

М.А. Гендельманның 110 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары – 19» халықаралық ғылыми - практикалық конференциясының материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 19», посвященной 110-летию М.А. Гендельмана». - 2023.- Т. I, Ч. IV. – С. 282-286.

УДК 502.74

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ ФАУНЫ КАЗАХСТАНА НА ОСНОВЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНА ЦИТОХРОМА Б (СУТВ)

*Бекбаева А., лаборант-исследователь
Жолдыбаева Е. В., заведующий лабораторией ННЛБКП
Национальный Центр Биотехнологии, г. Астана*

Страны Средней Азии обладают богатым и разнообразным животным миром, встречающимся в различных географических зонах: лесах, степях, полупустынях, пустынях и горах. Например, Казахстан, одна из пяти стран Центральной Азии, занимает первое место по запасам диких копытных на единицу площади [1]. Сохранение парнокопытных животных, таких как косуля, сайгак является актуальной проблемой в Республике Казахстан. Основными причинами снижения численности этих видов являются расширение хозяйственной деятельности человека, бесконтрольная охота и торговля продуктами диких животных [2]. Наиболее показательным примером стало снижение численности сайгака в Казахстане, которое составило почти миллион особей в 1970-х годах, но за 20 лет сократилась на 98% до нескольких тысяч особей к 2003 году. Основными причинами этого сокращения стали открытие границ и неконтролируемый экспорт рогов сайгака [1].

В Казахстане реализуются программы по сохранению и защите биологического разнообразия животного и растительного мира: создаются заповедники и ужесточается законодательство за отстрел и причинение вреда дикой природе. Несмотря на это, случаи браконьерства регистрируются ежегодно, и, к сожалению, многие из них остаются недоказанными из-за ограниченности доказательств. Это связано с тем, что видовая идентификация животных до сих пор проводится на основе морфологических различий или иммунологическими методами, что не позволяет установить точную видовую принадлежность, особенно если браконьеры избавляются от копыт, шкур, голов, позволяющих идентифицировать животного [3]. Современные методы, основанные на анализе образцов ДНК могут безошибочно идентифицировать видовую принадлежность биологического материала и являются наиболее надежными. Развитие молекулярно-генетических методов идентификации животных сделало возможным использование таких биологических образцов, как кровь, волосы (мех), перья, кожа, образцы мышц и фекалий [4]. В настоящее время анализ ДНК с помощью ПЦР стал рутинно используемым методом идентификации видов, поскольку он позволяет амплифицировать участки конкретных представляющих интерес генов.

Критерием идеального видового маркера является последовательность, которая показывает достаточную изменчивость между видами и отсутствие или небольшую внутривидовую изменчивость, достаточно короткая, чтобы быть секвенированной в реакции, и обладают консервативной областью для расположения универсальных праймеров [5]. Ген цитохрома б (*cyt b*) широко используется как молекулярно-генетический маркер для идентификации видов позвоночных. Многокопийность митохондриального генома, высокая межвидовая изменчивость гена *cyt b* и доступность большого количества последовательностей этого гена в базах данных нуклеотидных последовательностей, как *GenBank*, делают этот маркер одним из эффективных для видовой идентификации животных [6].

В качестве объекта исследований была использована ДНК, выделенная из мышечной ткани косули (*Capreolus pygargus*) и сайгака (*Saiga tatarica*), убитых браконьерами. Для выделения ДНК 1-2 см³ биологического образца гомогенизировали и к суспензии добавляли 5 мл Буфера Б, 1.5 мл SDS 10% и 50 мкл протеиназы К. Далее инкубировали в водяной бане при 57°C в течение 1-1.5 часа. Лизированный супернатант перенесли в 15 мл пробирку. Для удаления фрагментов клеточной оболочки, остаточных белков и полисахаридов, добавляли 1 мл 5М NaCl. Затем, тщательно перемешивали и добавляли 1 мл раствора СТАВ (10% СТАВ в 0.7 М NaCl). Перемешав на вортексе, инкубировали 10 минут, при 65°C. Заключительную очистку, выполняли хлороформным методом, с этой целью добавили 4 мл хлороформ/изоамилового спирта (24/1), тщательно встряхнули и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 8 минут. Водную фазу переносили в новую пробирку. Повторяли процедуру очистки с хлороформ/изоамиловым спиртом (24/1). Водную фазу переносили в новые пробирки. Преципитировали ДНК 0,6 объемами изопропилового спирта. Полученный преципитат ДНК перенесли в стерильную 500 мкл пробирки. Промыли осадок ДНК однократно 70% этиловым спиртом. Очищенный образец ДНК растворяли в 100 мкл однократного ТЕ буфера и хранили при минус 20°C. Измеряли концентрацию ДНК спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра NanoDrop при длине волны 260/280 нм.

