

B. N. Mynbayeva¹, D. A. Ualiyeva¹, B. O. Bekmanov², N. V. Voronova³

¹Abai Kazakh National Pedagogical University, Almaty, Kazakhstan,

²Institute of General Genetics and Cytology, Almaty, Kazakhstan,

³Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: bmynbayeva@gmail.com, daniya.2010@mail.ru; bobekman@rambler.ru; slovonine@mail.ru

DNA PURIFICATION OF KAZAKHSTANI RAINBOW TROUT

Abstract. Previously, we examined the state of Kazakhstan's population of rainbow trout in 6 ponds in Almaty region, by the following criteria: presence, abundance, biometry and other parameters of fish habitat. The aim of this research is DNA purification from trapped samples of Kazakhstani rainbow trout. In order to achieve this aim the following tasks have been resolved: selection of population samples for genetic analysis; adoption of common methods of genetic analysis; DNA purification from fins. For the first time ever in Kazakhstan we used the method of fish sampling for genetic analysis based on ecological principle “caught - let it go”. Population tests generation was composed from 10 rogues from 3 rivers Tekes, Ornek and Ulken-Kakpak, where trout was found. During selection of various methods for DNA purification, originally we applied ready-made commercial KITS. The results showed that purified DNA products had low concentration and purity, the presence of protein-based foreign bodies, etc. Then we employed for trout fins adapted method of phenol-chloroform extraction, which allowed allocating concentrated, pure and high-quality original DNA. Via this method 30 DNA products were obtained, 13 of which samples of trout found in rivers Ornek and Ulken-Kakpak, had an extreme concentration and purity. They were called “DNA of rainbow trout”.

Keywords: rainbow trout, tests generation, DNA purification.

УДК 575: 577(57.012)

Б. Н. Мынбаева¹, Д. А. Уалиева¹, Б. О. Бекманов², Н. В. Воронова³

¹Казахский национальный педагогический университет им. Абая, Алматы, Казахстан,

²Институт общей генетики и цитологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан,

³Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК КАЗАХСТАНСКОЙ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ

Аннотация. Ранее нами были исследованы 6 водоемов Алматинской области, в которых изучалось состояние казахстанской популяции радужной форели: наличие, численность, биометрия и другие параметры обитания рыб. Цель данной исследовательской работы – выделение ДНК из отловленных образцов казахстанской радужной форели. Для осуществления поставленной цели были решены следующие задачи: отбор популяционных выборок для генетического анализа; освоение общих методов генетического анализа; выделение ДНК из плавников. Впервые в Казахстане использована методика отбора проб рыб для генетического анализа по экологическому принципу «поймал – отпусти». Популяционная генерация проб составила по 10 экз. из 3 рек Текес, Орнек и Улкен-Какпак, в которых обнаружена форель. При подборе различных методов выделения ДНК, изначально использовали готовые коммерческие наборы. Результаты показали, что выделяемые ДНК-продукты имели низкие концентрации и чистоту, присутствие примесей белкового характера и т.д. Затем нами был использован для плавничков радужной форели адаптированный метод фенол-хлороформной экстракции, который позволил выделить концентрированную, чистую и качественную исходную ДНК. С помощью этого метода были получены 30 ДНК-продуктов, из которых 13 образцов форели, обитающих в реках Орнек и Улкен-Какпак, имели предельную концентрацию и чистоту. Они получили название «ДНК радужной форели».

Ключевые слова: радужная форель, генерация проб, выделение ДНК.

Введение. История акклиматизации рыб в водоемы Казахстана началась еще в дореволюционный период. Интродукция молоди радужной форели (камчатской микижи *Parasalmo (O.) mykiss* Walbaum, 1792) произведена в 1929-1935, 1964-1966 и 1970-х гг. несколькими партиями из питомников Камчатки Российской Федерации [1].

Условия вселения и акклиматизации камчатской микижи в Казахстане были разными. Подращивание молоди микижи проводилось в бассейнах форелевого хозяйства по технологии выращивания радужной форели [2].

