

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ  
КАФЕДРА ЗООЛОГИИ И ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ  
Направление подготовки 06.04.01 Биология  
Магистерская программа «Биоресурсы и биоразнообразие»

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА МАГИСТРА  
ЗАЛЯЛОВОЙ ЭНДЖЕ РИФАТОВНЫ

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МЕЛКИХ  
НАЗЕМНЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ПО ГЕНЕТИЧЕСКИМ  
ДЕТЕРМИНАНТАМ

Работа завершена:

« 20 » мая 2019 г.  (Э.Р. Залялова)

Работа допущена к защите:

Научные руководители

Кандидат биологических наук, доцент

« 3 » июня 2019 г.  (А. Ф. Беспалов)

Кандидат биологических наук, доцент

« 3 » июня 2019 г.  (А. Р. Каюмов)

Заведующий кафедрой

Кандидат биологических наук, доцент

« 03 » 06 2019 г.  (Р. М. Сабиров)

Казань – 2019

## РЕФЕРАТ

*Ключевые слова:* мелкие позвоночные животные, идентификация грызунов, белки, электрофорез, выделение ДНК, пробоподготовка, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Выпускная квалификационная работа посвящена разработке подхода для идентификации мелких позвоночных животных с помощью молекулярных методов. Создали показательную выборку по грызунам пяти видов - рыжей полевке, обыкновенной полевке, малой лесной мыши, желтогорлой мыши и домовой мыши (свободноживущей и лабораторной), а также по озерной и прудовой лягушкам. Выявили, что для идентификации мелких позвоночных животных до вида по паттерну белков крови оптимально использовать электрофорез в денатурирующих условиях в 10% полиакриламидном геле, окрашивая гель нитратом серебра. Чтобы проверить возможность идентификации грызунов по паттерну белков крови, проводили идентификацию животных по морфометрическим признакам и полученные данные сопоставляли с данными идентификации по белкам крови. Всего было проанализировано 102 грызуна. Из них для 85 % животных результаты обоих методов совпали. Для идентификации белков проводили электрофорез крови лабораторной мыши *Mus musculus*, белковые бэнды вырезали и идентифицировали методом масс-спектрометрии. Также проведен анализ возможности идентификации грызунов с помощью амплификации фрагментов гена сывороточного альбумина.

Работа изложена на 80 страницах, содержит 12 рисунков (все оригинальные), 2 таблицы, 1 приложение, Список литературы включает 91 источник, из них 22 на иностранном языке.

## СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Видовой состав мелких позвоночных животных.....	10
1.2 Краткое описание мелких позвоночных животных.....	11
1.3 Особенности и отличия.....	14
1.4 Питание.....	17
1.5 Распространение, места обитания.....	20
1.6 Образ жизни.....	22
1.7 Размножение.....	26
1.8 Значение мелких позвоночных животных.....	29
1.9 Лабораторные мыши.....	32
2. ФИЗИКО-ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЙОНА ИССЛЕДОВАНИЯ.....	34
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
3.1 Сбор материала.....	38
3.2 Определение позвоночных животных по морфометрии.....	39
3.3 Пробоподготовка для молекулярно-биологических исследований.....	40
3.4 Определение белка по методу Мэрион Брэдфорд (Bradford, 1976).....	41
3.5 Электрофорез белка в денатурирующих условиях в 10-15 % геле.....	42
3.6 Электрофорез белка в нативных условиях.....	42
3.7 Окраска гелей.....	43
3.8 Выделение ДНК из крови.....	43

3.9 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) .....	46
3.10 Электрофорез ДНК .....	47
3.11 Биоинформатика .....	47
4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	49
4.1 Создание показательной выборки мелких позвоночных животных.....	49
4.2 Подбор и оптимизация условий электрофореза образцов крови грызунов и земноводных для идентификации животных до рода и вида...	50
4.3 Верификация стабильности белкового паттерна крови внутри вида. ...	52
4.4 Апробация метода идентификации мышевидных грызунов и лягушек по белковому паттерну крови.....	54
4.5 Оценка возможности использования ПЦР для различения видов .....	56
ВЫВОДЫ .....	66
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	67
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	76



## ВВЕДЕНИЕ

Мелкие позвоночные животные имеют большое значение в природных экосистемах и для человека. Благодаря своей значительной численности и высокой скорости размножения они составляют фундамент экосистем, служа пищей для хищных рептилий, птиц и млекопитающих и влияя на динамику их популяций. Для человека важный аспект биологии мелких позвоночных животных заключается в том, что, размножаясь в значительных количествах, они наносят ощутимый урон урожаю сельскохозяйственных культур. Ряд видов, помимо этого, способен приводить к ущербу в других областях народного хозяйства.

