

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

Картавец 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 obscurus*)

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

File Edit View Insert Format Tools Data Window Help Adobe PDF Type a question for help

Verdana 7

T113

	Museum Accession	Specimen Accession	Phylum	Class	Order	Family	Subfamily	Genus	Species	Identifier
60	57			Actinopterygii	Pleuronectifoni	Pleuronectidae		Limanda	L. obscurus	Соколовский А.С.
61	58			Actinopterygii	Pleuronectifoni	Pleuronectidae		Limanda	L. obscurus	Соколовский А.С.
62	59			Actinopterygii	Pleuronectifoni	Pleuronectidae		Pleuronectes	P. punctatissimus	Соколовский А.С.
63	60			Actinopterygii	Pleuronectifoni	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	Pleuronectifoni	Pleuronectidae		Limanda	L. obscurus	Соколовский А.С.
71	68			Actinopterygii	Pleuronectifoni	Pleuronectidae		Limanda	L. obscurus	Соколовский А.С.
72	69			Actinopterygii	Scorpaeniform	Cottidae		Myoxocephali	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		Myoxocephali	M. jaok	Соколовский А.С.
77	74			Actinopterygii	Osmeriformes	Osmeridae		Osmerus	O. mordax dentex	Соколовский А.С.
78	75			Actinopterygii	Scorpaeniform	Hemitripterae		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	Pleuronectifoni	Pleuronectidae		Limanda	L. obscurus	Соколовский А.С.
83	80			Actinopterygii	Scorpaeniform	Hemitripterae		Hemitripterus	H. villosus	Соколовский А.С.
84	81			Actinopterygii	Scorpaeniform	Cottidae		Myoxocephali	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	

Specimen Data Input (Max 999) Help

Ready

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)

- FishF1-50TCAACCAACCAACAAGACATTGGCAC30,
- FishF2-50TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC30,
- FishR1-50TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA30,
- FishR2-50ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA30.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23



2007/06/06

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 полимеразы – 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

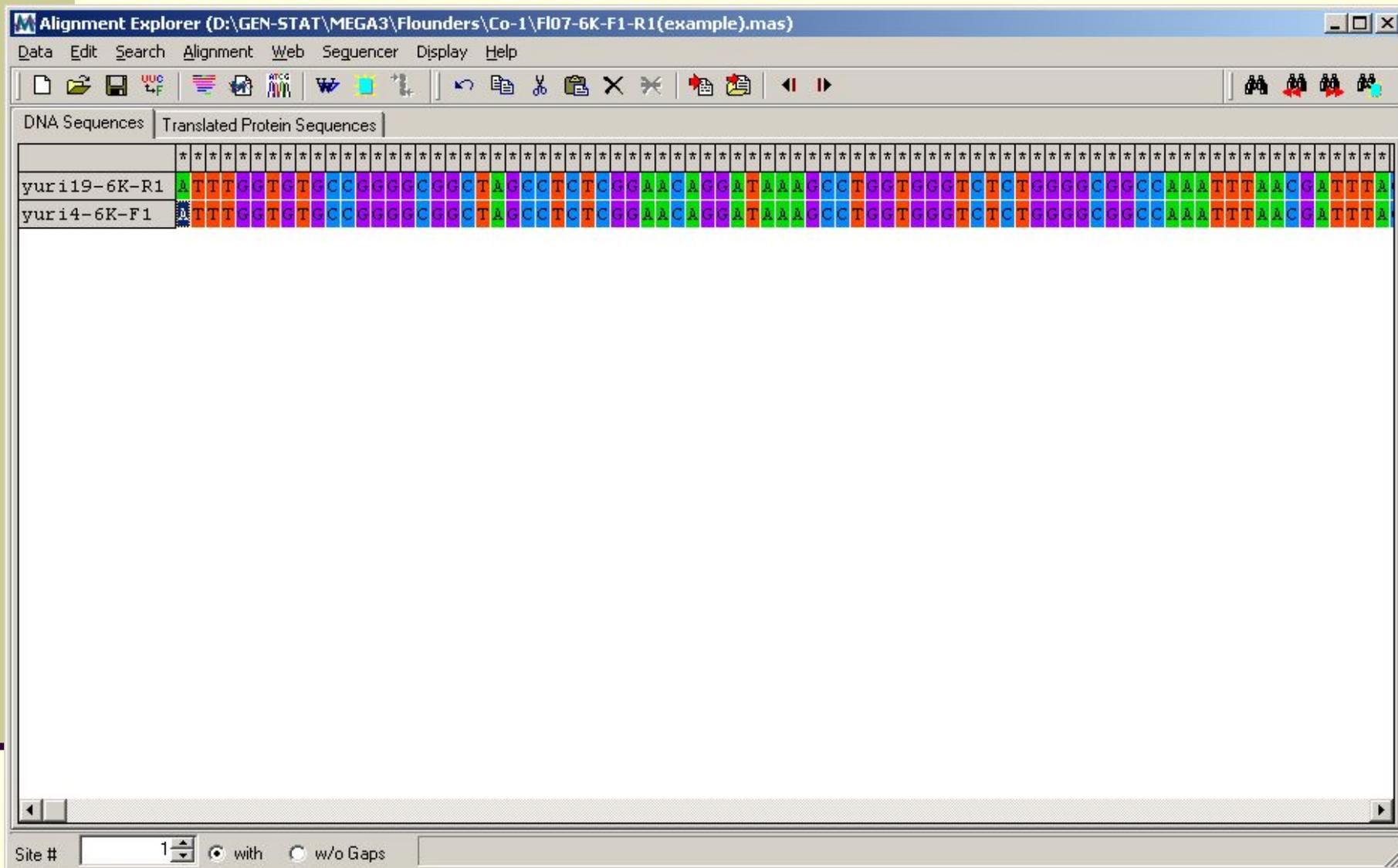
Циклосеквенирование проводили с использованием реагентов фирмы Amersham (Amersham, DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit)

