

ДУБІН О.В., канд. с.-г. наук

ШОСТАК Л.В., аспірант

ДИМАНЬ Т.М., д-р с.-г. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

ПЛР-ПДРФ-АНАЛІЗ ГЕНА ЦИТОХРОМУ Б ЯК МЕТОД ВИДОВОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ОСЕТРОВИХ ВИДІВ РИБ

Проведено множинний елаймент нуклеотидних послідовностей гена цитохрому б чотирьох видів осетрових риб та визначено консервативні і поліморфні ділянки мтДНК. Підбрано універсальні праймери для ампліфікації загального для всіх досліджених видів ПЛР-продукту з молекулярною масою 655 н.п. На підставі отриманої рестрикційної карти для проведення ПЛР-ПДРФ обрано дві рестриктази – *BsaII* та *MseI*, за використання яких отримано унікальні патерни для севрюги і білуги. Російський та сибірський осетри мали однакові спектри продуктів рестрикції.

Ключові слова: осетрові, мітохондріальний геном, множинний елаймент, олігонуклеотидні праймери, ПЛР-ПДРФ.

Постановка проблеми. Висока комерційна вартість ікри осетрових видів риб та постійно високий попит на міжнародному ринку призвели до катастрофічного зменшення чисельності осетрових видів риб. Представники родини *Acipenseridae* нині перебувають під загрозою повного зникнення.

Важливим елементом програм збереження і відновлення чисельності популяцій осетрових риб є розроблення методів визначення видової належності осетрових. Традиційно видову ідентифікацію дорослих особин проводять за комплексом морфологічних характеристик (пластичних і меристичних ознак). Однак у більшості випадків ці методи не дають змоги проводити досконалий аналіз видової належності ікри та молоді.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. У розвинутих країнах для вирішення цієї проблеми широко застосовують новітні методи досліджень геномів риб, більшість з яких базується на використанні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Основною вимогою для застосування того чи іншого методу видової ідентифікації є висока достовірність, простота та низька вартість аналізу. Цим критеріям відповідає метод рестрикційного аналізу продуктів ампліфікації (ПЛР-ПДРФ).

Метою роботи було розроблення методики видової ідентифікації севрюги, білуги, російського та сибірського осетрів за використання методу ПЛР-ПДРФ.

Матеріал і методика досліджень. У роботі було використано послідовності гена цитохрому б досліджених видів риб, депоновані у банку нуклеотидних послідовностей GenBank (NCBI) (табл. 1).

Таблиця 1 – Використані у роботі нуклеотидні послідовності мтДНК осетрових

| Вид | Номер послідовності у GenBank |
|-------------------|--|
| Російський осетер | AF238693-AF238699, AF238682-AF238690, AF238673-AF238679, AJ245826, AJ245827, AF238662-AF238669 |
| Сибірський осетер | AF238625-AF238631, AF238655- AF238658, AF238644-AF238654 |
| Севрюга | AY846701, AY846689, AY846700, AY846680-AY846688, AJ249693 |
| Білуга | AY846704-AY846716 |

Вирівнювання послідовностей (множинний елаймент) проводили за допомогою комп'ютерної програми Mega4 за використання моделі максимальної комбінованої правдоподібності [1]. Підбір та визначення термодинамічних показників праймерів проводили за використання програм GeneRunner (Hastings Software, США) та FastPCR [2].

Аналіз сайтів рестрикції та вибір відповідних ендонуклеаз рестрикції здійснювали за використання комп'ютерної програми NEBcutter V.2.0 [3]. Рестрикцію продуктів ПЛР проводили за використання ферментів *Bsa*II та *Mse*I (Fermentas, Литва).

Препарати ДНК виділяли з фіксованих у 96 % етанолі плавців риб за методикою сорбції ДНК на силіцій оксиді [4] з власними модифікаціями. ПЛР проводили на ампліфікаторі Терцик (ДНК-Технологія, Росія). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20, 2,0 мМ dNTP, 1 од. *Tag*-полімерази, 50 нг геномної ДНК, 1,7 мМ MgCl₂ та по 0,2 мкМ кожного праймера.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації та рестрикції здійснювали у 2 %-ному агарозному гелі за використання 1×TBE-буфера. Після закінчення електрофорезу гель обробляли бромистим етидієм (0,5 мкг/мл) та фотографували за допомогою відеосистеми GelDoc XR System (BioRad, США). Молекулярну масу ПЛР-продуктів визначали за маркером GeneRuler 100 bp (Fermentas, Литва).

