

**ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ И
ОБНАРУЖЕНИЯ ГИБРИДОВ У СТЕРЛЯДИ (*ACIPENSER RUTHENUS* L.)**

О.Ю. Конева, Е.А. Ровба, М.И. Лесюк, А. М. Слуквин

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,
220027, Республика Беларусь, Минск, ул. Академическая, 27,
e-mail: A.Slukvin@igc.bas-net.by*

**EFFICIENT METHOD OF SPECIES IDENTIFICATION AND DETECTION
OF STERLET'S HYBRIDS (*ACIPENSER RUTHENUS* L.)**

O. Koneva, E. Rovba, M. Lesjuk, A. Slukvin

*Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus,
220027, Akademicheskaya Street, 27, Minsk, Republic of Belarus,
e-mail: A.Slukvin@igc.bas-net.by*

Реферат. Цель работы – оценить эффективность использования микросателлитных маркеров митохондриальной ДНК для определения видовой принадлежности и обнаружения гибридов у стерляди (*Acipenser ruthenus* L.), выращиваемой в рыбоводных хозяйствах Республики Беларусь.

Анализ D-петли мтДНК у 41 экз. производителей стерляди с помощью видоспецифичных праймеров для стерляди (RutF – длиной ДНК-фрагментов – 190 п.о.) и белуги (HusF – длиной ДНК-фрагментов – 374 п.о.) показал, что выделенные и проанализированные мтДНК производителей на 100% являются стерляжьими. В ПЦР с парой праймеров, видоспецифичной для белуги, наработки ПЦР-продукта не наблюдалось.

Установлено, что среди изученных производителей гибридных форм стерляди нет.

Изучение мтДНК является эффективным способом для видовой идентификации и обнаружения гибридов в стадах производителей у стерляди.

Ключевые слова: стерлядь, белуга, микросателлитные маркеры мтДНК, гибриды.

Abstract. The objective of work is to estimate the efficiency of using microsatellite markers of mitochondrial DNK for identifying species attribute and discovery of sterlet's hybrids (*Acipenser ruthenus* L.) grown in fish farms of the Republic of Belarus.

Analysis of D-loop mitochondrial DNK with 41 bions of starlet spawners by means of species specific primers for sterlet (Ruf- length of DNK fragments-190 p.o.)

and great sturgeon (Ruf- length of DNK fragments 374 p.o.) showed that the extracted and analyzed spawners' mitochondrial DNK for 100% belong to sterlet. In PCR with a couple of primers species- specific for great sturgeon, accumulation of PCR product was not observed.

It was ascertained that among the spawners under study no sterlet hybrid forms are found.

Study of mitochondrial DNK represents the efficient method for species identification and detection of hybrids in sterlet spawners stock.

Key words: sterlet, great sturgeon, mitochondrial DNK microsatellite markers, hybrids.

Введение

При анализе литературы, как в природе, так и при выращивании в аквакультуре среди видов осетровых, в том числе у видов с разной ploидностью, встречаются гибридные особи [1,2]. Анализ мтДНК позволяет определить видовую принадлежность гибрида по материнской линии, а происхождение гибрида по отцовской линии определяется присутствием у гибрида аллелей, не характерных для материнского вида [1].

Материал и методика

1.1. Отбор и подготовка проб для анализа

В ходе экспедиций 13-15 мая 2014 г. и 5-9 ноября 2014 г. в ОАО «Рыбхоз «Полесье» (Республика Беларусь, Брестская область) были помечены с помощью внешних Т-образных меток 41 особь из маточного стада стерляди (*Acipenser ruthenus* L.), выращиваемой в хозяйстве (метки с зелёными флажками, №№ 101-139, 141, 142) (рисунок 1). Параллельно с мечением осуществлялся забор биологического материала (кусочек плавника) для молекулярно-генетических исследований.

Отобранный материал был законсервирован в 96% этаноле и помещен для хранения в холодильную камеру (-20 °C).

Далее приступили к процедуре выделения ДНК из отобранных образцов тканей.