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 Biosystems, 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=nucore&id=114052818>

ICQ Search (20)

Rambler Поиск Найти! icq Погода Аудио Вход

Google Поиск Закладки 0 заблокировано Проверка Переводчик Отправить Настройки

NCBI Nucleotide

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

I: [NC_008327](#). Reports *Solea senegalensis*...[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

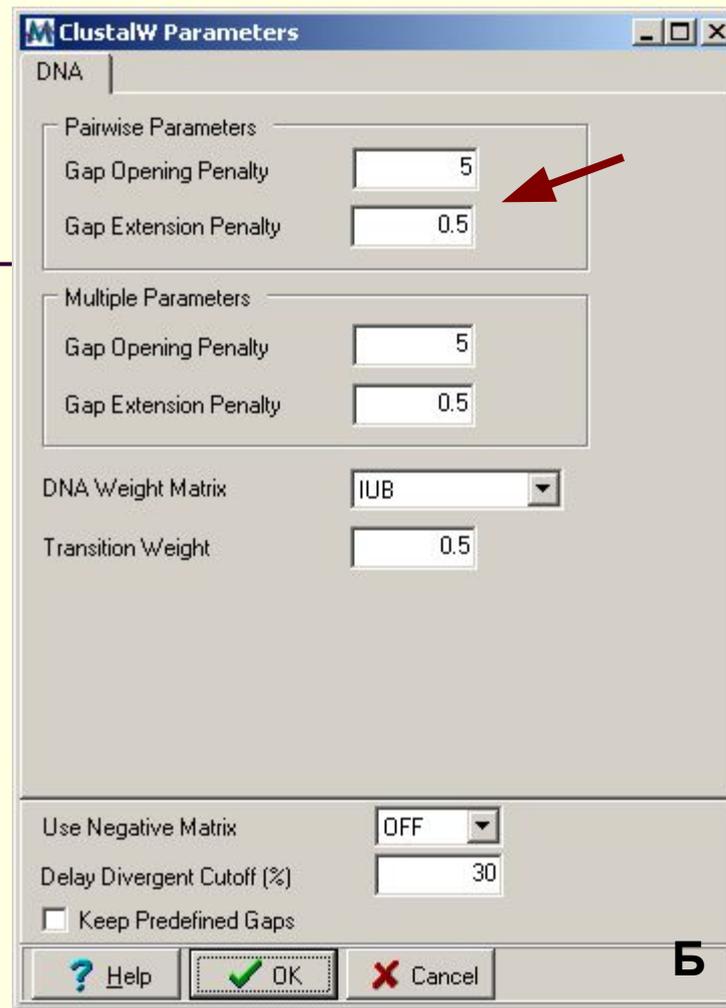
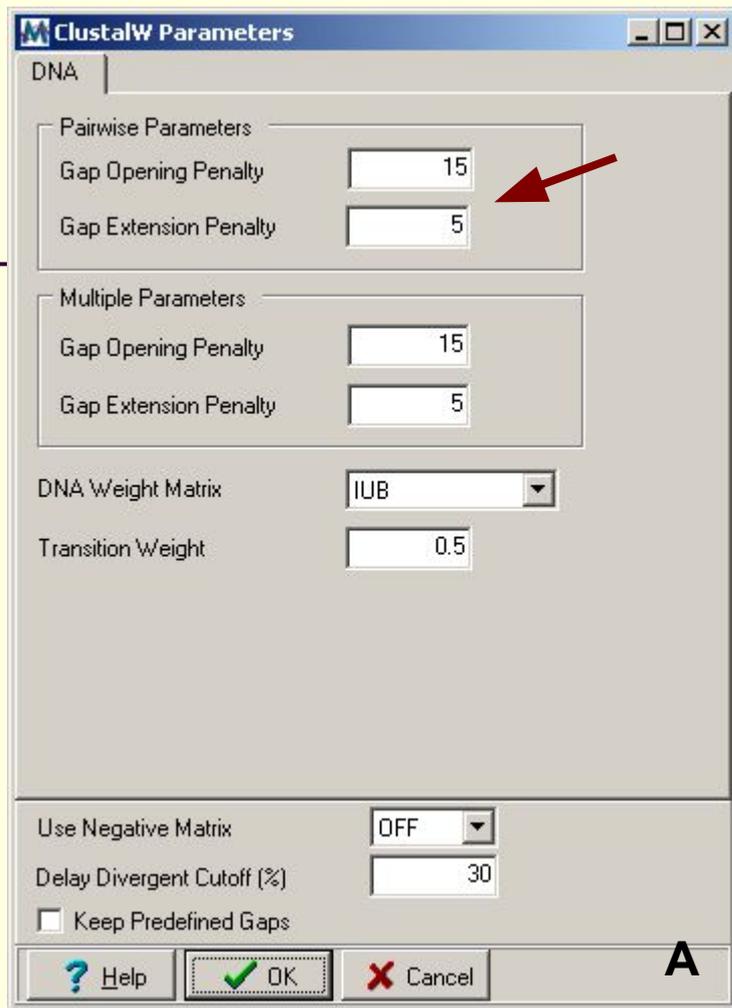
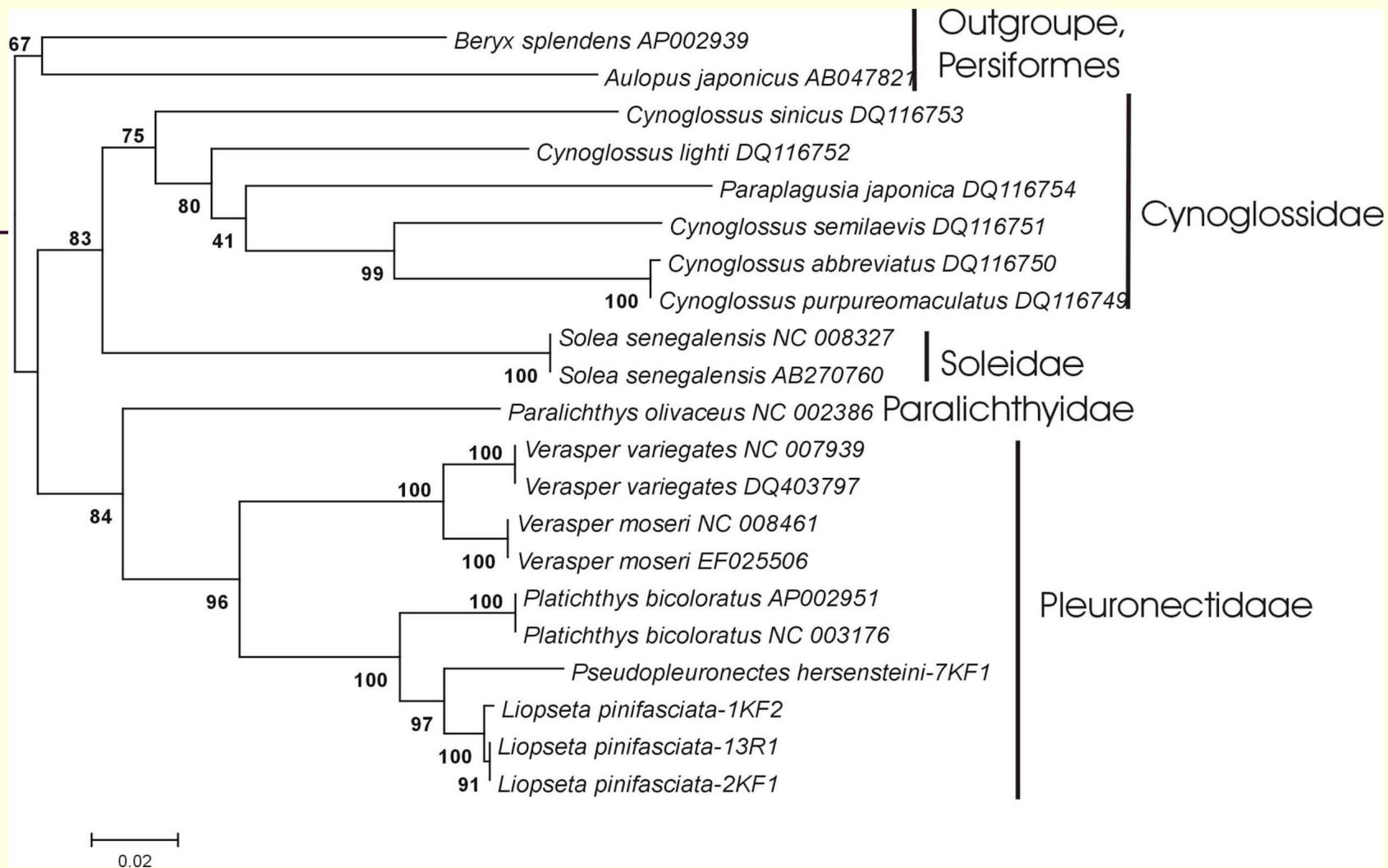


