

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің Ғылым жаршысы (пәнаралық) = Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2022. - №3 (114). –Ч.1. - С. 63-71

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК НЕКОТОРЫХ РЕДКИХ ВИДОВ РЫБ

Адырбекова Камила Болаткызы

PhD докторант

Научный сотрудник

НАО «Казахский национальный университет имени Аль-Фараби»

ТОО «Научно-производственный центр рыбного хозяйства»

г. Алматы, Казахстан

E-mail: kamila.adyrbekova@gmail.com

Исбеков Куаныш Байболатович

Доктор биологических наук, ассоциированный профессор

Генеральный директор ТОО «Научно-производственный

центр рыбного хозяйства»

г. Алматы, Казахстан

E-mail: isbekov@mail.ru

Аннотация

Настоящее исследование было направлено на экономичное выделение значительного количества ДНК из определенной ткани рыб без какого-либо потенциального ущерба. Для этой цели предпочтительно выбиралась ткань из плавников, так как подлежит быстрой регенерации.

Выделение геномной ДНК является фундаментальным шагом для изучения генетического разнообразия и филогении видов. Протокол должен быть эффективным, занимать меньше времени, экономичным и не травмирующим, особенно для редких, эндемичных и исчезающих видов. Всего для выделения ДНК использовали 16 образцов тканей плавников двух редких видов рыб. Внесение некоторых модификаций в методы выделения на спин-колонках и набором для выделения привело к получению большого количества ДНК высокого качества, которые были выделены от живых рыб и немедленно консервированы в этаноле. Модификации включают использование большего количества Протеиназы К и небольшое увеличение времени на процесс лизиса из-за жесткой структуры плавника. ДНК, экстрагированная двумя методами, была достаточно чистой, высокого качества и пригодна для последующей ПЦР-амплификации. Этот метод особенно подходит для выделения ДНК исчезающих, эндемичных и редких видов, поскольку требует минимального количества фрагмента ткани без какого-либо вредного воздействия на рыб.

Ключевые слова: водоемы; редкие виды; рыбы; выделение ДНК; протеиназа K; агарозный гель; электрофорез.

Введение

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) не только хранит наследственную информацию, но и передает эту информацию поколению за поколением от родителей потомству. ДНК известна как наследственный материал во всех живых организмах и массово используется в различных молекулярных исследованиях. Принцип и методы выделения играют важную роль для успешного извлечения очищенного и значительного количества ДНК, поскольку клетка представляет собой комплекс различных органелл и биологических молекул [1]. Примеси в изолированной ДНК, такие как липиды, белки, полисахариды, различные неорганические и органические соединения, мешают ее дальнейшему анализу и снижают качество и срок хранения ДНК. Степень выделения и чистоты ДНК зависит от многих факторов, включая размер образца, методы экстракции и условия хранения образца [2].

В последние годы наиболее интересной и развивающейся методологией является выделение ДНК из не деструктивных для живого организма источников. Этот метод чрезвычайно важен для выделения ДНК исчезающих или находящихся под угрозой исчезновения видов для изучения их сохранения, популяции, разнообразия и генетической

оценки. Выделение ДНК рыб можно проводить из чешуи и внутренних органов. Печень, кровь и мышечная ткань рыб представляют собой наиболее часто используемые источники ДНК [3;4].

Однако выделение ДНК желательно без разрушения целостности живого организма, особенно когда анализируются большие популяции или объектом исследований являются редкие, эндемичные и исчезающие виды. К тому же, эти источники обеспечивают плохое и малое количество ДНК, поэтому реже используются для индивидуальной идентификации. Для лучшего выделения могут быть использованы плавники, где будет достаточное количество и более качественное ДНК без какого-либо потенциального вреда для рыб. Выделенную ДНК можно использовать для идентификации, реконструкции родословной и определения генетического полиморфизма между популяциями [5;6]. Стоит отметить, что для выделения ДНК предпочтение отдается плавникам, а не чешуе, поскольку чешуя имеется не у всех видов рыб.

