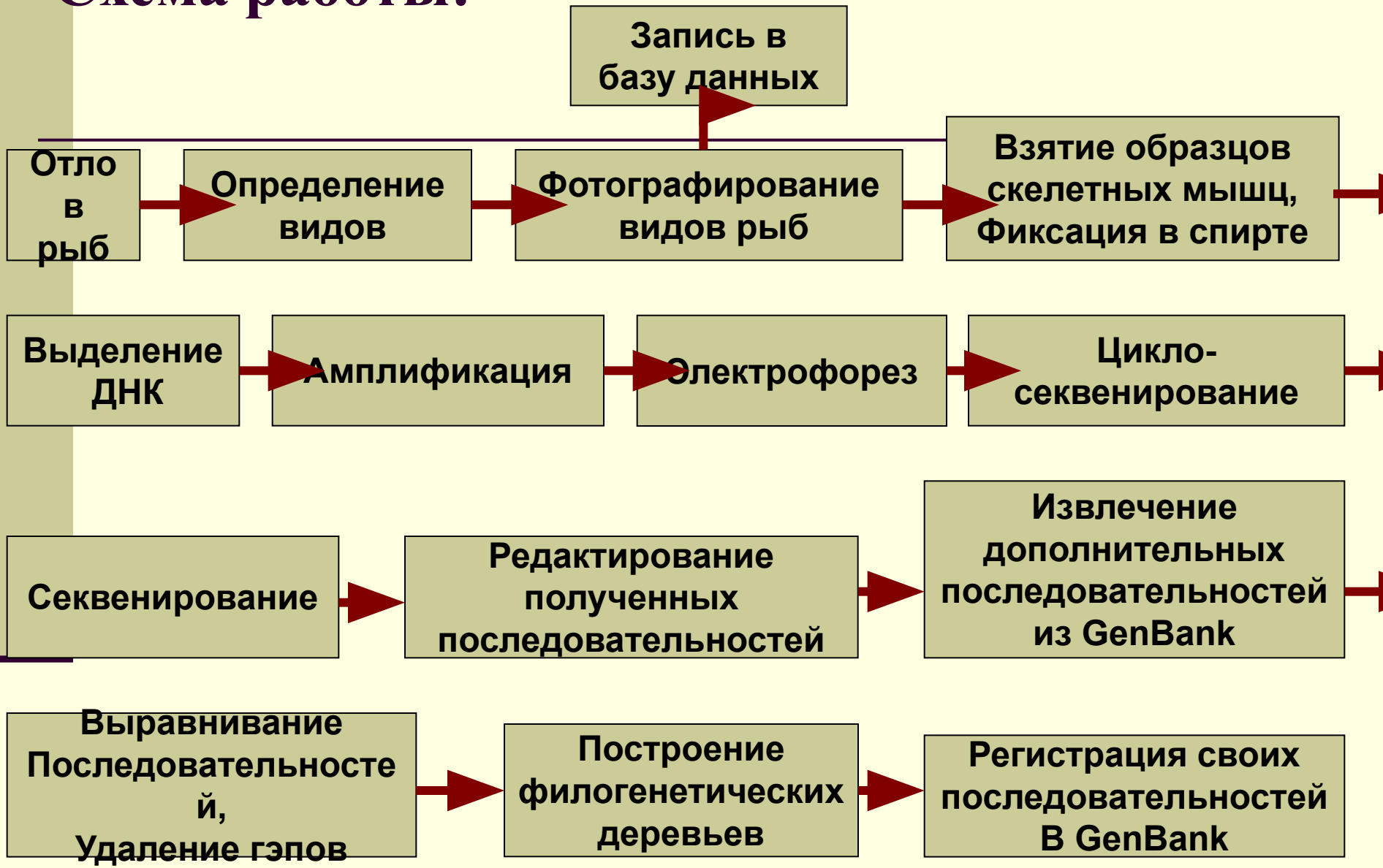
# ПЕРВЫЙ ОПЫТ УЧАСТИЯ В ШТРИХ-КОДИРОВАНИИ ВИДОВ РЫБ РОССИИ НА ОСНОВЕ ПЕРВИЧНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА СО-1

**Картавцев Ю.Ф., Шарина С.Н., Чичвархин А.Ю., Соколовский А.С., Баланов А. А., Винников К.А., Иванков В.Н.**

***Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток 690041;***

***e-mail: Kartavtsev_yu48@hotmail.com***

# Схема работы:



# Некоторые из объектов

Рис. 1 Внешний вид (А) полосатой камбалы (*Liopseta pinifasciata)* и (Б) темной камбалы (*Pseudopleuronectes obcurus)*

