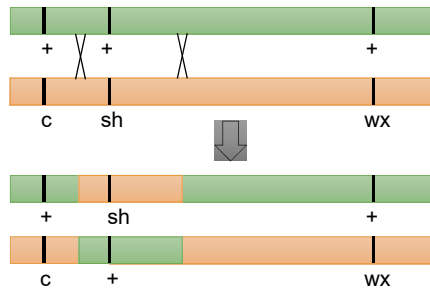


30

中山大学生命科学院
贺竹梅



分析：为什么 $25.51 \neq 4.36 + 23.07$?



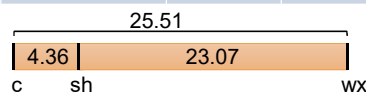
因为 *C* 和 *wx* 之间发生了双交换

中山大学生命科学院
贺竹梅

31

三点测交-双交换

F1配子的基因型	实得籽粒数	c-sh	sh-wx	c-wx	双交换
+ + +	2238				
<i>c sh wx</i>	2198				
<i>c + +</i>	98	√		√	
+ <i>sh wx</i>	107	√		√	
+ + <i>wx</i>	672		√	√	
<i>c sh +</i>	662		√	√	
<i>c + wx</i>	39	√	√		
+ <i>sh +</i>	19	√	√		
总数	6033	263	1392	1539	
重组/总数		0.0436	0.2307	0.2551	
距离cM		4.36	23.07	25.51	

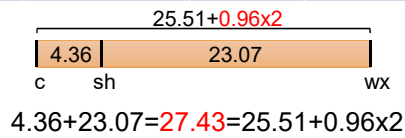


32

中山大学生命科学院
贺竹梅

三点测交-双交换

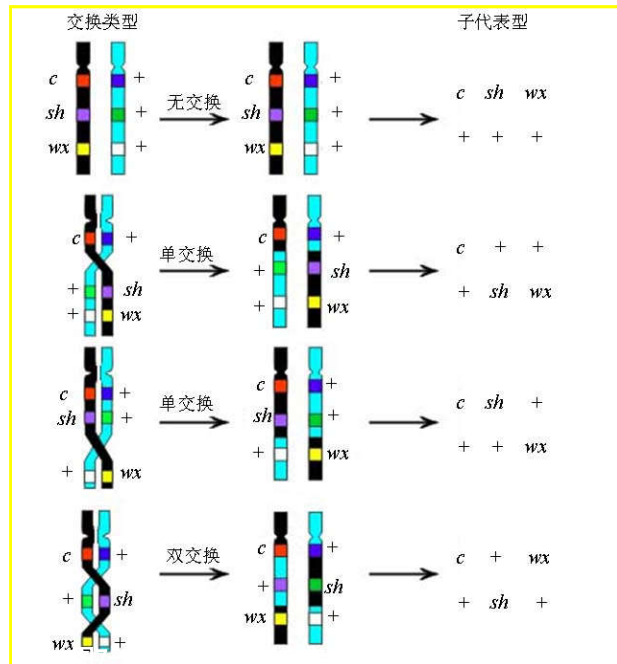
F1配子的基因型	实得籽粒数	c-sh	sh-wx	c-wx	双交换
+ + +	2238				
<i>c sh wx</i>	2198				
<i>c</i> + +	98	√		√	
+ <i>sh wx</i>	107	√		√	
+ + <i>wx</i>	672		√	√	
<i>c sh</i> +	662		√	√	
<i>c</i> + <i>wx</i>	39	√	√		√
+ <i>sh</i> +	19	√	√		√
总数	6033	263	1392	1539	58
重组/总数		0.0436	0.2307	0.2551	0.0096
距离cM		4.36	23.07	25.51	0.96x2



33

中山大学生命科学学院
贺竹梅

- 三个基因的顺序是*c-sh-wx*, 即遗传作图



34

中山大学生命科学学院
贺竹梅

遗传作图三条原则 (Three criteria)

① 基因型都是杂合体 (heterozygous)



纯合体不能检测交换 杂合体才能检测交换

② 表型 (phenotypes) 对应基因型 (genotypes)

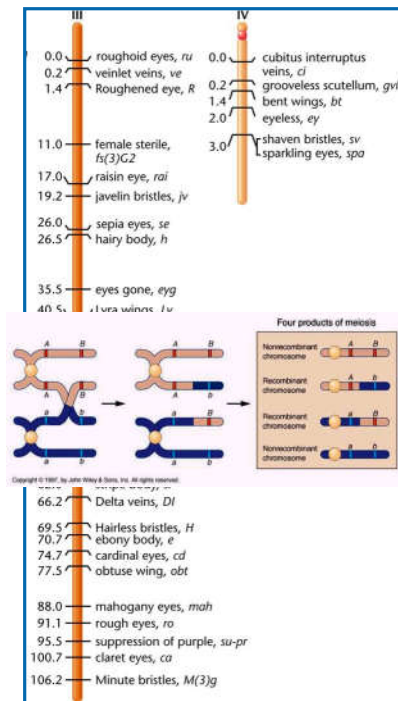


③ 子代数量足够多

35

中山大学生命科学学院
贺竹梅

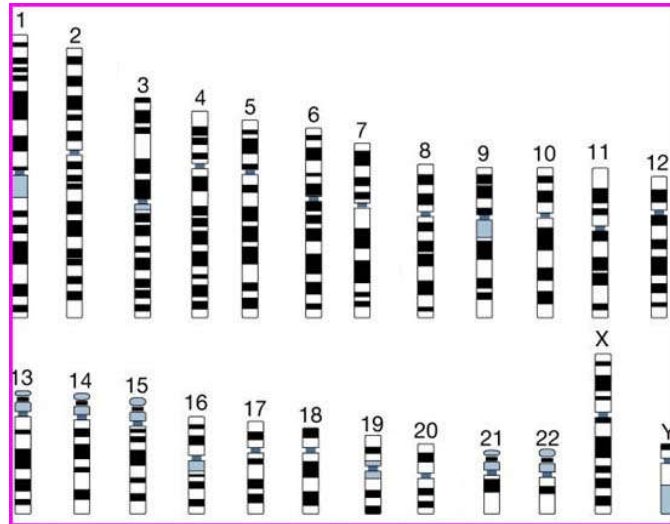
- **基因座 (locus)** : 基因在遗传图上的位置。
- **座位怎么排?** 绘制遗传图时, 以最先端基因为0, 发现新基因在更先端时, 让出0点, 其余基因位置相应移动。
- 交换值介于0到50%。
- 遗传图上可看到两基因间超过50图距单位, 是因为两基因间多次交换累加。实际上两基因间重组值不会超过50%。
- 要从图上知道基因间的重组值 **只限于邻近基因座位间。**



36

什么叫连锁群 (linkage group) ?

