

СТУДЕНТАМ ГЕНОМНОЙ ЭРЫ

---



**ПРАКТИКА ПОЛЕВОЙ ГЕНОМИКИ:**

ПАМЯТКА ПО СБОРУ ПРОБ

---

Москва 2009

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК**

**Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова**

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова**

**Пензенский государственный педагогический университет**

**им. В.Г. Белинского**

**Федеральная Целевая Программа**

**«Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»**

*СТУДЕНТАМ ГЕНОМНОЙ ЭРЫ*

## **ПРАКТИКА ПОЛЕВОЙ ГЕНОМИКИ:**

### **ПАМЯТКА ПО СБОРУ ПРОБ**

Методическое пособие

Москва 2009

УДК 575.852:599.36

**Практика полевой геномики: памятка по сбору проб.**  
Методическое пособие. Т-во научных изданий КМК. 2009. 24 с.

Методическое пособие предназначено для полевых зоологов, генетиков, молекулярных биологов, а также для студентов биологических специальностей ВУЗов.

Авторы:

**Булатова** Нина Шамильевна, *к.б.н., доцент, ИПЭЭ РАН*

**Павлова** Светлана Владимировна, *к.б.н., ИПЭЭ РАН*

**Банникова** Анна Андреевна, *к.б.н., МГУ*

**Наджафова** Рена Сергеевна, *к.б.н., ИПЭЭ РАН*

**Быстракова** Наталья Викторовна, *к.б.н., доцент, ПГПУ*

Адрес для переписки: [admin@sevin.ru](mailto:admin@sevin.ru)

Отв. редактор – д.б.н. Рожнов В.В.

*Издание подготовлено при поддержке Федеральной Целевой Программы  
"Научные и научно-педагогические кадры инновационной России"  
на 2009-2013 гг. (Госконтракт 02.740.11.0282)  
и гранта Президента Российской Федерации для государственной  
поддержки молодых российских ученых (МК-1155.2009.4)*

ISBN 978-5-87317-610-6

© Коллектив авторов, 2009  
© Товарищество научных изданий КМК, издание 2009

## *Предисловие*

Познание родной природы все люди начинают одинаково – с цветов, деревьев и животных, которые их окружают в детстве. Школа, как правило, учит через учебники и очень мало прибавляет практики в общении с окружающим миром. Только студент, ставший биологом, проходит полевую практику узнавания видов с учетом опыта своих учителей и новых научных достижений.

Еще недавно с большими трудностями шло возрождение генетики в нашей стране, где в 20-е и 30-е годы генетические исследования процветали, а с конца 1930-х к генетике и ее ведущим представителям были применены жестокие репрессии. Прошло несколько десятилетий, и без ДНК - «молекулы наследственности» – в мире уже не мыслятся работы по изучению и охране биологического разнообразия. Так, например, запущена глобальная программа ДНК-штрихкодов (<http://barcoding.si.edu>).

Анализ ДНК требует не только специальной научной базы и лабораторной школы, но и определенных навыков сбора материала, которые, в свою очередь, полезно было бы распространить для обновления методик исследовательских и образовательных полевых работ с учетом современных требований геномной эры. При этом, общая схема взятия проб применима к любым живым объектам, без ограничений. Необходимо только выбрать удобные для извлечения ДНК органы или ткани.



Рис. 1. Линней, портрет 1732 г.

## Общие сведения

Целью биологических коллекций является сбор экземпляров и фиксация необходимого материала для морфологического, биохимического и генетического изучения. Как правило, в музеях ботанические и зоологические коллекции в первую очередь предназначены для сравнительно-морфологического исследования видов и ориентированы на длительное хранение.

Сборы животных и растений в этом случае рассортированы по таксономическим группам и снабжены видовыми ярлыками. Многим из видов дал имя в 18 веке создатель иерархической естественной системы Карл фон Линней.

