

УДК 595.384:575.17

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИК ОТБОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБ И ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК У ДЛИННОПАЛОГО РАКА (*ASTACUS LEPTODACTYLUS* *ESCH.*) ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

¹Слуквин А.М. – к. б. н.,

¹Сасинович М.А.,

²Алехнович А.В. – к. б. н.,

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,

²ГНПО «Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам»

По результатам анализа литературных источников и проведенных научно-исследовательских работ разработана методика прижизненного отбора биологических проб у длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.) для осуществления генетических исследований. Разработанная методика предусматривает наименее травматическое получение биологического материала путем удаления у трехлетков раков части пятой ходильной ноги (переоподы Y). Экспериментальным путем было установлено, что величина удаленного участка длиной 30 мм достаточна для получения необходимого количества мышечной ткани с целью выделения качественной ДНК (с двойным повтором) и не представляет опасности для жизни раков. Усовершенствована методика фенол-хлороформного выделения ДНК из биологических образцов десятиногих раков, предложен протокол проведения исследований.

Ключевые слова: длиннопалый рак, методики, биологические образцы, выделение ДНК.

Постановка проблемы. В мире год от года растет спрос на морских и пресноводных ракообразных, как деликатесного продукта питания и это закономерно. Раки являются ценными пищевыми объектами, которые по калорийности (72 ккал/100 г), содержанию жиров (2,83%), протеина (17,13%), витаминов группы В, содержанию кальция, не уступают пресноводным рыбам [12]. С точки зрения экологии, раки являются природными санитарами водоёмов, поедающими органику растительного и животного происхождения. Общеизвестный факт – чем больше раков в водоёме, тем чище считается вода. Раки всегда используются как тест-объекты в экологических исследованиях водных объектов различного типа [10].

По данным ФАО за последние десять лет (1995-2015) объем вылова и производства пресноводных ракообразных в мире возрос почти в 3 раза

и составил более 6,9 млн. тонн [13]. Успешному развитию промысла и производства раков способствуют высокие цены на ракообразных (в Финляндии до 6 евро за одного благородного рака, в Беларуси до 15 долларов за 1 кг длиннопалого рака), большая востребованность этого деликатесного продукта на внутреннем и внешнем рынках. Привлекательность данного направления связана и с безотходной технологией производства продукции ракообразных, которая обусловлена наличием в карапаксах раков хитина, меланина и хитозана, нашедших свое широкое применение от медицины (БАД-Тяньши, радиопротекторы), продуктов питания (рачьи шейки, соусы) и до сельского хозяйства (защитная обработка семян растений) [12, 15–17].

Анализ последних публикаций. Согласно литературным источникам, БССР занимала одно из первых мест в Советском Союзе по промыслу раков. Так, к 1940 г. промысловый вылов раков из естественных водоемов превышал 40 тонн [4]. После войны улов раков сильно сократился, и в 1950 г. было добыто только 17,6 тонн. В дальнейшем, уловы раков стали снижаться и в настоящее время раки в водоемах страны малочисленны, промысловый лов, практически, не ведется, а широкопалый рак с 1981 г. был даже занесен в Красную книгу Беларуси. В этой связи существует настоятельная необходимость для проведения генетических исследований в популяциях раков, с дальнейшим выделением наиболее гетерогенных, которые будут служить маточными стадами для зарачивания перспективных водоемов и увеличения промысловых запасов длиннопалого рака в водоемах Беларуси. Помимо этого, необходимо уточнить видовой статус длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.) в водоемах Республики Беларусь, который в ряде научных публикаций представлен комплексом видов [2, 10, 5–7, 9, 14, 18, 21, 24].

Постановка задания и методика исследования. С 2016 года Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси» совместно с ГНПО «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам» начаты научно-исследовательские работы на тему «Изучение генетического разнообразия водных и околотовных беспозвоночных» (Государственная программа научных исследований «Биотехнологии» 2016-2020 гг., подпрограмма 2 «Структурная и функциональная Геномика»). В рамках выполняемого проекта, впервые в Беларуси проводится изучение генетического разнообразия у длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.), обитающего в водоемах Брестской и Гомельской областей.