Присутствие, хороший рост и развитие популяции камчатской радужной форели в верхних горных зонах р. Шелек отмечал исследователь Ю.А. Бирюков [3]. В последующие годы использовалась для интродукции икра из других хозяйств, но интродукция осуществлялась не в природные водоемы, а Тургенское форелевое хозяйство – для выращивания молоди из икры. Более поздних исследований по состоянию популяции радужной форели в реках и озерах Казахстана не проводилось.

В 2015 г. нами были исследованы 6 водоемов Алматинской области, в которых изучалось состояние казахстанской популяции радужной форели: наличие, численность, биометрия и другие параметры обитания рыб [4, 5]. Цель настоящих исследований: через отбор популяционных выборок для генетического анализа и освоение методов генетического анализа выделить ДНК из плавников отловленных экземпляров радужной форели по принципу «поймал-отпусти». Данная исследовательская работа выполнялась по грантовому финансированию научных исследований МОН РК по подприоритету «Проблемы экологии и рационального природопользования».

Объекты и методы исследования. Использована методика по отбору популяционных выборок для генетического анализа [6], которая основана на экологическом принципе «поймал – отпусти». Рыбы ловились на удочку, у них срезалась лишь часть брюшного плавника, который фиксировался в 96% этиловом спирте и служил материалом для дальнейшего генетического исследования. Потом рыбы отпускались в водоем.

Выделение ДНК из 3 объектов: кровь человека, плавнички морского окуня *Sebastes Cuvier*, 1829, радужной форели *Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1972 и казахстанской радужной форели *Parasalmo (O.) mykiss* Walbaum 1972 проводили согласно протоколу производителя Genomic DNA Purification Kit с использованием соответствующих наборов реактивов. Данные электрофореза интерпретировали при помощи флуоресцентного трансиллюминатора BioPad. Определение степени концентрации ДНК и ее чистоты проводили с помощью специального устройства нанодропа BiophotometerPlus.

Результаты и обсуждение

Отбор популяционных выборок для генетического анализа. Отлов радужной форели производился в горных реках вблизи пос. Нарынкол Райымбекского района Алматинской области крючковой снастью. В результате экспедиционных работ нами отобраны из р. Текес, Орнек и Улкен-Какпак 30 экз. радужной форели, плавнички которых были зафиксированы в 96% этаноле. Следовательно, популяционная выборка для генетического анализа составила по 10 образцов из 3 рек, из которых мы выделяли ДНК.

Выделение ДНК из крови человека проводили согласно протоколу производителя Genomic DNA Purification Kit. Оказалось, что данный метод является основой для выделения ДНК из любой ткани и его можно будет применить для выделения ДНК из плавничков рыб.

Далее мы корректировали условия выделения ДНК из плавничков морского окуня. Вносили следующие изменения: а) использовали 10 г биопсированной ткани плавника, оставленной в 96% этаноле в холодильнике на 1 сут.; б) гомогенизация, как обычно с 200 мкл ТЕ-буфера; в) выделение ДНК из плавника производилось тем же коммерческим набором Genomic DNA Purification Kit с добавлением 80 мкл Precetipitation Solution и 720 мкл dH₂O. Далее проверили выделенную ДНК методом визуализации выделенной ДНК, а также определили ее концентрацию и чистоту. При измерении были получены следующие результаты: концентрация ДНК оказалась высокой и равной 184,9 ng/μl. Качество или чистота препарата ДНК оказалась низкой: 0,98²⁶⁰/₂₈₀ нм, что свидетельствовало о наличии различных примесей, которые помешали качественному выходу ДНК.