В настоящее время фундаментальные морфологические хранилища животных и растений часто сосредоточены в столицах государств, но два с половиной столетия назад их средоточием являлся старинный шведский университетский город Упсала. Отсюда Линней организовал глобальную научную инвентаризацию живой природы и лично просмотрел и классифицировал несчетные множества образцов.

Портрет, воспроизведенный на рис. 1, изображает Карла Линнея, всемирно известного шведского натуралиста, в национальном лапландском облачении, очень похожем на полевой наряд, с цветком, носящим его имя (*Linnea borealis*).

В 19 веке два англичанина, Чарлз Дарвин и Альфред Уоллес, открыли эру эволюционного естествознания. Книга Дарвина «Происхождение видов путем естественного отбора» выдержала при его жизни только в Англии 6 изданий, неугомимо дополняемых и исправляемых автором. В 2009 г. отмечается двойной юбилей – 150 лет основного труда Дарвина (1859 г.) и 200-летие со дня его рождения (12 февраля 1809 г., Шрюсбери, графство Шропшир). Теория Дарвина дала ключ к естественной истории видов, основывающейся на важном, хотя и не единственном механизме – естественном отборе. Для сбора видовых коллекций стало необходимым отражать как полноту географического содержания, так и глубину палеонтологической летописи.

В 20 веке начался сбор генетических коллекций.

Трудами Н.И. Вавилова и его школы Россия стала центром изучения мировых генетических ресурсов культурной флоры (Вавилов 1920, 1931; Vavilov 2009).

В ходе всеветных экспедиций, которые совершил он сам или его сотрудники (Рис. 2), были собраны обширнейшие материалы по характеристике генного разнообразия для множества растений, которые человек за свою историю ввел в культуру. Коллекция семян видов растений во Всесоюзном Институте Растениеводства (ВИР) в Ленинграде - сейчас Всероссийский институт растениеводства имени Н.И. Вавилова в Санкт-Петербурге – является мировым и национальным достоянием.

ЛЭЗ  
От. 2142

*Труду Северцова  
А.Н. Северцову  
от коллег*



### Географические закономерности в распределении гонов культурных растений.

(Предварительное сообщение)

И. И. Вавилов.

Исследуя распределение разнообразия и рас культурных растений на земном шаре и пытаясь найти очаги возникновения земледельческих культур, мы пришли к установлению географических центров скелетной разнообразия флоры. Путем детального изучения расового состава отдельных дикорастущих видов выявлена система признаков, соответствующая до некоторой степени системам рас, и географические области сосредоточения их, о которых еще так недавно не подозревал исследователь.

В нашей книге «Центры происхождения культурных растений»<sup>1)</sup> даны общие контуры этих исследований.

Новые факты и правильности вскрылись дальнейшим углублением и расширением изучения центров формирования.

§ 1. Неполноценное изучение экспедициями Института Прикладной Ботаники на месте центров формирования культурных растений в горных районах Азии, Африки, в странах, расположенных по Средиземноморскому побережью, в Закавказье обнаружало не только наличие в них богатого разнообразия форм, но также и весьма существенное скелетное здесь доминантных форм разнообразия, характеризующихся доминантными генами. Значительное число растений, изученных нами, обнаружало эту правильность. Приведем примеры.

а) Восточная Малая Азия и Закавказье, как выясняется в особенности данными последних экспедиций Института Прикладной Ботаники и Малую Азию (проф. И. М. Жукоскис) и Армению (Б. А. Стедогова) и в Азербайджан (проф. И. И.

<sup>1)</sup> Труды по Прикладной Ботанике и Селекции, том XVI, вып. 2, 1926 г.

Рис. 2. Оттиск статьи И.И. Вавилова с автографом для А.Н. Северцова, организатора будущего ИПЭЭ РАН в 1934 г.



С 1930-х г.г. в исследование эволюции включен анализ генетических процессов. Этот этап ознаменован выходом в свет книги Ф.Г. Добжанского, изданной Колумбийским университетом в США (*Dobzhansky* 1937).