Основными задачами первого этапа выполнения НИР являлись:

- поиск и анализ современных методов отбора биологического материала у десятиногих раков и подбор экономически оправданных методик выделения ДНК;

- апробация эффективных и ресурсосберегающих методов и методик отбора биологического материала и выделения ДНК для изучения генетического полиморфизма у длиннопалых раков;
- создание банка биологических образцов и банка ДНК длиннопалого рака для их передачи в Республиканский банк ДНК животных микроорганизмов и растений.

Методика отбора биологического материала у десятиногих раков для генетических исследований имеет свою специфику.

По данным многих исследователей лучшим временем для отлова раков и сбора биологических проб является период спаривания, когда самки и самцы концентрируются на небольших, локальных участках водоемов, где их легко можно отловить [1, 11, 19, 20, 22, 23, 25–27]. Так как в этот период в большинстве стран существует запрет на вылов раков, то для научных целей необходимо брать разрешение на их отлов в органах охраны природы.

Поиск и анализ литературы по методикам отбора биологических проб для генетических исследований у десятиногих раков показали, что при проведении научных исследований редко используют методики декапитации животных, а в основном применяют способы прижизненного отбора биологического материала после изъятия раков из водоемов. Методики умерщвления животных, как правило, предусматривают отбор биологических образцов у целого организма раков разного возраста [1].

Для прижизненного отбора биологического материала используют преимущественно, взрослых особей (трехлетков раков) и пробы отбирают из следующих органов и частей тела: гонады, первая пара ходильных ног (клешня или переопода I); пятая пара ходильных ног (переоподы V); антенны (усики), плавательные конечности (плеоподы или брюшные ноги) [11, 19, 20, 22, 23, 25–27]. При этом способе, раков в живом виде, возвращают в водоем, из которого они были выловлены.

Результаты исследований. В результате проведенных исследований был выбран и усовершенствован прижизненный метод забора биологического материала, который осуществляется с отловленными раками непосредственно на воде или на берегу водоема. Он предусматривает наименее травматическое получение биологического материала путем удаления с помощью простерилизованных ножниц у трехлетков раков части (до 30 мм) пятой ходильной ноги (переоподы V). Все манипуляции с раками при отборе биологических проб выполняются в резиновых перчатках на руках и марлевых повязках на лице.

Экспериментальным путем было установлено, что величина удаленного участка пятой ходильной ноги у рака длиной 30 мм вполне достаточна, чтобы с двойным повтором получить необходимое количество мышечной

ткани для выделения качественной ДНК. При этом, как показала практика, данная процедура отбора биологических проб не представляет опасности для жизни животных.

При необходимости, у раков изучают морфометрические показатели, плодовитость (у самок), а также проводят диагностику на инфекционные и паразитарные заболевания. Пойманные раки, после отбора проб, замеров, взвешивания, клинического осмотра, возвращаются в водоем. Было установлено, что восстановление удаленных участков пятой ходильной ноги у раков происходит за счет регенерации уже в течение очередной линьки.

Отобранные биологические пробы с помощью стерильного пинцета помещают в небольшие по объему (на 1,5 мл) пробирки типа Эппендорф и заливают 75% этанолом. Каждую пробирку подписывают водостойким маркером, с указанием номера пробы. В полевом журнале под номером пробы отмечают названия водоема, ориентировочный возраст животного, пол особи, дату отбора проб. Пробирки с пробами помещают в штативах и размещают в термоконтейнерах. Следует отметить, что такой способ позволяет компактно размещать большое число биологического материала как в переносных (при выполнении экспедиционных работ), так и в стационарных холодильных установках, обеспечивая температуру хранения – 200С. В лаборатории подписи на пробирках дублируются в рабочем журнале с указанием исследователя, отобравшего пробы.