Использованная методика потребовала повторной корректировки: образец плавничка морского окуня фиксировали в 96% этаноле и выдерживали в холодильнике 3-4 сут. при температуре -4°C (а); образец плавничка фиксировали дополнительно в PBS растворе (б). Последующие этапы выделения ДНК проводили согласно протоколу производителя, описанному выше. Результаты по концентрации и чистоте ДНК были следующие: образец, очищенный только в 96% этаноле при -4°C , показал концентрацию ДНК $55,7 \text{ ng}/\mu\text{l}$, чистоту $- 1,96^{260}/_{280} \text{ нм}$, т.е. осадок ДНК оказался чистым, без примесей. Образец, погруженный для очищения от примесей в PBS раствор, показал концентрацию ДНК $15,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$, чистота ДНК $- 0,91^{260}/_{280} \text{ нм}$, т.е. образец имел низкую концентрацию ДНК, но ее чистота соответствовала допустимым нормам.

Далее исходные ДНК мы разделили электрофоретически и визуализировали данные на флуоресцентном трансиллюминаторе. Были получены концентрированные фрагменты с небольшим белковым шлейфом: при среднем уровне чистоты ДНК-продукта, что позволяет продолжить молекулярно-генетические исследования, например, провести ПЦР-анализ. Таким образом, можно не использовать специальный PBS раствор в начальном этапе выделения ДНК, а держать в 96% этаноле большее количество дней при температуре -4°C .

Выделение ДНК из крови человека и ткани плавничка морского окуня помогли нам освоить основные методы и принципы молекулярно-генетического анализа. Следующей нашей задачей явилось выделение общей ДНК из ткани радужной форели *Oncorhynchus mykiss*, которая генетически близка нашему объекту исследования *Parasalmo (O.) mykiss* (микижа). Основная часть эксперимента была проведена согласно методике выделения ДНК из ткани [7] с гомогенизацией плавничков жидким азотом и фиксацией 2 способами: в 96% этаноле при -4°C и в PBS растворе. Этапы выделения ДНК были идентичны вышеописанным. Для проверки чистоты и количества выделенной ДНК из *Oncorhynchus mykiss* W. провели электрофорез, и полученные данные интерпретировали на флуоресцентном трансиллюминаторе (рисунок 1).

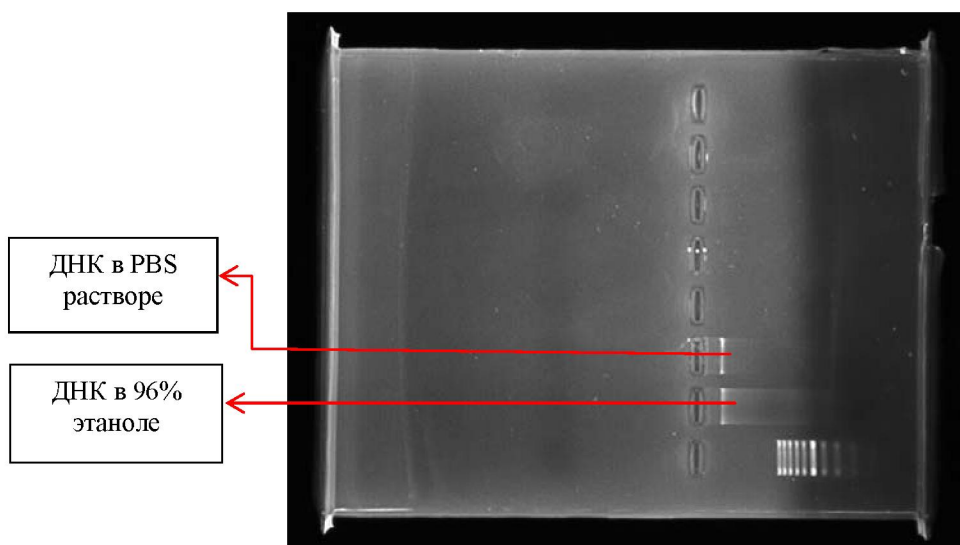


Рисунок 1 – Электрофорез ДНК радужной форели *Oncorhynchus mykiss*

Выделение ДНК двумя способами прошло успешно. Оба образца имели высокий показатель концентрации и чистоты, а также четкие и правильные фрагменты разделения. Следовательно, мы имеем проверенную методику выделения ДНК, которую следует использовать для получения ДНК из плавничков казахстанской радужной форели, которую отловили на 3 реках Алматинской области.