Многие исследователи пытались выделить ДНК из животных, хранящихся в музеях естествознания, но им не удалось получить достаточное количество ДНК из сохранившихся образцов [7;8]. Вероятно, эти организмы

были собраны до развития молекулярной биологии. В большинстве музеев природы животных хранят в жидких консервантах, таких как формалин и изопропанол. Формалин является наиболее популярным источником для консервации организма. Извлечение ДНК высокого качества из животных, консервированных в формалине, проблематично. Многие физические, химические и биологические процессы влияют на качество [9]. Формалиновая реакция с ДНК обратима, если образцы хранятся в течение короткого периода времени. Длительное хранение в формалине вызывает различные химические реакции и приводит к денатурации ДНК. Также сообщается, что нуклеиновая кислота, выделенная из тканей, фиксированных формалином, является худшей матрицей для ПЦР-амплификации [8].

Данное исследование было разработано для выделения геномной ДНК из плавников рыб, которые можно было бы подвергнуть успешной ПЦР-амплификации. Более того, отсечение небольшого фрагмента плавника не оказывает вредного воздействия на рыбу. В данной работе использовались два метода выделения ДНК, которые сравнивались по качеству выделенной ДНК, включая методы выделения на спин-колонках и коммерческим набором для выделения ДНК. Мы внесли некоторые изменения в вышеуказанные методы, что

способствовало улучшению качества выделенной ДНК. Данный модифицированный метод дает достаточно высокий выход чистой ДНК, которая служит подходящей матрицей для ПЦР-амплификации интересующих последовательностей.

Объектами исследования послужили два редких вида ихтиофауны Казахстана. В бассейне озера Маркаколь на территории Восточного Казахстана маркакольский ленок - *Brachymystax lenok* Pallas на подвидовом уровне является эндемичным видом. *B. lenok* – типичный представитель бореального предгорного комплекса в пределах своего обширного ареала, вероятнее всего, образует несколько подвидов или экологических рас. [10]. В литературе совершенно недостаточно сведений по озерным популяциям этого вида.

Естественный ареал аральского усача *Luciobarbus brachycephalus* Kessler - бассейн Аральского моря. Огромное негативное влияние на размножение аральской популяции усача оказало зарегулирование стока рек Сырдарьи и Амударьи, повлекшее за собой падение уровня моря, гибель молоди в ирригационных системах в связи с большим отбором воды на орошение. Все вышеперечисленное привело к серьезному нарушению естественного воспроизводства и катастрофического сокращения численности усачей, поэтому усачи Арало-Сырдарьинского бассейна занесены в Красную книгу РК.

Международный союз охраны природы (МСОП / IUCN) усачей Арало-Сырдарьинского бассейна

относит к видам, которые находятся на грани исчезновения [11].

Материалы и методы

Отбор проб проводился с использованием различных типов рыболовных сетей из некоторых водоемов Казахстана в 2021 году. Всего было отобрано 16 экземпляра ценных и эндемичных рыб, затем были доставлены в лабораторию генетики гидробионтов ТОО «НПЦ РХ», проэтикетированы и идентифицированы согласно морфометрическим характеристикам (рисунок 1).

Рисунок 1 – Некоторые представители ценных и эндемичных видов рыб



А- Маркакольский ленок

В бассейне озера Маркаколь на территории Восточного Казахстана было отобрано 8 экземпляров маркакольского ленка - *Brachymystax lenok* Pallas.

Усачей из Арало-Сырдарьинского бассейна удалось проанализировать в количестве 8 экземпляров.

При получении проб от разных особей не допускается смешение. Перед взятием пробы покровных тканей, участок используемой поверхности должен быть очищен от возможных эктопаразитов и слизи, чистой салфеткой обильно смоченными спиртом. Все инструменты, используемые при взятии материала (скальпели, ножницы,



В- Аральский усач

пинцеты и т.д.), при переходе от особи к особи должны тщательно очищаться механически (салфеткой), промываться чистой водой и обеззараживаться спиртом. Не допускается использование инструментов, загрязненных остатками тканей от предыдущего взятия проб. У каждого вида рыб с помощью стерилизованных ножниц вырезали небольшой фрагмент (2x2 мм) грудного плавника. Ткани немедленно консервировали в 96%-ном этаноле. ДНК хранили при температуре -20°C до использования.

Для выделения ДНК из плавниковой ткани использовали два метода, которые были модифицированы. Эти методы

включают выделение ДНК на спин-колонках (PALL) [12] и набором для выделения ДНК-ЭКСТРАН-2 (Синтол, Россия).