Последовательный методический прогресс сделал возможным непосредственное изучение генов и генома на хромосомах не только растений, но и животных, в первую очередь, на модельных видах дрозофил, а вслед за тем позволил перейти к систематическому изучению хромосом человека и других млекопитающих.

Открывшиеся к 1960-м г.г. перспективы сравнительной цитогенетики были успешно реализованы в карносистематике млекопитающих, так что этот период сопоставим по интересу к видам с первоописаниями времен Линнея. Первый среди млекопитающих хромосомный вид-двойник с разными числами хромосом в диплоидном наборе выявлен в группе обыкновенных полевок в фауне России: *Microtus arvalis* Pallas, 1779,  $2n=46$  и *M. rossiaemeridionalis* Ognev, 1924,  $2n=54$  (*Meißer, Орлов и Схолль* 1969, 1972).

С этого времени в зоологических музеях внимательно следят за таксономическими описаниями с использованием генетических подходов (*Павлинов* 2003).

Списки кариотипированных видов разных отрядов класса млекопитающих помещены на сайте лаборатории А.С. Графодатского [http://www.bionet.nsc.ru/labs/chromosomes/intr\\_russ.htm](http://www.bionet.nsc.ru/labs/chromosomes/intr_russ.htm).

В 21 веке открыты методы тотального обследования видов самых различных групп для изучения их эволюции в пространстве (на ареале) и во времени (смена геологических и климатических эпох). Возник раздел науки, изучающий географическое распространение генеалогических линий внутри вида, – филогеография (*Avise 2000*) (Рис. 3). Огромный интерес к новому методу анализа обусловлен тем, что изучение изменчивости мтДНК позволяет реконструировать колонизацию пространства на основе принципа корреляции генетической и географической дистанций.

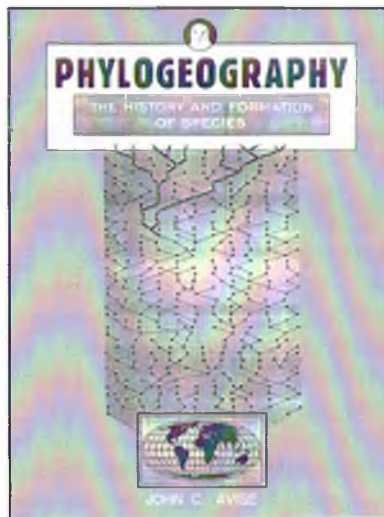


Рис. 3. Обложка первой книги по филогеографии.

Быстрое развитие нового направления науки обязано успехам в исследовании митохондриальной ДНК животных и человека (Табл. 1).

Табл. 1. Краткая хронология важнейших этапов истории филогеографии (по: *Avise*, 2000, с дополнением\*).