位于一对同源染色体上的所有基因的组合。

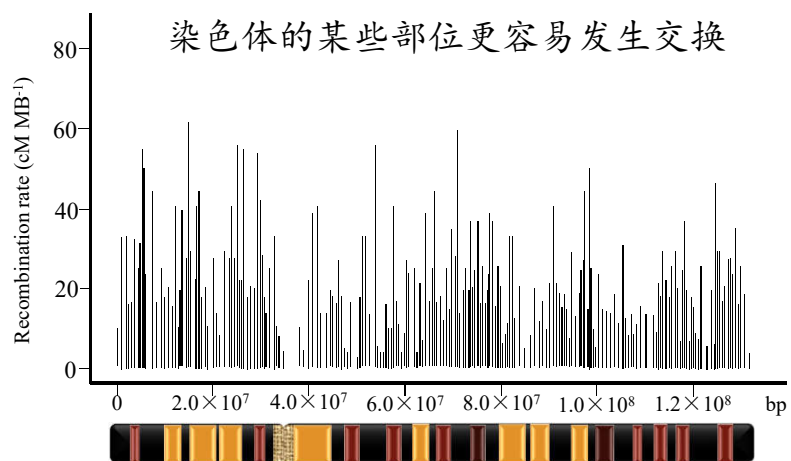


37

大学生命科学学院
贺竹梅

所有基因间的交换是不是一样频率？

染色体的某些部位更容易发生交换



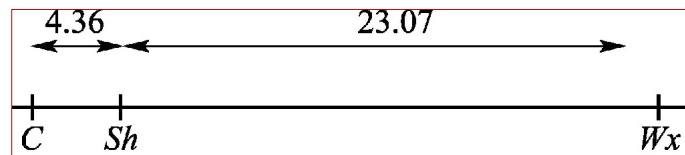
人类12号染色体的重组率

38

中山大学生命科学学院
贺竹梅

干涉和并发系数

- 染色体上三个基因之间发生双交换的**理论双交换率**是两个单交换概率的乘积，上例中为：

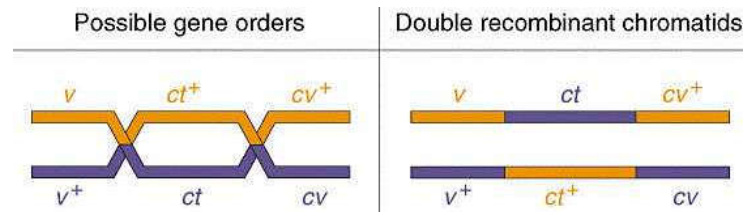


- 理论双交换率： $23.07\% \times 4.36\% = 1.0\%$,
- 可实际双交换值只有：0.96%，

39

中山大学生命科学院
贺竹梅

- 干涉 (interference)**：每发生一次单交换时，其邻近基因间也发生一次交换的机会减少的现象。



干涉由美国著名遗传学家穆勒于1916年最先在果蝇中报道并命名 (Muller, American Naturalist, 1916)

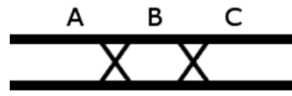


THE AMERICAN NATURALIST
Vol. 51, April, 1917, pp. 150-151
THE MECHANISM OF CROSSING-OVER
HERMANN J. MULLER
New Haven, Conn.
It is the object of this paper to give an account of the most important evidence that has been gathered to date in regard to the manner in which recombination of linked factors—often referred to as “crossing-over”—takes place, and to describe an experiment in which a new method for studying the occurrence of such operations is employed. This subject would be still much better, but as it may be a considerable time before the results obtained in fact, it would not be advisable to withhold longer an account of this work and of other work that bears on the nature of the “crossing-over.”
1. THE MECHANISM OF RECOMBINANT INHERITANCE
Crossing-over
The question as to whether recombination of linked factors is due to pieces of homologous chromosomes changing places with each other, or to such a thing as the operation whether the factors lie in the chromosome at all. As it would be known, there is a large body of evidence from cytology and from experimental embryology, showing that the chromosomes are separated, and participating alike, from their mutual recombination. It is not possible to say that the best definite evidence that the Mendelian factors are contained in the chromosomes for in this striking case recombination which was found between their respective

40

学院

•干涉程度常用**并发系数**表示



并发系数 (coefficient of coincidence, c)：实际双交换率与理论双交换率的比值。

$$\text{并发系数}(c) = (\text{实际双交换值}) / (\text{理论双交换值})$$

负干涉 (negative interference)：并发系数大于1，表示一次交换的发生使第二次发生交换的频率增加了。

41

中山大学生命科学院
贺竹梅

染色体干涉 (chromosomal interference)：染色体内基因区段之间的干涉。

染色单体干涉 (chromatid interference)：减数分裂前期，交换并不限于某二条非姊妹染色单体之间。非姊妹染色单体间的一次单交换会干涉其它非姊妹染色单体间的交换。

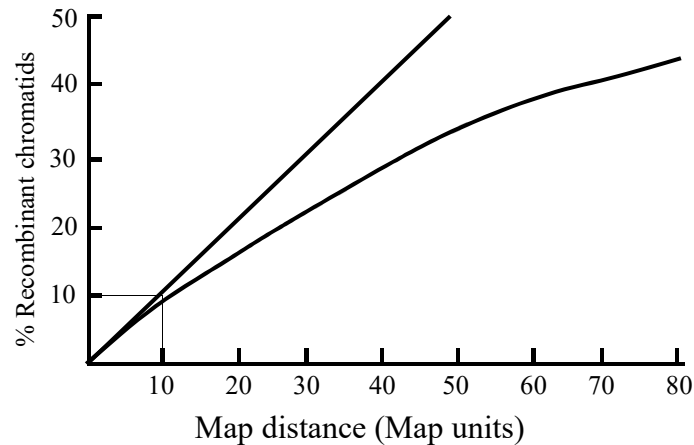
通常，第一次交换除对同线双交换有干涉外，对其他双交换没有干涉



42

中山大学生命科学院
贺竹梅

基因越近，干涉越强，双交换越少，作图越精准



43

中山大学生命科学学院
贺竹梅

利用基因编辑技术实现水稻遗传干涉现象的完全消除

2021年10月1日，Frontiers in Plant Science基因编辑专刊在线发表了王克剑团队和程祝宽团队合作的题为“Concurrent Disruption of Genetic Interference and Increase of Genetic Recombination Frequency in Hybrid Rice Using CRISPR/Cas9”的研究论文。该研究利用基因编辑技术对杂交稻减数分裂联会复合体中央元件基因进行编辑，同步实现了遗传干涉现象的完全消除与遗传重组频率的增加，为水稻种质资源创新和遗传多样性创造提供了一个高效途径。

进一步对突变体进行授粉并对后代进行遗传分析发现：突变体中遗传重组频率提高了1.5倍左右，特别是在着丝粒重组冷点区域甚至提高到3.3倍之多。令人意外的是，在同一染色体的相邻区间相互干涉的强度几乎降为0，表明突变体中交叉干涉现象基本完全消失。该结果证明水稻联会复合体可能参与介导交叉干涉的形成。此外，该研究也为利用基因组编辑技术打破遗传累赘、实现优异基因聚合、提高育种效率提供了一种有效策略。

44

中山大学生命科学学院
贺竹梅

遗传标记、物理图谱与遗传图谱

什么是遗传标记 (Genetic marker) ?

指可追踪染色体、染色体某一节段、某个基因座、某性状在家系中传递的任何一种遗传特性。

可识别性

可遗传性

45

中山大学生命科学院
贺竹梅

表 8-2 用于遗传作图的常用标记

标记	定义和应用
形态学表型	形态学表型变异 (包括疾病等)。用于符合孟德尔遗传的形态学变异的作图。受显性关系复杂性、非等位基因相互作用和环境效应的影响,人类疾病基因一般是二态表型变异
细胞学标记	指染色体数目和形态的变异,主要包括:染色体核型和带型及缺失、重复、易位、倒位等
蛋白多态性	在电泳和等电聚焦时蛋白迁移率的差异。共显性和中等的多态性在数量上有限。很多蛋白的多态性不能通过电泳检测,因为有些氨基酸替代不改变蛋白的物理化学性质。同时,基因编码的多态性蛋白本身可能不被作图
限制性片段长度多态性 (RFLP)	等位 DNA 片段中限制性位点的差异。共显性且丰富,但常为二态性。如果变异位于限制性位点之外,很多顺序多态性不能被检测
VNTR, STR	由于不同个体串联重复序列的数目和位置不同所引起的片段长度差异。呈共显性和高度多态性。小卫星 DNA 组成的染色体座位具有丰富的多态性,即 VNTR 序列。微卫星 DNA (STR) 在整个基因组中平均分布,可以用 PCR 快速测定基因型
随机扩增的多态性 DNA (RAPD)	随机引物扩增的 DNA 片段。丰富,但并非总可以区分纯合和杂合基因型,有时重复性较差。主要用于植物基因组作图
单核苷酸多态性 (SNP)	基因组内某一特定核苷酸位置上的核苷酸差异。在人基因组中平均每 1 000 个核苷酸中有一个差别,数目多,覆盖密度大

分子标记为什么具有遗传标记特性?