Выделение ДНК из плавничков казахстанской радужной форели произвели коммерческим набором Genomic DNA Purification Kit по методике М.Н. Мельниковой с соавторами [8]. Выделенные ДНК визуализировали с помощью электрофореза и проверили их чистоту и концентрацию на флуоресцентном трансиллюминаторе. Оказалось, что из 30 выделенных ДНК при электрофоретическом разделении четкие и качественные фрагменты имели только 9 образцов (рисунок 2).

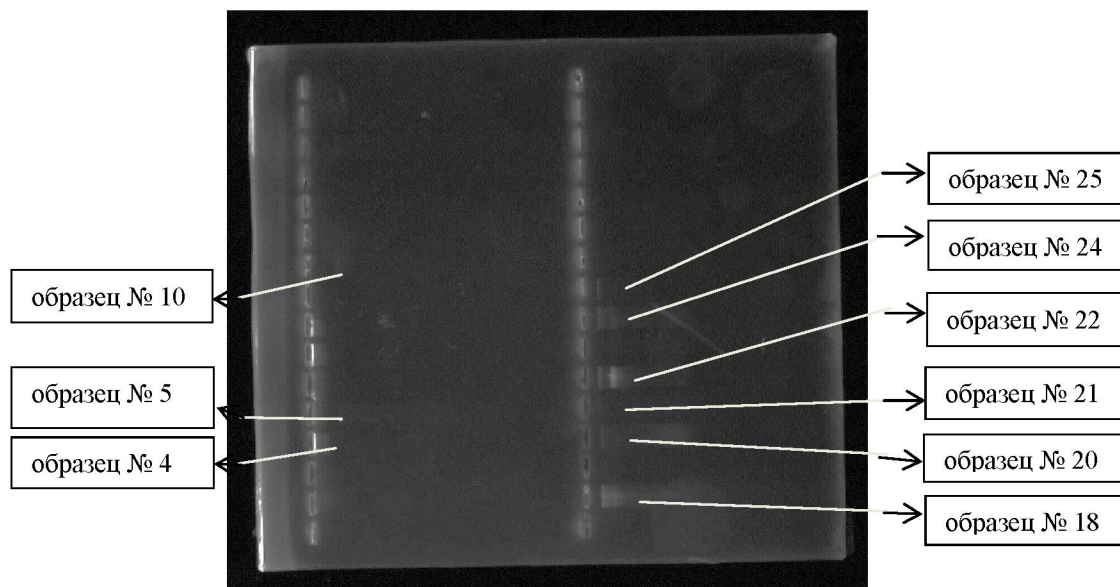


Рисунок 2 – Электрофорез ДНК из плавничков казахстанской радужной форели

Следовательно, необходимость повторения выделения ДНК из плавничков радужной форели очевидна.

Для корректировки методики решили использовать РНК-зу (или эндорибонуклеазу, свободную от ДНК) для очищения исходной ДНК от РНК и других примесей, для чего добавили 200 мкл ТЕ-буфера и 4 мкл РНК-зы («Thermo Scientific»). Выделение ДНК далее провели по протоколу. Полученные ДНК-продукты поместили в холодильную камеру на 1-2 сут. для полного растворения. Визуализация на флуоресцентном трансиллюминаторе показала непонятные, мутные фрагменты ДНК и шлейф РНК. ДНК смогли выделить только из 16 образцов ткани плавничков форели, имевшие явные фрагменты ДНК, но низкие по качеству (рисунок 3).

