

УДК 599.32:59.088:57.088

БЕЛКОВЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ КАК МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОВ-ДВОЙНИКОВ ОБЫКНОВЕННОЙ ПОЛЕВКИ *Microtus arvalis* Pallas, 1779 И *M. rossiaemeridionalis* Ognev, 1924 (Rodentia, Cricetidae)

© 2019 г. И. А. Жигарев*, **, @, Д. И. Жигарев*, ***, В. В. Алпатов*, **,
В. В. Лапковский**, В. М. Малыгин****, С. В. Симак*****

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия

**Московский педагогический государственный университет,
Институт биологии и химии, ул. Кибальчича, 6, корп. 3, Москва, 129164 Россия

***Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
ул. Островитянова, 1, Москва, 117997 Россия

****Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический ф-т,
Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

*****Самарская государственная областная академия (Наяновой),
ул. Молодогвардейская, 196, Самара, 443001 Россия

@E-mail: i.zhigarev@gmail.com

Поступила в редакцию 16.10.2017 г.

После доработки 30.01.2018 г.

Принята к публикации 22.03.2018 г.

Предложен новый протокол идентификации двух видов-двойников обыкновенных полевков *Microtus arvalis* и *M. rossiaemeridionalis* методом электрофореза белков крови в полиакриламидном геле (ПААГ). Исследованы образцы двух видов, отловленных в 10 районах Московской, Калужской, Самарской областей и природных территорий г. Москвы (1030 особей), а также взятых из коллекций вивария (5 особей гибридов двух видов). Осуществлено сравнение электрофорезов в ПААГ, агарозном геле и на ацетатцеллюлозных пластинах. Проведена оценка использования разных органов и тканей для видовой идентификации. Определены относительная электрофоретическая подвижность и масса видоспецифического белка крови восточно-европейской полевки.

DOI: 10.1134/S0002332919030159

Существование симпатрических, а иногда и симбиотопических, но генетически закрытых одна для другой популяционных систем, представители которых, на взгляд исследователя, чрезвычайно схожи и, по всей видимости, одинаково используют среду обитания, представляет интерес как для систематиков, так и для экологов и эволюционистов. С использованием этого природного феномена можно решать множество задач. Однако до сих пор идентификация видов-двойников обыкновенной полевки *Microtus arvalis* s.l. – проблемная задача. Сегодня для распознавания двух симпатрических и симбиотопических близких видов полевков – обыкновенной *M. arvalis* Pallas, 1779 и восточно-европейской *M. rossiaemeridionalis* Ognev, 1924 (= *M. levis* Miller, 1908, обоснование приоритета этого названия требует дополнительного исследования) полевков – существуют четыре группы методов.

Цитогенетический метод надежен для определения этих видов (Мейер и др., 1969; Малыгин, 1970, 1983; Орлов, Малыгин, 1974; Загороднюк, 1991а; Баскевич и др., 2016). Полевки имеют разные наборы хромосом: различаются их числа и формы. В кариотипе *M. rossiaemeridionalis* ($2n = 54$) преобладают акроцентрические хромосомы (число хромосомных плеч (NF) равно 56), а у *M. arvalis* ($2n = 46$) – субметацентрические и метацентрические (хромосомные формы “arvalis” (NF = 84) и “obscurus” (NF = 72)). Имеются данные об относительно широкой изменчивости NF у кариоформ “arvalis” и “obscurus”, которая обусловлена разным числом наблюдаемых акроцентриков в хромосомном наборе, что не мешает надежно различать 54- и 46-хромосомные виды (Малыгин, 1983; Загороднюк, 1991а; и др.). К недостаткам метода следует отнести его трудоемкость, продолжительность и необходимость иметь исходно живой материал для использования клеток костного

мозга. В экологических исследованиях, этот метод идентификации видов можно использовать лишь при работе с живыми объектами (метод мечения и повторных поимок, лабораторные эксперименты). Идентифицировать полевков, добытых давилками и цилиндрами, цитогенетический метод не позволяет.

Морфометрический метод до последнего времени вообще не считался сколь-нибудь надежным. До сих пор не найдены более-менее четкие, дискретные морфологические признаки, по которым можно было бы различать восточно-европейских и обыкновенных полевков (Малыгин, 1978, 1983; Загороднюк, 1991б; и др.). Использование математических методов, в том числе дискриминантного анализа экстерьерных, краниометрических (Мейер, Дитятев, 1989; Малыгин, Пантелейчук Сантуш Луиш, 1996) и одонтологических признаков (Маркова и др., 2003; Markova *et al.*, 2010), позволяет с некоторой осторожностью проводить разграничение этих видов. Однако выявленные в работах отличия двойников имеют характер "тенденций". Доля ошибок в определении видовой принадлежности достаточно высока (20–25%), что позволяет дифференцировать виды лишь с некоторой вероятностью. Таким образом, даже статистический анализ по множеству морфологических признаков сегодня следует признать мало надежным методом.

Убедительные различия видов-двойников и оценку внутривидового полиморфизма демонстрируют молекулярно-генетические методы. Один из них – оценка полиморфизма рестриктивных фрагментов (ПДРФ) ДНК RFLP (Календарь, Глазко, 2002; Juskeviciute, Paulauskas, 2003) – основан на обработке выделенной ДНК различными рестриктазами, с дальнейшим разделением фрагментов рестрикции электрофорезом и их гибридизацией со специфическими ДНК-зондами. Другая группа методов – анализ анонимных последовательностей с помощью полимеразной цепной реакции (RAPD, AFLP, ISSR), где используют специфические праймеры, получают и анализируют дискретные ДНК-продукты амплификации. Для полевков надвидового комплекса *M. arvalis* s.l. в различных работах использовали анализ как ядерной, так и митохондриальной ДНК (мтДНК) (Потапов и др., 1999; Fink *et al.*, 2004; Баскевич и др., 2009, 2012; Булатова и др., 2010). С 2004 г. растет популярность метода ДНК-штрихкодирования (ДНК-баркодинг) с использованием коротких специфических маркеров из эталонных участков генома для определения таксономического положения изучаемого организма. Для этого создается ДНК-библиотека эталонных участков генома (Galan *et al.*, 2012).