Результати досліджень та їх обговорення. Поліморфізм гена цитохрому б досліджували за використання мтДНК російського осетра (44 зразки), сибірського осетра (22 зразки), севрюги (23 зразки) та білуги (12 зразків). За результатами проведеного вирівнювання нуклеотидних послідовностей було визначено консервативні та поліморфні ділянки цього гена (рис. 1).

| | |
|---|-----|
| H. huso | 8 |
| GCSTTATTACASAAATCTTAACAGGACTATTTCTT GCAATACACTACACAGCTGACA TCT | |
| A. stellatus | 1 |
|C.....C.....T. | |
| A. baerii | 14 |
|G.C.....C.....T. | |
| A. gueldenstaedtii | 14 |
|G.C.....C.....T. | |
| H. huso | 668 |
| ACCCSCTTGT ACTCCCCACACATCAAGCCCGAATGATACTTTCTCTTTGCCTACGCCA | |
| A. stellatus | 661 |
| .T.....C..... | |
| A. baerii | 674 |
|C..... | |
| A. gueldenstaedtii | 674 |
|C..... | |

Рис. 1. Нуклеотидний елаймент ділянок гена цитохрому б осетрових (позиції обраних праймерів позначено курсивом).

Ампліфікацію ділянки гена цитохрому б у всіх досліджених видів риб проводили за використання підібраних універсальних праймерів з послідовностями *GCAATACACTACACAGCTGACA* та *GCTTGATGTGTGGGGGAGT*. Враховуючи повну гомологію між праймерами та всіма наявними послідовностями гена цитохрому б, ПЛР проводили за "жорстких" умов ампліфікації (висока температура відпалу праймерів (62 °С) та низька концентрація йонів магнію у реакційній суміші (1,7 мМ)). Температурний режим ПЛР був таким: початкова денатурація – 4 хв за температури 94 °С; 36 циклів: 30 с за 94 °С, 30 с за 62 °С; 1 хв за 72 °С; термінальна елонгація – 5 хв за 72 °С.

Чутливість та специфічність обраних праймерів визначали за ампліфікації зі зразками осетрових видів риб. Як видно з електрофореграми, наведеної на рисунку 2, з ДНК всіх досліджених видів отримано специфічний ПЛР-продукт з молекулярною масою 655 н.п.

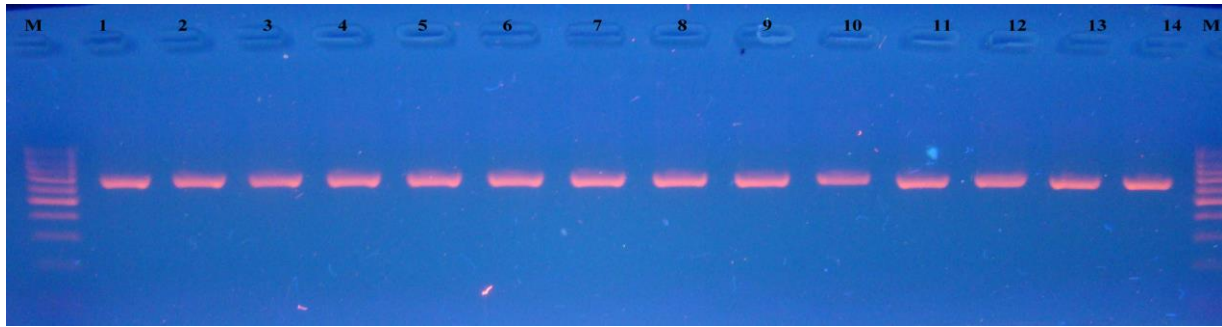


Рис. 2. Ампліфікація ділянки гена цитохрому б осетрових: М – маркер молекулярної маси; 1–4 – російський осетер; 5–7 – сибірський осетер; 8–11 – севрюга; 12–14 – білуга.

За використання комп'ютерної програми NEBcutter V.2.0 було побудовано рестрикційну карту ділянки цитохрому б осетрових видів риб, яка загалом включала 54 рестриктази. У результаті аналізу наявних сайтів рестрикції ПЛР-продукту для проведення ПЛР-ПДРФ було обрано 2 рестриктази – *BsaI* та *MseI*, використання яких уможливлювало диференціацію досліджених видів. За картиною рестрикції російський та сибірський осетри мали ідентичні фрагменти з молекулярною масою 478 н.п. та 116 н.п. Для білуги були характерні 3 продукти рестрикції: 247 н.п., 230 н.п. та 116 н.п. відповідно. ПЛР-продукт гена цитохрому б севрюги не мав сайтів рестрикції (табл. 2).

На електрофореграмі розділення продуктів рестрикції гена цитохрому б досліджених видів осетрових (рис. 3) показано, що теоретично розрахована молекулярна маса продуктів рестрикційного аналізу повністю збігається з практично отриманою.