亲本间存在差异即多态性,即具可识别性;

亲本间存在的差异在后代中可以重演,即具有可遗传性。

46

学院

基因是非常有用的遗传标记，但为什么还需要其他标记？

- 可用作标记的基因十分有限。许多性状都涉及多基因（数量性状遗传，通过实验无法区分）；只有部分基因其等位基因成员可以通过常规实验予以区分，导致遗传图不完整。
- 高等生物基因组中存在大量间隔区和重复序列，使得大片段无标记。

人类遗传图用6000多个遗传标记作路标，把基因组分成6000多个区域，连锁分析时，找到某表型（疾病）基因与其中某一标记紧密连锁的证据，即可定位基因。

47

中山大学生命科学学院
贺竹梅

什么叫物理图？

应用分子生物学技术直接将DNA分子标记、基因等标定在染色体（基因组）实际位置所制作的图谱。

48

中山大学生命科学学院
贺竹梅

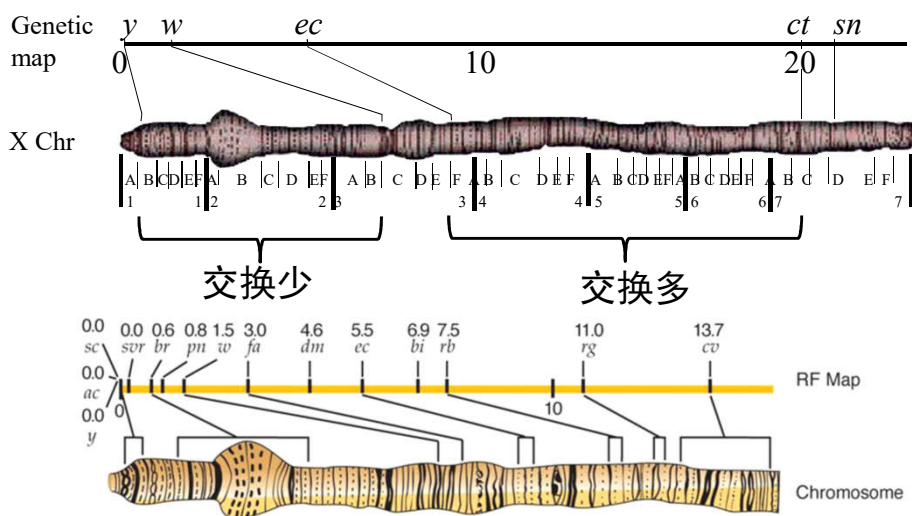
为什么要绘制物理图？

- ◆ 遗传图谱的**分辨有限**：测序要求标记间小于100kb，人类遗传图标记的平均密度实际是599kb。在人类中由于子代群体大小、婚配方式受限，无法获得高分辨率遗传图。
- ◆ 遗传图谱的**精确性有限**：重组热点、着丝粒区、不同性别具有不同的重组热点。
- ◆ 遗传图谱的**准确率有限**：环境因素和取样误差。可以相互校正。
- ◆ 基因组太大，必须分散测序再组装，组装时需要图谱指导；基因组中存在大量重复序列，干扰排序。

49

中山大学生命科学院
贺竹梅

遗传图距 (Genetic Distance) 与物理图距 (Physical Distance)



中山大学生命科学院
贺竹梅

制作物理图谱的主要方法：

限制性作图 (restriction mapping) 。

荧光原位杂交 (fluorescent hybridization, FISH)

序列标签位点作图 (sequence tagged sites mapping, STS)

51

中山大学生命科学院
贺竹梅

遗传图谱与物理图谱的异同：

①遗传图谱是表示基因或标记间的**相对距离**，以重组值表示；物理图谱表示的是基因或标记间的**物理距离**，距离的单位为长度单位，如 μm 或者碱基对数 (bp或kp) 等。

②减数分裂**重组**的频率沿染色体并不统一，有**热点和冷点**。

遗传图的意义：通过遗传图谱，我们可以大致了解各个基因或DNA片段之间的相对距离与方向，如哪个基因更靠近着丝粒，那个更靠近端粒等。遗传图谱不仅是现阶段定位基因的重要手段，即使在很多物种基因组全物理图谱建立起来之后，它依然是研究基因组遗传与变异以及克隆基因的重要手段。

52

中山大学生命科学院
贺竹梅



不同生物的基因定位方法是否一样？

- 细菌：根据细菌之间**遗传物质转移的不同方式**（转化、接合、转导）而异，有中断杂交、高频重组与性导、转化、重组和转导作图等；
- 噬菌体：遗传重组进行作图；
- 真菌：顺序四分子分析和非顺序四分子分析；
- 高等动植物：杂交法，利用基因间的交换值定位；
- 人类：家系分析法、体细胞杂交、全基因组扫描及核酸杂交技术等；
- 利用有丝分裂交换进行基因定位。

但基因定位的原理及基本方法不变。

53

中山大学生命科学院
贺竹梅



Summary

基本概念：基因定位，干涉，并发系数，基因座，连锁群，遗传标记，遗传图，物理图，。。

基因定位的基本原理：遗传重组。

基因定位的基本方法：两点测交和三点测交。

不同的生物类群，基因定位的方法有所不同。

54

中山大学生命科学院
贺竹梅

人类基因定位的基本方法

人类连锁分析要解决的问题：

- ①所研究的两个基因是位于不同还是相同染色体上，即连锁还是自由组合；
- ②如位于同一染色体上，基因间距离是多少？

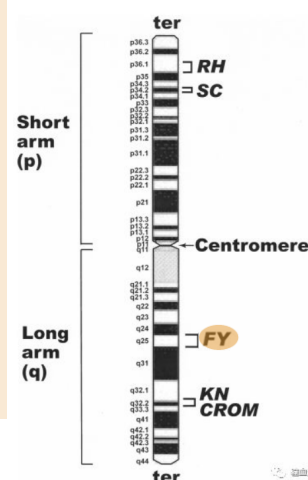
•E. B. Wilson于1911年开创人类基因定位先河，将红绿色盲基因首次定位到X染色体上。

55

中山大学生命科学院
贺竹梅

•1968年R. P. Donohue利用系谱分析将Duffy血型基因定位于1号染色体上，人类首次将基因定位于常染色体上。

Donohue在研究中发现他自己细胞的1号染色体较其他人的长，认为是**有一段染色质螺旋化松弛**之故。C带法显示这一异常在长臂靠近着丝粒的地方。他进一步检查家系成员，发现有的也有这种1号染色体异常现象；他又对此作了连锁分析，发现**这一标记（即1号染色体的多态性）与Duffy血型及清蛋白类型之间具有平等性（连锁关系），**因此将Duffy血型基因定位于1号染色体上。



56

人类基因定位

- 特点：人类**家庭成员少，世代长，不能计划婚配**，人类基因定位难度较大，最初人类基因定位多以**可见或可测量性状**与血型或血浆蛋白连锁进行。
- 发展：由于体细胞杂交、重组DNA、分子杂交和PCR等技术的出现、分子标记的发现及HGP成就的应用，加上计算技术和LOD值（logarithm of the odds，优势对数分数法）的应用，人类基因定位取得了迅速发展。
- 应用：越来越多的**致病基因被克隆**，使得对病因学认识及产前诊断、症状前诊断、遗传咨询、基因诊断和基因治疗等技术获得了极大发展。

57

中山大学生命科学学院
贺竹梅

1. 家系连锁分析法（pedigree-linkage analysis）

- **家系法（pedigree method）和连锁法（linkage analysis）**结合应用于研究人类某一基因与其他基因或标记连锁关系的方法，通过分析、统计家系中有关性状的连锁情况和重组率而进行基因定位。
- **连锁分析**：应用被定位的基因与同一染色体上另一基因或遗传标记相连锁的特点定位。