Рис. 8 Окна установления параметров для выравнивания (А) штрафа для первого выравнивания, (Б) штрафа для второго выравнивания

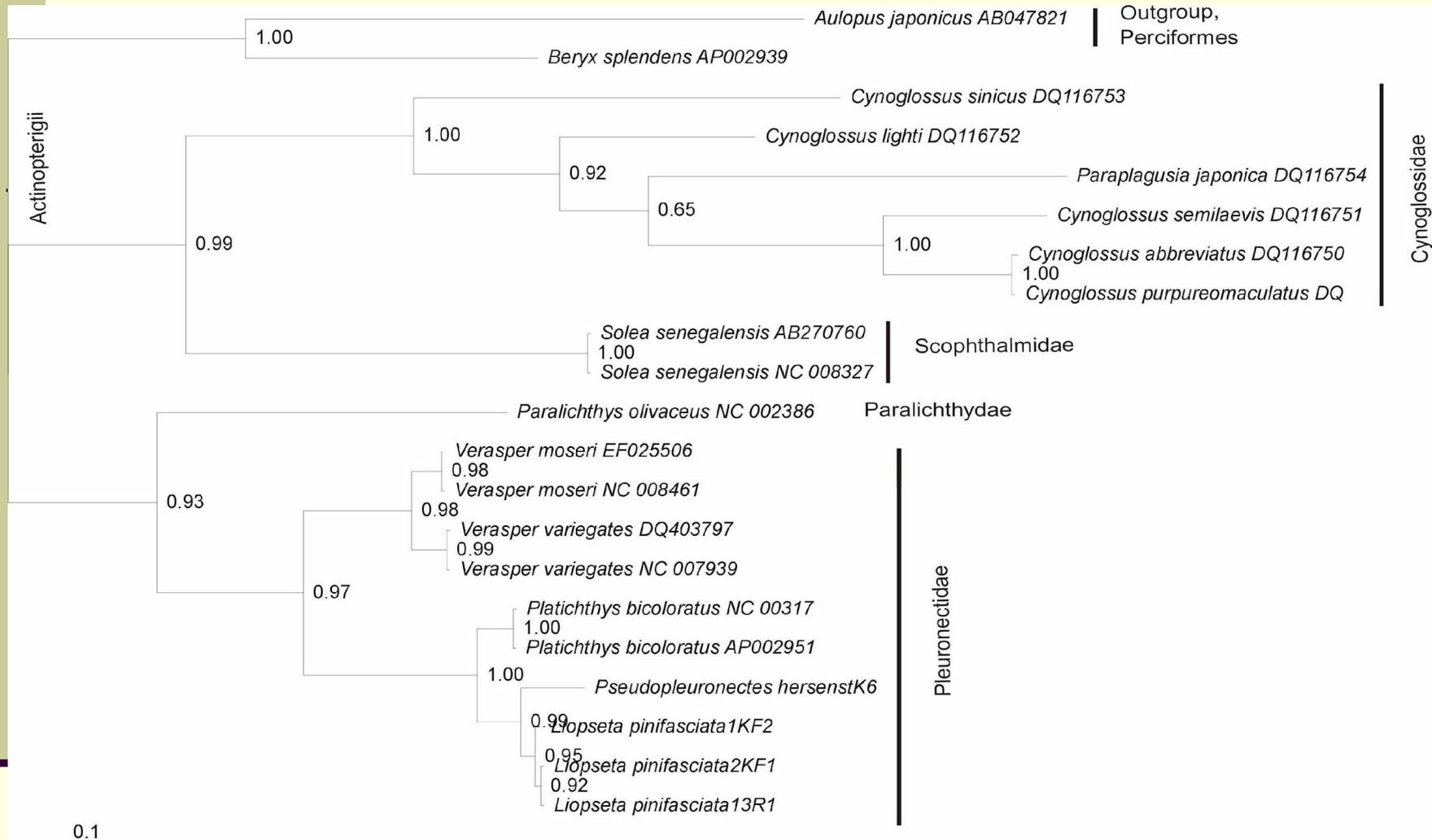
Значения средних p -расстояний по гену Co-1 на четырех различных филогенетических уровнях