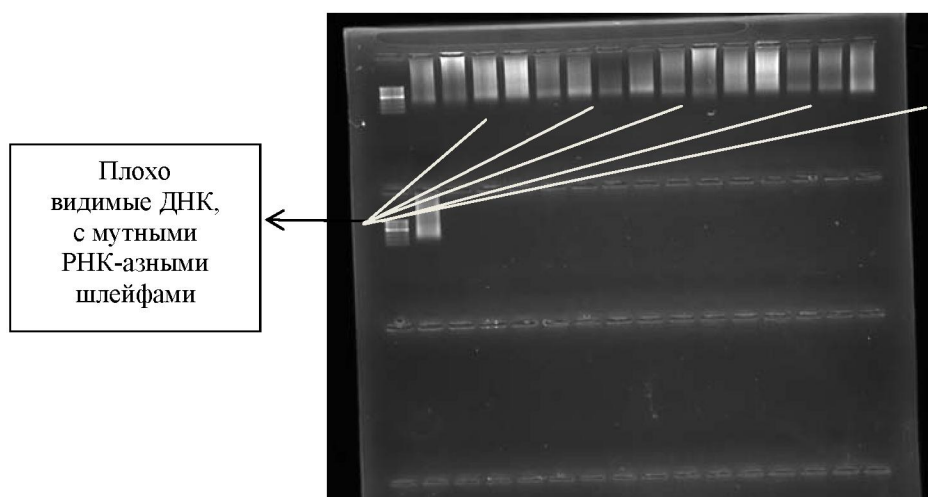


Рисунок 3 – Электрофоретическое разделение ДНК радужной форели

Следовательно, использование РНК-полимеразы не улучшило чистоту и концентрацию выхода ДНК, также она плохо взаимодействовала с компонентами использованного набора для выделения ДНК.

Далее для выделения ДНК высокой концентрации и максимальной чистоты мы использовали метод фенол-хлороформной экстракции [9, 10]. Полученную методом фенол-хлороформной экстракции смесь ДНК мы визуализировали на горизонтальном 1,4% агарозном геле (рисунок 4).

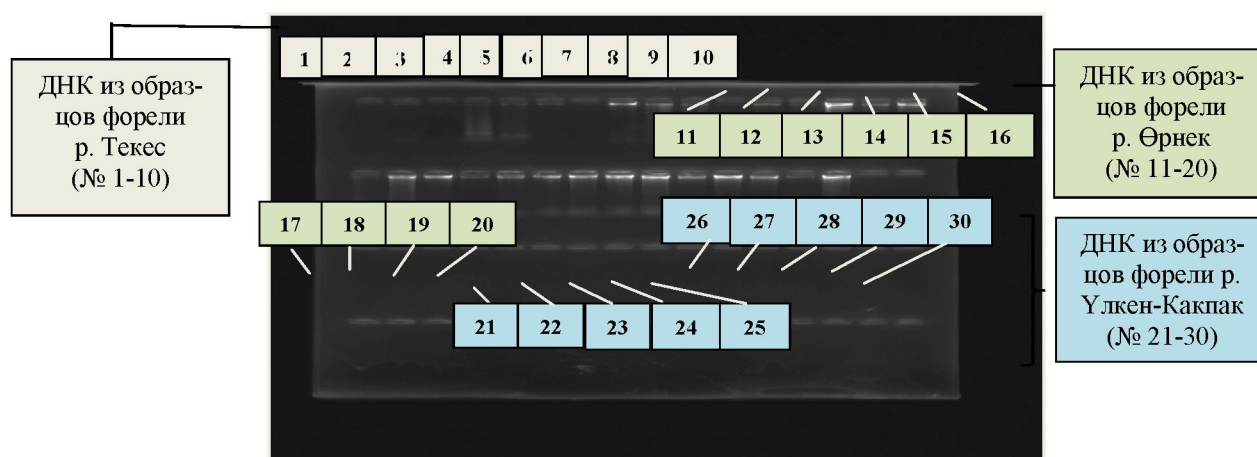


Рисунок 4 – Электрофоретическое разделение ДНК радужной форели, выделенной фенол-хлороформным методом

Из 10 образцов ДНК, выделенных из плавничков выловленной из р. Текес радужной форели, № 8, 9 и 10 имели хорошо видимые фрагменты, остальные № 1-7 – слабовыраженные, но их также можно использовать для молекулярно-генетических исследований. № 12-16 и № 18-20 образцов плавничков, взятых на р. Орнек, дали яркие фрагменты ДНК, что свидетельствовало о высокой ее концентрации. Все 10 ДНК из образцов плавничков радужной форели, выловленной в р. Улкен-Какпак, имели четкие и качественные фрагменты, доказывающие высокую концентрацию и чистоту выделенных ДНК. После этого мы отобрали 13 самых высококачественных фрагментов и измерили их концентрацию на нанодропе (таблица 1).