1974	<i>Brown &amp; Vinograd</i> – создание карт сайтов рестрикции для мтДНК животных
1975	<i>Watterson</i> – описание базовых свойств генов геналогий, что знаменует возникновение современной теории коалесценции <i>Brown &amp; Wright</i> – предложен анализ мтДНК для изучения происхождения и эволюции партеногенетических таксонов
1977	<i>Upholt</i> – первый статистический метод для вычисления дивергенции последовательности мтДНК по данным рестрикции
1979	<i>Brown, George &amp; Wilson</i> – вывод о быстрой эволюции мтДНК <i>Avise, Lansman et al.</i> – впервые о филогеографической изменчивости мтДНК в природе
1980	<i>Brown</i> – первое сообщение об изменчивости мтДНК человека
1983	<i>Tajima</i> и также <i>Hudson</i> – первые статистические обработки различия между геномным деревом и популяционным деревом
1986	<i>Birmingham &amp; Avise</i> – начало сравнительного филогеографического обследования мтДНК для многих совместно распространенных видов
1987	<i>Avise et al.</i> – создание термина «филогеография», определение области науки и предложение нескольких филогеографических гипотез <i>Cann et al.</i> – описание глобальной изменчивости мтДНК человека
1989	<i>Slatkin &amp; Maddison</i> – метод для вычисления межпопуляционного генного потока из филогении аллелей
1989	<i>Avise &amp; Ball</i> – предлагают принципы генеалогического соответствия как компонента филогенетических экспертиз
1992	<i>Avise</i> – первая значительная компиляция на многих видах и методах анализа по филогеографическим паттернам для региональных фаун
1994	<i>Moritz</i> подчеркивает концептуальное отличие поверхностной и глубокой внутривидовых филогений через распознавание служебных единиц и эволюционно значимых единиц (см также <i>Ryder 1986; Avise 1987; Waples 1991; Dizon et al. 1992; Riddle 1996</i> )
1996	книги под редакцией <i>Avise &amp; Hamrick and Smith &amp; Wayne</i> посвящены роли молекулярного филогеографического анализа в природоохранной биологии
1998	специальный выпуск журнала <i>Molecular Ecology</i> посвящен филогеографии
2000	выход в свет монографии <i>Avise</i> «Phylogeography»
2002*	первый отклик на книгу на русском языке ( <i>Булатова, 2002</i> ) <a href="http://www.bionet.nsc.ru/vogis/vestnik.php?f=2002&amp;p=19_4">http://www.bionet.nsc.ru/vogis/vestnik.php?f=2002&amp;p=19_4</a>

Открытия 1970-х и начала 80-х г.г. сделали эту молекулу из специальной клеточной структуры микрореволюционным филогенетическим маркером благодаря таким свойствам, как:

- наследование по материнской линии с полезным для анализа отсутствием межмолекулярной генетической рекомбинации;
- быстрая эволюция на уровне нуклеотидной последовательности;
- экстенсивный внутривидовой полиморфизм, по большей части распределенный скорее между особями вида, чем внутри них.

В силу особенностей строения и эволюции митохондриальный геном обладает преимуществами перед ядерным геномом в аспекте генеалогическом, открывая доступ к семейным архивам видов, хотя бы только по материнской линии.

Диплоидия и рекомбинация препятствуют использованию многих других генетических маркеров для целей филогеографии. Поэтому рабочим инструментом филогеографии является анализ генных родословных в составе митохондриальной ДНК (Рис. 4).

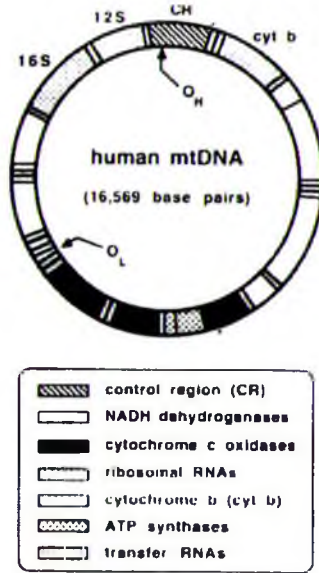
Как правило, филогеографический анализ подразумевает сборы *живого* материала и получение *свежих* образцов тканей от экземпляров из *географически различных* мест.

Наш опыт сбора проб приобретен при изучении распространения хромосомных рас по ареалу обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L., в рамках международного научного сотрудничества, организованного Международным комитетом по цитогенетике *S. araneus*, ISACC (Банникова и др. 2006; Bannikova et al. 2003; Searle et al. 2007).

Мы, авторы настоящего пособия, посчитали, что школа масштабного исследования вида в полном объеме ареала могла бы пригодиться не только для работы с другими видами, но и как практическое руководство для тех, кто только начинает сбор материалов в полевых условиях (Bulatova et al. 2009).

Об актуальности молекулярных исследований свидетельствует большой объем материалов, полученных на самых разных систематических группах и представленных на конференции «Современные проблемы зоо- и филогеографии млекопитающих», состоявшейся в Пензенском государственном педагогическом университете в 2009 г. (15-20 мая) (<http://www.sevin.ru/news/Konference.pdf>).