Имеющиеся в базе данных GenBank (NCBI) расшифрованные последовательности мтДНК

этих видов позволят в будущем разработать перспективные методы для дифференциации видов-двойников обыкновенной полевки.

Электрофорез гемоглобина стал наиболее перспективным, умеренно затратным и достоверным методом дифференциации близких видов обыкновенных полевков (Доброхотов, Малыгин, 1982). Идентификация видов основана на том, что гемоглобин обыкновенной полевки имеет одну широкую (мажорную) мигрирующую при электрофорезе белковую фракцию, а гемоглобин восточно-европейской полевки – две: одну широкую, схожую с таковой у предыдущего вида, и одну минорную, более узкую и подвижную (следовательно, мигрирующую в электрофорезе несколько дальше).

Техника постановки электрофореза в горизонтальной камере на ацетилцеллюлозных пластинах (Доброхотов, 1985) хорошо себя зарекомендовала и использовалась во многих исследованиях (Загороднюк, Тесленко, 1986; Барановский, Охотский, 1988; Жигарев, 1993, 2004; Тихонов и др., 1998, 2010; Баскевич и др., 2005; Тихонова и др., 2005; Михайлова и др., 2008; Опарин и др., 2010; и др.). Однако в последнее время оборудование и оснащение биохимических лабораторий существенно изменились. Современные электрофорезы белков проводят в основном в агарозном геле и ПААГ. Эти анализы можно проводить в любой биохимической лаборатории.

Цель работы – создание нового современного протокола электрофореза белков крови в ПААГ для дифференциации двух видов-двойников – *M. arvalis* и *M. rossiaemeridionalis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были использованы 9 экз. цитогенетически идентифицированных особей *M. arvalis*, *M. rossiaemeridionalis*, отловленных в Калужской, Московской областях и на природных территориях г. Москвы (служили контролем в работах по электрофорезу), а также их гибридов (5 экз., коллекция кафедры зоологии позвоночных МГУ). Кроме того, использовали цитогенетически не идентифицированных серых полевков, отловленных в Калужской обл. (окрестности г. Балабаново, Жуковского р-на) – 21 экз., в Московской обл. (окрестности г. Черноголовка, Ногинского р-на) – 5 экз., в Самарской обл. (национальный парк "Самарская Лука", Жигулевский заповедник и окрестности г. Тольятти) – 983 экз., в лесопарковых районах г. Москвы (долина р. Сетунь) – 12 экз.

Препараты для определения хромосомного набора готовили по стандартной методике из клеток костного мозга (Ford, Hamerton, 1956).

Для определения видов-двойников электрофорезом гемоглобина достаточно в полевых условиях взять несколько капель крови у живых осо-

бей или использовать органы добытых животных, содержащих кровь. Для отработки различных методических приемов мы использовали свежую кровь, кровяные сгустки, легкое, сердце, селезенку, печень и скелетные мышцы добытых зверьков. У живых особей кровь брали из подъязычной вены. В анализе использовали как свежие органы, так и замороженные. Заморозку осуществляли в двух режимах: при -18°C (температура стандартных бытовых морозильных камер) и при -80°C .

Электрофорез белков крови (>2600 анализов) проводили с использованием трех методических приемов – на ацетатцеллюлозных пластинах, в агарозном геле и ПААГ.

Молекулярную массу видоспецифичного белка (минорной полосы на фореграмме) оценивали с использованием денатурирующего электрофореза в трициновом буфере, обладающего более высокой разрешающей способностью по сравнению с нативным электрофорезом, описанным далее. Денатурирующий электрофорез требует больших временных и материальных затрат.

Для проведения электрофореза в ПААГ использовали следующее оборудование: вертикальную электрофорезную камеру (рассчитанную на 1–4 геля) Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, США, cat. № 165-8000), pH-метр (Аквилон pH-410, Россия), источник питания “Эльф-4” (ДНК-технология, Россия, cat. № PS-400). Для электрофореза в агарозном геле и на ацетатцеллюлозных пластинах использовали камеру для горизонтального электрофореза SE-1 (Хеликон, артикул SE-1), источник питания “Эльф-4”, ацетатцеллюлозные пластины Владипор 90×90 (МФФС-ЩС-1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ методов разделения белков показал, что из трех существующих типов наибольшей информативностью в дифференциации видов-двойников обыкновенных полевок обладает электрофорез в ПААГ, меньшей – на ацетатцеллюлозных пластинах. Электрофорез белков крови в агарозном геле (2.5%) неприменим для разделения видов-двойников, так как диагностические белковые фракции ввиду малой разрешающей способности этого геля не разделяются.

Стерильные межвидовые гибриды *M. arvalis* и *M. rossiaemeridionalis*, как и межвидовые гибриды *M. rossiaemeridionalis* и *M. transcaspicus*, дают электрофореграмму, сходную с “чистым” видом *M. rossiaemeridionalis* (Жигарев и др., 2011). В этом случае диагностируется вторая (минорная) полоса.