Рисунок 1 – Мечение особей стерляди и забор биологического материала рыб для молекулярно-генетического анализа

1.2. Выделение ДНК из образцов тканей рыб

Выделение ДНК производили методом фенол-хлороформной экстракции. Для этого образцы тканей помещали в центрифужные пробирки типа Эппендорф (1,5 мл), заливали 500 мкл лизирующего буфера и инкубировали в течение ночи при температуре +37 °С, затем один час при +65 °С. Лизирующий буфер содержал 10 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 10 мМ ЭДТА (рН 8.0), 50 мМ NaCl, 2% SDS, 1 мМ дитиотрейтола (DTT). Непосредственно перед лизисом в буфер добавляли раствор протеиназы К (20 мг/мл) до конечной концентрации 100 мкг/мл. После завершения лизиса проводили депротенинизацию лизата фенол-хлороформной смесью. Для этого к лизату приливали 500 мкл фенол-хлороформной смеси. Пробирки аккуратно взбалтывали. Центрифугировали при 12000 об./мин. в течение 10 мин., верхнюю водную фазу переносили в чистые пробирки. Данную процедуру повторяли 2 раза. Далее для более полной очистки ДНК и удаления остатков фенола к супернатанту добавляли 500 мкл

хлороформа, образцы аккуратно взбалтывали, центрифугировали при 12000 об./мин. в течение 10 мин., водную фазу переносили в чистые пробирки.

ДНК осаждали охлаждённым до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 96% этанолом (1 мл/пробирку), образцы оставляли на ночь при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем центрифугировали при 12000 об./мин. в течение 10 мин. Спирт сливали. Осадок промывали 70% этанолом (1 мл). Далее осадок высушивали при комнатной температуре на воздухе и растворяли в 100 мкл деионизированной воды.

Концентрацию и чистоту выделенной ДНК определяли на спектрофотометре NanoPhotometer P360 (Implen, Германия). Спектрофотометрический анализ степени загрязнения полученных препаратов ДНК белками проводили на основе соотношения коэффициентов поглощения A_{260}/A_{280} (норма в диапазоне 1,8-2,0).

Значения коэффициента A_{260}/A_{280} и концентрация ДНК в препаратах из отобранных образцов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Концентрация и чистота выделенной ДНК

Название образца	Соотношение коэффициентов поглощения A_{260}/A_{280}	Концентрация, нг/мкл
101	1,950	385,0
102	1,950	570,0
103	2,011	448,0
104	1,944	612,0
105	1,961	623,0
106	1,950	360,0
107	2,029	350,0
108	1,971	838,0
109	1,942	505,0
110	1,937	538,0
111	1,978	445,0
112	1,932	565,0
113	1,925	448,0
114	1,946	360,0
115	1,941	660,0
116	1,915	733,0
117	1,927	462,0

Продолжение таблицы 1

118	1,948	652,0
119	1,917	345,0
120	2,018	555,0
121	2,000	315,0
122	1,931	280,0
123	1,911	215,0
124	1,925	193,0
125	1,988	428,0
126	1,989	468,0
127	2,000	225,0
128	2,080	130,0
129	2,043	118,0
130	1,962	128,0
131	1,929	405,0
132	1,979	238,0
133	2,036	143,0
134	2,042	123,0
135	2,048	108,0
136	1,914	168,0
137	1,974	188,0
138	2,051	200,0
139	2,025	202,0
141	2,000	215,0
142	2,083	125,0

Качество выделенной ДНК проверяли электрофоретически в 2% агарозном геле (Conda) (рисунок 2). Фракция фрагментов ДНК размером 10-20 тыс. пар оснований (п.о.) и более составляла большую часть от общего количества выделенной ДНК, что говорит о пригодности выделенной ДНК для дальнейшего анализа.

1.3. Амплификация диагностических локусов ДНК

Идентификация видовой принадлежности осетровых рыб с помощью ПЦР с использованием видоспецифичных праймеров к мтДНК

Для определения и подтверждения видовой принадлежности особи семейства Осетровых применяется амплификация участков D-петли мтДНК, специфичных для определенного вида осетров [1].