Аmplification фрагмента *cytB* гена была выполнена со специфичными праймерами прямой праймер 5' –CATGGTGAAACTTTGGCTCTC-3' и обратный праймер 5'-GGTTGTCCTCCAATTCATGTTA-3' в общем объеме 20 мкл. ПЦР смесь содержала 100 нг. ДНК, 1Ед. *TaqDNA Polymerase (Syntol)*, 0,2 mM каждого дНТФ, 1-х ПЦР буфер (Fermentas), 2,5 mM *MgCl₂*, 10 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию 95°C в течение 5 минут; 25 циклов: 95°C – 1 минут, 59°C- 1 минут, 72°C – 1 минута; заключительная элонгация 10 минут при 72°C, ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора *BioRad T100(BioRad)*. Реакцию секвенирования проводили с применением *BigDye® Terminator v3.1 (AppliedBiosystems)* согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе *3730xlDNA Analyzer (AppliedBiosystems)*. Нуклеотидные последовательности биологического образца были анализированы и объединены в общую последовательность в программном обеспечении *SeqMan (DNASTAR)*. После чего были удалены концевые фрагменты (нуклеотидные

последовательности праймеров, фрагменты, имеющие низкий показатель качества), что позволило нам получить нуклеотидную последовательность протяженностью более 400 пар нуклеотидов, которые были идентифицированы в *GenBank* по алгоритму *BLAST*. По полученным последовательностям и данным из *GenBank* было построено филогенетическое дерево с помощью программы MEGA версия 11.

При выделении ДНК получили следующие данные:

1 таблица. Концентрация выделенной ДНК образцов

Название образца	Концентрация (нг/мкл)	ДНК 260/280
Косуля 1	1499,5	1,94
Косуля 2	2956,4	1,88
Сайгак 1	3090,52	1,92
Сайгак 2	1440,37	2,06
Сайгак 3	1672,90	2,07

Результаты *BLAST* показали что фрагмент гена цитохрома б (*cytB*) у Косули №1 был идентичен на 99,76% с косулями под идентификационными номерами *KT964395.1* (*Capreolus pygargus* haplotype 333) и *KT964393.1* (*Capreolus capreolus* haplotype 313), тогда как фрагмент гена *cytB* у Косули №2 был идентичен на 100% с косулями под идентификационными номерами *KT964392.1* (*Capreolus pygargus* haplotype 302) и *KJ681492.1* (*Capreolus pygargus* isolate Cp5). У сайгака №1 идентичность фрагмента гена *cytB* с сайгаком под идентификационным номером *KU560643.1* составила 96,33%, у сайгака №2 идентичность с сайгаком под идентификационным номером *MF497028.1* составила 97,13%, тогда как у сайгака №3 идентичность с сайгаком под идентификационным номером *KU560643.1* составила всего 92,13%.

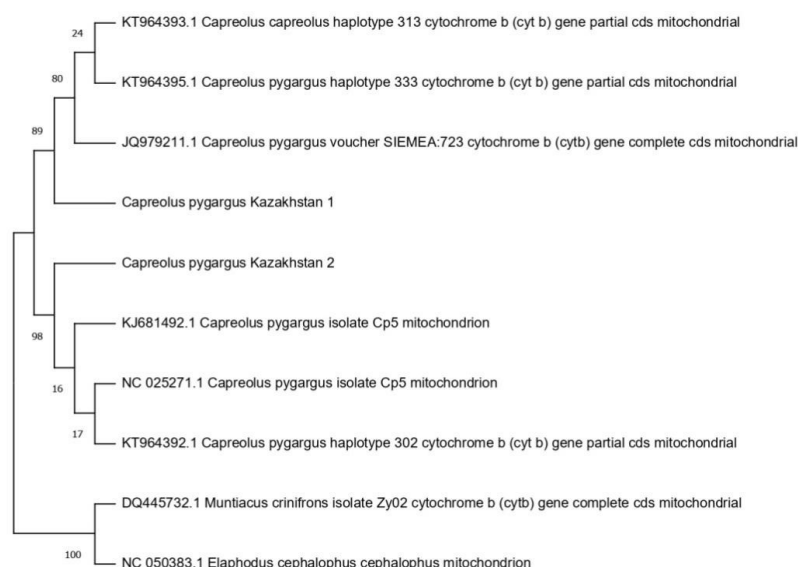


Рисунок 1. Филогенетическое дерево *Capreolus pygargus* построенное методом *Maximum Likelihood*. Чёрный мунтжак (*Muntiacus crinifrons*) и Хохлатый олень (*Elaphodus cephalophus*) были взяты в качестве внешней группы.