对于单基因病，连锁分析是可行的。但对于多基因病，连锁分析的作用非常有限。

58

中山大学生命科学学院
贺竹梅

性连锁基因的定位

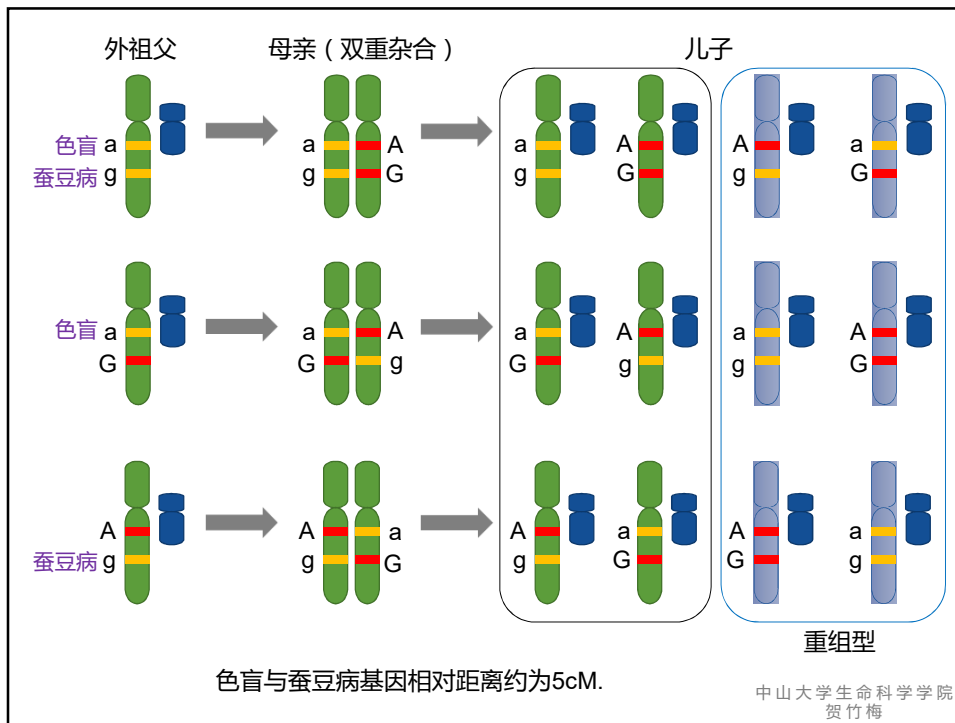
- 最常用的家系分析是性连锁分析。
- 原理：如果某性状只出现于男性，则一般可将决定这个性状的基因定位于Y染色体上（注意排除限性遗传）。根据伴性遗传特点，男性的X染色体总是来自他的母亲，而这条X染色体又总是传给他的女儿，所以正常情况下X染色体上的基因不会出现直接从男性到男性的遗传方式，而是隔代交叉遗传，从外祖父传给外孙。如果两个性状都表现为隔代交叉遗传，则可判断这两个性状的基因都在X染色体上，或可以说这两个基因是X连锁的。

中山大学生命科学院
贺竹梅

外祖父法（grandfather method）

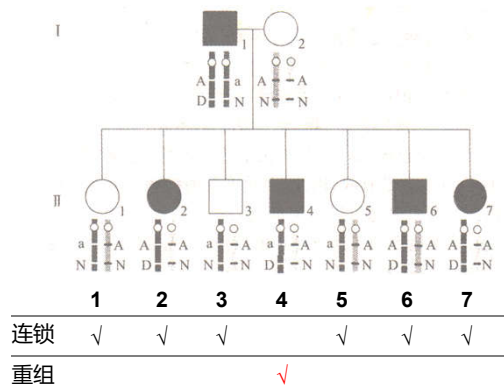
- 对于X染色体上的基因来说，只需要知道母亲的基因型为双重杂合体（即两对基因都处于杂合状态），即可以根据双重杂合体的母亲所生儿子中有关性状的重组情况估计出重组率（因为Y染色体不含此基因，相当于隐性）。而母亲X染色体上的基因组成，可以由外祖父的表型得知，因此这种基因定位的方法称为外祖父法。

中山大学生命科学院
贺竹梅



家系连锁分析，常规计算

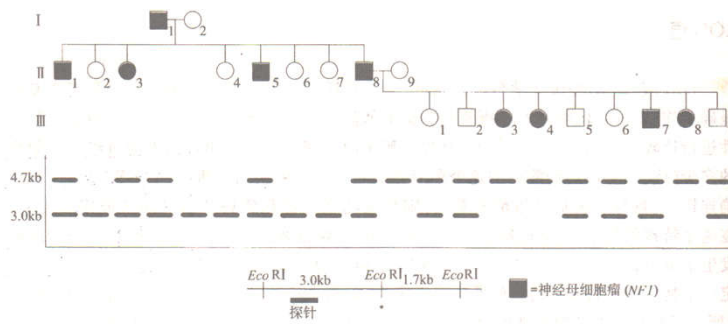
显性遗传病致病基因 (D) 和标记基因 (A/a) 的连锁图



重组发生的几率：1/7

两位点之间距离：1/7遗传单位（摩），即14.3厘摩

常染色体神经母细胞瘤 (NF1) 的基因定位, 用的是第一代遗传标记 (RFLP)

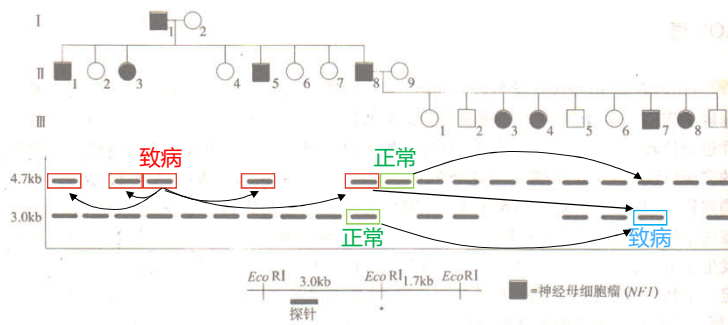


NF1家系的连锁分析

患者I-1通过4.7kb片段将致病基因传给17个子孙两代中的8个子孙, 患者III-? 发生重组?

中山大学生命科学院
贺竹梅

常染色体神经母细胞瘤 (NF1) 的基因定位, 用的是第一代遗传标记 (RFLP)



NF1家系的连锁分析

患者I-1通过4.7kb片段将致病基因传给17个子孙两代中的8个子孙, 患者III-7发生重组, 他继承父亲3.0kb片段患病, 重组率 $1/17=6\%$, 致病基因与这个标记的距离是6厘摩。

人类基因定位方法的发展在于所用遗传标记从第一代发展到第二代, 再到第三代; 从而标记在染色体上的分布密度越来越高, 检测通量越来越大, 越来越简便。

中山大学生命科学院
贺竹梅

2. 全基因组扫描连锁分析

- 原理：利用全基因组上一系列特征性强的、在全基因组上均匀分布的、具有一定密度的**DNA多态性标记**，观察疾病/性状与分子标记间的连锁关系，从而进行定位的方法。
- 在得到阳性结果后，**在阳性位点附近再加密分子标记**，用同样方法确定哪一个多态性位点与疾病连锁的可能性最大等等。这样在**不断缩小分析范围**后，疾病相关基因定位的范围也越来越精细。

65

中山大学生命科学院
贺竹梅

- 全基因组扫描**并不能直接搜寻具体的疾病相关基因**，而是通过研究均匀分布于整个基因组的分子标记来间接选择其相关的基因座位。
- 由于人类基因组序列已知，**一旦发现与疾病相关基因连锁两侧的遗传标记**，根据标记位点的具体位置，我们就可以知道**定位区域内所有的基因**。当定位区域确定后，在该**区域内选择候选基因直接进行测序**，对所发现的突变在病人和对照组进行分型并分析，搜寻致病基因。

66

中山大学生命科学院
贺竹梅

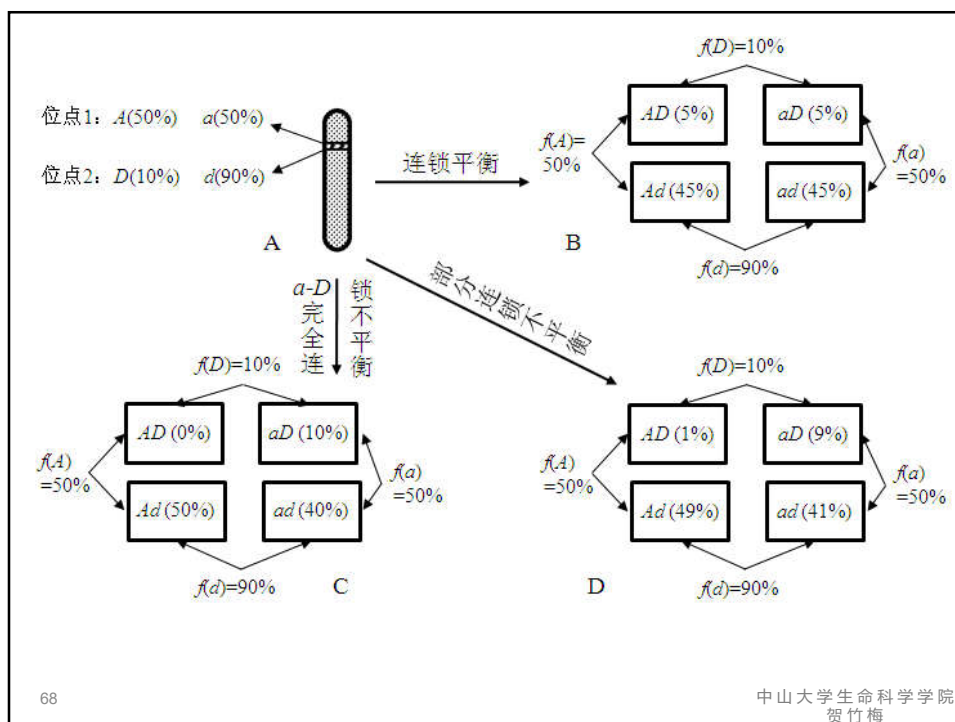
在**家系中**，重组率可通过连锁分析方法进行计算；而在**无亲缘关系**的群体中，重组以**连锁不平衡**的形式表现出来，这是进行关联分析的基础。

