

УДК 595.3: 575.113

**ВЫБОР МЕТОДИК ОТБОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБ  
И ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК У ДЛИННОПАЛОГО РАКА  
(*ASTACUS LEPTODACTYLUS* ESCH.)  
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА**

***М.А. Сасинович<sup>1</sup>, А.М. Слуквин<sup>1</sup>, А.В. Алехнович<sup>2</sup>***

<sup>1</sup> Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, emci@inbox.ru

<sup>2</sup> Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам, alekhnovichav@gmail.com

Статья посвящена выбору и обоснованию методики отбора генетического материала у длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.). По результатам анализа литературных источников выбраны и усовершенствованы методики прижизненного отбора биологических проб (участок пятой пары ходильных ног (переоподы Y) и фенол-хлороформного выделения ДНК у длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.) с целью изучения генетического полиморфизма. Результаты работы будут в дальнейшем использованы для развития раководства в Республике Беларусь.

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

**SCREENING OF TECHNIQUES (METHODS)  
FOR THE BIOLOGICAL SAMPLES' SELECTION  
AND DNA-EXTRACTION IN NARROW-CLAWED CRAYFISH  
(*ASTACUS LEPTODACTYLUS* ESCH.)  
FOR THE GENETIC POLYMORPHISM STUDY**

***M.A. Sasinovich<sup>1</sup>, A.M. Slukvin<sup>1</sup>, A.V. Alekhnovich<sup>2</sup>***

<sup>1</sup> Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus

<sup>2</sup> State Scientific and Production Amalgamation «The Scientific and Practical Center for Bioresources»

Article focuses on the selection and justification of methods used for selection of genetic material of narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch.)/ 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 (pereopods Y)) and phenol-chloroform DNA extraction in narrow-clawed crayfish, have been chosen and improved to study the genetic polymorphism. The results will be further used for the development of crayfish culture in the Republic of Belarus.

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

**Введение**

В мире год от года возрастает спрос на морских и пресноводных ракообразных как деликатесного продукта питания, и это закономерно. Раки являются ценным хозяйственным пищевым объектом и по калорийности (72 ккал/100 г), содержанию жиров (2,83 %), протеина (17,13 %), витаминов группы В и кальция

не уступают пресноводным рыбам [13]. С точки зрения экологии раки являются природными санитарями водоемов, поедающими органику растительного и животного происхождения. Известен факт, что чем больше раков в водоеме, тем вода считается чище, и раки используются как тест-объекты в экологических исследованиях различного характера [11].

По данным ФАО, за десять лет — с 1995 по 2015 г. — объем вылова и производства пресноводных ракообразных в мире возрос почти в три раза и составил более 6,9 млн тонн [14]. Успешному развитию промысла и производства раков способствуют высокие цены на ракообразных (в Финляндии до 6 евро за одного благородного рака, в Беларуси до 13 долларов за 1 кг длиннопалого рака), большая востребованность этого деликатесного продукта на внутреннем и внешнем рынках, безотходная технология. Безотходность продукции ракообразных обусловлена наличием в карапаксах раков хитина, меланина и хитозана, которые нашли широкое применение в самых разных областях: от медицины (БАД Тяньши, радиопротектор) и продуктов питания (рачьей шейки, соус) до сельского хозяйства (защитная обработка семян растений) [12, 13, 16, 17].

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 продолжали 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 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 в водоемах Республики Беларусь длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.), который в ряде научных публикаций представлен комплексом видов [2, 5—7, 9, 11, 15, 18, 22, 24].

*Целью данного исследования* является изучение генетического разнообразия у длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.), обитающего в водоемах Брестской и Гомельской областей, которое проводится в Беларуси впервые.

*Основными задачами работы* являлись:

— поиск и анализ современных методов отбора биологического материала у десятиногих раков и подбор дешевых 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

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, 3, 10, 19—21, 23, 25—27]. Поскольку в этот период в большинстве стран существует запрет на вылов раков, необходимо брать разрешение на их отлов в органах охраны природы.

Поиск и анализ литературы по методикам отбора биологических проб для генетических исследований десятиногих раков показали, что при проведении научных исследований редко используются методики декапитации животных, а в основном применяются 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). Пробы отбираются 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) [10, 19—21, 23, 25—27]. При таком, прижизненном способе отбора проб раков возвращают в водоем, из которого они были выловлены.

Нами был выбран и усовершенствован метод прижизненного отбора раков, осуществляемый непосредственно на воде или берегу водоема и предусматривающий наименее травматический забор биологического материала у трехлетков раков с удалением пятой ходильной ноги (переоподы V). 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, причем, как показала практика, эта процедура отбора проб не представляет опасности для жизни животных. При необходимости изучаются морфометрические показатели раков, плодовитость самок, а также проводится диагностика инфекционных и паразитарных заболеваний.