Далее работы с биологическим материалом выполняются в лабораторных условиях. Перед работой инструменты (ножницы, пинцеты, скальпели, препаровальные иглы) стерилизуются путем обжигания над пламенем спиртовки. Пинцетом из пробирки с фиксатором извлекается часть пятой ноги (до 30 мм) и при помощи ножниц отбирается первый образец размером 5-10 мм для дальнейшей работы по извлечению мышечной ткани. Оставшуюся часть ноги либо помещаем обратно в пробирку и сохраняют в коллекции, либо отбирают еще один образец (5-10 мм) для повторного выделения ДНК. Часть пробы, как правило, используется для передачи биологического материала раков в Республиканский банк ДНК, созданный на базе ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси». Для извлечения мышцы из образца, с помощью ножниц разрезают хитиновую поверхность панциря, пинцетом и препаровальной иглой выделяют мышечный материал, который помещают в новую пробирку Эппендорф, заливают буфером и ставят на лизис. После проведенных манипуляций инструментарий протирают спиртом для подготовки и обработки следующей пробы к выделению ДНК.

Весьма важным положением является выбор оптимальной методики выделения ДНК из биологических образцов десятиногих раков. В этой связи, был проведен анализ специальной литературы по методам выделе-

ния ДНК у раков, который показал, что, как и при работе с другими животными, они должны соответствовать следующим основным требованиям [3, 8]: лизис биологического материала, селективная экстракция (сорбция), концентрирование из больших объемов, отделение ингибирующих ПЦР компонентов, разделение ДНК и РНК, высокий процент выхода, возможность калибровки и положительного контроля, отсутствие контаминации, малые временные затраты, возможность автоматизации.

Методы выделения нуклеиновых кислот по основным физическим и биохимическим признакам разделяют на два класса – жидкофазные и твердофазные [3, 8]. При этом, нами был выбран менее затратный – классический жидкофазный метод выделения ДНК, описанный в многочисленных работах зарубежных исследователей [11, 19, 20, 22, 23, 25–27]. Применяя данный метод, выделенную у раков ДНК можно длительное время хранить в банке ДНК, с возможностью ее использования при проведении других исследований по генетике раков. Следует отметить, что наиболее приближенная к нашим условиям по оборудованию и реактивам оказалась методика выделения ДНК, которую используют польские коллеги [26, 27], представленная по протоколу тремя последовательными этапами. Краткое описание манипуляций по каждому из этапов представлено ниже.

На *I этапе* проводятся следующие манипуляции:

- стерильным скальпелем или ножницами выделяется фрагмент мышечной ткани размером приблизительно 5-8 мм² и помещается в 1,5 мл пробирку Эпшендорф;
- добавляется 400 мкл лизирующего буфера и, непосредственно перед лизисом, добавляется 5 мкл протеиназы К (10 мг/мл), с последующим перемешиванием;
- проводят инкубирование на протяжении ночи при температуре 45°C.

II этап предусматривает проведение следующих манипуляций:

- добавляется 500 мкл смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1) и тщательно перемешивается на протяжении 5 минут;
- проводят центрифугирование при 12000 об/мин на протяжении 10 минут;
- аккуратно переносят верхнюю водную фазу (не задевая интерфазу) в стерильную микроцентрифужную пробирку;
- проводят повторные операции по предыдущим пунктам II этапа до тех пор, пока интерфаза не станет чистой;
- переносят верхнюю водную фазу в новую пробирку, добавляют 500 мкл хлороформа, перемешивают 5 минут, центрифугируют при 12000 об/мин на протяжении 6 минут;
- переносят верхнюю водную фазу в пробирку и добавляют 1 мл холодного 96% этанола;

- пробирку после перемешивания помещают в холодильник (-20°C) как минимум на 30 минут, лучше на ночь.