Таблиця 2 – Характеристика продуктів рестрикції ділянки гена цитохрому б осетрових видів риб

| Вид | Кількість сайтів рестрикції | Рестриктази | Позиція | Молекулярна маса, н.п. |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|---------|------------------------|
| <i>A. gueldenstaedtii</i> | 2 | <i>MseI</i> | 1-478 | 478 |
| | | <i>MseI-BsaI</i> | 479-594 | 116 |
| <i>A. baerii</i> | 2 | <i>MseI</i> | 1-478 | 478 |
| | | <i>MseI-BsaI</i> | 479-594 | 116 |
| <i>H. huso</i> | 3 | <i>BsaI</i> | 1-247 | 247 |
| | | <i>BsaI-MseI</i> | 249-478 | 230 |
| | | <i>MseI-BsaI</i> | 479-594 | 116 |
| <i>A. stellatus</i> | - | - | - | - |

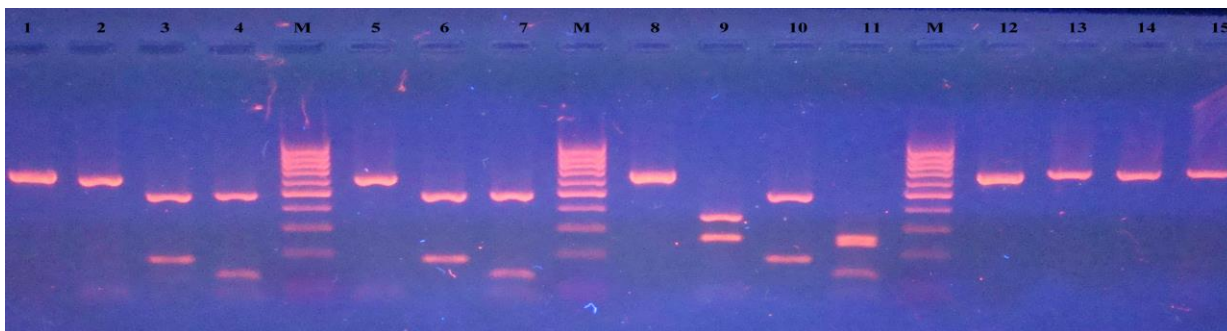


Рис. 3. ПЦР-ПДФ анализ гена цитохрому б осетрових (1–4 – російський осетер, 5–7 – сибірський осетер, 8–11 – білуга, 12–15 – севрюга): М – маркер молекулярної маси; 1, 8, 12 – ПЦР продукт; 2, 5, 9, 13 – рестрикція BseDI; 3, 6, 10, 14 – рестрикція TruI; 4, 7, 11, 15 – рестрикція BseDI + TruI.

Висновки. Таким чином, у результаті досліджень визначили консервативні та поліморфні ділянки мітохондріального гена цитохрому б чотирьох видів осетрових риб і розробили відповідні олігонуклеотидні праймери. За картою аналізу продуктів рестрикції вдалося дискримінувати зразки севрюги та білуги. Зразки російського та сибірського осетра мали ідентичні за молекулярною масою продукти рестрикції.

Отримані результати дають змогу рекомендувати метод ПЦР-ПДФ для визначення видової належності живих риб, а також аналізу харчових продуктів, джерелом яких вони є. Стосовно видової дискримінації російського та сибірського осетрів постає необхідність подальшого пошуку ефективних видових маркерів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Tamura K. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura, J. Dudley, M. Nei // Mol. Biol. Evol. – 2007. – Vol. 24. – P.1596–1599.
2. Kalendar R. FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search / R. Kalendar, D. Lee, A. H. Schulman // Genes, Genomes and Genomics. – 2009. – Vol. 3, № 1. – P. 1–14.
3. Vincze T. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes / T. Vincze, J. Posfai, R.J. Roberts // Nucleic Acids Res. – 2003. – Vol. 31. – P. 3688–3691.
4. Carter M. J., Milton I. D. An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles / M. J. Carter, I. D. Milton // Nucleic Acids Res. – 1993. – Vol.21. – P.1044–1046.

ПЦР-ПДФ-анализ гена цитохрома б как метод видовой идентификации осетровых видов рыб

А.В. Дубин, Л.В. Шостак, Т.Н. Дымань

Проведен множественный элаймент нуклеотидных последовательностей гена цитохрома б четырех видов осетровых рыб и определены консервативные и полиморфные участки мтДНК. Подобраны универсальные праймеры для амплификации общего для всех исследованных видов ПЦР-продукта с молекулярной массой 655 н.п. На основании полученной рестрикционной карты для проведения ПЦР-ПДФ выбрано две рестриктазы – *BsaI* та *MseI*, при использовании которых получены уникальные паттерны для севрюги и белуги. Русский и сибирский осетры имели одинаковые спектры продуктов рестрикции.

Ключевые слова: осетровые, митохондриальный геном, множественный элаймент, олигонуклеотидные праймеры, ПЦР-ПДФ.

PCR-RFLP analysis of the cytochrome b gene as a method for sturgeon species identification

A. Dubin, L. Shostak, T. Dyman

Conservative and polymorphic regions of mtDNA were identified by means of multiple alignment of nucleotide sequences the cytochrome b gene of four sturgeon species. The universal primers for amplification the common PCR product with a

molecular weight of 655 bp for all studied species were developed. Based on obtained restriction map for PCR-RFLP were selected two restriction enzyme - *Bsa**II* and *Mse**I*. The unique patterns were received for stellate sturgeon and beluga. Russian and siberian sturgeons had similar spectra of the restriction products.

Key words: sturgeon, the mitochondrial genome, multiple alignment, oligonucleotide primers, PCR-RFLP.