При методе выделения ДНК на спин-колонках к образцу ткани добавили 190 μ l лизирующего буфера, содержащего 0,4 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl (pH 8,0) и 2 мМ ЭДТА, а также 40 μ l 20% SDS и увеличив от 5 до 10 μ l Протеиназы К, тщательно перемешали и проинкубировали в термостате при температуре 55-60°C, оставив не на 3 часа, а на 12-14 часов. По окончании инкубации в пробирку добавили 100 μ l AcONa, прогрели смесь 10 минут при 55°C. Супернатант перенесли в чистые пробирки и добавили 300 μ l изопропилового спирта, после чего центрифугировали 2 минуты при +4°C на скорости 10000 об/мин. Добавили Wash 1 (промывочный раствор) который состоит из изопропилового спирта 30%, этанола 35% и 35% из AcONa, центрифугировали 2 минуты при +4°C на скорости 10000 об/мин, затем промывали Wash 2 (AcONa 30 мМ и этанола 70%). Проводили элюцию ДНК в чистые микроцентрифужные пробирки (эппендорфы) с помощью деионизованной воды.

При втором методе мы использовали коммерческий набор ДНК-ЭКСТРАН-2 (набор реагентов для выделения геномной ДНК из тканей животных), где в составе Протеиназа К, лизирующий (для лизиса клеток), осаждающие 1 и 2 (для осаждения белков и ДНК), промывочный (для промывки ДНК), элюирующий (для

растворения ДНК) растворы, 2-меркаптоэтанол (для лизиса клеток) и гликоген (реагент для соосаждения ДНК).

В соответствии с инструкцией производителя и с некоторыми внесенными модификациями: для лизиса клеток, в пробирку 2 мл внесли 5-10 мг ткани, затем 300 μ l лизирующего раствора без 2-меркаптоэтанола, 10 μ l Протеиназы К, оставили на ночь при температуре 56°C. Для осаждения белков, к лизату добавили 100 μ l осаждающего раствора 1, перемешали содержимое на вортексе 20 секунд, центрифугировали смесь 5 мин при 13000 об/мин., на дне пробирки образовался плотный осадок. Для осаждения ДНК в чистые пробирки 2 мл внесли 2 μ l гликогена. Супернатант, содержащий ДНК, перенесли в полном объеме в пробирки с соосадителем ДНК, добавили 300 μ l осаждающего раствора 2 и перемешали переворачиванием до появления видимого осадка ДНК. Центрифугировали смесь 5 минут при 13000 об/мин., осторожно слили супернатант и промокнули пробирки на фильтровальной бумаге. Для промывки и растворения ДНК, добавили 400 μ l промывочного раствора, центрифугировали 2 мин при 13000 об/мин., удалили супернатант и промокнули пробирки на фильтровальной бумаге. Согласно инструкции, на этом этапе нужно добавить элюирующий раствор, но по нашим наблюдениям лучше всего получалось выделить чистую ДНК, когда мы повторно

применили промывочный раствор (AcONa 30 мМ и этанола 70%) из методики выделения на спин-колонках. Затем открытые пробирки подсушили в термостате при 37 °С 10 минут до полного высыхания. Наконец добавили к осадку 50 µl элюирующий раствор, перемешали и прогрели при 65°С 5 минут до растворения ДНК. Полученный раствор ДНК соответственно хранили при -20 °С.

Целостность ДНК проверяли, нанося маркер молекулярных масс, 8 µl выделенной ДНК на 1,4% агарозный гель, окрашенный SYBR Green I – интеркалирующим красителем, интенсивность

флуоресценции которого увеличивается на несколько порядков при встраивании в двухцепочечную ДНК, который полностью заменяет бромистый этидий.

Для проведения горизонтального электрофореза ДНК в агарозном геле использовали рабочий 1X Трис-ацетатный буфер (ТАЕ) содержащий трис, уксусную кислоту и ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту). Буфер обеспечивает хорошее разделение фрагментов ДНК и имеет высокую буферную емкость.