Microsoft Excel - SPECIMEN-DATA-RECORD2-22-11-06.xls

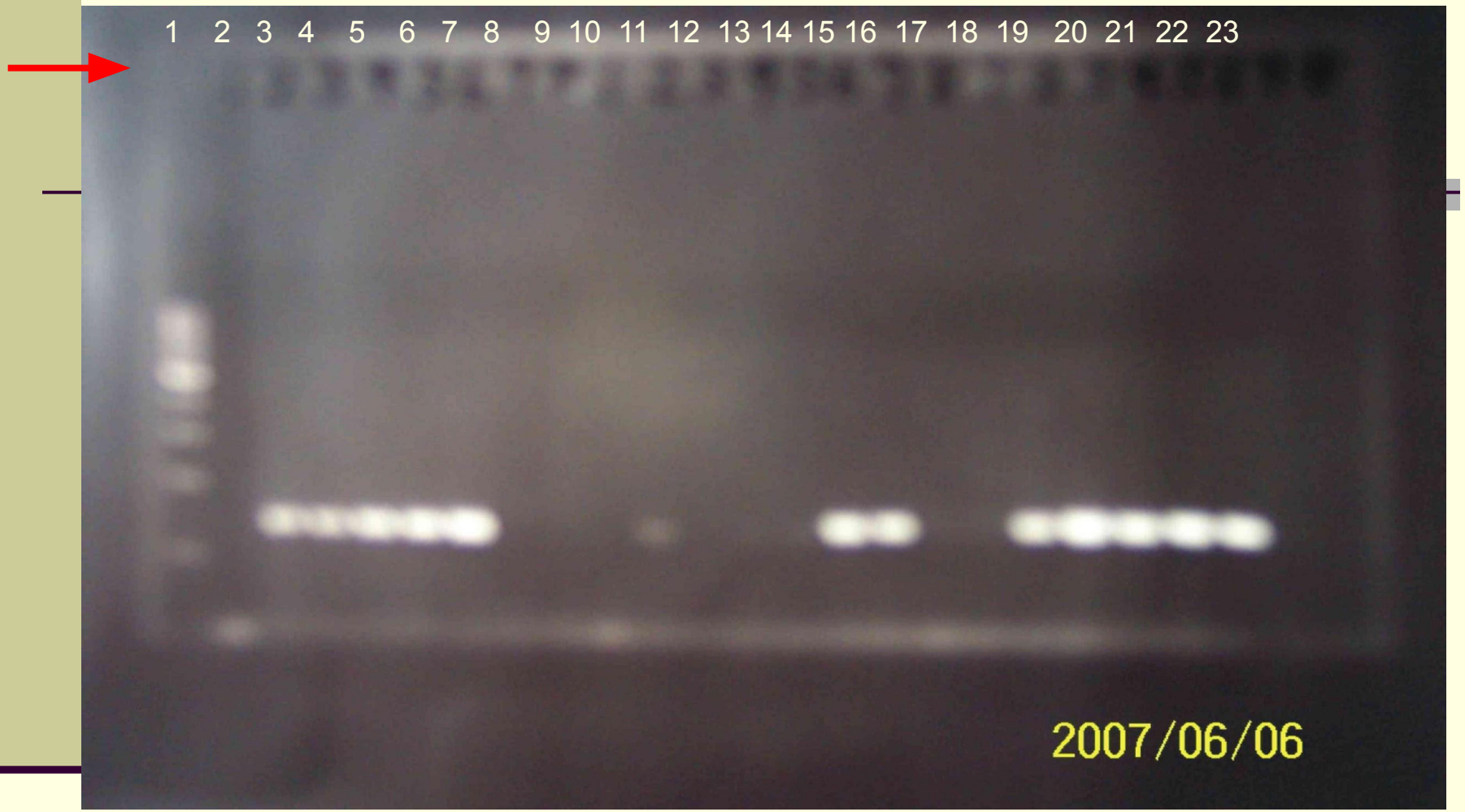
| | | Museum Accession | Specimen Accession | Phylum | Class | Order | Family | Subfamily | Genus | Species | Identifier |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 60 | 57 | | | | Actinopterygii | Pleuronectifor | Pleuronectidae | | Limanda | L. obscurus | Соколовский А.С. |
| 61 | 58 | | | | Actinopterygii | Pleuronectifor | Pleuronectidae | | Limanda | L. obscurus | Соколовский А.С. |
| 62 | 59 | | | | Actinopterygii | Pleuronectifor | Pleuronectidae | | Pleuronectes | P. punctatissimus | Соколовский А.С. |
| 63 | 60 | | | | Actinopterygii | Pleuronectifor | Pleuronectidae | | Pseudopleuro | P. pinnifasciatus | Соколовский А.С. |
| 64 | 61 | | | | Actinopterygii | Perciformes | Stichaeidae | | Chirolopus | C. japonicus | Соколовский А.С. |
| 65 | 62 | | | | Actinopterygii | Perciformes | Pholidae | | Pholis | P. nebulosa | Соколовский А.С. |
| 66 | 63 | | | | Actinopterygii | Perciformes | Stichaeidae | | Pholidapus | P. dybowskii | Соколовский А.С. |
| 67 | 64 | | | | Actinopterygii | Scorpaeniform | Hexagrammidae | | Hexagrammo | H. octogrammus | Соколовский А.С. |
| 68 | 65 | | | | Actinopterygii | Scorpaeniform | Hexagrammidae | | Hexagrammo | H. octogrammus | Соколовский А.С. |
| 69 | 66 | | | | Actinopterygii | Scorpaeniform | Hexagrammidae | | Hexagrammo | H. octogrammus+H. o | Соколовский А.С. |
| 70 | 67 | | | | Actinopterygii | Pleuronectifor | Pleuronectidae | | Limanda | L. obscurus | Соколовский А.С. |
| 71 | 68 | | | | Actinopterygii | Pleuronectifor | Pleuronectidae | | Limanda | L. obscurus | Соколовский А.С. |
| 72 | 69 | | | | Actinopterygii | Scorpaeniform | Cottidae | | Myoxocephal | M. brandtii | Соколовский А.С. |
| 73 | 70 | | | | Actinopterygii | Perciformes | Stichaeidae | | Pholidapus | P. dybowskii | Соколовский А.С. |
| 74 | 71 | | | | Actinopterygii | Perciformes | Stichaeidae | | Chirolopus | C. japonicus | Соколовский А.С. |
| 75 | 72 | | | | Actinopterygii | Perciformes | Stichaeidae | | Chirolopus | C. japonicus | Соколовский А.С. |
| 76 | 73 | | | | Actinopterygii | Scorpaeniform | Cottidae | | Myoxocephal | M. jaok | Соколовский А.С. |
| 77 | 74 | | | | Actinopterygii | Osmeriformes | Osmeridae | | Osmerus | O. mordax dentex | Соколовский А.С. |
| 78 | 75 | | | | Actinopterygii | Scorpaeniform | Hemitripteridae | | Hemitripterus | H. villosus | Соколовский А.С. |
| 79 | 76 | | | | Actinopterygii | Scorpaeniform | Cottidae | | Megalocottus | M. platycephalus | Соколовский А.С. |
| 80 | 77 | | | | Actinopterygii | Gadiformes | Gadidae | | Gadus | G. morchua | Соколовский А.С. |
| 81 | 78 | | | | Actinopterygii | Scorpaeniform | Sebastidae | | Sebastes | S. schlegelii | Соколовский А.С. |
| 82 | 79 | | | | Actinopterygii | Pleuronectifor | Pleuronectidae | | Limanda | L. obscurus | Соколовский А.С. |
| 83 | 80 | | | | Actinopterygii | Scorpaeniform | Hemitripteridae | | Hemitripterus | H. villosus | Соколовский А.С. |
| 84 | 81 | | | | Actinopterygii | Scorpaeniform | Cottidae | | Myoxocephal | M. brandtii | Соколовский А.С. |
| 85 | 82 | | | | Actinopterygii | Perciformes | Stichaeidae | | Pholidapus | P. dybowskii | |
| 86 | 83 | | | | Actinopterygii | Perciformes | Stichaeidae | | Pholidapus | P. dybowskii | |
| 87 | 84 | | | | Actinopterygii | Perciformes | Stichaeidae | | Pholidapus | P. dybowskii | |