Информативность электрофореграмм, проведенных в ПААГ, практически не зависит от того, используются в анализе цельная кровь (плазма и форменные элементы) или отмытые эритроциты. Оба варианта дают приемлемые результаты диф-

ференциации исследуемых видов. Использование цельной крови несколько перегружает электрофореграмму дополнительными полосами белков плазмы крови, но эта работа требует меньших затрат усилий и времени. Кроме того, цельная кровь более информативна, так как включает в себя и другие белки, которые могут быть использованы для дифференциации межвидовых гибридов (Жигарев и др., 2011).

Анализ результатов электрофореза лизатов (в ЭДТА) разных органов и тканей (кровь, легкие, сердце, селезенка, печень и скелетные мышцы) показал пригодность всех проб для идентификации видов-двойников методом электрофореза в ПААГ. Более четкое разграничение видов-двойников обнаружено в пробах из свежей крови и сгустков свернувшейся крови (в том числе замороженной). Неплохие результаты получают при анализе лизатов селезенки, легких и печени, значительно хуже – результаты анализа лизатов мышц, сердца и легкого, не имеющих сгустков крови (рис. 1). Важно наличие в лизате гемоглобина. Надо учитывать, что при использовании печени для дифференциации видов на электрофореграмме проявляется много белков, поэтому камеры с малым пробегом (имеющие короткие гелевые пластины) могут давать трудноразличимые полосы, малоприспособленные для идентификации.

После проведения полевых исследований не всегда удается сразу проанализировать полученные данные. Приходится хранить материал в морозильной камере. Мы проверили влияние хранения биологического материала в холодильнике на качество получаемой информации. Оказалось, что биологический материал (трупы полевок или замороженные в том числе в растворах ЭДТА кровь и органы), хранящийся в морозильной камере (-18°C) в течение 2–3 лет, дает приемлемый для идентификации результат и практически не меняет характер распределения белков при форе-зе. Годятся для идентификации и более старые образцы. Со временем белки разрушаются и на электрофореграмме дают широкую полосу, не позволяющую разделять виды. К такому же результату приводит многократное замораживание и оттаивание биоматериала. Хранение при -80°C позволяет значительно продлить (по крайней мере до 6–8 лет) качество материала.

Электрофореграммы в ПААГ могут существенно отличаться по информативности в зависимости от концентраций используемых веществ и методик. Необходимо обратить внимание на степень разведения образцов раствором ЭДТА перед загрузкой в гель. При использовании концентрированных образцов получают смазанные полосы, избыточное разведение приводит к тому, что увидеть видоспецифические полосы на электрофореграмме невозможно (рис. 2). Для по-

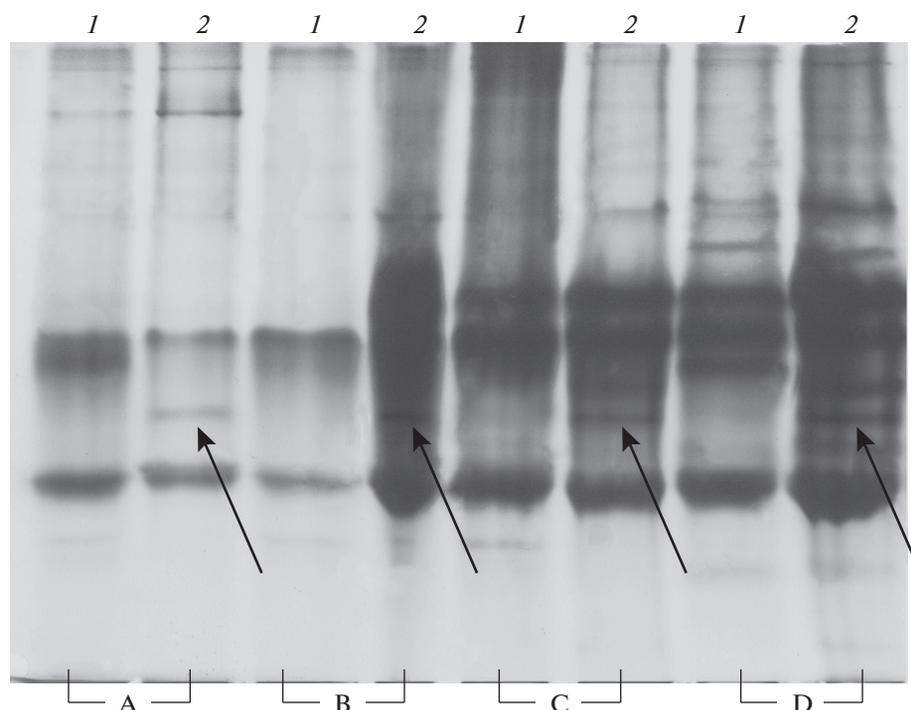


Рис. 1. Электрофореграмма в ПААГ белков лизатов разных органов двух видов-двойников *Microtus arvalis* (1) и *M. rossiaemeridionalis* (2). А – легкое со сгустками крови, В – селезенка, С – печень, D – сердце. Стрелками указана видоспецифическая для восточно-европейской полевки полоса белков ($R_f = 0.584$); для рис. 1 и 2.

лучения хороших результатов необходимо разводить биоматериал раствором ЭДТА до слаборозового цвета.

Были использованы разные концентрации ПААГ (6.25–12.5%) и экспериментально выявлено, что для идентификации двойников наиболее информативен 10.4%-ный гель.