Тот факт, что мелкие позвоночные животные могут являться переносчиками различных инфекционных заболеваний человека, дополнительно подчеркивает значение этих млекопитающих для медицины. Такие опасные болезни как чума, сибирская язва, брюшной тиф, паратифы, энцефалит, бешенство, туберкулез, туляремия и геморрагическая лихорадка с почечным синдромом и ряд других – разносятся мелкими позвоночными животными. Паразитирующие на них блохи, клещи, питаясь кровью грызунов, больных этими болезнями, передают возбудителей человеку или домашним животным, когда начинают питаться их кровью (Естафьев, 1994; Дмитриев П.П., 2015).

Вредное воздействие лягушек в том, что они являются переходным звеном – хозяином глистов, которые поражают птиц и пушного зверя. Также они могут являться временным хозяином возбудителя туляремии. У рыжей полевки геморрагическая лихорадка проявляется в виде латентного вирусоносительства. Передача между грызунами осуществляется в основном через дыхательные пути. Заражение человека происходит воздушно-пылевым путем. Лягушки и используются в качестве лабораторных животных. На них проводятся опыты, всевозможные исследования в области медицины и биологии (Кучерук, 1989).

Зелёные лягушки являются объектом изучения уже более 250 лет. Однако в последние десятилетия они привлекают к себе особенно пристальное внимание исследователей разных стран в качестве модели необычного видообразования среди позвоночных животных. В конце 60-х годов польский зоолог Лешек Бергер (Berger, 1967) высказал предположение о том, что довольно обычный вид съедобная лягушка (*Pelophylax esculenta*), описанный еще К. Линнеем в 1758 году, имеет гибридное происхождение. Эта гипотеза противоречила, как тогда казалось, основным принципам видообразования и потому была встречена с некоторым недоверием. Впоследствии она получила подтверждение в исследованиях многих ученых (Günther, 1990; Лада, 1995).

В настоящее время общепринято, что съедобная лягушка (*P. esculenta*), как вид является результатом гибридизации озерной (*P. ridibundus* Pallas, 1771) и прудовой (*P. lessonae* Camerano, 1882) лягушек. Исторически эта гибридная форма возникла довольно давно (Böhme, Günther, 1979).

Однако *P. esculenta* оказалась не менделеевским гибридом (Бергер, 1976), она обладает особым так называемым полуклональным типом наследования, при котором во время гаметогенеза один из родительских геномов избирательно элиминируется. Детали этого необычного типа цитогенетического процесса были изучены с помощью проточной ДНК – цитометрии (Боркин и др., 1987; Виноградов и др., 1988; Vinogradov et al., 1990, 1991).

Все три вида комплекса широко расселены в центральной и восточной Европе, и ареалы их заметно перекрываются. Благодаря своей необычной генетике *P. esculenta* может сосуществовать в популяционных системах как с двумя родительскими видами, так и только с одним или даже вообще без них. *P. esculenta* может быть представлена в популяциях самцами или самками или в ряде случаев только одним из полов. Помимо диплоидных встречаются также триплоидные гибриды. Поэтому зеленые лягушки могут образовать различные типы популяционных систем. На территории бывшего

СССР к настоящему времени выявлены четыре типа популяций с участием гибридов (Цауне и др., 1993; Лада, 1995; Боркин, 1999; Borkin et al., 1986, Lada et al., 1995).

В свете новой концепции образования *P. esculenta* многие данные, полученные прежними авторами без адекватных методов идентификации, нуждаются в пересмотре. По-видимому, во многих случаях под этим названием скрывались, по крайней мере, два вида: *P. esculenta* в современном понимании и *P. lessonae*.