На завершающем *III этапе* осуществляются следующие манипуляции:

- проводят центрифугирование при 12000 об/мин на протяжении 20 минут, с последующим аккуратным удалением спирта;
- добавляют 1 мл холодного 70% этанола, сбивают осадок покачиванием 50 раз, центрифугируют при 12000 об/мин на протяжении 10 минут, осторожно удаляют спирт;
- высушивают осадок при комнатной температуре на протяжении 30-60 мин;
- растворяют осадок ДНК в 100 мкл деионизированной воды.

Концентрацию и чистоту выделенной ДНК определяют на спектрофотометре типа NanoPhotometer P360 (Implen, Германия). Спектрофотометрический анализ степени загрязнения полученных препаратов ДНК белками проводят на основе соотношения коэффициентов поглощения A260/A280 (норма в диапазоне 1,8-2,0). В качестве примера, в таблице представлены показатели концентрации и чистоты выделенной ДНК длиннопалого рака, обитающего в озере Соминское (Брестская область, Республика Беларусь).

Таблица. Концентрация и чистота выделенной ДНК из части биологических проб длиннопалого рака (оз. Соминское, Брестская область, Республика Беларусь)

Название образца	Соотношение коэффициентов поглощения A260/A280	Концентрация, нг/мкл
1	2,18	415
2	2,07	388
3	2,16	395
4	2,38	435

Как свидетельствуют представленные данные спектрометрии, есть необходимость в очистке ДНК от РНК. В этом случае, для снижения содержания РНК, используются РНК-азы, которые расщепляют РНК не повреждая ДНК [8].

Качество выделенной ДНК проверяют электрофоретически в 1% агарозном геле (рис.), для чего полученный раствор ДНК в количестве 4 мкл наносят на агарозный гель, содержащий бромистый этидий (0,5 мкг/мл).

На рассматриваемом примере установлено, что фракция фрагментов ДНК длиннопалого рака размером 10-20 тыс. пар оснований и более составляла бóльшую часть от общего количества выделенной ДНК, что свидетельствует о пригодности полученных образцов для дальнейшего анализа.

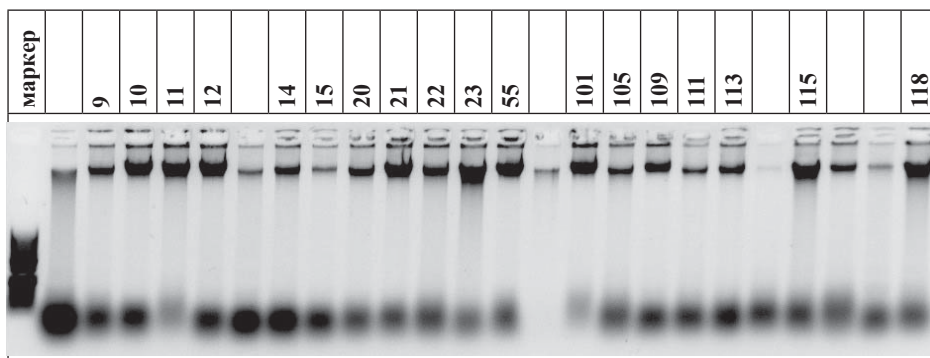


Рис. Электрофореграммы образцов ДНК длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.)

Таким образом, проведенные научно-исследовательские работы позволили реализовать поставленные задачи по разработке и совершенствованию методик прижизненного отбора биологического материала и выделения ДНК ракообразных, которые могут быть рекомендованы к практическому применению.

Выводы и предложения. На основе анализа литературных данных и экспериментальным путем была разработана методика прижизненного отбора проб биологического материала у длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.) для проведения генетических исследований. Выбрана и усовершенствована более дешевая ресурсосберегающая фенол-хлороформная методика выделения ДНК у длиннопалого рака, позволяющая длительное время хранить и использовать ДНК для научных исследований. Разработанные методики могут быть использованы как при проведении соответствующих научно-исследовательских работ, так и в учебном процессе при подготовке специалистов в области генетики, гидробиологии, экологии, аквакультуры.

**УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДИК ВІДБОРУ БІОЛОГІЧНИХ
ПРОБ І ВИДІЛЕННЯ ДНК У ДОВГОПАЛОГО РАКУ
(*ASTACUS LEPTODACTYLUS* ESCH.) ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

¹*Слуквін А.М. – к. б. н.,*

¹*Сасинович М.А.,*

²*Алехнович А.В. – к. б. н.,*

¹*ДНУ «Інститут генетики і цитології НАН Білорусії»,*

²*ДНВО «Науково-практичний центр НАН Білорусії по біоресурсам»*

За результатами аналізу літературних джерел і проведених науково-дослідних робіт розроблено методику прижиттєвого відбору біологічних проб у довгопалого раку (*Astacus leptodactylus* Esch.) для забезпечення генетичних досліджень. Розроблена методика передбачає найменш травматичне отримання біологічного матеріалу шляхом видалення у трьохліток раків частки п'ятої ходильної ноги (переоподи Y). Експериментальним шляхом було визначено, що величина видаленої частки довжиною 30 мм достатня для отримання необхідної кількості м'язової тканини з метою виділення якісної ДНК (з подвійним повтором) і не представляє загрози для життя раків. Удосконалено методику фенол-хлороформного виділення ДНК з біологічних зразків десятиногих раків, запропоновано протокол проведення досліджень.

Ключові слова: довгопалий рак, методики, біологічні зразки, виділення ДНК.

**IMPROVEMENT OF METHODS FOR THE BIOLOGICAL
SAMPLES' SELECTION AND DNA-EXTRACTION IN
NARROW-CLAWED CRAYFISH
(*ASTACUS LEPTODACTYLUS* ESCH.) FOR THE
MOLECULAR-GENETIC RESEARCH**

¹*Slukvin A.M. – Ph. D.,*

¹*Sasinovich M.A.,*

²*Alekhnovich A.V. – Ph. D.,*

¹*Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus,*

²*The Scientific and Practical Center for Bioresources,*

National Academy of Sciences of Belarus

Based on the analysis results of the literary sources, the techniques (methods) for intravital selection of biological samples (the plot of the fifth pair of walking legs (pereiopods Y) and phenol-chloroform DNA extraction in narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch.) have been chosen and improved to the molecular-genetic research.

Keywords: narrow-clawed crayfish, methods, biological samples, DNA extraction.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азизов А.П. Популяционно-генетическая характеристика длиннопалых раков *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) Каспийского моря с применением RAPD техники / А.П. Азисов // Доклады НАНА. – 2014. – №1. – С. 1-7.
2. Алехнович А.В. Речные раки Беларуси в современных условиях. Распространение, динамика численности, продукционно-промысловый потенциал / А.В. Алехнович. – Минск, 2016. – 302 с.
3. Антонова О.С. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии / О.С. Антонова [и др.] // Научное приборостроение. – Т. 20. – 2010. – № 1. – С. 3-9.
4. Беляев В.И. Справочник по рыбоводству и рыболовству / В.И. Беляев. – Минск, 1986. – 224 с.
5. Биология и промысел речных раков в БССР // Труды белорусского отделения ВНИОРХ / под ред. А.Л. Штейнфельд. – Минск, 1957. – Т. 1. – С. 17-42.
6. Бирштейн Я.А. Пресноводные Decapoda СССР и их географическое распространение / Я. А. Бирштейн, Л. Г. Виноградов. – М.: Зоол. журнал. – Т. 13. – 1934. – С. 39-70.
7. Бродский С.Я. Фауна Украины – Высшие раки / С.Я. Бродский. – К.: Наукова думка, 1981. – 203 с.
8. Воронова Н.В. Видовая идентификация тлей – вредителей плодовых и ягодных культур методом молекулярной диагностики: метод. пособие / Н.В. Воронова, С.В. Буга, В.П. Курченко. – Минск: БГУ, 2011. – 30 с.
9. Кулеш В.Ф. Речные раки как ценнейший ресурсный компонент фауны Беларуси / В.Ф. Кулеш, А.В. Алехнович, Г.П. Прищепов // Природные ресурсы Беларуси. – 1998. – № 1. – С. 39-49.
10. Мицкевич О.И. Раколовство и раководство на водоемах Европейской части России / О.И. Мицкевич. – Санкт-Петербург, 2006. – 207 с.
11. Межжерин С.В. Особенности аллозимной изменчивости в популяциях длиннопалых раков (*Pontastacus* ВОТТ, 1950) в пределах Украины / С.В. Межжерин, Е.И. Жалай, В.С. Костюк // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія. – 2012. – № 32. – С. 140–144.
12. Слуквин А.М. Разработка биотехнологии воспроизводства и получения посадочного материала длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.) в условиях рыбоводных предприятий Брестской области / А.М. Слуквин, В.В. Ус. – Минск: Беларус. навука, 2011. – С. 195-242.
13. Состояние мирового рыболовства и аквакультуры 2016. Вклад в обеспечение всеобщей продовольственной безопасности и питания [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://old.belal.by/elib/fao/791.pdf>. Дата доступа: 05.12.2016.