В результате исследований с помощью компьютерной программы *Totalab TL 120* (info@totalab.com) была проведена оценка молекулярной массы видоспецифичного белка (минорная полоса на фореграмме, позволяющая идентифицировать *M. rossiaemeridionalis*). Массы маркерных белков составляют 12.8–13 кДа (рис. 3). Относительная электрофоретическая подвижность (R_f) белка минорной полосы в нативном электрофорезе (10.4%-гель) составила 0.58–0.59. Проведенные цитогенетический и электрофоретический анализы зверьков (1030 экз.), добытых в 10 географических районах Московской, Калужской, Самарской областей и природных территорий г. Москвы, показали численное доминирование *M. arvalis*. Лишь в Москве преобладала восточно-европейская полевка (табл. 1).

Протокол детального описания электрофореза белков крови в ПААГ рассчитан на осуществление электрофореза исследователем-биохимиком любой квалификации, поэтому некоторые описания для специалистов высокой квалификации

покажутся излишними. Электрофорез потребует небольших затрат времени и средств.

ПРОТОКОЛ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА БЕЛКОВ КРОВИ ВИДОВ-ДВОЙНИКОВ *M. arvalis* И *M. rossiaemeridionalis* В 10.4%-НОМ ПААГ

Приготовление растворов

Трис-НСI-буферы. Для проведения электрофореза необходимы два раствора с рН 8.8 и 6.8. В обоих случаях в качестве кислотно-основного буфера используют трис (трис(гидроксиметил)аминометан (Panreac, Испания, cat. № 141940.1209)), одномолярный раствор которого имеет щелочное значение рН. Для доведения растворов до необходимого значения кислотности используют 1 М химически чистую соляную кислоту (Стерлитамакское ОАО “Каустик”, Россия).

Сначала готовят 1 М раствор триса в dH_2O . На 100 мл конечного раствора необходимо 12.1 г кристаллического триса. Его растворяют в половине конечного объема воды. После полного растворения доливают воду до 100 мл. Затем раствор разливают в две емкости (20 и 80 мл, по объему 1 : 4). Большой объем доводят до рН 8.8, аккуратно добавляя НСI, отслеживая при этом изменение значения рН на потенциометре. Аналогично меньший объем доводят до рН 6.8. Готовые растворы

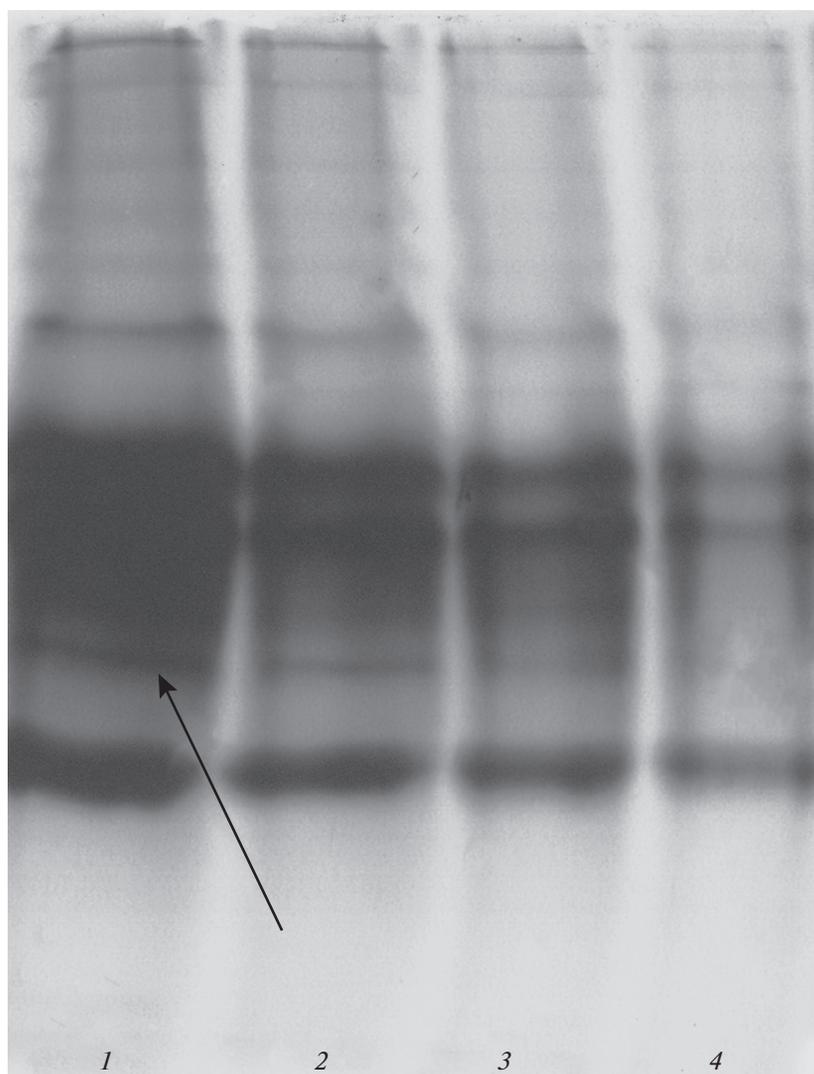


Рис. 2. Электрофореграмма в ПААГ белков лизата печени *Microtus rossiaemeridionalis* при разбавлении ЭДТА. 1 – однократное (лизат красноватого цвета), 2 – двукратное (лизат светло-розового цвета), 3 – четырехкратное, 4 – восьмикратное разбавление.

хранят в холодильнике (+4°C). Этого объема хватит на проведение анализа 600–800 образцов.