Результаты

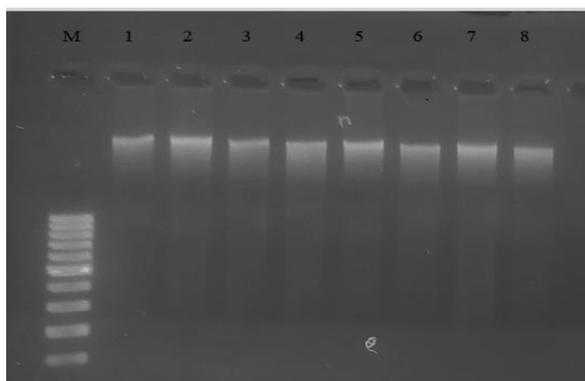
Чистоту выделенной ДНК оценивали по отношению оптической плотности при длинах волн 260 и 280 нм (Implen, NanoPhotometer). Соотношение ДНК/белки рассчитывали с помощью спектрофотометра видимого диапазона со средним значением 1,9 что указывает на ДНК достаточно хорошего качества. Результаты спектрофотометрических измерений представлены в Таблице 1.

Таблица 1 — Данные спектрофотометрических измерений и концентрация ДНК

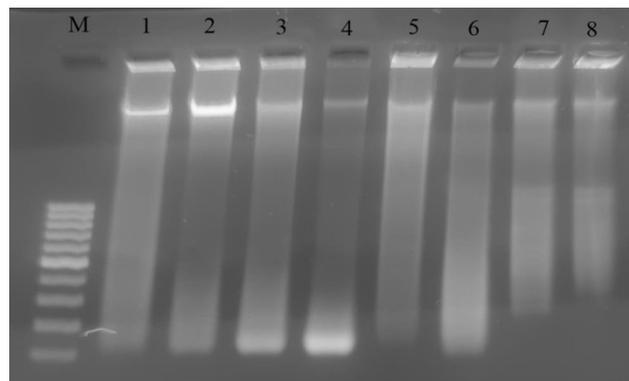
Метод	Концентрация ДНК нг/ µl (средняя)	Количество образцов
Выделение на спин-колонках	91	24
Коммерческий набор	77	

Количество и качество выделенной ДНК из всех использованных образцов проверяли на агарозном геле, который показал высококачественную ДНК, свободную от примеси белков (рисунок 2).

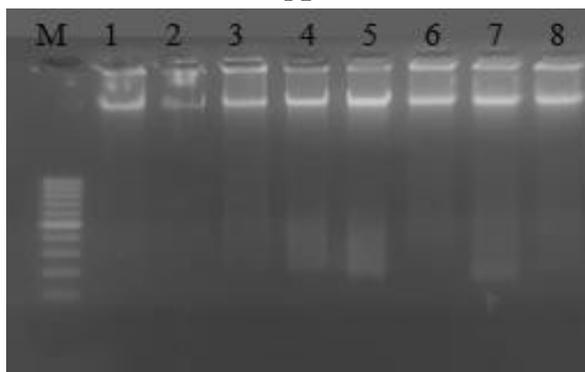
Рисунок 2 — Электрофореграмма образцов и визуальная детекция ДНК рыб в 1,4 % агарозном геле



А



Б



В



Г

А, В – метод выделения ДНК на спин-колонках (А-ленки, В-усачи); Б, Г, Д - коммерческий набор ДНК-ЭКСТРАН-2 (Б-ленки, Г- усачи); М- маркер молекулярных масс ДНК содержащий фрагменты ДНК размером от 100 до 1000 пар нуклеотидов

Высокая степень сохранности ДНК была получена всеми методами выделения. Метод модифицированного выделения на спин-колонках оказался одним из эффективных методов выделения геномной ДНК из плавников рыб, в частности из-за увеличения концентрации Протеиназы К.

Метод выделения геномной ДНК из тканей животных набором реагентов был изменен исключением 2-меркаптоэтанола, а также до растворения ДНК элюирующим раствором, дополнительно применив промывочный раствор (AcONa 30 мМ и этанола 70%) из методики выделения ДНК на спин-колонках.