Определенно, включение протоколов по сбору молекулярных проб в общий свод правил может быть полезным для обновления полевой зоологической работы, имея в виду не только школу полевых наблюдений, но и задачи создания и пополнения зоологических коллекций с учетом современных требований в свете геномики, а также образовательный аспект. Не стоит говорить, как важно приобщить студентов с первых шагов к геномной практике.



**Рис. 4.** Структура митохондриального генома (по характеристикам мтДНК человека) (из: *Anise* 2000).

Показана схема расположения на кольцевой молекуле мтДНК последовательностей генов цитохрома b, оксидаз цитохрома c, NADH-дегидрогеназ, рибосомных и транспортной РНК, АТФ синтетаз. CR – контрольный регион (D-петля).



## Литература

Банишкова А.А., Булатова Н.Ш., Крамеров Д.А. Генетическая изменчивость обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. Европейской России и Сибири по данным о полиморфизме длин участков ДНК, фланкируемых короткими диспергированными повторами (Inter-SINE-PCR), и взаимоотношения хромосомных рас “Москва” и “Селигер” // Генетика. 2006. Т. 42. № 6. С. 737-747.

Булатова Н.Ш. Открытие «Филогеографии» Джона Си Ависа // Вестник ВОГИС. 2002. № 19. С. 18-20.

Вавилов Н.И. 1920. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Доклад на III Всероссийском селекционном съезде в г. Саратове 4 июня 1920 г. в г. Саратове. 16 с. - 1931. Линнеевский вид как система. Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. Т. 26. № 3. С. 109-134.

Мейер М.Н., Орлов В.Н., Схалль Е.Д. Использование данных кариологического, физиологического и цитофизиологического анализов для выделения нового вида у грызунов (Rodentia, Mammalia) // Докл. АН СССР. 1969. Т. 188. С. 1411-1414. - Виды-двойники в группе *Microtus arvalis* (Rodentia, Cricetidae) // Зоол. журн. 1972. Т. 51. С. 724-738.

Павлинов И. Я. Систематика современных млекопитающих. М.: изд-во МГУ. 2003. 297 с.

Avise J.C. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts - London, England. 2000. 447 p.

Bannikova A.A., Bulatova N.S., Krysanov E.Y., Kramerov D.A. DNA polymorphism within *Sorex araneus* and two congeneric species as inferred from inter-SINE-PCR // Mammalia. 2003. Vol. 67. P. 263-274.

Bulatova N., Searle J.B., Nadjafova R., Pavlova S., Bystrakova N. Field protocols for the genomic era // Comparative Cytogenetics. 2009. 3(1): 57-62.[<http://www.zin.ru/journals/compcyt/contents.asp?vol=3&n=1>]

Dobzhansky T. Genetics and the Origin of Species. N.Y.: Columbia University Press. 1937. 364 p. (2nd ed., 1941; 3rd ed., 1951).

<http://www.barcoding.si.edu>

[http://www.bionet.nsc.ru/labs/chromosomes/intr\\_russ.htm](http://www.bionet.nsc.ru/labs/chromosomes/intr_russ.htm)

<http://www.sevin.ru/news/Konference.pdf>

Searle J.B., Hausser J., Zima J., Fredga K., Wójcik J.M., Volobouev V.T., Bulatova N.S., Nadjafova R. The ISACC heritage // Rus. J. Theriology. 2007. Vol. 6. №. 2. P. 123-167.

Vavilov N.I. Geographical regularities in the distribution of the genes of cultivated plants // Comparative Cytogenetics. 2009. 3(1): 71-78. (Republication from: Bull. Appl. Bot., Genet. and Plant-Breeding. Leningrad. 1927. Vol. 17. №.3. P.420-428).