Загрузочный буфер (4X-раствор). Надо перемешать до получения однородной темно-синей густой жидкости 100 мл глицерина (Лабтех, Россия), 50 мл трис-НСI-буфера (рН 6.8) и добавить на кончике шпателя бромфеноловый синий (Panreac, Испания, cat. № 131165.1604). Стоковый буфер хранится в холодильнике неограниченное время. Данного объема хватит для работы с 15000 образцов.

Раствор акриламида. Раствор акриламида (MP biomedical, США, cat. № 814326) и N,N'-метиленбисакриламида (MP biomedical, США, cat. № 800173) в воде – главный гелеобразующий компонент ПААГ. Для приготовления 100 мл раствора сначала в 50 мл dH₂O полностью растворя-

ют 0.9 г бисакриламида (сшивающий компонент), затем вносят 24.1 г акриламида и доводят объем дистиллированной водой до 100 мл. Готовый 25%-ный раствор акриламида хранят в холодильнике в темной таре. Данного объема хватит для анализа нескольких сотен образцов в зависимости от размеров электрофорезной камеры.

Трис-глицериновый буфер (5X-раствор). Трис-глицериновый буфер (ТГБ) – основной электродный буфер в обеих камерах электрофоретической системы. Для приготовления пятикратного трис-глицеринового буфера необходимо 15.1 г триса (Panreac, Испания, cat. № 141940.1209) и 94 г глицерина (Panreac, Испания, cat. № 141340.1209), которые нужно разбавить дистиллированной водой до 1 л. Стоковый ТГБ хранят в холодильнике. Не-

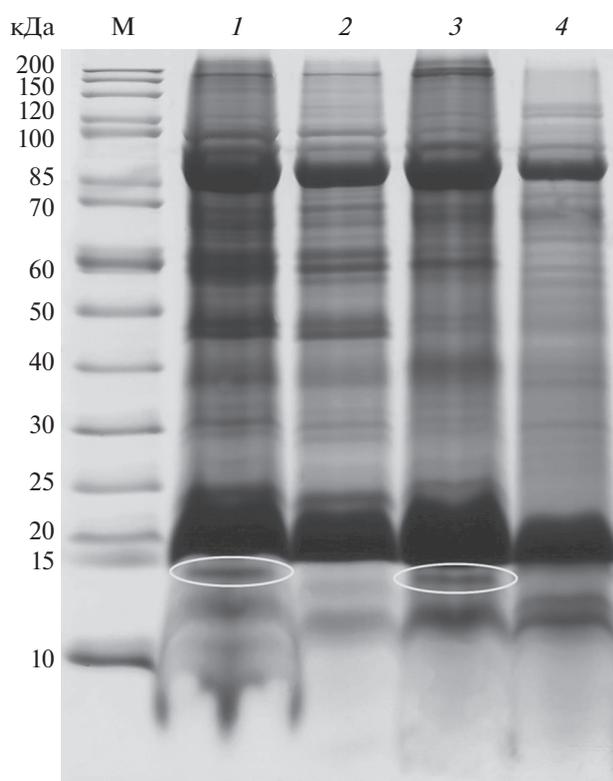


Рис. 3. Оценка молекулярной массы видоспецифических белков восточно-европейской полевки. 1 – *Microtus rossiaemeridionalis* (сгусток крови), 2 – *M. arvalis* (сгусток крови), 3 – *M. rossiaemeridionalis* (селезенка), 4 – *M. arvalis* (селезенка), М – набор белковых маркеров. Овалы – видоспецифические для восточно-европейской полевки полосы белков.

посредственно перед применением его необходимо разбавить дистиллированной водой в 5 раз.

Раствор персульфата аммония, 10%. Кристаллический персульфат аммония (ПСА) (Sigma-Aldrich, США, cat. № A3678) – активатор полимеризации, который необходимо растворить в дистиллированной воде, доведя концентрацию до 10%. Хранить его надо в холодильнике не более 2 нед.

Раствор кумасси (бриллиантового синего G-250). Для приготовления 100 мл раствора необходимо 0.2 г бриллиантового синего G-250 (Panreac, Испания, cat. № 254933.1606), 45 мл этилового спирта, 10 мл уксусной кислоты ледяной х. ч. (Купавнар-актив, Россия) и 45 мл дистиллированной воды. Перемешать до получения темно-синей однородной жидкости. Полученный раствор хранят при комнатной температуре.

Отмывочный раствор. Для приготовления 100 мл отмывочного раствора необходимо смешать 20 мл этилового спирта, 4 мл уксусной кислоты ледяной х. ч. и 76 мл дистиллированной воды. Хранить полученный раствор можно при комнатной температуре.

Методика проведения электрофореза

Подготовка образцов. Небольшое количество свежих тканей или органов необходимо поместить в пробирку Эппендорф и залить 0.5%-ным раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА-динатриевая соль AppliChem A1103.0500). Этот раствор можно хранить продолжительное время в морозильной камере или 1–2 сут при комнатной температуре (в этом случае перед загрузкой образца на гель его желательнее подвергнуть заморозке-разморозке для эффективного разрушения мембран эритроцитов). В случае если органы были ранее заморожены, их размораживают и заливают раствором ЭДТА. Раствор должен иметь слабо-розовый цвет, его необходимо пипетировать с помощью кубового сэмплера и внести в загрузочный буфер. Для этого в чистые пробирки Эппендорф следует залить по 10 мкл загрузочного буфера и добавить по 30 мкл исследуемого лизата, после чего хорошо перемешать.

Заливка гелей и проведение электрофореза. В предлагаемом методе гель, в котором происходит разделение белков, двухкомпонентный. Он состоит из разрешающего (нижнего) и концентрирующего (верхнего) гелей. Оба раствора мономеров готовят отдельно.