Выделение ДНК из плавников рыб с помощью вышеописанных методов предлагает положительную альтернативу классическому выделению ДНК (фенол-хлороформный метод). Также нужно отметить, что сохранность образцов тканей является ключевым моментом в полевых условиях. Протокол, изложенный в данной статье, предлагает подходящую альтернативу обычным методам выделения ДНК, представляющие собой подход для выделения высококачественного ДНК рыб, что чрезвычайно важно в дальнейших исследованиях, основанные на полимеразной

цепной реакции, поскольку низкое количество ДНК или деградировавшая ДНК и наличие ингибиторов ПЦР являются основными факторами, которые способны затруднить последующую амплификацию.

Общее количество выделенной ДНК также достаточно для ряда других молекулярных процедур, которые часто требуют больше ДНК. Можно считать, что генетический запас несколько видов рыб могут быть легко получены с использованием описанной методологии.

Обсуждение

Генетические исследования в основном основаны на высококачественном выделении ДНК на основе методов ее выделения из источника. Для этой цели предпочтение отдается мягким тканям из-за их легкого и быстрого разрушения в лизирующих буферах. Специалисты в основном избегают твердых тканей, поскольку она не поддаются легкому лизису и для их полного разрушения в лизирующем растворе требуется много времени. В случае с объектом изучения, например рыб, в основном выделяют из мягких тканей, таких как кровь, мышцы, печень и т.д., но, как правило, выделение ДНК из этих тканей достигается за счет умерщвления животных. Такие последствия нежелательны в случае исчезающих, эндемичных и редких видов или для особей небольших популяций. Чешуя на первый взгляд кажется наиболее подходящей для выделения ДНК.

Однако из чешуи можно выделить небольшое количество ДНК из-за ее анатомического строения. В нашем исследовании при выделении ДНК предпочтение отдавалось плавникам, а не чешуе, поскольку чешуя не универсальна в своем распространении у рыб по сравнению с плавниками.

Еще одно улучшение было получено за счет добавления большего количества Протеиназы К (10 μ l) и большего времени инкубации тканей плавников в лизирующем буфере. Некоторые авторы предположили что время, температура и концентрация Протеиназы К очень важны для выделения ДНК высокого качества [5].

По нашим данным, количество и качество выделяемой ДНК также зависит от ее качества хранения в 95%-ном этиловом спирте после отбора проб. По мере увеличения периода гибели животных и разрыва консервации в абсолютном этаноле снижается качество и количество выделяемой ДНК.

Спектрофотометрическое сравнение поглощения при 260-280 нм было проведено на всех образцах рыб, что дало результаты соотношения ДНК/белки (1,6-2,0), показывающие хорошее качество выделенной ДНК. Из шестнадцати образцов ткани плавников, принадлежащих к двум видам рыб, была выделена ДНК с применением этих методик, и из всех образцов была выделена ДНК достаточно хорошего качества.

Заклучение

В этом исследовании сделан вывод о том, что выделение ДНК из ткани плавников рыб с помощью модифицированного метода выделения на спин-колонках является более подходящим, из-за преимущества его экономичности и высокого выхода и качества ДНК. Эта методика может быть успешно применена для выделения ДНК из плавников других видов рыб.

Касательно применения набора реагентов ДНК-ЭКСТРАН-2, выделенная ДНК имеет высокий уровень чистоты (соотношение $A_{260}/A_{280} = 1,8-1,9$) и пригодна для ПЦР. Наборы не содержат таких потенциально опасных

компонентов, как фенол и хлороформ, не требуют большого расхода пластика и не образуют токсичного мусора. Метод выделения геномной ДНК из тканей животных набором реагентов был модифицирован исключением 2-меркаптоэтанола, до этапа растворения ДНК, дополнительно применили промывочный раствор заимствованной из методики выделения ДНК на спин-колонках. Предполагается, что метод при использовании набора может быть успешно применен для выделения ДНК из плавников рыб с меньшими затратами времени.

Информация о финансировании

Исследование финансируется Министерством экологии, геологии и природных ресурсов Республики Казахстан (грант № BR10264236).