Фрагмент таблицы базы данных (в таблице указывается номер пробы (образца), название вида, систематика вида, кем данный вид определен, где собран, кем и когда).

- Тотальную ДНК выделяли из скелетных мышц обычной хлороформ-фенольной методикой с осаждением ДНК спиртом.
- Полученную ДНК амплифицировали с помощью ПЦР-методики в прямом и обратном направлении с использованием праймеров F1 – R1 и F2 – R2, затем продукты ПЦР подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле и окрашивали бромистым этидием после чего просматривали в УФ-свете, где было видно что длина амплифицированной последовательности (т.е. длина гена СО-1) составляет примерно 700п.н. (для определения длины гена использовали маркер (1100+100)).

# Праймеры используемые для ПЦР-реакции (Ward et al., 2005)

- FishF1-50TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC30,
- FishF2-50TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC30,
- FishR1-50TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA30,
- FishR2-50ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA30.




Вид продуктов ПЦР-реакции в агарозном геле после электрофореза. Цифрами 2-23 обозначены номера проб, 1 – маркер, стрелкой обозначен старт электрофореза.

# Амплификация

Реакционная смесь на одну пробу (25µl) для ПЦР включала: дистиллированная вода - 17,4 µl; Ex-Tag буфер – 2,5; смесь dNTP – 2,0; праймер F1 (20pmol/ µl ) – 1,0; праймер R1 (20pmol/ µl ) – 1,0; Ex-Tag полимераза – 0,5; образец ДНК – 1,0

## 30 циклов

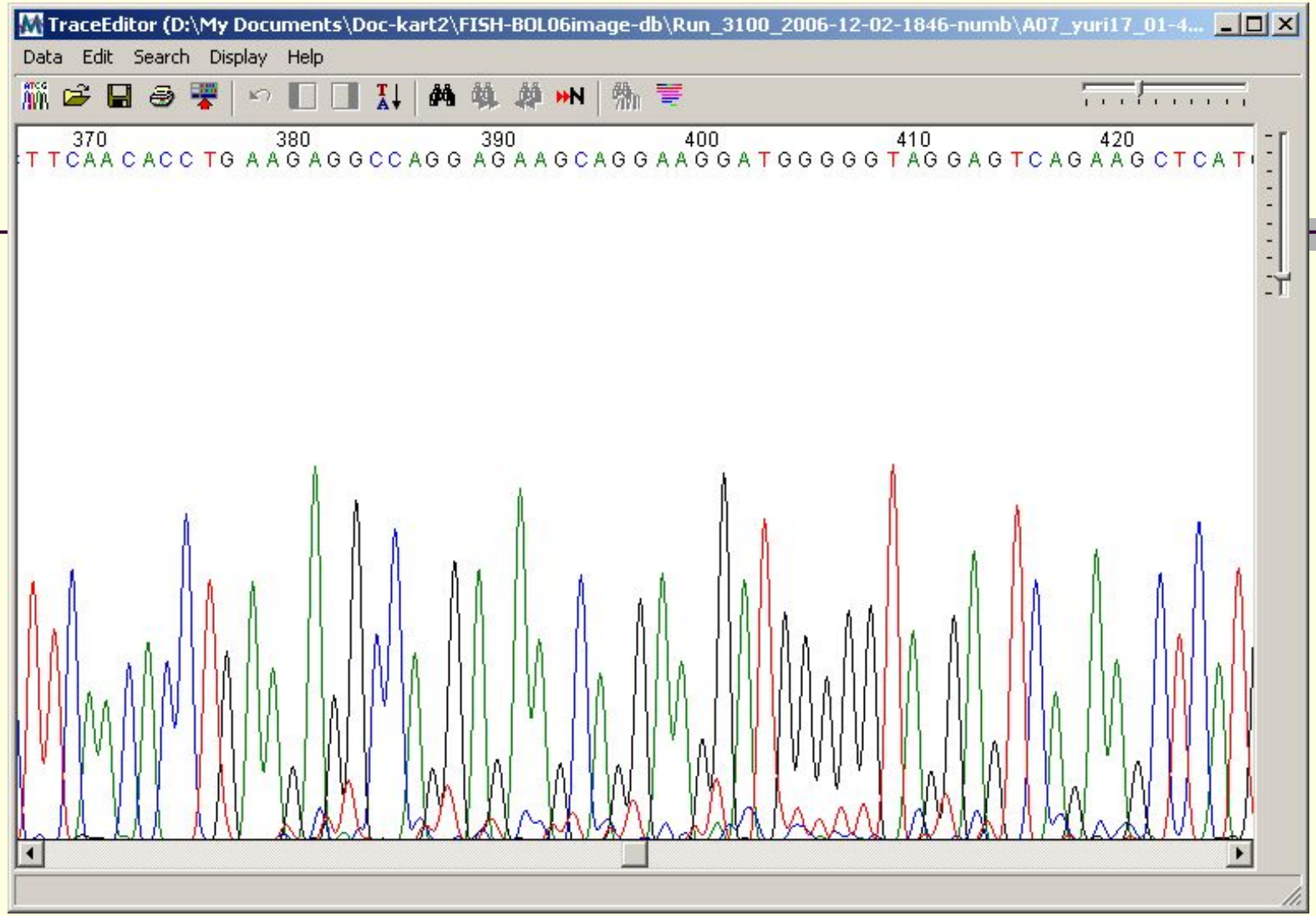
| Температура, ˚C | 94,0 | 94,0 | 60,0 | 72,0 | 72,0 | 4,0 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Время, мин | 5:00 | 0:30 | 0:30 | 1:00 | 7:00 | ∞ |