在某一群体中，不同座位上某两个等位基因出现在同一条单元型上的频率与预期的随机频率之间存在明显差异的现象称为**连锁不平衡 (LD)**。（如果各单元型中等位基因的频率与群体中该等位基因的频率相等，表明这些等位基因处于**连锁平衡**。）

运用基因组中的**连锁不平衡 (linkage disequilibrium)**现象能够绘制出更高分辨率的遗传图谱。

67

中山大学生命科学院
贺竹梅



68

中山大学生命科学院
贺竹梅

3. 体细胞杂交定位

- 技术：体细胞杂交
- 原理：亲缘关系较远的杂种细胞会**排出**一种亲本细胞的染色体，**只保留少数几条**。
- 分析：同线分析



69

中山大学生命科学院
贺竹梅

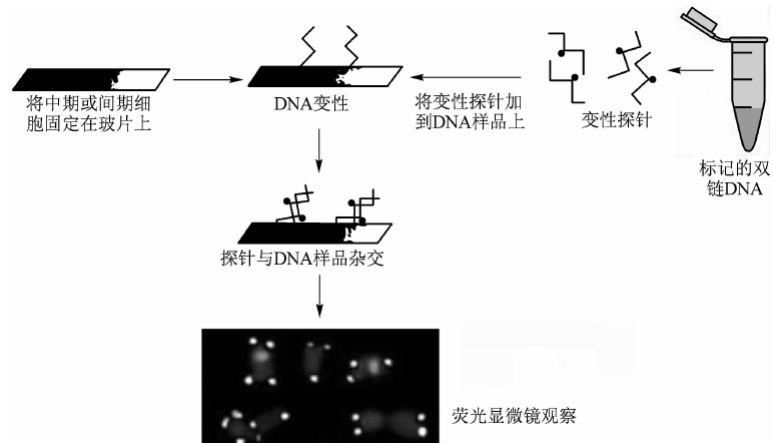
		Hybrid Cell Line				
		A	B	C	D	E
Human Gene	W	+	-	-	+	-
	X	-	+	-	+	-
	Y	+	-	-	+	-
	Z	+	+	+	-	-
Human Chromosome	1	-	+	-	+	-
	2	+	-	-	+	-
	3	-	-	-	+	+

70

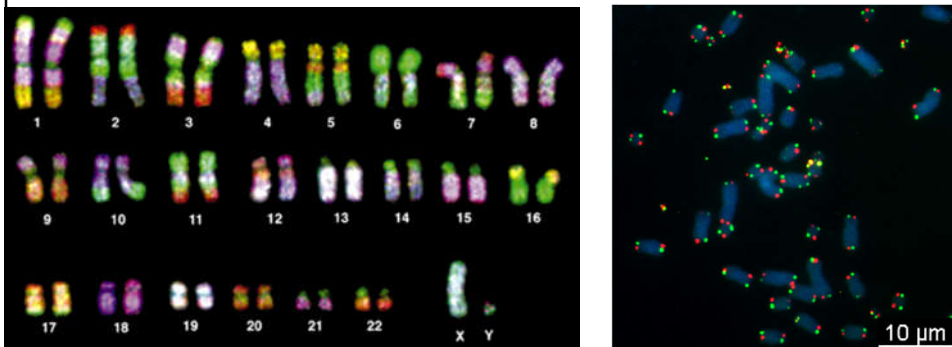
贺竹梅

4. 核酸杂交技术

- 原理：DNA/DNA杂交。
- 技术：电泳、荧光（FISH）、原位PCR
- 例子：FISH



FISH图



真菌类生物的遗传分析

真菌常被用作研究基因的克隆、表达和遗传修饰等。

酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 于1996年，第一个完成基因组测序的真核生物。



73

中山大学生命科学学院
贺竹梅

真菌被用作遗传学研究材料的优点：

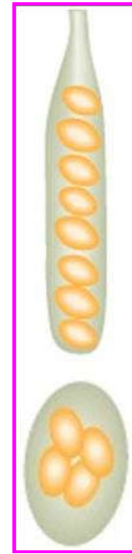
- ①个体小，生长迅速，便于培养；
- ②可在确定成分的培养基培养；
- ③具高等生物染色体，研究结果可广泛应用；
- ④无性或有性繁殖，一次杂交可产生大量后代；
- ⑤无性世代是单倍体，基因型直接在表型上反映；
- ⑥一次分析一个减数分裂产物。
- ⑦真菌是用作基因表达和遗传操作的重要真核生物，许多蛋白特别是药用蛋白已在真菌中表达。

74

中山大学生命科学学院
贺竹梅

顺序四分子分析
(如脉孢霉菌 *Neurospora crassa*)

非顺序四分子分析
(如酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和
莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii*)

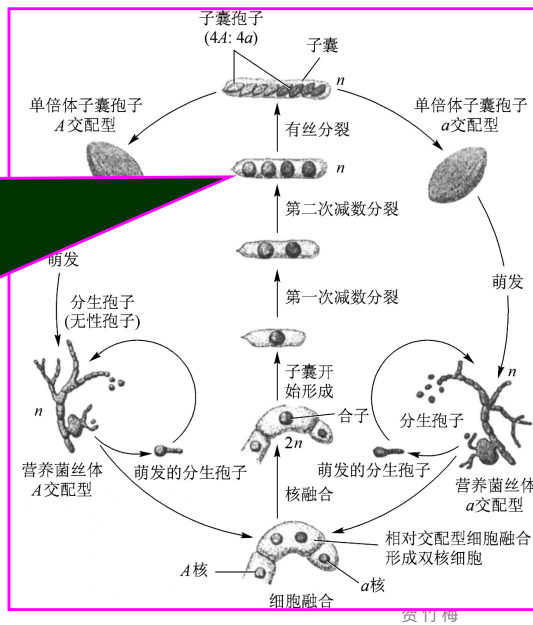


75

中山大学生命科学院
贺竹梅

1. 顺序四分子分析 (Ordered tetrad)

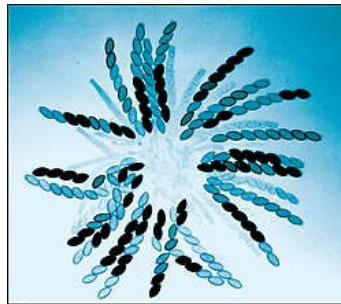
脉孢霉每个子囊的核都进行一次减数分裂，产生4个单倍体细胞核，再经一次有丝分裂形成8个核，形成子囊孢子 (ascospores)，每一子囊中8个子囊孢子是单一减数分裂产物。



76

贺竹梅

- 脉孢霉合子在子囊内进行减数分裂所形成的4个子囊孢子叫**四分子 (tetrad)**，对四分子进行的遗传分析叫**四分子分析 (tetrad analysis)**。
- 脉孢霉子囊很狭窄，子囊里的细胞核按直线顺序排列，分裂后产生的细胞就呈现有规律的排列—**顺序四分子 (ordered tetrad)**。