Для приготовления 12 мл (на 4 геля, т.е. по 3 мл на каждый) разрешающего геля используют следующий протокол: в чистой стеклянной емкости смешать приготовленный ранее 25%-ный раствор акриламида (5 мл), dH_2O (2.4 мл), трис-НСl, рН 8.8 (4.5 мл), 10%-ный раствор персульфата аммония в воде (0.13 мл), ТЕМЕД (0.01 мл).

Для инициации реакции полимеризации необходимо наличие в растворе ТЕМЕД. Поэтому, прежде чем добавлять его, надо убедиться в том, что стекла электрофоретического прибора правильно установлены (согласно инструкции прибора) и все остальные компоненты раствора добавлены. После внесения ТЕМЕД и персульфата необходимо как можно быстрее залить раствор мономеров разрешающего геля с помощью кубового сэмплера в пространство между стеклами. Для выравнивания верхней поверхности геля сверху настилают по 300 мл бутанола (можно заменить этанолом). Полная полимеризация происходит через 30 мин после добавления ТЕМЕД и персульфата. По завершении полимеризации нужно удалить слой бутанола с помощью фильтровальной бумаги. Полученный гель разделяющий, его концентрация 10.4%.

Для приготовления 8 мл (на 4 геля, по 2 мл на каждый) концентрирующего геля необходимо в чистой стеклянной емкости смешать приготовленный ранее 25%-ный раствор акриламида (1.34 мл), dH_2O (5.5 мл), трис-НСl, рН 6.8 (1 мл), 10%-ный водный раствор ПСА (0.08 мл), ТЕМЕД (0.008 мл).

Таблица 1. Пункты отлова и число определенных (цитогенетически и (или) электрофорезом белков крови) видов-двойников *Microtus arvalis* и *M. rossiaemerdionalis*

| Место отлова | Число особей | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------|------------------|
| | Всего | <i>M. arv.</i> | <i>M. rossi.</i> |
| г. Москва, долина р. Сетунь, пересечение с ул. Минской (N 55.721037, E 37.501080), ул. Рябиновой (N 55.701107, E 37.412872) и Аминьевским шоссе (N 55.710323, E 37.460100) | 14 | 0 | 14 |
| Московская обл., Ногинский р-н, окр. г. Черноголовка (N 56.037164, E 38.423409; N 56.022408, E 38.415616) | 7 | 6 | 1 |
| Калужская обл., Жуковский р-н, окр. г. Балабаново (N 55.196806, E 36.717885; N 55.188731, E 36.705424) | 26 | 26 | 0 |
| Самарская обл., национальный парк “Самарская Лука”, окр. с. Брусяны (N 53.229453, E 49.374495) | 297 | 287 | 10 |
| Самарская обл., национальный парк “Самарская Лука”, окр. с. Малая Рязань (N 53.229107, E 49.302547) | 217 | 213 | 4 |
| Самарская обл., национальный парк “Самарская Лука”, окр. д. Кольцово (N 53.189586, E 49.419946) | 206 | 202 | 4 |
| Самарская обл., Жигулевский ГПБЗ, окр. с. Бахилова Поляна (N 53.428487, E 49.669588) | 91 | 88 | 3 |
| Самарская обл., окр. г. Тольятти, вблизи завода “Тольяттиазот” (N 53.532389, E 49.632381) | 35 | 34 | 1 |
| Самарская обл., окр. г. Тольятти, вблизи Васильевских очистных сооружений (N 53.539804, E 49.567104) | 59 | 57 | 2 |
| Самарская обл., окр. г. Тольятти, вблизи бывшего АО “Фосфор” (N 53.537076, E 49.508280) | 78 | 77 | 1 |
| Всего | 1030 | 990 | 40 |

Как и в случае приготовления разрешающего геля, ТЕМЕД добавляют непосредственно перед заливкой. Концентрирующий гель наслаивают поверх уже застывшего разрешающего до верхней границы стекол. Затем для создания загрузочных карманов вставляют тefлоновую гребенку до упора в пространство между стеклами. Верхний гель полностью застывает за 15 мин.

Застывшие гели вынимают из заливочных столиков и зажимов, затем устанавливают в электрофоретический прибор. Камеры прибора заполняют разбавленным в 5 раз дистиллированной водой ТГБ (5X-раствор). В данном исследовании использовали 10-луночные тefлоновые гребенки (соответственно, на одном геле разгоняли 10 образцов). Подготовленные образцы, смешанные с загрузочным буфером, вносят по 15 мкл в каждую лунку. После этого необходимо подключить прибор к источнику питания (необходимо выставить выходное напряжение 150 В и выходную мощность 60 Вт). Электрофорез проводят в две стадии, в которых значения силы тока различаются. Первая стадия длится 35 мин, фиксируемая сила тока источника 50 мА. По истечении этого времени

фронт должен сместиться к границе концентрирующего и разрешающего гелей. После этого силу тока увеличивают до 80 мА. Вторая стадия продолжается 60–80 мин. Электрофорез считают оконченным, когда фронт подходит к нижнему краю геля. Гели вынимают и окрашивают приготовленным заранее раствором бриллиантового синего G-250 в течение нескольких часов (оставить на ночь). После окрашивания необходимо провести отмывку гелей от лишней краски. Для этого используют отмывочный раствор, в котором гели находятся до появления четких синих белковых полос на фоне прозрачного геля. После этого образцы можно фотографировать и анализировать. Для этого необходимо рассчитать на электрофореграмме R_f . Наличие полосы в области $R_f = 0.58–0.59$ диагностирует восточно-европейскую полевку.