# Циклосеквенирование

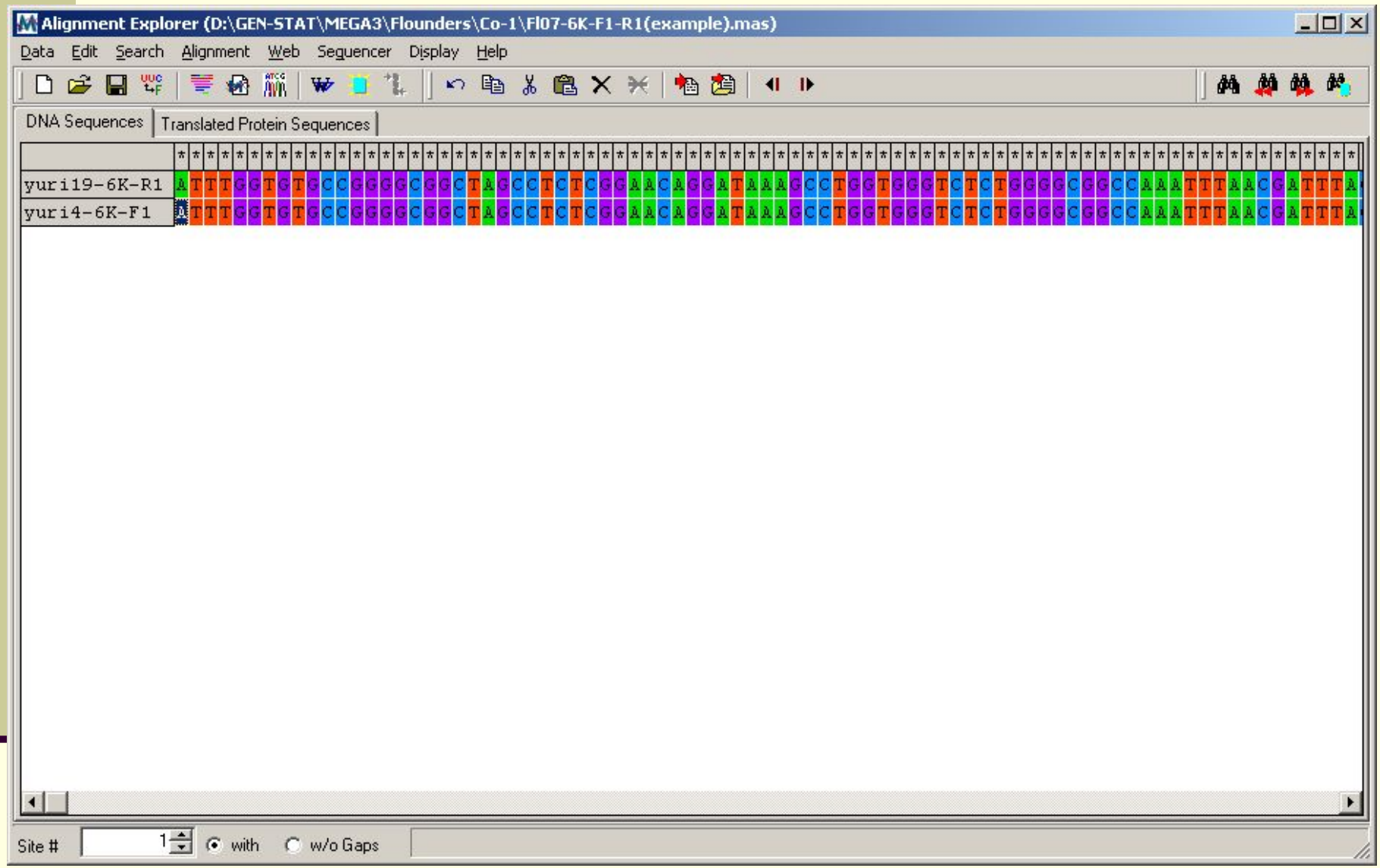
Циклосеквенирование проводили с использованием реагентов фирмы Amersham (Amersham, DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit)

## 30 циклов

| Температура, ˚C | 95,0 | 50,0 | 60,0 | 4,0 |
|---|---|---|---|---|
| Время, мин | 0:20 | 0:15 | 1:00 | ∞ |




Такой вид имеет последовательность после секвенирования, использовалась модель секвенатора ABI-3100 (Applied Biosistems, USA)




Отредактированная последовательность одного образца.