77

中山大学生命科学院
贺竹梅

顺序四分子分析的优点：

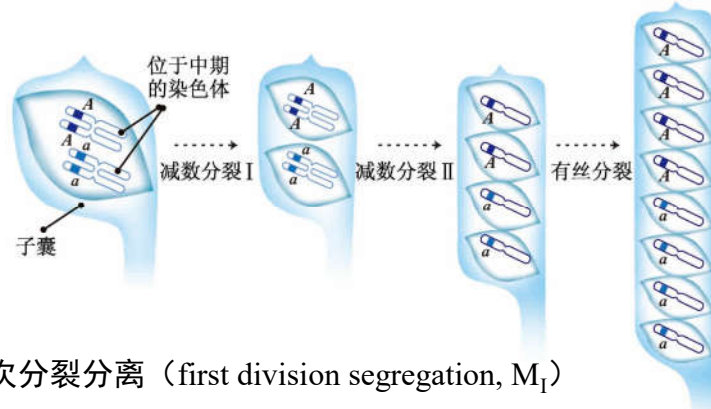
- (1) 子囊孢子是单倍体；
- (2) 子囊孢子在子囊中直线排列；
- (3) 着丝粒可看作是一个基因座。

78

中山大学生命科学院
贺竹梅

着丝粒作图

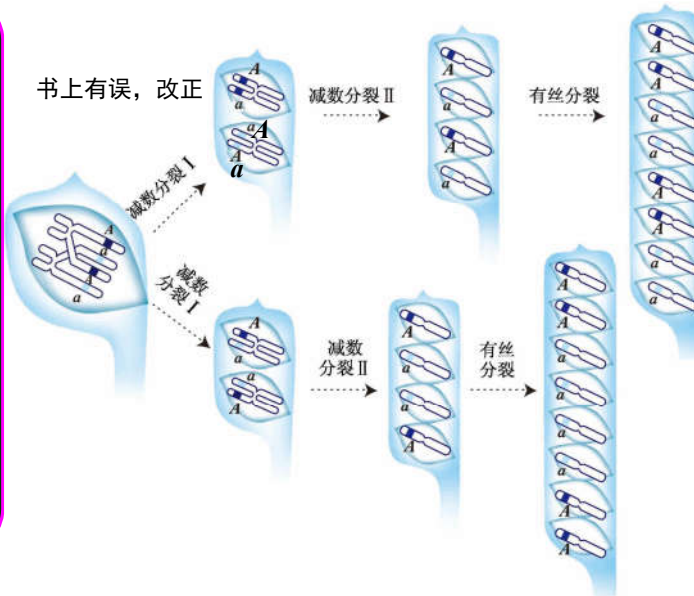
如若着丝粒和基因A之间没交换，M1时，A和a分开进入不同的两极，M2时，染色单体分开，进入四个孢子，进一步有丝分裂形成8个子囊孢子，呈AAAAaaaa（或aaaaAAAA）排列方式。



79 第一次分裂分离 (first division segregation, M_I)

科学院
每

着丝粒和基因座间发生交换，M1后，A和a仍在同一核中，M2时，A和a才进入不同核中，基因排列模式AAaaAAaa(或aaAAaaAA)。



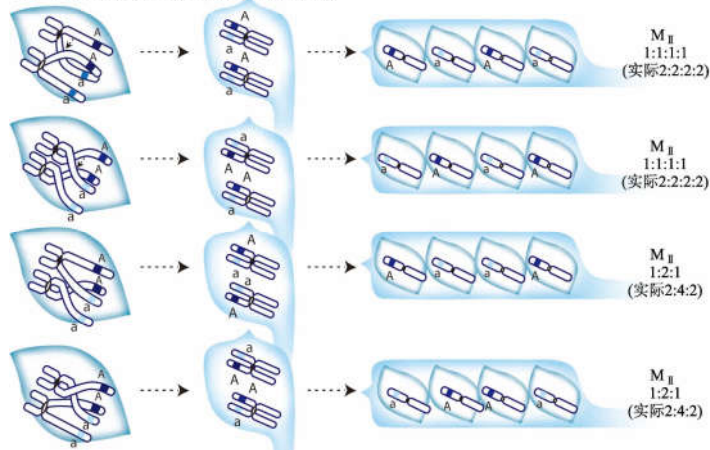
第二次分裂分离 (second division segregation, M_{II})

80

中山大学生命科学学院
贺竹梅

- MII特征：一半四分子产物中发生重组(着丝粒与基因间)，排列模式还可能出现： $AAaaaaAA$ （或 $aaAAAAaa$ ），
- 这是纺锤体随机趋向所致，“A上a下”和“A下a上”或“A下a上”和“A上a下”随机，频率相当。

B. 在A基因座与着丝粒间发生交换(4种方式)



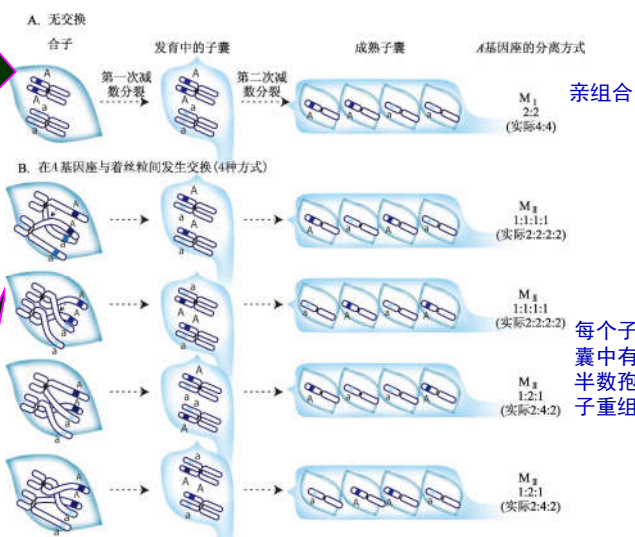
81

学院

着丝粒作图 (centromere mapping) :
以着丝粒作为一个座位计算某一基因与着丝粒间的距离。

交配型位点与着丝粒间没有交换， A 与 a 按MI的模式分开，结果产生2:2的子囊孢子表型比(图A)。

交配型位点与着丝粒间发生交换， A 与 a 的分离按MII模式，产生的4种子囊型频率相同(图B)



亲组合

每个子囊中有半数孢子重组

中山大学生命科学学院
贺竹梅

MII中，由于每发生一次交换，一个子囊中只有半数孢子发生了重组，因此，

$$\text{重组率} = (\text{交换型子囊数(MII)}/\text{子囊总数}) \times 1/2 \times 100\%$$

•问题:

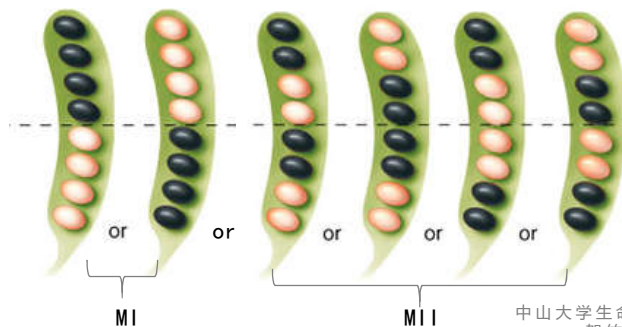
- 1、如第二次分裂分离的子囊愈多,说明有关基因和着丝粒的距离近还是远?
- 2、怎样计算基因和着丝粒间的距离?