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 помещают с помощью стерильного пинцета в небольшие по объему (1,5 мл) пробирки типа Эппендорф и заливают 75 %-ным этанолом. Каждую пробирку подписывают водостойким маркером с указанием номера пробы, названия водоема, ориентировочного возраста животного, пола особи, даты отбора проб. Пробирки с пробами помещают в штативы и затем 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 при температуре хранения  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Далее работы с биологическим материалом выполняются в условиях лаборатории. Перед работой инструменты (ножницы, пинцеты, скальпели, препаровальные иглы) стерилизуются (обжигаются над пламенем спиртовки). Пинцетом из пробирки с фиксатором достается часть пятой ноги (до 30 мм) и ножницами отрезается первый образец размером 5—10 мм для дальнейшей работы по извлечению мышечной ткани. Оставшаяся часть пробы может быть использована для передачи биологического материала раков в Республиканский банк ДНК либо для повторного выделения. Для того чтобы извлечь мышцы из образца, необходимо с помощью ножниц разрезать хитиновую поверхность панциря и с помощью пинцета и препаровальной иглы отделить мышцы. Затем выделенный из образца мышечный материал помещают в новую пробирку Эппендорф, заливают буфером и ставят на лизис.

### **Методика выделения ДНК из биологических образцов десятиногих раков**

Анализ литературы по методам выделения ДНК у раков показал, что, как и при работе с другими животными, они должны соответствовать следующим основным требованиям [3, 8]: 1) лизис биологического материала; 2) селективная экстракция (сорбция); 3) концентрирование из больших объемов; 4) отделение компонентов, которые ингибируют ПЦР; 5) разделение ДНК и РНК; 6) высокий процент выхода; 7) возможность калибровки и положительного контроля; 8) отсутствие контаминации; 9) малые временные затраты; 10) возможность автоматизации.

Методы выделения нуклеиновых кислот разделяют по основным физическим и биохимическим признакам на следующие классы [3, 8]:

- жидкофазные методы,
- твердофазные методы.

Нами выбран менее затратный — жидкофазный (классический) — метод выделения ДНК у десятиногих раков, описанный в многочисленных работах зарубежных исследователей [3, 10, 19—21, 23, 25, 26]. При использовании такого метода выделенную у раков ДНК можно длительное время хранить в Республиканском банке ДНК, созданном при Институте генетики. Наиболее приспособленной к нашим условиям (оборудование и реактивы) оказалась методика выделения ДНК, используемая польскими коллегами [26, 27], которая по протоколу представлена тремя последовательными этапами.

#### *1 этап*

1. Стерильным скальпелем или ножницами выделить фрагмент мышечной ткани размером приблизительно 5—8 мм<sup>2</sup> и поместить его в пробирку Эппендорф объемом 1,5 мл.

2. Добавить 400 мкл лизирующего буфера и 5 мкл протеиназы К (10 мг/мл) (добавляется непосредственно перед лизисом). Перемешать.

3. Инкубировать всю ночь при температуре 45 °С.

*II этап*

4. Добавить 500 мкл смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1). Тщательно перемешивать 5 мин.

5. Центрифугировать 10 мин при скорости 12 000 об./мин.

6. Осторожно перенести верхнюю водную фазу (не задевая интерфазу) в стерильную микроцентрифужную пробирку.

7. Пункты 4—6 повторять до тех пор, пока интерфаза не станет чистой.

8. Перенести верхнюю водную фазу в новую пробирку, добавить 500 мкл хлороформа, перемешивать 5 мин, центрифугировать при скорости 12 000 об./мин в течение 6 мин.

9. Перенести верхнюю водную фазу в пробирку и добавить 1 мл холодного 96 %-ного этанола.

10. Перемешать, пробирку поместить в холодильник при температуре –20 °С как минимум на 30 мин, лучше на ночь.

*III этап*

11. Центрифугировать 20 мин при скорости 12 000 об./мин. Осторожно удалить спирт.

12. Добавить 1 мл холодного 70 %-ного этанола, сбить осадок покачиванием 50 раз, центрифугировать 10 мин при скорости 12 000 об./мин. Осторожно удалить спирт.

13. Высушивать осадок при комнатной температуре 30—60 мин.

14. Растворить 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) (табл. 1).

*Таблица 1*

Пример концентрации и чистоты ДНК, выделенной из части биологических проб длиннопалого рака из озера Соминское (Республика Беларусь)

Номер 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 данные спектрометрии, представленные в таблице, есть необходимость в очистке ДНК от РНК. Для снижения содержания РНК используются РНК-азы, которые расщепляют РНК, не повреждая ДНК [8].

Качество выделенной ДНК проверяют электрофоретически в 1 %-ном агарозном геле. Для этого полученный раствор ДНК в количестве 4 мкл наносится на агарозный гель, содержащий бромистый этидий (0,5 мкг/мл). Установлено, что

фракция фрагментов ДНК размером 10—20 тыс. пар оснований и более составляла большую часть общего количества выделенной ДНК, что свидетельствует о пригодности ДНК для дальнейшего анализа.

### Выводы

Данные, полученные авторами, показали, что выбранные по результатам анализа из литературных источников и усовершенствованные авторами методики прижизненного отбора биологических проб (участок пятой пары ходильных ног (переподы Y) и фенол-хлороформного выделения ДНК у длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.) позволяют получить ДНК, пригодную для дальнейшего использования с целью изучения его генетического полиморфизма, а также для пополнения Республиканского банка ДНК, созданного при Институте генетики, где ДНК, выделенную у раков именно таким методом, можно длительное время хранить.