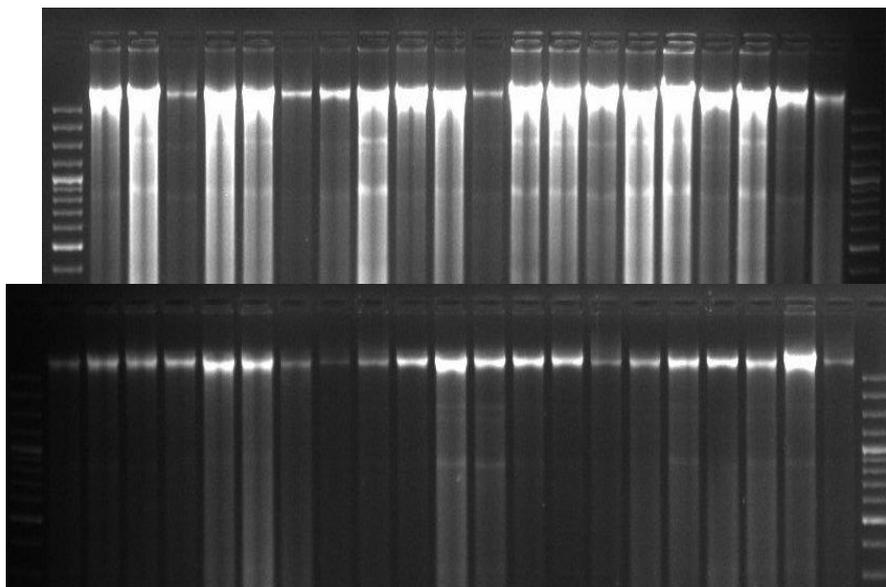


Рисунок 2 – Электрофореграммы с выделенной ДНК из образцов стерляди ОАО «Рыбхоз «Полесье» №№ 101-139, 141, 142

ПЦР осуществляли с использованием амплификатора C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Для анализа использовали следующий состав ПЦР-смеси (таблица 2):

Таблица 2 – Состав ПЦР-смеси и объём компонентов для проведения амплификации участков D-петли мтДНК, специфичных для определенного вида осетров

Компоненты ПЦР-смеси	Конечная концентрация компонентов (объём)
10x ПЦР-буфер с NH ₄ ⁺	1x (2 мкл)
10x смесь дНТФ	2,0 мМ/мкл (2 мкл)
50 мМ MgCl ₂	2,5 мМ (1 мкл)
Праймер прямой (F)	10 пМ/мкл (1 мкл)
Праймер обратный (R)	10 пМ/мкл (1 мкл)
Тaq-полимераза (5 ед./мкл)	0,05 ед./мкл (0,2 мкл)
ДНК-матрица	20-30 нг/мкл (1 мкл)
Mili-Q вода	11,8 мкл
Общий объём ПЦР-смеси	20 мкл

Проведен анализ двух локусов D-петли мтДНК исследуемых образцов (таблица 3), специфичных для белуги и стерляди, так как наиболее часто встречаемым гибридом стерляди с другими осетровыми является гибрид стерляди и белуги.

Таблица 3 – Праймеры к участкам D-петли мтДНК для видовой идентификации осетровых рыб

Название	Последовательность (5'-3')	Используется я с праймером	Длина продукта (п.о.)	Видоспецифичность
AHR	TATACACCATTATCTCTATGT	все		Все виды
HusF	TATCTATTACCTGCGAGCAGGCTG	AHR	374	Белуга
RutF	GGGAATAACCGTTAATTTGG	AHR	190	Стерлядь

ПЦР проводили при следующих условиях (рисунок 3):

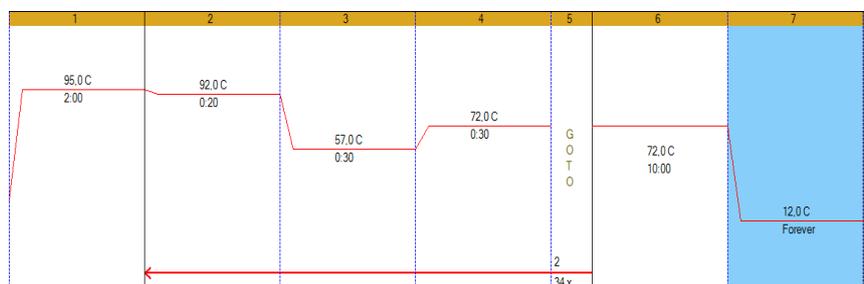


Рисунок 3 – Протокол проведения ПЦР участков D-петли мтДНК, специфичных для определенного вида осетров

Продукты ПЦР наносили на 2% агарозный гель (на 1x TBE-буфере) и разгоняли 45 мин. при напряжении 5 В/см. Определение вида осетровых рыб проводилось по наличию ПЦР-фрагмента определённой длины в реакции с видоспецифическими праймерами. В реакциях с другими праймерами ПЦР-продукт должен отсутствовать.