NCBI Sequence Viewer v2.0 - Microsoft Internet Explorer

File Edit View Favorites Tools Help

Address http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=114052818

NCBI Entrez Nucleotide

My NCBI [Sign In] [Register]

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books

Search CoreNucleotide for Go Clear

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display GenBank Show 5 Send to Hide: sequence all but gene, CDS and mRNA features

Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: + Refresh

1: NC_008327. Reports Solea senegalensi...[gi:114052818] Links

Comment Features Sequence

```
LOCUS       NC_008327              16659 bp    DNA     circular VRT 02-MAY-2007
DEFINITION  Solea senegalensis mitochondrion, complete genome.
ACCESSION   NC_008327
VERSION     NC_008327.1  GI:114052818
PROJECT     GenomeProject:17599
KEYWORDS    .
SOURCE      mitochondrion Solea senegalensis (sole)
  ORGANISM  Solea senegalensis
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
            Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Pleuronectiformes;
            Soleoidei; Soleidae; Solea.
REFERENCE   1  (bases 1 to 16659)
  AUTHORS   Manchado,M., Catanese,G., Ponce,M., Funes,V. and Infante,C.
  TITLE     The complete mitochondrial genome of the Senegal sole, Solea
            senegalensis Kaup. Comparative analysis of tandem repeats in the
            control region among soles
```

Internet

# Окно GenBank

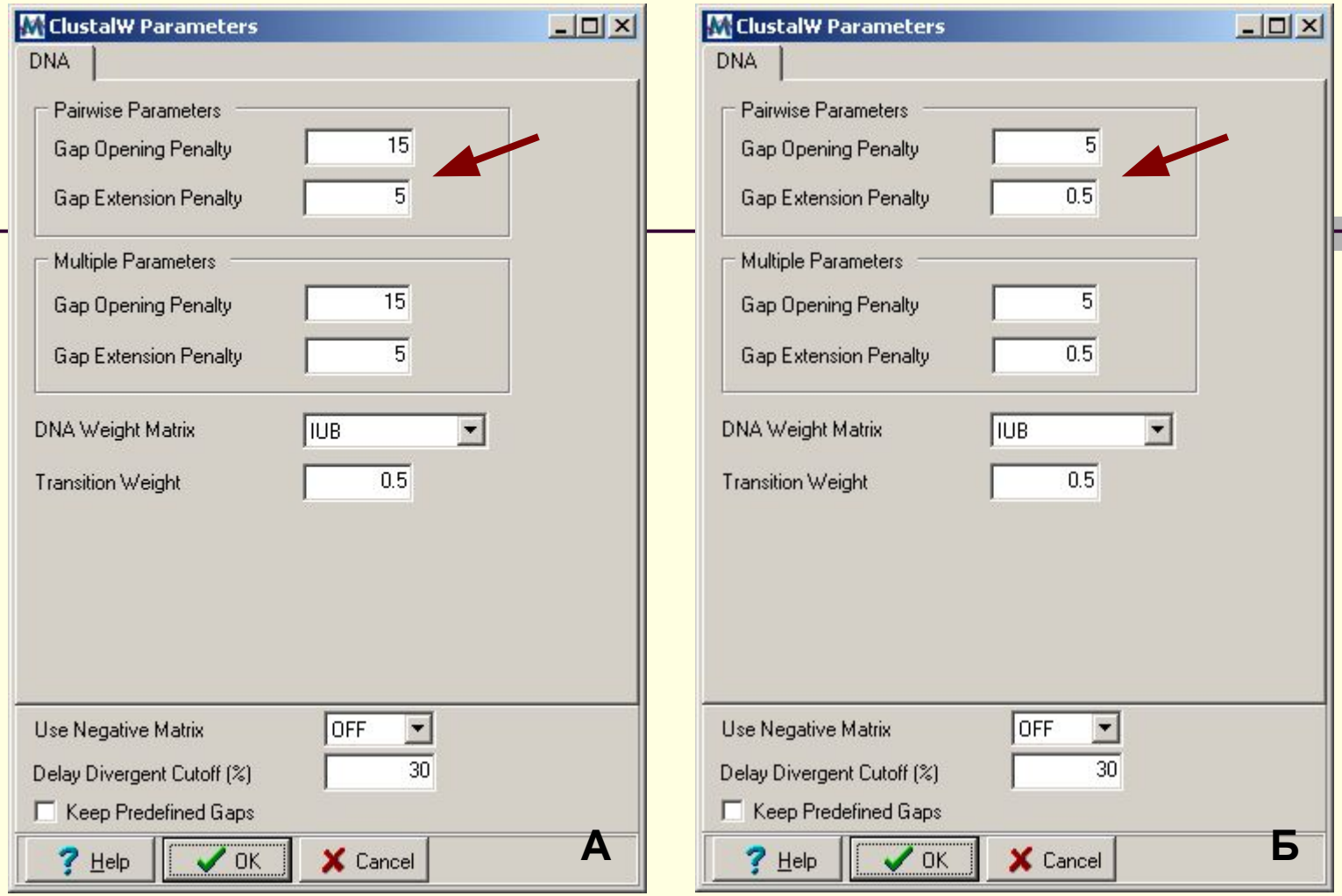
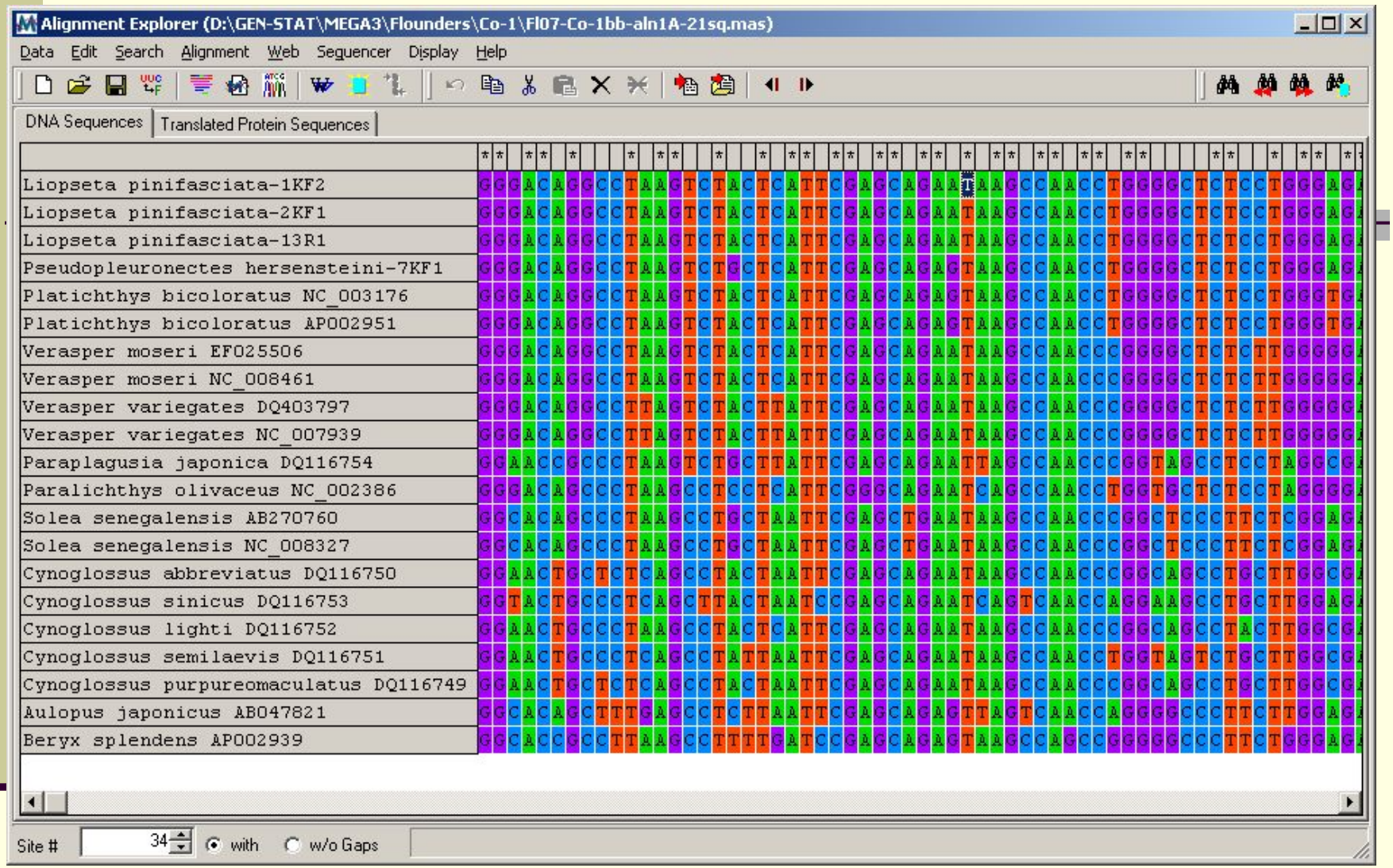