Таблица 1 – Измерение концентрации и чистоты выделенных ДНК радужной форели

Образцы	Концентрация ДНК, ng/μl	Чистота ДНК, $\lambda_{260-280}$
№ 8	115,4	1,8
№ 14	186,6	1,5
№ 16	53,0	1,0
№ 18	880,3	1,9
№ 19	508,2	1,7
№ 21	181,1	1,6
№ 22	69,8	1,0
№ 23	510,0	1,9
№ 24	483,0	1,7
№ 25	654,0	1,7
№ 27	841,4	1,7
№ 28	1119,7	1,8
№ 30	456,2	1,6

Все 13 фрагментов ДНК имели предельную чистоту и высокую концентрацию: 1 фрагмент ДНК приходился на экземпляр радужной форели, выловленной в р. Текес, 4 – из р. Орнек и 8 – из р. Улкен-Какпак, также самая высокая концентрация ДНК зафиксирована в образце № 28, который относится к контрольным выборкам радужной форели именно из этой реки.

Таким образом, выделенные ДНК-продукты с высокими показателями концентрации и чистоты отмечены в образцах плавничков форели из р. Орнек и Улкен-Какпак, что свидетельствует о хорошем экологическом состоянии воды этих рек и оптимальных условиях обитания в них радужной форели [11].

В заключении можно сказать, что поставленные цель и задачи выполнены. Освоен метод отбора популяционных выборок, основанный на экологическом принципе «поймал – отпусти». Полученные результаты могут быть полезны для контроля любой популяции рыб с помощью биологического мониторинга или биоанализа, для отбора популяционных выборок, основанного на экологическом принципе «поймал – отпусти».

Также впервые для Казахстана было произведено выделение ДНК из собранных плавников экземпляров популяции казахстанской радужной форели молекулярно-генетическими методами. Выделенная ДНК радужной форели будет использована для дальнейших исследований по определению таксона казахстанской радужной форели. Подбирая различные методики к нашим исследованиям, мы изначально использовали готовые коммерческие наборы, приготовленные специально для выделения ДНК из животной ткани. Результаты показали, что выделяемые ДНК-продукты имели дефекты: низкие концентрации и чистоту, присутствие примесей белкового характера и т.д. Впервые использованный нами для плавничков радужной форели адаптированный метод фенол-хлороформной экстракции позволил выделить концентрированную, чистую и качественную исходную ДНК. С помощью этого метода были получены 30 ДНК-продуктов, из которых 13 имели предельную концентрацию и чистоту. Они получили название «ДНК радужной форели» и сейчас хранятся при температурах от -20°C до -70°C .

ЛИТЕРАТУРА

[1] О результатах интродукции камчатской микижи (*Salmo mykiss* Walb.) в горные водоемы Юго-Восточного Казахстана / Ю.А. Бирюков и др. //Изучение зоопродукторов в водоемах бассейна реки Или. – Алма-Ата: КазГУ, 1982. – С. 194-209.

[2] Бирюков Ю.А. Сравнительные особенности развития микижи *Salmo mykiss* (Walbaum) и радужной форели *Salmo gairdneri* (Richardson) в связи с интродукцией их в водоемы Юго-Восточного Казахстана: автореф. дис. канд. биол. наук. – М.: МГУ, 1982. – 22 с.

[3] Бирюков Ю.А. *Salmo mykiss* Walbaum – микижа // Рыбы Казахстана. – Алма-Ата: Фълым, 1992. – Т.5. – С.119-125.