83

中山大学生命科学院
贺竹梅


- 假设有二种不同接合型的脉孢霉菌株，
- 野生型菌株（+），子囊孢子呈黑色，
- 赖氨酸缺陷型（-），子囊孢子呈灰色。
- 将二种菌株杂交，
- 根据黑色孢子和灰色孢子的排列次序，杂种子囊中减数分裂产物共有6种子囊类型。

子囊中子囊孢子排列方式互为镜影，说明减数分裂交互过程



84

中山大学生命科学院
贺竹梅



脉孢霉 + × - 杂交子代的子囊类型

	I	II	III	IV	V	VI
子囊类型	+ + - -	- - + +	+ - + -	- + - +	+ - - +	- + + -
子囊数	105	129	9	5	10	16
分裂类型	M _I	M _I	M _{II}	M _{II}	M _{II}	M _{II}
是否交换型	非交换型		交换型			

一半除以子囊总数即得重组值

中山大学生命科学学院
贺竹梅

85

- 根据以上分析，合成赖氨酸的基因与着丝粒间的重组值为：

$$\bullet \frac{M_{II} \times \frac{1}{2}}{M_I + M_{II}} \times 100\% = \frac{(9 + 5 + 10 + 16) \times \frac{1}{2}}{105 + 129 + 9 + 5 + 10 + 16} = 7.3\%$$

- 合成赖氨酸的基因与着丝粒间的图距为7.3 cM。

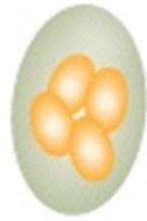
86

中山大学生命科学学院
贺竹梅

2. 非顺序四分子分析 (unordered tetrad)

酵母减数分裂及其分析特点:

- 1、每次减数分裂的4个分生孢子都保存在一个子囊中;
- 2、四分子在子囊中非直线排列。
- 3、由于子囊孢子在子囊中不是顺序排列，不能着丝粒作图。



87

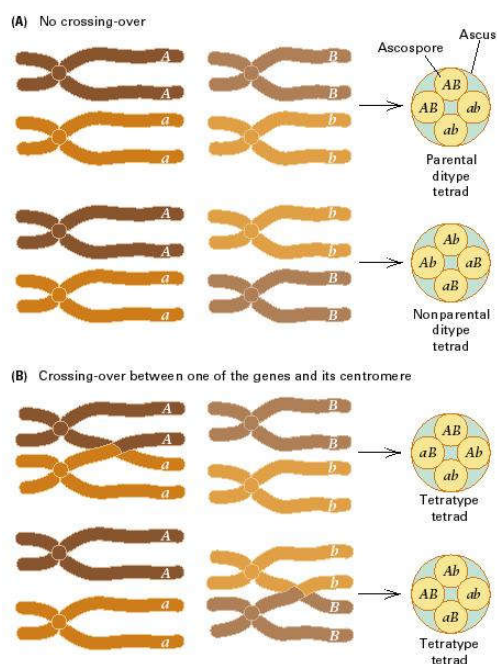
中山大学生命科学院
贺竹梅

当二对基因位于不同染色体上时， $ab \times AB$ ，如不考虑孢子排列顺序，只考虑组合，可将子囊分为3种类型

PD型：四条染色单体都是亲组合；

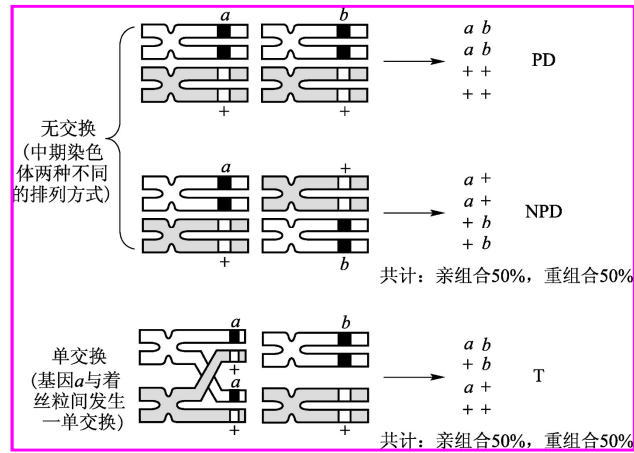
NPD型：四条染色单体都是重组组合。

T型：两条染色单体是重组组合，另外两条是亲组合；



88

当二对基因位于不同染色体上时，不管是否发生交换，后代四分孢子中，亲本类型和重组类型均各占50%，符合自由组合规律。



规律：如果PD=NPD，二个基因是自由组合的

89

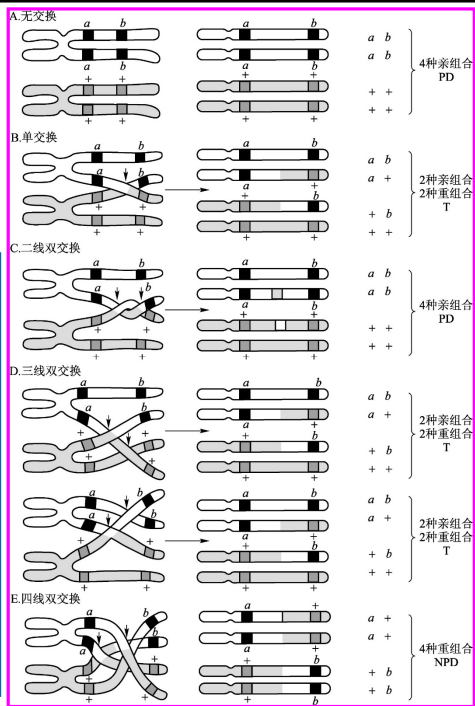
中国大学生命科学学院
贺竹梅

当两对基因连锁时，产生亲二型和非亲二型频率不同。如两基因间无交换，将产生PD型子囊（图a）；在两基因间发生单交换，将产生T型子囊（图b）；

在两基因间发生二线双交换，因无重组子代，仍为PD型子囊（图c）；在两基因间发生三线双交换，因涉及四条染色体中的三条，则有两种方式，但都产生T型子囊（图d）；在两基因间发生四线双交换，将产生NPD型子囊（图e）。

PD：通过非交换和二线双交换产生，
NPD：仅通过四线双交换产生，
四线双交换：是四种可能双交换之一（图c, d, e），非常少。

90



问题：当知道二个基因连锁后，如何计算两个基因之间的重组频率？

重组频率计算总公式：重组子数目/总后代数

其中：重组子数目 = $\frac{1}{2} T + \text{NPD}$

\therefore 重组频率 = $(\frac{1}{2} T + \text{NPD}) / \text{总子囊数} \times 100\%$

91

中山大学生命科学院
贺竹梅

四分子分析总结

	非顺序四分子	顺序四分子
Example	酵母	脉孢霉
Gene-Gene Distance	$\text{RF} = \frac{1/2T + \text{NPD}}{\text{total}}$	$\text{RF} = \frac{1/2T + \text{NPD}}{\text{total}}$
Gene-centromere Distance	/	$\frac{1}{2} M_{II} / \text{total}$

92

中山大学生命科学院
贺竹梅

有丝分裂交换与基因定位

正常情况下分裂分离和重组是在减数分裂中发生，但实验证据表明在有的有机体中交换也可发生在有丝分裂中，这叫做体细胞交换。

93

中山大学生命科学院
贺竹梅

1936年，C. Stern首次在果蝇中发现。
在果蝇X染色体上有两对连锁基因：

y (黄体)对 y^+ (灰体)隐性，

sn (短曲刚毛)对 sn^+ (长直刚毛)隐性。



杂合体 ($y sn^+ / y^+ sn$) 雌果蝇表现出野生型的灰体直刚毛。

94

中山大学生命科学院
贺竹梅

$(y^+ sn / y^+ sn)$ ♀ × $(y sn^+ / Y)$ ♂
 灰体曲刚毛 黄体直刚毛

↓
 $(y^+ sn / y sn^+)$ ♀
 灰体直刚毛

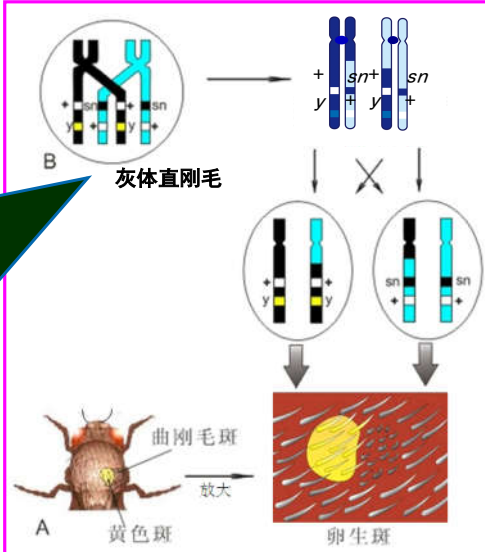



Stern发现，在某些雌果蝇身上出现孪生斑（twin spots），即两块互相靠近而面积大小相当的斑点，一块为黄色，一块为曲刚毛，呈镶嵌表型，孪生斑周围都是野生型表型（灰体直刚毛）。