Данные, полученные авторами, будут в дальнейшем использованы для уточнения видового статуса длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.) и выделения наиболее гетерогенных особей, с помощью которых будут созданы маточные стада для зарачивания перспективных водоемов и увеличения промысловых запасов длиннопалого рака в водоемах Беларуси.

### Список литературы

1. Азизов А.П. Популяционно-генетическая характеристика длиннопалых раков *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) Каспийского моря с применением RAPD техники // Доклады НАНА. 2014. № 1. С. 1—7.
2. Алехнович А.В. Речные раки Беларуси в современных условиях. Распространение, динамика численности, продукционно-промысловый потенциал. Минск, 2016. 302 с.
3. Антонова О.С. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии // Научное приборостроение. 2010. Т. 20, № 1. С. 3—9.
4. Беляев В.И. Справочник по рыбоводству и рыболовству. Минск, 1986. 224 с.
5. Биология и промысел речных раков в БССР // Труды Белорус. отд. ВНИОРХ / Под ред. А.Л. Штейнфельд. 1957. Т. 1. С. 17—42.
6. Бириштейн Я.А., Виноградов Л.Г. Пресноводные *Decapoda* СССР и их географическое распространение // Зоологический журнал. 1934. Т. 13. С. 39—70.
7. Бродский С.Я. Фауна Украины — высшие раки. Киев: Наукова думка. 1981. 203 с.
8. Буга С.В., Курченко В.П., Воронова Н.В. Видовая идентификация тлей — вредителей плодовых и ягодных культур методом молекулярной диагностики / Метод. пособие. Минск: БГУ, 2011. 30 с.
9. Кулеш В.Ф., Алехнович А.В., Прищепов Г.П. Речные раки как ценнейший ресурсный компонент фауны Беларуси // Природные ресурсы Беларуси. 1998. № 1. С. 39—49.
10. Межжерин С.В., Жалай Е.И., Костюк В.С. Особенности аллозимной изменчивости в популяциях длиннопалых раков (*Pontastacus* ВОТТ, 1950) в пределах Украины // Науковий вісник. 2012. № 32. С. 140—144.
11. Мицкевич О.И. Раколовство и раководство на водоемах Европейской части России. СПб: изд-во ГосНИОРХ, 2006. 207 с.
12. Получение хитозана из панциря речных раков / Е.С. Франченко и др. М.: Известия ВУЗов. 2005. № 5—6.
13. Слуквин А.М., Ус В.В. Разработка биотехнологии воспроизводства и получения посадочного материала длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.) в условиях рыбоводных предприятий Брестской области. Минск: Беларус. навука, 2011. С. 195—242.

14. 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.
15. Старобогатов Я.М. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. СПб: Гидрометеоиздат, 1977. С. 177—183.
16. Утеушев Р.Р. Разработка технологии комплексной переработки панцирьсодержащего сырья из ракообразных Волго-Каспийского региона / Дисс. ... канд. техн. наук. М., 2006.
17. Утеушев Р.Р., Мукатова М.Д. Хитин из панцирьсодержащих отходов речных раков Волго-Каспийского региона // Рыбная промышленность. 2006. № 1. С. 16—18.
18. Букерзис Я.М. Речные раки. Вильнюс: Моксклас, 1989. 142 с.
19. Alaranta A. et al. Genetic differences among noble crayfish (*Astacus astacus*) stocks in Finland, Sweden and Estonia based on the its1 region // Bull. Fr. Pêche Piscic. 2006. No. 380—381. 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 // Bull. Fr. Pêche Piscic. 2002. No. 367. P. 691—706.
21. Genetic variation in the narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*) populations as assessed by PCR-RFLP of mitochondrial COI gene / Majidreza Khoshkholgh, Sajad Nazari // Molecular Biology Research Communications. 2015. P. 225—237.
22. Holdich D.M. Background and functional morphology. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2002. P. 3—29.
23. Kalaycı G., Akhan S. Molecular Identification of *Astacus leptodactylus* and *Austropotamobius torrentium* Using mtDNA-RFLP Method // Turkish J. Fisheries and Aquatic Sci. 2016. V. 16. P. 789—795.
24. Longshaw M., Stebbing P. Biology and Ecology of Crayfish. Florida: CRC Press, 2016. 375 p.
25. Maguire I. et al. Two distinct evolutionary lineages of the *Astacus leptodactylus* species-complex (Decapoda: Astacidae) inferred by phylogenetic analyses // CSIRO PUBLISHING. Invertebrate Systematics. 2014. No. 28. P. 117—123.
26. Soroka M. Application of mitochondrial DNA in the identification of diverse crayfish // Polish J. Natural Sci. 2008. V. 23 (3). P. 624—634.
27. Skuza L. Molecular characterization of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.) population from Pomeranian lakes (north-western Poland) based on mitochondrial DNA // Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems. 2016. No. 13. 417 p.