Авторы благодарны Е.В. Черепановой (ИПЭЭ РАН) за помощь в проведении цитогенетического анализа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 16-14-10269).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барановский П.М., Охотский Ю.В. Использование территории, суточная активность и подвижность видов-двойников *Microtus arvalis* и *Microtus rossiaemeridionalis* (Rodentia, Microtinae) // Зоол. журн. 1988. Т. 67. Вып. 7. С. 1090–1094.
- Баскевич М.И., Миронова Т.А., Черепанова Е.В., Кривоногов Д.М. Новые данные по хромосомной изменчивости, распространению видов-двойников и гибридизации 46-хромосомных форм *Microtus arvalis sensu lato* (Rodentia, Arvicolinae) в Верхнем Поволжье // Зоол. журн. 2016. Т. 95. № 9. С. 1096–1107.
- Баскевич М.И., Окулова Н.М., Сапельников С.Ф., Балакирев А.Е., Рябина С.Б., Малыгин В.М. Цитогенетическая и электрофоретическая дифференциация видов-двойников *Microtus arvalis* s.l. (Rodentia, Arvicolidae) в Воронежском заповеднике // Зоол. журн. 2005. Т. 84. Вып. 10. С. 1298–1309.
- Баскевич М.И., Окулова Н.М., Потапов С.Г., Миронова Т.А., Сапельников С.Ф., Сапельникова И.И., Егоров С.В., Власов А.А. Новые данные о распространении видов-двойников и гибридизации 46 хромосомных форм *Microtus arvalis sensu lato* (Rodentia, Arvicolinae) в Центральном Черноземье // Зоол. журн. 2012. Т. 91. № 8. С. 994–1005.
- Баскевич М.И., Потапов С.Г., Окулова Н.М., Сапельников С.Ф., Власов А.А., Опарин М.Л., Миронова Т.А., Авилова Е.А. К распространению и изменчивости видов-двойников *Microtus arvalis sensu lato* (Rodentia, Arvicolinae) в Центральном Черноземье по хромосомным и молекулярно-генетическим данным // Зоол. журн. 2009. Т. 88. Вып. 4. С. 473–483.
- Булатова Н.Ш., Потапов С.Г., Лавренченко Л.А. Генетическая и хромосомная политипия в исследовании маркеров митохондриальной и ядерной ДНК у обыкновенных полевков (группа *Microtus arvalis*) // Генетика. 2010. Т. 46. № 5. С. 668–676.
- Доброхотов Б.П. Техника постановки электрофореза гемоглобинов крови для определения некоторых трудноразличимых видов мелких млекопитающих в полевых условиях // Зоол. журн. 1985. Т. 64. Вып. 10. С. 1569–1575.
- Доброхотов Б.П., Малыгин В.М. Применение электрофореза гемоглобинов для идентификации серых полевков (*Microtus*) группы *arvalis* (Rodentia, Cricetidae) // Зоол. журн. 1982. Т. 61. Вып. 3. С. 436–439.
- Жигарев И.А. Изменения плотности населения мышевидных грызунов под влиянием рекреационного пресса на юге Подмосковья // Зоол. журн. 1993. Т. 72. № 12. С. 117–137.
- Жигарев И.А. Мелкие млекопитающие рекреационных и естественных лесов Подмосковья. М.: Прометей, 2004. 230 с.
- Жигарев И.А., Лапковский В.В., Алпатов В.В., Малыгин В.М. Идентификация видов-двойников *Microtus arvalis sensu lato* и их гибридов методами электрофореза // Териофауна России и сопредельных территорий. Междунар. совещ. М.: КМК, 2011. С. 165.
- Загороднюк И.В. Кариотипическая изменчивость 46-хромосомных форм полевков группы *Microtus arvalis* (Rodentia): таксономическая оценка // Вестн. зоологии. 1991а. № 1. С. 36–46.
- Загороднюк И.В. Систематическое положение *Microtus brevirostris* (Rodentiformes): материалы по таксономии и диагностике группы “*arvalis*” // Вестн. зоологии. 1991б. № 3. С. 26–35.
- Загороднюк И.В., Тесленко С.В. Виды-двойники надвида *Microtus arvalis* на Украине. Сообщение I. Распространение *Microtus subarvalis* // Вестн. зоологии. 1986. № 3. С. 34–40.
- Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений. 2002. Т. 34. № 4. С. 279–296.
- Малыгин В.М. Систематика надвида обыкновенной полевки // Вестн. МГУ, Сер. биол. почв. 1970. № 5. С. 89–91.
- Малыгин В.М. Сравнительно-морфологический анализ видов полевков из группы *Microtus arvalis* (Rodentia, Cricetidae) // Зоол. журн. 1978. Т. 57. № 7. С. 1062–1073.
- Малыгин В.М. Систематика обыкновенных полевков. М.: Наука, 1983. 207 с.
- Малыгин В.М., Пантелейчук Сантуш Луиш Т.М. Морфологические критерии определения голотипов таксонов видов обыкновенных полевков (*Microtus*, Rodentia, Mammalia) // Докл. РАН. Общ. биология. 1996. Т. 348. № 2. С. 282–286.
- Маркова Е.А., Бородин А.В., Гилева Э.А. Одонтологические признаки обыкновенной (*Microtus arvalis* Pal-las, 1779) и восточноевропейской (*M. rossiaemeridionalis* Ognev, 1924) полевков Уральского региона и их диагностическое значение // Зоол. журн. 2003. Т. 82. № 9. С. 1086–1094.
- Мейер М.Н., Дитятев А.Э. Применение линейного дискриминантного анализа в диагностике видов-двойников обыкновенной полевки (Rodentia, Microtus) // Зоол. журн. 1989. Т. 68. № 7. С. 119–129.
- Мейер М.Н., Орлов В.Н., Схоль Е.Д. Использование данных кариологического, физиологического и цитологического анализов для выделения нового вида у грызунов (Rodentia, Mammalia) // Докл. АН СССР. 1969. Т. 188. № 6. С. 1411–1414.
- Михайлова Т.В., Бернштейн А.Д., Балакирев А.Е., Анекина Н.С., Альбов С.А., Новохатка А.Д., Дорофеев Э.М. Некоторые черты биологии полевков *Microtus arvalis* и *Microtus rossiaemeridionalis* (Rodentia, Cricetidae) и их взаимоотношения с хантавирусом *Tula* // Зоол. журн. 2008. Т. 87. № 2. С. 239–247.
- Опарин М.Л., Опарина О.С., Матросов А.Н., Кузнецов А.А. Динамика фауны млекопитающих степей Волго-Уральского междуречья за последнее столетие // Поволж. экол. журн. 2010. № 1. С. 71–85.
- Орлов В.Н., Малыгин В.М. Родственные связи видов из надвида *Microtus arvalis* по кариологическим данным // Бюл. Моск. о-ва испытателей природы. Отд. биол. 1974. Т. 79. Вып. 2. С. 23–28.
- Потапов С.Г., Орлов В.Н., Ковальская Ю.М., Малыгин В.М., Рысков А.П. Генетическая дифференциация полевков трибы Arvicolini (Cricetidae, Rodentia) методом таксоопринтного анализа и полимеразной цепной реакции со случайными праймерами // Генетика. 1999. Т. 35. № 4. С. 484–492.