Список литературы

- 1 Taggart, J.B. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes [Текст] / Hynes R.A., Prodohol P.A. and Ferguson A. // J. Fish Biol. -1992. - P.963–965.
- 2 Bauer, M. A method for simultaneous RNA and DNA isolation from dried blood and semen stains [Текст] / Patzelt D. // Forensic Sci. Int. - 2003. - P 76-80.
- 3 Hilsdorf, A. Muscle biopsy technique for electrophoresis analysis of fish from the genus Brycon [Текст] / Caneppele, D. and Krieger, J. E. // Genet. Mol. Biol. -1999. - P.547– 550.
- 4 Martinez, G. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood [Текст] / Biotechniques. -1998. - P.238–239.
- 5 Wasko, A.P. Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales [Текст] / Martin C., Oliveira C. and Forresti F. Hereditas. -2003. - P.161-165.
- 6 Kumar, R. A non-invasive technique for rapid extraction of DNA from fish scales [Текст] / Singh P.J., Nagpure N.S., Kushwaha B., Srivastava S.K. and Lakra W.S. // Ind. J. Exp. Biol. -2007. - P.992-997.

- 7 Bruyn, M.D., Successful extraction of DNA from archived alcohol-fixed white-eye fish specimens using an ancient DNA protocol [Текст] / Parenti L.R. and Carvalho G.R. // J. Fish Biol. -2011. - P.2074–2079.
- 8 Raja, M. Comparative analysis of DNA extracted from fish species preserved in formalin in two different periods [Текст] / Muralidharan M. and Arunachalam M. // Turk. J. Biol. -2011. - P.331-336.
- 9 Fang, S. Formalin removal from archival tissue by critical point drying [Текст] / Wan Q. and Fujihara N. // Biotechnology, -2002. - P.604-611.
- 10 Митрофанов В.П. Рыбы Казахстана [Текст] / Миноговые, Осетровые, Сельдевые, Лососевые, Щуковые / Дукравец Г.М., Песереды Н.Е. и др. // Алма-Ата: Наука. -1986. -Т.1. - С. 272.
- 11 <https://www.iucn.org/regions/eastern-europe-and-central-asia> [Текст]
- 12 Ivanova N.V. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA [Текст] / Waard J., Hebert P.D.N. // Molecular Ecology Notes, -2006. - P. 998–1002.

Reference

- 1 Taggart, J.B. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes [Tekst] / Hynes R.A., Prodohol P.A. and Ferguson A. // J. Fish Biol. -1992. - P.963–965.
- 2 Bauer, M. A method for simultaneous RNA and DNA isolation from dried blood and semen stains [Tekst] / Patzelt D. // Forensic Sci. Int. -2003. - P 76-80.
- 3 Hilsdorf, A. Muscle biopsy technique for electrophoresis analysis of fish from the genus Brycon [Tekst] / Caneppele, D. and Krieger, J. E. // Genet. Mol. Biol. -1999. - P.547– 550.
- 4 Martinez, G. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood [Tekst] / Biotechniques. -1998. - P.238–239.
- 5 Wasko, A.P. Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales [Tekst] / Martin C., Oliveira C. and Forresti F. Hereditas. -2003. - P.161-165.
- 6 Kumar, R. A non-invasive technique for rapid extraction of DNA from fish scales [Tekst] / Singh P.J., Nagpure N.S., Kushwaha B., Srivastava S.K. and Lakra W.S. // Ind. J. Exp. Biol. -2007. - P.992-997.
- 7 Bruyn, M.D., Successful extraction of DNA from archived alcohol-fixed white-eye fish specimens using an ancient DNA protocol [Tekst] / Parenti L.R. and Carvalho G.R. // J. Fish Biol. -2011. P.2074–2079.
- 8 Raja, M. Comparative analysis of DNA extracted from fish species preserved in formalin in two different periods [Tekst] / Muralidharan M. and Arunachalam M. // Turk. J. Biol. -2011. - P.31-336.

- 9 Fang, S. Formalin removal from archival tissue by critical point drying [Tekst] / Wan Q. and Fujihara N. // Biotechnology, -2002. - P.604-611.
- 10 Mitrofanov V.P. Ryby Kazahstana [Tekst] / Minogovye, Osetrovye, Sel'devye, Lososevye, SHCHukovye / Dukravec G.M., Peseredi N.E. i dr. / Alma-Ata: Nauka, -1986. -T.1. - S.272.
- 11 <https://www.iucn.org/regions/eastern-europe-and-central-asia> [Tekst]
- 12 Ivanova N.V. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA [Tekst] / Waard J., Hebert P.D.N. / Molecular Ecology Notes, -2006. - P. 998–1002.