1.4. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации и обработка полученных результатов

Разделение продуктов ПЦР по участку D-петли мтДНК проводили с

помощью горизонтального электрофореза (Biometra, Германия) в 2% агарозном геле (Conda) в 1×TBE-буфере.

Визуализацию ПЦР-продуктов осуществляли с помощью системы геле-документирования GelDoc XR (Bio-Rad, США). Полученные изображения обрабатывали с помощью программы Quantity One 4.4 (Bio-Rad, США).

Разделение продуктов амплификации по микросателлитным локусам осуществляли при помощи капиллярного электрофореза. Для проведения фрагментного анализа использовали генетический анализатор (секвенатор) Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (длина капилляров – 50 см, полимер POP-7). Полученные данные подвергались дальнейшей компьютерной обработке с помощью программы GeneMapper 4.1.

Результаты и обсуждение

Анализ D-петли мтДНК с помощью видоспецифичных праймеров для стерляди (*Acipenser ruthenus* L.) и белуги (*Huso huso* L.) показал, что анализируемые мтДНК являются стерляжьими, так как в ПЦР с видоспецифичной парой праймеров наблюдали наработку ПЦР - продукта с характерной для стерляди с длиной ДНК-фрагментов – 190 п.о. (рисунки 5,6) [1].

В ПЦР с парой праймеров, видоспецифичной для белуги, наработки ПЦР-продукта не наблюдалось.

Таким образом, можно заключить, что анализируемые образцы производителей осетровых рыб являются стерлядью.

Также в ходе выполнения исследований было установлено, что необходимо избегать постановки мультиплексной ПЦР с парами праймеров, видоспецифичными для стерляди и белуги, так как в результате мультиплексной ПЦР получают дополнительные ПЦР – продукты, которые отсутствуют при раздельном проведении ПЦР с парами праймеров HusF-AHR, RutF-AHR (рисунок 7).

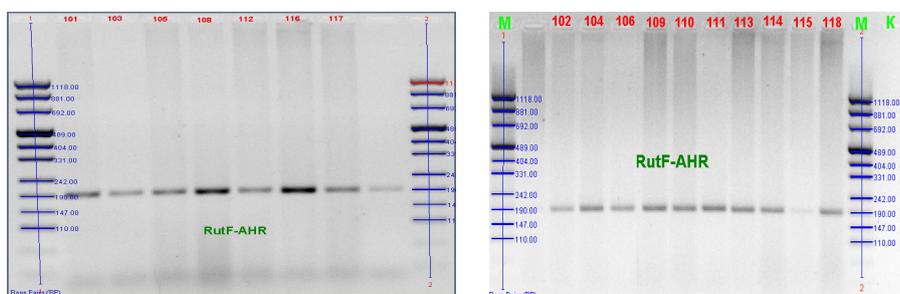
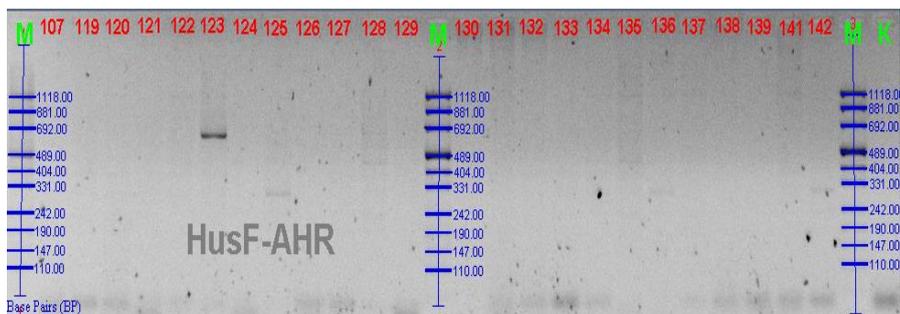
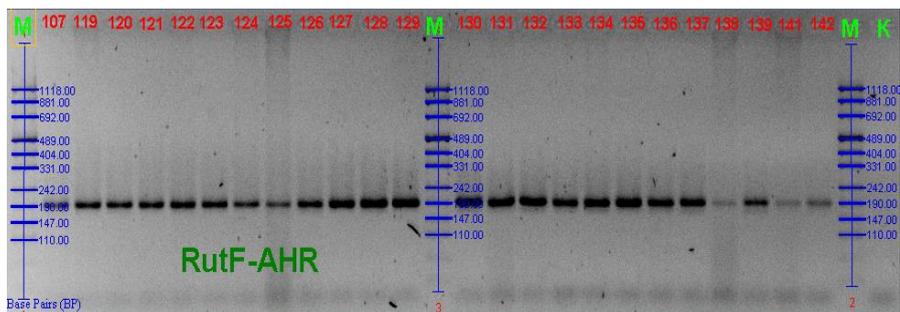