Результаты составленного филогенетического дерева *Capreolus pygargus* показали что, косуля №1 образует один кластер с косулями под идентификационными номерами *KT964395.1* и *KT964393.1*, а косуля №2 образует один кластер с косулями под идентификационными номерами *KT964392.1* и *KJ681492.1*.

Результаты составленного филогенетического дерева *Saiga tatarica* показали что, сайгаки изъятые в результате деятельности браконьеров на территории Казахстана составляют отдельный кластер от сайгаков, сохраненные в базе данных *GenBank*.

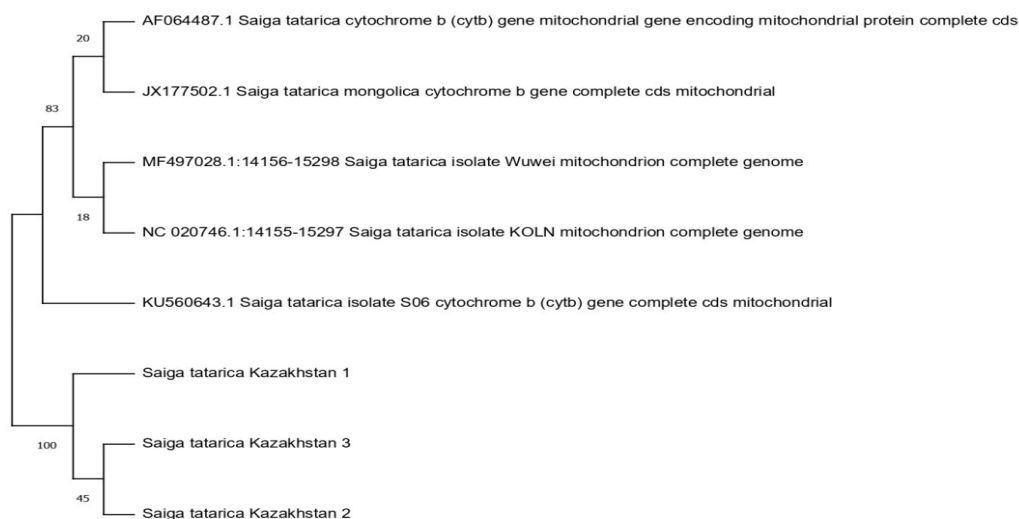


Рисунок 2. Филогенетическое дерево *Saiga tatarica* построенное методом *Maximum Likelihood*.

Устойчивое управление природными ресурсами, в частности фауной, имеет большое значение для Казахстана, который занимает первое место по запасам диких копытных на единицу площади в Центральной Азии. Данное научное исследование будет полезно при разработке специальных методов борьбы с незаконной охотой, а так же для устойчивого управления фауной на основе использования современных методов биотехнологии.

Список использованной литературы

- 1 David Blank, Yaoming Li. Sustainable use of wildlife resources in Central Asia. Regional Sustainability, Volume 2, Issue 2, 2021, Pages 144-155, ISSN 2666-660X, <https://doi.org/10.1016/j.regusus.2021.05.001>.

- 2 Goudaa, S., Kerry, R.G., Dasc, A. and Chauhana, N.S. (2020) Wildlife forensics: A boon for species identification and conservation implications. *Forensic Sci. Int.*, 317: 110530.
- 3 Mukantayev K, Kanayev D, Zhumabekova S, Shevtsov A, Tursunov K, Mukanov K, and Ramankulov Y (2022) Optimization of polymerase chain reaction for the identification of Roe deer, Saiga, and Siberian stag living in Kazakhstan, *Veterinary World*, 15(8): 2067–2071.
- 4 Ghosh, A., Basu, S., Jabin, G., Khatri, H., Singh, S.K., Maheswaran, G., Chandra, K. and Thakur, M. (2019) Wildlife forensics in voiding false offences: A case study to deal with unidentified cooked meat. *Forensic Sci. Int.*, 1: 100011.
- 5 Lopez-Oceja, A., Gamarra, D., Borragan, S., Jiménez Moreno, S. and De Pancorbo, M.M. (2016) New cyt b gene universal primer set for forensic analysis. *Forensic Sci. Int. Genet.*, 23: 159–165
- 6 Andrejevic, M., Markovic, M.K., Bursac, B., Mihajlovic, M., Tanasic, V., Kecmanovic, M. and Keckarevic, D. (2019) Identification of a broad spectrum of mammalian and avian species using the short fragment of the mitochondrially encoded cytochrome b gene. *Forensic Sci. Med. Pathol.*, 15(2): 169–177.