95 中山大学生命科学学院
贺竹梅

- 孪生斑发生频率高，并非偶然，且孪生斑两部分相连，应是交互产物。不能用体细胞突变解释，应是体细胞在有丝分裂中发生了同源染色体间交换所产生。

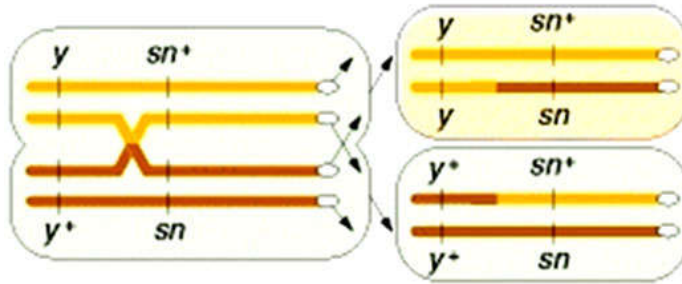
• 在杂合子位点和着丝粒之间发生一个**有丝分裂交换**，交换后，由于**染色单体的随机定向**，在其后代细胞中就会产生**等位基因的纯合**，出现孪生斑。



96

问题：

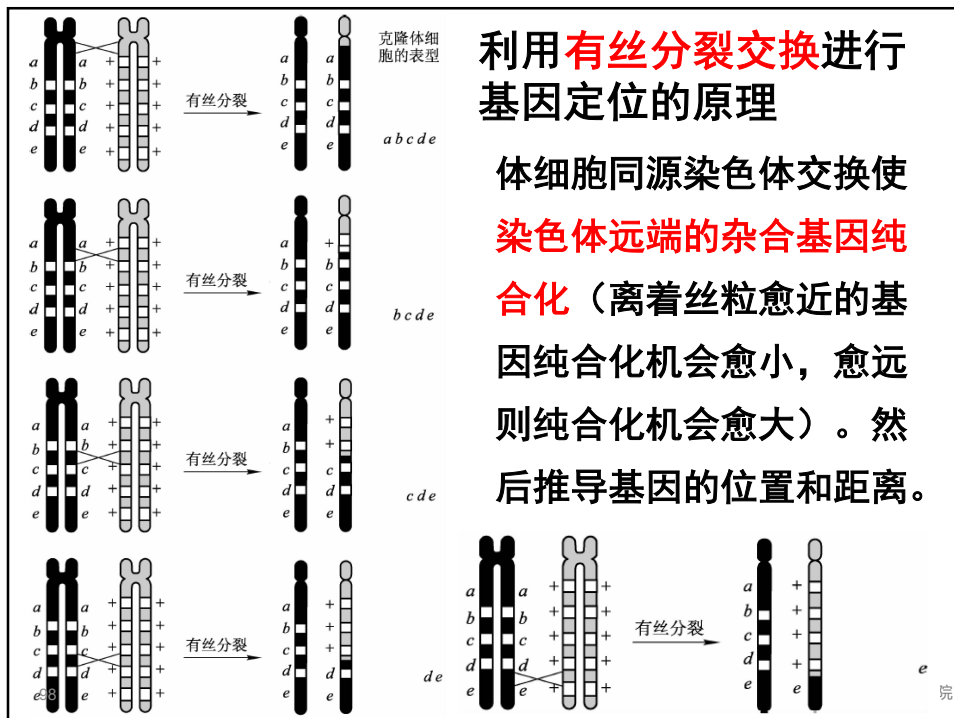
如果交换发生在 y 和 sn 之间会出现怎样的情况？



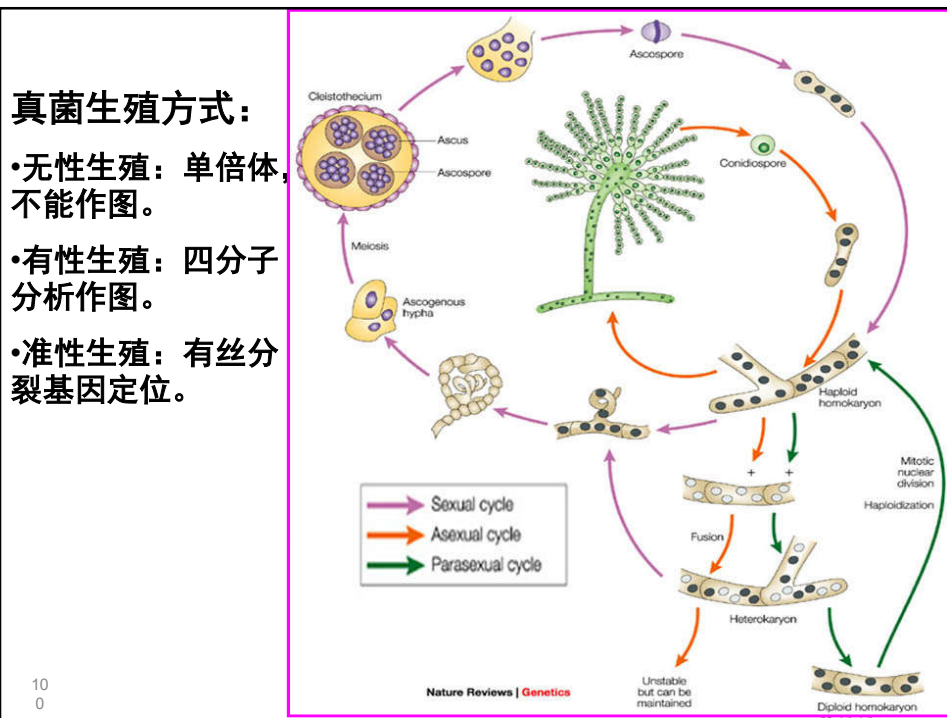
注意：姐妹染色单体分向不同细胞

97

中山大学生命科学院
贺竹梅



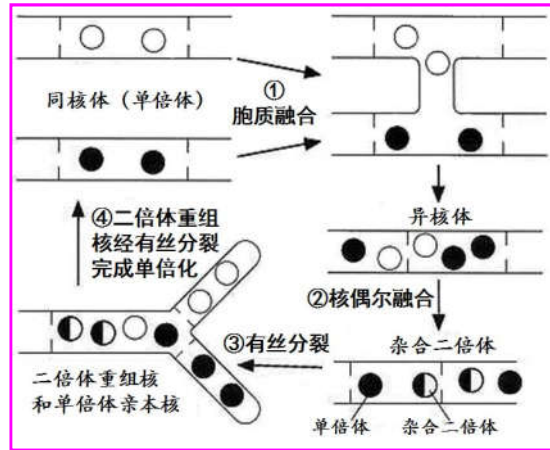
有丝分裂作图对那些非有性生殖生物如黑曲霉、酱油曲霉等的基因定位具有一定价值。



准性生殖 (Parasexual cycle) :

- ①在多核菌丝中形成异核体；
- ②在异核体中不同基因型的单倍体核偶尔融合；
- ③二倍体融合核进行有丝分裂交换形成二倍体重组核；
- ④二倍体重组核经有丝分裂完成单倍化。

准性生殖是真菌遗传变异的一个重要来源

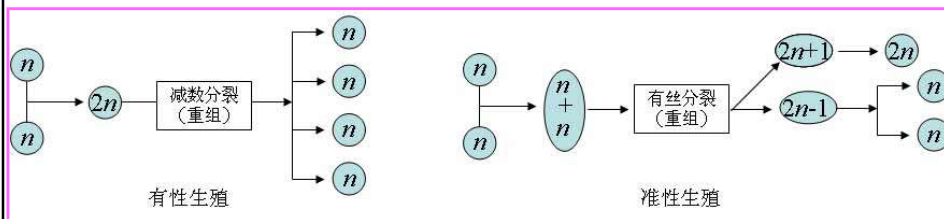


10
1

准性生殖通过有丝分裂而非减数分裂单倍体化

染色体一分二时，产生不离开行为而趋向同一极，结果产生缺少一条染色体和多一条染色体的子细胞。

则 $2n-1$ 常进一步失去其他染色体而最终形成单倍体。



有性生殖和准性生殖产生孢子和发生重组的差异

10
2

中山大学生命科学院
贺竹梅