Рисунок 5 – Электрофореграмма с продуктами амплификации с праймерами к мтДНК стерляди (RutF-AHR) и белуги (HusF-AHR); *K* – контроль, *M* – маркер молекулярного веса pUC Mix Marker, 8 (Fermentas)

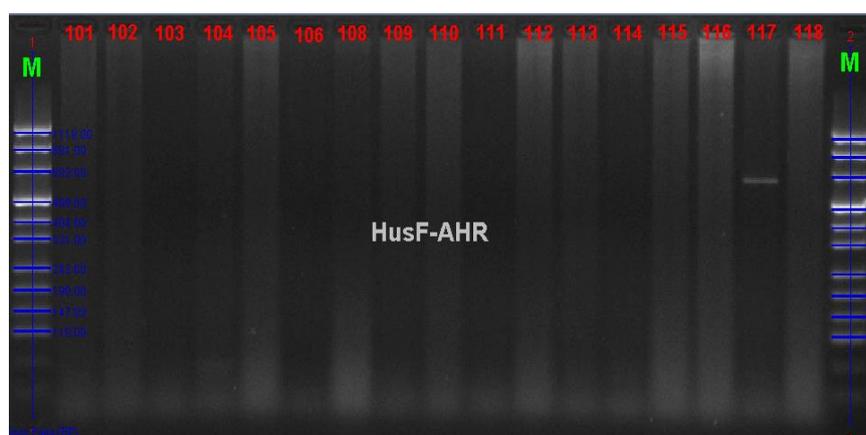


Рисунок 6 – Электрофореграмма с продуктами амплификации с праймерами к мтДНК стерляди (RutF-AHR) и белуги (HusF-AHR); *K* – контроль, *M* – маркер молекулярного веса pUC Mix Marker, 8 (Fermentas)

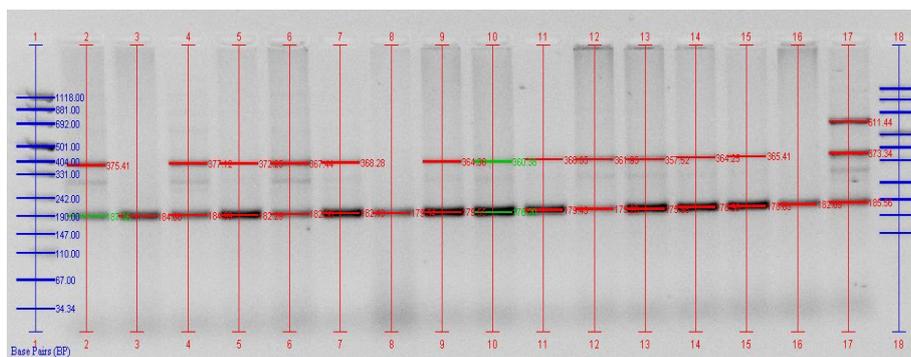


Рисунок 7 – Электрофореграмма с продуктами мультиплексной амплификации с праймерами к мтДНК стерляди и белуги (HusF-RutF-AHR) (маркер молекулярного веса pUC Mix Marker, 8 (Fermentas))

Заключение

По результатам молекулярно-генетического анализа D-петли мтДНК установлено, что по материнской линии проанализированные производители в ОАО «Рыбхоз «Полесье» (Республика Беларусь) относятся к виду осетровых – стерлядь (*Acipenser ruthenus* L.). Гибридов среди производителей не выявлено.

Список использованных источников

1. Мюге Н.С. 2008. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов / Н.С. Мюге, А.Е. Барминцева, С.М. Расторгуев, В.Н. Мюге, В.А. Барминцев // Генетика. – Т. 44, №7. – С. 913-919.
2. Барминцева А.Е. 2013. Использование микросателлитных локусов для установления видовой принадлежности осетровых (*Acipenseridae*) и выявления особей гибридного происхождения / А.Е. Барминцева, Н.С. Мюге // Генетика животных. – Т. 49, №9. – С. 1093-1105.