Рис. 8 Окна установления параметров для выравнивания (А) штрафы для первого выравнивания, (Б) штрафы для второго выравнивания

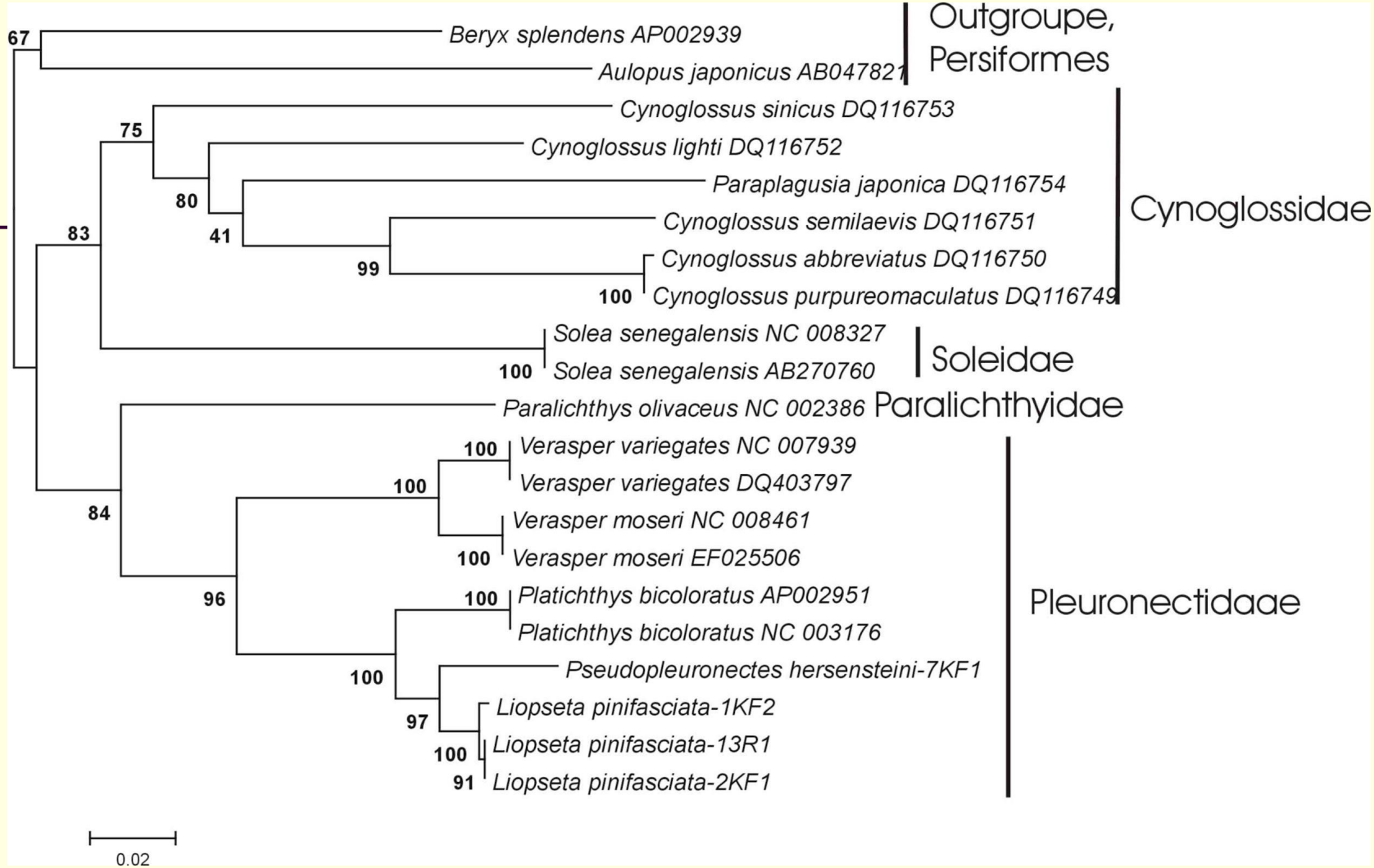



Выровненные последовательности гена Co-1 взятые из

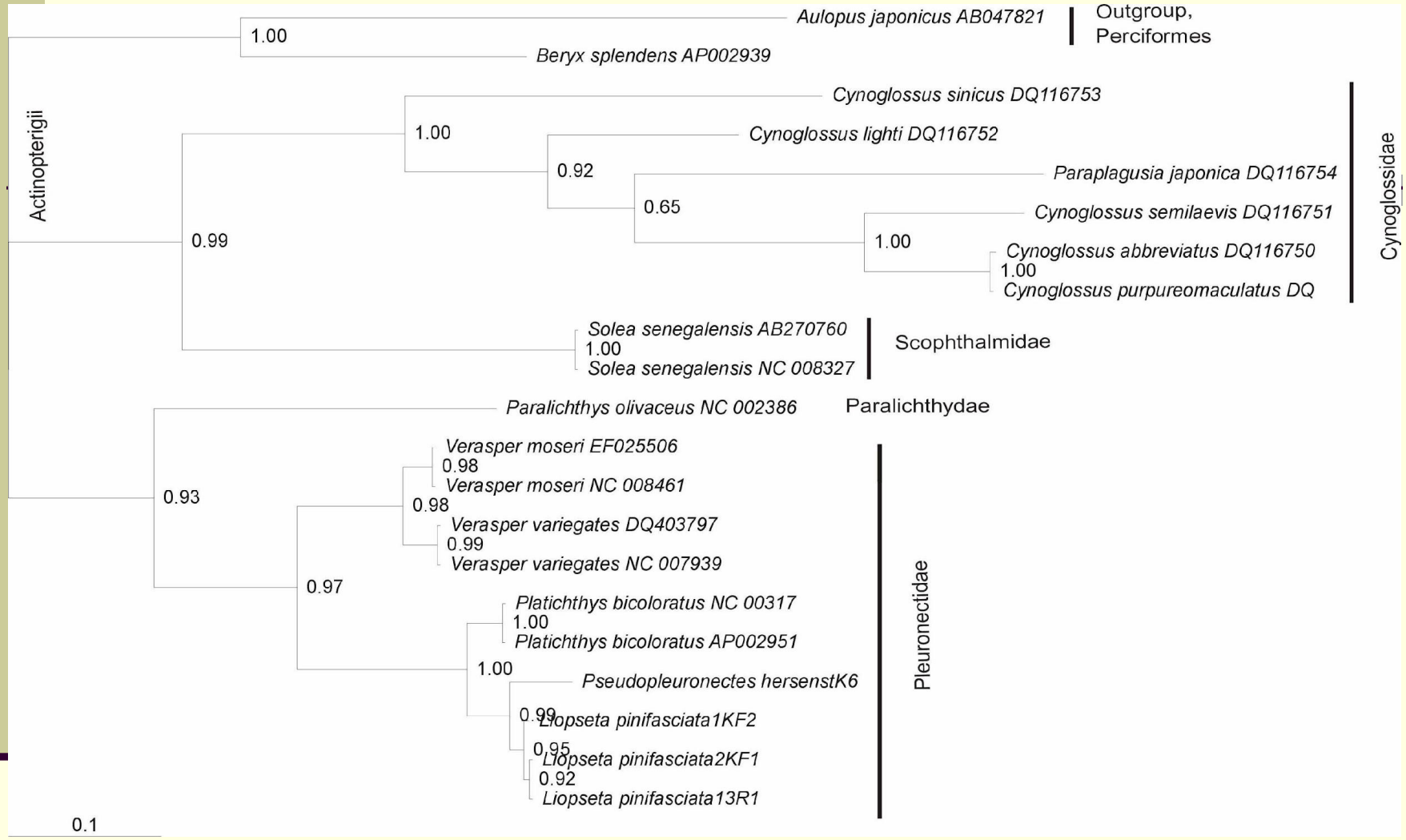
Генного банка вместе со своими последовательностями