[<http://www.zin.ru/journals/compcyt/contents.asp?vol=3&n=1>]

## *Правила сбора проб*

При сборе проб для филогеографического изучения несколько общих правил являются совершенно необходимыми.

В первую очередь, во всякий выезд в поле, необходимо помнить, как важно сохранять и тщательно документировать все собранные материалы. По тем или иным причинам, любой материал может оказаться эксклюзивным, и его идентификация с первой находки должна быть надежно обеспечена. Для этого полезно для современного натуралиста соблюдать и поддерживать слагавшуюся веками культуру полевой работы – в первую очередь, знать свой объект, вести журнал находок и быть предельно аккуратным при сборе образцов.

Для современной экипировки необходим набор чистых, в идеале одноразовых, инструментов (для мелких объектов – глазные ножницы, скальпель, пинцет); коробка с пробирками Эппендорфа (объем 1,5 – 2 мл), которые перед поездкой в поле на 2/3 заполняют очень чистым 96% этанолом; наклейки и простой карандаш для маркировки пробирок; полевой дневник или журнал. Этот набор так же необходим, как привычный полевой комплект средств лова и походного жизнеобеспечения, при этом он абсолютно не громоздкий.

Любые протоколы и правила сбора материалов для молекулярного исследования ориентируют на получение и сохранение образцов органов и тканей, в которых сохраняются все необходимые для проведения анализов свойства ДНК.



В основе сбора *молекулярной полевой коллекции* – живые ткани различных органов или частей организма. В некоторых случаях (лабораторные животные и экземпляры из зоопарка и хозяйств или домашние питомцы) практикуется прижизненное взятие образцов, если предоставляется возможность отстричь кончик хвоста, уха или коготь без особого ущерба для зверька.

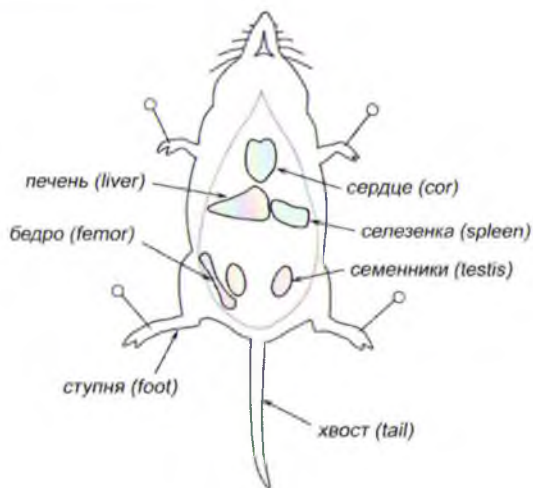
При получении материалов из природы желательно, чтобы добытый экземпляр не проявлял признаков распада. Вместе с тем, нужно иметь в виду, что короткие последовательности митохондриальной ДНК можно получить и из очень плохого материала, вплоть до сгнивших останков и фекалий. Поэтому в том случае, если добытый образец уникален, не стоит пренебрегать им, даже при плохой сохранности. Однако в этом случае нет смысла брать внутренние органы (печень, почки и проч.), в которых ДНК деградирует в первую очередь из-за высокой ферментативной активности. Но в мышцах, пальцах и косточках ДНК сохраняется дольше, и именно эти части тела следует брать от несвежих зверьков.

Кроме того, неплохим материалом для выделения ДНК является высохшее (но не протухшее!) на черепках мясо. В случае, если, например, в поле нет с собой никакого фиксатора, можно просто тщательно высушить или даже засолить мышцы.

Заметим, что для извлечения и изучения ДНК музейных экземпляров существуют специальные методики!

Для целей филогенетического анализа объем локальной выборки обычно небольшой (от 1 до 3-5 особей на географическую популяцию). Для филогеографического анализа объем каждой локальной выборки обычно варьирует от 3 до 15 экземпляров в зависимости от возможностей коллектора, тогда как стандартный популяционный анализ требует самого большого размера локальной выборки (от 10 до 50 особей).