- Тихонов И.А., Тихонова Г.Н., Полякова Л.В. Виды-двойники *Microtus arvalis* и *M. rossiaemeridionalis* (Rodentia, Cricetidae) на северо-востоке Московской области // Зоол. журн. 1998. Т. 77. Вып. 1. С. 95–100.
- Тихонов И.А., Мунтяну А.И., Успенская И.Г., Коновалов Ю.Н., Бурлаку В.И., Караман Н.К., Нистреану В.Б., Тихонова Г.Н., Котенкова Е.В. Биотопическое распределение, структура популяций и некоторые особенности размножения мелких млекопитающих г. Кишинева // Поволж. экол. журн. 2010. № 4. С. 404–414.
- Тихонова Г.Н., Тихонов И.А., Суров А.В., Опарин М.Л., Богомолов П.Л., Ковальская Ю.М. Экологическая характеристика фоновых видов грызунов степей в низовьях Волги и Дона // Поволж. экол. журн. 2005. № 3. С. 281–291.
- Fink S., Excoffier L., Heckel G. Mitochondrial gene diversity in the common vole *Microtus arvalis* shaped by historical divergence and local adaptations // Mol. Ecol. 2004. V. 13. Iss. 11. P. 3501–3514.
- Ford C.E., Hamerton J.L. A colchicine hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes // Stain Technol. 1956. V. 31. P. 247–251.
- Galan M., Pages M., Cosson J.-F. Next-Generation Sequencing for Rodent Barcoding: Species Identification from Fresh, Degraded and Environmental Samples // PLOS One. 2012. 7(11). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://doi.org/>. Дата обновления: 01.12.2018. doi 10.1371/journal.pone.0048374
- Juskeviciute E., Paulauskas A. Application of DNA fragment length polymorphism analysis for identification of small rodents // Ecologija. 2003. № 1. P. 21–23.
- Markova E., Malygin V., Montuire S., Nadochowski A., Quere J.P. Dental variation in sibling species *Microtus arvalis* and *M. rossiaemeridionalis* (Arvicolinae, Rodentia): Between-species Comparisons and geography of morphotype dental patterns // J. Mamm. Evol., Kluwer Acad. Plenum Publ. (United States). 2010. V. 17. № 2. P. 121–139.

Protein Polyacrylamide Gel Electrophoresis as a Common Vole Sibling Species Identification Method (*Microtus arvalis* PALLAS, 1779 and *M. rossiaemeridionalis* OGNEV, 1924 (Rodentia, Cricetidae))

I. A. Zhigarev^{1,2,#}, D. I. Zhigarev^{1,3}, V. V. Alpatov^{1,2}, V. V. Lapkovsky², V. M. Malygin⁴, and S. V. Simak⁵

¹Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninskij prosp. 33, Moscow, 119071 Russia

²Moscow Pedagogical State University, Institute of Biology and Chemistry, ul. Kibalchicha 6, Moscow, 129164 Russia

³Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

⁴Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Leninskiye Gory 1, str. 12, Moscow, 119234 Russia

⁵Samara State Regional Academy (Nayanova), ul. Molodogvardeyskaya 196, Samara, 443001 Russia

#e-mail: i.zhigarev@gmail.com

A new sibling species identification (*Microtus arvalis* and *M. rossiaemeridionalis*) protein polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) protocol has been offered in that study. Blood samples of two species have been researched: voles from the vivarium (5 hybrid animals of both species) and free-living caught in Central Russia (1030 animals from Moscow, Kaluga, Samara regions). A comparing of a PAGE, agarose electrophoresis and cellulose acetate electrophoresis has been done. Moreover, we evaluated usefulness of different tissues and organs suitability. The specie-specific protein has been described: we found relative mobility (Rf-value) and mass range of that protein.