# Значения средних *p*-расстояний по гену Co-1 на четырех различных филогенетических уровнях (средняя±SE) :

- 1. Внутривидовом 0.09±0.06%
- 2. Внутриродовом 0.97±1.87%
- 3. Внутрисемейственном 11.98±0.63%
- 4. Внутриотрядном 20.09±0.17%




Укорененное дерево построенное на основе метода ближайшего соседства (NJ) показывающее филогенетические взаимосвязи на основе нуклеотидных последовательностей гена *Co-1* для 19 проанализированных видов камбал (Pleuronectiformes) и двух внешних таксонов (out-group). В узлах показана bootstrap поддержка n=1000. Древо построено на основе модели Kumara 2 parametres и укорененное по двум внешним таксонам: Окунеообразные (Perciformes). Отрезки снизу показывают масштаб для длин ветвей.




Укорененное Байесовское консенсусное (50%) древо показывающее филогенетические взаимосвязи на основе нуклеотидных последовательностей гена *Co-1* для 13 проанализированных видов камбал (Pleuronectiformes) и двух внешних таксонов (out-group). В узлах показаны частоты (вероятности) в $n=10^6$ модельных повторностей. Древо построено на основе модели Тамуры-Нея (TrN+I+G) и укорененное по двум внешним таксонам: Окунеообразные, Perciformes. Отрезки снизу показывают масштаб для длин ветвей.

- Полученные нуклеотидные последовательности были зарегистрированы в GenBank под номерами:
- EF643448 1K-F2 - Liopseta pinifasciata
- EF643449 2K-F1 - Liopseta pinifasciata
- EF643450 13-R1 - Liopseta pinifasciata
- EF643451 5K-F1 - Hippoglossoides dubius
- EF643452 7K-F1 - Pseudopleuronectes hersensteini

# Так выглядит запись одной из последовательностей в GenBank:

```
LOCUS       bankit916597          613 bp    DNA     circular     01-JUN-2007
DEFINITION  Flounder mtDNA Co-1 sequence, coding for cytocrome oxidase subunit
            1.
ACCESSION   916597
VERSION
KEYWORDS    .
SOURCE      mitochondrion Pseudopleuronectes hersensteini (Jordan & Snyder,
            1901)
  ORGANISM  Pseudopleuronectes hersensteini (Jordan & Snyder, 1901)
            Unclassified.
REFERENCE   1  (bases 1 to 613)
  AUTHORS   Scharina,S., Kartavtsev,Y., Goto,T., Chichvarkhin,A., Hanzawa,N.,
            Sokolovsky,A., Balanov,A., Vinnikov,K. and Ivankov,V.
  TITLE     BARCODING OF FAR EASTERN FLATFISH SPECIES OF RUSSIA ON CYTOCHROME
            OXIDASE 1 AND CYTOCHROME B GENE SEQUENCE DATA
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 613)
  AUTHORS   Kartavtsev,Y., Scharina,S., Goto,T. and Chichvarkhin,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (01-JUN-2007) Group of Genetic Resources, Institute of
            Marine Biology, Paltchevski 17, Vladivostok, Primorye 690041,
            Russia
COMMENT     Bankit Comment: Peter the Great Bay, East Sea, August, 2006
            sharina-svetlana@rambler.ru.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..613
                     /organism="Pseudopleuronectes hersensteini (Jordan &
                     Snyder, 1901)"
                     /organelle="mitochondrion"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /PCR_primers="fwd_name: FishF1, fwd_seq:
                     tcaaccaaccacaaagacattggcac, rev_name: FishR1, rev_seq:
                     tagacttctgggtggccaaagaatca"
                     /genotype="7K-F1"
                     /note="Pisces, Pleuronectiformes, Pleuronectidae,
                     Pseudopleuronectes hersensteini"
     gene            11..613
                     /gene="CO-1"
     CDS             11..613
                     /gene="CO-1"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=2
                     /protein_id="PROT_1_bankit916597"
                     /translation="MSLGTGLSLLIRAELSQPGALLGDDQIYNVIVTAHAFVMISL**
                     YQLWLEGSETDYPLMIGAPEYGLPSNKNMSFWLLPPSFLLLLASSGWSRGGN*WTVTP
                     H*LELAHAGAS*THHFSLHLAGISQF*GQSTLSPHMNETNSSTMYQIPYLFGPYNYRC
                     PSSPFPPVLAAGITCYWQTAT*TQPSLTLR*GWPILYLLG"
BASE COUNT      147 a    172 c    124 g    170 t
ORIGIN
        1 tgttgtttgt gtgagcctgg ggacaggcct aagtctgctc attcgagcag agctaagcca
       61 acctggggct ctcctgggag acgaccaaat ttataacgta atcgtcaccg cacacgcctt
      121 tgtaataatt tctttatagt aataccaatt atgattggag ggttcggaaa ctgactatcc
      181 attaataatt ggggcccccg aatatggcct tccctcgaat aaaaacatga gcttctgact
      241 tctacccccca tccttcctcc ttcttttggc ctcttcaggg tgaagccggg gcgggaacag
      301 gtgaaccgtt acccccccact agctggaact agcacacgcc ggagcatcgt agactcacca
      361 tttctctctt caccttgccg gaatttctca attctagggg caatcaactt tatcaccaca
      421 tataaatgaa accaacagca gtactatgta ccaaatcccc tatttgtttg ggccgtataa
      481 ttaccgctgt ccttcttctc ctttccctcc ggttctagcc gctggcatta catgctactg
      541 acagaccgca acctaaacac aaccttcttt gaccctgcgg agggggtgac ccattcttta
      601 cctgttgggt taa
//
```

# СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!