КЕЙБІР СИРЕК КЕЗДЕСЕТІН БАЛЫҚ ТҮРЛЕРІНІҢ ГЕНОМДЫҚ ДНҚ-ЫН БӨЛУ ӘДІСТЕРІ

Адырбекова Камила Болатқызы

PhD докторант

«Балық шаруашылығы ғылыми- өндірістік орталығы»

ЖШС ғылыми қызметкері

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті

Алматы қ., Қазақстан

E-mail: kamila.adyrbekova@gmail.com

Исбеков Куаныш Байболатович

Биология ғылымдарының докторы, қауымдастырылған профессор

«Балық шаруашылығы ғылыми-өндірістік орталығы»

ЖШС бас директоры

Алматы қ., Қазақстан

E-mail: isbekov@mail.ru

Түйін

Зерттеу жұмыстары барысында ДНҚ-ның сандық көрсеткіштерін тиімді жолмен пайдалану арқылы және балыққа еш зияны тимейтіндей етіп тін алынды. Осы мақсатта жүзу қанаттарынан алынған тін пайымдырақ, өйткені оның тез арада қалпына келу қабілеті бар.

Генетикалық алуантүрлілікті және филогенезін зерттеудің бастапқы қадамы болып геномдық ДНҚ-ны бөлу қажет. Зерттеу хаттамасы тиімді, аз уақытты қажет ететін, үнемді және зиянсыз болуы керек, әсіресе сирек кездесетін, эндемиялық және жойылып бара жатқан түрлер үшін. ДНҚ экстракциясы үшін сирек кездесетін екі балық түрінің қанаттарынан барлығы 16 балықтың үлгілері алынды. Кейбір өзгерістерді енгізу спин-колонка методикасы және комерциялық бөлу жинағы әдістері арқылы тірі балықтардың этанолда сақталынған ДНҚ-ның жоғары сапада алынғаны көрсетілген. Модификацияларға көбірек протеиназа К пайдалану және қанаттың қатты құрылымына байланысты лизис процесінің уақытын сәл

ұлғайту кіреді. ДНҚ-ын екі әдіспен алу арқылы, олар жеткілікті, таза жоғары сапалы және кейінгі ПТР күшейту үшін жарамды болды. Бұл әдіс құрып кету қаупі төнген, эндемикалық және сирек түрлердің ДНҚ-ның бөлу үшін өте қолайлы, өйткені ол балыққа ешқандай зиянды әсер етпейтін тін фрагментінің ең аз мөлшерін қажет етеді.

Кілт сөздер: су қоймалары; сирек түрлер; балық; ДНҚ изоляциясы; протеиназа К; агарозды гель; электрофорез.

METHODS FOR GENOMIC DNA ISOLATION IN SOME RARE FISH SPECIES

Adyrbekova Kamila Bolatkyzy

PhD student, research associate

LLP «Fisheries Research and Production Center»

Al-Farabi Kazakh National University

Almaty, Kazakhstan

E-mail: kamila.adyrbekova@gmail.com

Isbekov Kuanysh Baibulatovich

Doctor of biological sciences, associate professor

General Director LLP «Fisheries Research and

Production Center»

Almaty, Kazakhstan

E-mail: isbekov@mail.ru

Abstract

The present study was aimed at economically isolating a significant amount of DNA from certain fish tissue without any potential damage. For this purpose, tissue from fins was preferably chosen, since it is subject to rapid regeneration.

The isolation of genomic DNA is a fundamental step in the study of the genetic diversity and phylogeny of species. The protocol should be effective, less time consuming, economical and non-traumatic, especially for rare, endemic and endangered species. A total of 16 tissue samples from the fins of two rare fish species were used for DNA extraction. Some modifications to the spin column and DNA isolation kit methods resulted in large quantities of high quality DNA, which were isolated from live fish and immediately preserved in ethanol. Modifications include using more Proteinase K and slightly increasing the time for the lysis process due to the rigid structure of the fin. The DNA extracted by the two methods was sufficiently pure, of high quality, and suitable for subsequent PCR amplification. This method is particularly suitable for DNA isolation of endangered, endemic and rare species, since it requires a minimum amount of tissue fragment without any harmful effect on the fish.

Key words: reservoirs; rare species; fish; DNA isolation; proteinase K; agarose gel; electrophoresis.