[4] Мынбаева Б.Н., Уалиева Д.А. Виды-индикаторы чистоты пресных водоемов Алматинской области // Вестн. КазНПУ им. Абая. Сер. естеств.-геогр. – 2015. – № 2. – С. 61-64.

[5] Мынбаева Б.Н., Уалиева Д.А., Бекманов Б.О., Воронова Н.В. Мониторинг гидрохимических и экологических характеристик горных рек и озер Южного Казахстана для оценки состояния акклиматизированной радужной форели // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5; URL: www.science-education.ru/128-21552

[6] Кузицин К.В., Павлов Д.С., Груздева М.А., Савваитова К.А. Типовые методики сбора материала для изучения и мониторинга разнообразия и среды обитания лососевых рыб в речных экосистемах (на примере лососевых рыб семейства *Salmonidae*). – М.: МГУ, 2009. – 139 с.

[7] Boom R., Sol C., Salimans M. et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids // Journal of clinical microbiology. – 1990. – No. 5. – P. 495-503.

[8] Мельникова М.Н., Сенчукова А.Л., Павлов С.Д. Разработка новых популяционно-генетических маркеров для вида *Parasalmo (oncorhynchus) mykiss* на основе вариабельности межсателлитной ДНК // Доклады Академии наук. – 2010. – Т. 435, № 1. – С. 138-141.

[9] Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction // Analytical Biochemistry. – 1987. – Vol. 162. – P. 156-159.

[10] Сербаканова Ш.Т., Даугалиева С.Т. Методические рекомендации по выделению ДНК из плавников осетровых рыб. – Алматы: TST-Company, 2011. – 14 с.

[11] Scott W.F., Crossman E.J. Freshwater fishes of Canada // Fish. Res. Board Can. Bull. – Ottawa, 1998. – 970 p.

REFERENCES

[1] O rezul'tatah introdukcii kamchatskoj mikizhi (*Salmo mykiss* Walb.) v gornye vodoemy Jugo-Vostochnogo Kazahstana / Ju.A. Birjukov i dr. // Izuchenie zooproductentov v vodoemah bassejna reki Ili. Alma-Ata: KazGU, 1982. S. 194-209. (in Russ.).

[2] Birjukov Ju.A. Sravnitel'nye osobennosti razvitija mikizhi *Salmo mykiss* (Walbaum) i raduzhnoj foreli *Salmo gairdneri* (Richardson) v svjazi s introdukciej ih v vodoemy Jugo-Vostochnogo Kazahstana: avtoref. dis. kand. biol. nauk. M.: MGU, 1982. 22 s. (in Russ.).

[3] Birjukov Ju.A. *Salmo mykiss* Walbaum – mikizha // Ryby Kazahstana. – Alma-Ata: Fylym, 1992. T.5. S.119-125. (in Russ.).

[4] Мынбаева Б.Н., Уалиева Д.А. Видь-индикаторь чистоть пресных водоемов Алматинской области // Vestn. KazNPU im. Abaja. Ser. estestv.-geogr, 2015, 2, S. 61-64 (in Russ.).

[5] Мынбаева Б.Н., Уалиева Д.А., Бекманов Б.О., Воронова Н.В. Мониторинг гидрохимических и экологических характеристик горных рек и озер Южного Казахстана для оценки состоjаниjа акклиматизированной радужной форели // Sovremennye problemy nauki i obrazovanija. 2015, 5; URL: www.science-education.ru/128-21552. (in Russ.).

[6] Kuzishhin K.V., Pavlov D.S., Gruzdeva M.A., Savvaitova K.A. Tipovye metodiki sbora materiala dlja izuchenija i monitoringa raznoobrazija i sredy obitanija lososevyh ryb v rechnyh jekosistemah (na primere lososjovyh ryb semejstva Salmonidae). M.: MGU, 2009. 139 s. (in Russ.).

[7] Boom R., Sol C., Salimans M. et al. *Journal of clinical microbiology*, 1990, 5, 495-503 (in Eng.).