В реальных или ожидаемых зонах контакта видов или внутривидовых форм важно собирать как можно больше проб в сочетании с доступной информацией о репродуктивных свойствах добытых особей.



**Схема** показывает расположение органов и их названия по-русски и, в международном эквиваленте, по-английски у вскрытого зверька, пробы которых используются для изучения генома.

Различные для разных целей внутренние органы или их части (печень, селезенка, сердце) или кусочки мышц фиксируются этанолом, так же отдельно для каждой особи фиксируют кусочки наружных частей тела (ухо, ступня, хвост); костный мозг из бедренной кости и семенники понадобятся для приготовления препаратов хромосом, для этого существуют особые методы фиксации. С оставшейся после процедуры карิโอטיפирования бедренной кости счищают мышечную ткань и помещают в спирт, и точно так же необходимо фиксировать один из двух семенников самца для получения ДНК.

При сборе материала следует обратить внимание на то, что препараты из самцов имеют преимущество перед препаратами из самок, так как у самцов имеется Y-хромосома и, следовательно, только в этом случае можно работать как с материнской ДНК (унипарентальный маркер) или с бипарентальными молекулярными маркерами, так и с отцовской ДНК, что иногда бывает важно.

Полезно сохранять фиксированные органы от одного животного в отдельных пробирках (их, разумеется, берут одним и тем же пинцетом). Кроме того, печень даже у самого маленького зверька всегда достаточно объемна, так что ее можно дольками, только без желчного мешка, разделить по нескольким пробиркам.

Обменный фонд вам может очень пригодиться!

На этикетке и в журнале обязательно должен быть указан код особи, дающий указание на видовую принадлежность, пол особи, место находки, а также и имя коллекционера.

Географические координаты для каждого места отлова определяются, желательно, с помощью GPS.

Вместе с координатами мест отлова, в рабочий журнал заносят другие необходимые детали по видовой принадлежности, полу, возрасту особи (взрослая или неполовозрелая) и внешним данным.

При необходимости записывают данные взвешивания (для мелких зверьков с точностью до 0,1 г) и внешних измерений (например, длина туловища с головой - L, с точностью до 0,1 мм, длина хвоста - C, с точностью до 0,1 мм, длина правой задней лапы - Pl, с точностью до 0,1 мм).

Очень важно хранить тушки отловленных особей в музейной или лабораторной коллекции (сухой или влажной) и обеспечить сохранность скелета и черепа для снятия морфологических промеров.

Наличие и местонахождение молекулярных (и других) проб должно быть помечено на этикетках, сданных в коллекцию образцов.

С особой тщательностью следует относиться к взятию *проб* для последующего извлечения ДНК!

## ИТАК:

- В качестве проб используют мягкие органы (селезенка, печень, сердце для разных типов анализа) или части тела - ступню животного вместе с пальцами или кончик хвоста или уха (в последнем случае зверек остается живой и может быть отпущен в месте отлова). Процедура взятия материалов должна осуществляться исключительно чистыми инструментами.
- Ножницы и пинцеты после использования нужно протереть, прочистить мыльным раствором и затем хорошо промыть водой (если щелочь останется на инструменте, то ДНК будет разрушаться при взятии пробы у последующей особи!), смочить 96% этанолом и провести через пламя (либо только протереть 70% этанолом).
- Пробы должны храниться в 1.5-2 мл пластиковых закручивающихся пробирках с этиловым спиртом (96%) в соотношении к объему животного материала не меньше, чем 10:1.
- Важно, чтобы пробирка была надежно промаркирована (*маркировка не должна смываться водой или спиртом!*).
- Через день необходимо сменить фиксатор, залив в пробирки свежую порцию 96% спирта.
- До возвращения в лабораторию пробы лучше хранить в холодильнике при температуре 4°C, в крайнем случае, при комнатной температуре и избегать как замораживания, так и перегревания пробирок.

*Для заметок*