(средняя \pm SE) :

- 1. Внутривидовом $0.09\pm 0.06\%$
- 2. Внутривидовом $0.97\pm 1.87\%$
- 3. Внутрисемейственном $11.98\pm 0.63\%$
- 4. Внутриотрядном $20.09\pm 0.17\%$



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. Дерево построено на основе модели Kumara 2 parametres и укорененное по двум внешним таксонам: Окунеобразные (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 повторностях. Древо построено на основе модели Тамуры-Нея (TrN+I+G) и укорененное по двум внешним таксонам: Окунеобразные, 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 herzensteini*

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 cytochrome oxidase subunit
1.
ACCESSION 916597
VERSION
KEYWORDS
SOURCE mitochondrion Pseudopleuronectes herzensteini (Jordan & Snyder,
1901)
ORGANISM Pseudopleuronectes herzensteini (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 herzensteini (Jordan &
                     Snyder, 1901)"
                     /organelle="mitochondrion"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /PCR_primers="fwd_name: FishF1, fwd_seq:
                     tcaaccaaccacaagacattggcac, rev_name: FishR1, rev_seq:
                     tagactctgggtggccaagaatca"
                     /genotype="7K-F1"
                     /note="Pisces, Pleuronectiformes, Pleuronectidae,
                     Pseudopleuronectes herzensteini"
     gene              11..613
                     /gene="CO-1"
     CDS               11..613
                     /gene="CO-1"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=2
                     /protein_id="PROT_1_bankit916597"
                     /translation="MSLGTGLSLIRAEISQPGALLGDDQIYNVIVTAHAFVMISL**
                     YQLWLEGSETDYPLMIGAPEYGLPSNKNMSFWLLPPSFLLLASSGWSRGGN*WTVTP
                     H*LELAHAGAS*THHFSHLHAGISQF*GQSTLSPHMNETNSSTMYQIPYLFPGPNYRC
                     PSSPPFVLAAGITCYWQTAT*TQPSLTLR*GWPILYLLG"
     BASE COUNT       147 a 172 c 124 g 170 t
     ORIGIN
1   tgtgttgt gtgagcctgg ggacagccct aagtctgctc attcgagcag agctaagcca
61   acctgggct ctctgggag acgaccaaata tataacgta atcgtaaccg cacagcctt
121  tgaataaatt tttttagt aatacaaat atgattggag ggttcggaaa ctgactatcc
181  attaataatt gggccccc aatatggcct tcctcgaat aaaaacatga gctctgact
241  tctaccocca tctctccc tctttggc ctcttcagg tgaagccgg gcgggaacag
301  gtgaaccgtt acccccact agctggaact agcacagcc ggagcatgt agactacca
361  tttctctct cacctggcc gaattctca attctaggg caatcaact tatcaccaca
421  tataaatgaa accaacagca ctactatgta ccaatcccc tattgtttg gccggtataa
481  ttacogcgt ccttcttc cltccctcc ggttctagcc gctggcatta catgctactg
541  acagaccgca acclaaacac aacctcttt gacctgagg aggggggtgac ccattcttta
601  cctgtgggt taa
//
```

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