[8] Mel'nikova M.N., Senchukova A.L., Pavlov S.D. Razrabotka novyh populjacionno-geneticheskikh markerov dlja vida Parasalmo (oncorhynchus) mykiss na osnove variabel'nosti mezhsatellitnoj DNK //Doklady Akademii nauk. – 2010. – T. 435, № 1. – S. 138-141.

[9] Chomczunski P., Sacchi N. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162, 156-159. (in Eng.).

[10] Serbakanova Sh.T., Daugaljeva S.T. Metodicheskie rekomendacii po vydeleniju DNK iz plavnikov osetrovyh ryb. Almaty: TST-Company, 2011. 14 s. (in Russ.).

[11] Scott W.F., Crossman E.J. *Fish. Res. Board Can. Bull. Ottawa*, 1998, 970 p. (in Eng.).

Б. Н. Мынбаева¹, Д. А. Уалиева¹, Б.О. Бекманов², Н.В. Воронова³

¹Абай атындағы Қазақ ұлттық педагогикалық университеті, Алматы, Қазақстан,

²Жалпы генетика және цитология институты, Алматы, Қазақстан,

³Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан,

ҚАЗАҚСТАНДЫҚ ТҮСТІ АЛАБАЛЫҚТЫҢ ДНҚ ӨНДІРУІ

Аннотация. Алдыңғы зерттеу жұмысында біз Алматы қаласының 6 суқоймасын зерттедік. Су қоймаларындағы құбылмалы бахтактың популяциясы: саны, биометриясы және балықтың таралу аймағы қарастырылды. Ғылыми-жұмысының мақсаты – түсті алабалықтың ДНҚ өндіру. Мақсатқа жету үшін бірқатар міндеттер орындалды: түсті алабалығы тіршілік ететін Қазақстан су қоймаларын таңдау; генетикалық сараптама үшін популяцияны таңдап алу; жалпы генетикалық сараптама әдістерін меңгеру; қанаттарынан ДНҚ бөліп алу. Қазақстанда алғаш рет экологиялық принциптерге, яғни «ұстадын-жібер» негізделген генетикалық талдау үшін, балық денесі бөліктерін пайдаланылған. Популяция ұрпағын бақылау үшін әр өзеннен 10 балықтан алынды, ауланған 3 өзендер Текес, Өрнек және Үлкен-Қақпақ болды. Сонымен қатар, алғаш рет алабалықт популяциясының қанаттарынан молекулярлық-генетикалық әдіс бойынша ДНҚ бөлініп алынды. ДНҚ бөліп алу мақсатындағы қолданылатын әдістерді сараптау барысында алдымен коммерциялық жиынтық қолданылды. Алынған нәтижелер бойынша, өндірілген ДНҚ өнімдерінің тазалық концентрациясы төмен болып, ақуыздық тағамдардың қалдықтары, т.б. байқалды. Кейін құбылмалы бахтактың жүзбеқанаттарынан тиімді әдіс ретінде фенол-хлоролформды экстракция әдісі арқылы таза әрі сапалы ДНҚ бөлініп алынды. Осы әдіс арқылы 30-ға жуық ДНҚ өнімдері алынып, оның ішінде 13-і Өрнек және Үлкен-Қақпақ өзенінен ауланған бахтак өнімдері таза және жоғары концентрациялы көрсеткішке ие болды. Оларға «Түсті хан балық ДНҚ» атауы берілді.

Түйін сөздер: түсті алабалық, сынамаларды көбейту, ДНҚ өндіру.

Сведения об авторах:

Мынбаева Б.Н. – профессор, КазПНУ им. Абая, e-mail: bmynbayeva@gmail.com

Уалиева Д.А. – магистрант, КазПНУ им. Абая, e-mail: daniya.2010@mail.ru

Бекманов Б.О. – д.б.н., заместитель директора Института общей генетики и цитологии КН МОН РК, e-mail: bobekman@rambler.ru

Воронова Нина Викторовна – к.б.н., доцент, КазНУ им. аль-Фараби, e-mail: slovonine@mail.ru