14. Старобогатов Я.М. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий / Я.М. Старобогатов. – СПб, 1990. – С. 177-183.
15. Утеушев Р.Р. Разработка технологии комплексной переработки панцирь-содержащего сырья из ракообразных Волго-Каспийского региона: дисс. кандидата технических наук / Р.Р. Утеушев. – Москва, 2006. – 24 с.
16. Утеушев Р.Р. Хитин из панцирьсодержащих отходов речных раков Волго-Каспийского региона / Р.Р. Утеушев, М.Д. Мукатова. – М.: Рыбная промышленность. – № 1. – 2006. – С. 16-18.
17. Франченко Е.С. Получение хитозана из панциря речных раков / Е.С. Франченко [и др.]. – М.: Известия ВУЗов. – №5-6. – 2005.
18. Цукерзис Я.М. Речные раки / Я.М. Цукерзис. – Вильнюс, 1989. – 142 с.
19. Alaranta A. Genetic differences among noble crayfish (*Astacus astacus*) stocks in Finland, Sweden and Estonia based on the its1 region / A. Alaranta [et al.] // Bull. Fr. Pêche Piscic. – 2006. – P. 965-976.
20. Edsman L. Genetic differentiation between noble crayfish, *Astacus astacus* (L.), populations detected by microsatellite length variation in the RDNA its1 region / L. Edsman // Bull. Fr. Pêche Piscic. – 2002. – №367. – P. 691-706.
21. Holdich D.M. Background and functional morphology / D.M. Holdich. – Oxford, 2002. – P. 3-29.
22. Kalayci G. Molecular Identification of *Astacus leptodactylus* and *Austropotamobius torrentium* Using mtDNA-RFLP Method / G. Kalayci, S. Akhan // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. – 2016. – Vol. 16. – P. 789-795.
23. Khoshkholgh M. Genetic variation in the narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*) populations as assessed by PCR-RFLP of mitochondrial COI gene / M. Khoshkholgh, S. Nazari // Molecular Biology Research Communications. – 2015. – P. 225-237.
24. Longshaw M. Biology and Ecology of Crayfish / M. Longshaw, P. Stebbing. – Florida: CRC Press, 2016. – 375 p.
25. Maguire I. Two distinct evolutionary lineages of the *Astacus leptodactylus* species-complex (Decapoda: Astacidae) inferred by phylogenetic analyses / I. Maguire [et al.] // CSIRO PUBLISHING. Invertebrate Systematics. – 2014. – № 28. – P. 117–123.
26. Skuza L. Molecular characterization of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.) population from Pomeranian lakes (north-western Poland) based on mitochondrial DNA / L. Skuza // Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems. – 2016. – №13. – 417 p.
27. Soroka M. Application of mitochondrial DNA in the identification of diverse crayfish species / M. Soroka // Polish journal of natural sciences. – 2008. – Vol 23(3). – P. 624–634.