К сожалению, следует отметить, что распространение гибридов на территории европейской части России до сих пор изучено явно недостаточно (Боркин, 1999, Lada et al., 1995).

Сейчас наиболее точная идентификация видов возможна с использованием молекулярно биологических методов анализа последовательности макромолекул – ДНК и белков.

Также все чаще появляются сведения о видах – двойниках среди некоторых групп мелких млекопитающих. Для их идентификации используются методы кариосистематики. В практике зоологических работ этот метод весьма трудоемок и редко используется. Определение таких видов составляет значительную трудность.

Для решения было предложено использовать различия в молекулярной массе белков гемоглобинов крови мелких млекопитающих (Доброхотов, 1985). Изначально было предложено использовать электрофорез в нативных условиях, где гемоглобины видны без специальной окраски благодаря естественной окраске геля. Хотя этот метод нельзя назвать универсальным, зачастую при крупномасштабных экологических исследованиях ему нет альтернативы. Он хорошо зарекомендовал себя при видовой идентификации песчанок (Ritte et al., 1976), многососковых крыс рода *Mastomys* (Green et al., 1978; Доброхотов, 1982; Robbins et al., 1983) и некоторых серых полевков (Доброхотов, 1982; Доброхотов, Малыгин, 1982). Однако гемоглобины крови далеко не у всех видов грызунов имеют



значимые различия, идентифицируемые методом электрофореза (Доброхотов, 1985). Недавно методом двумерного электрофореза было показано, что межвидовое количество различающихся белков в белковом пуле различных тканей млекопитающих достигает 360 белков (Enard et al., 2002, Talamo et al., 2003), но высокая трудоемкость и дороговизна данного метода значительно ограничивает его использование.

Из этого следует актуальность разработки быстрого, простого и надежного метода идентификации мелких позвоночных животных. Малая трудоемкость и быстрота благоприятствовала бы его использованию в исследованиях массового материала, а сам метод давал бы возможность отбирать первичный материал неквалифицированным специалистам, что повышало бы его значение для служб и организаций научного и надзорного профиля.

В связи с этим, **целью** нашей работы явилась разработка подхода для идентификации мелких позвоночных животных с помощью молекулярных методов.

В связи с этим были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Создание показательной выборки мелких позвоночных животных.
- 2) Подбор и оптимизация условий электрофореза образцов крови грызунов и земноводных для идентификации животных до рода и вида.
- 3) Верификация стабильности белкового паттерна крови внутри вида.
- 4) Апробация метода идентификации мышевидных грызунов и лягушек по белковому паттерну крови.
- 5) Оценка возможности использования ПЦР для различения видов по размерам продуктов ПЦР.



## ВЫВОДЫ

1. Создана показательная выборка по грызунам пяти видов - рыжей полевке, обыкновенной полевке, малой лесной мыши, желтогорлой мыши и домовой мыши (свободноживущей и лабораторной), а также по озерной и прудовой лягушкам.
2. Для идентификации мелких позвоночных животных до вида по паттерну белков крови оптимально использовать электрофорез в денатурирующих условиях в 10% полиакриламидном геле, окрашивая гель нитратом серебра, при этом для грызунов маркерными белками являются серотрансферрин и сывороточный альбумин.
3. У каждого из пяти видов грызунов внутри вида наблюдается стабильность белкового паттерна, т.е. данные белки присутствуют у всех особей независимо от времени года и половой принадлежности и на 102 особях метод показал 85%-ную точность идентификации видов при сравнении с морфометрическим определением.
4. Для обоих видов лягушек наблюдается стабильность набора белков крови внутри вида, однако метод идентифицирует ряд особей со значительными отклонениями от эталонов, что говорит о наличии гибридных особей.
5. Созданы предпосылки для разработки метода для экспресс-идентификации грызунов до вида путем амплификации фрагментов гена сывороточного альбумина.
6. Предварительные данные показали, что как минимум полевки и мыши могут быть различены путем ПЦР с использованием подобранных в работе пар праймеров 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, однако требуется оптимизация и проверка работоспособности метода.