

УДК 577.21

Определение полной нуклеотидной последовательности митохондриального генома возбудителя описторхоза, *Opisthorchis felineus*

В. А. Мордвинов¹, А. В. Марданов², Н. В. Равин², С. В. Шеховцов¹,
С. А. Демаков¹, А. В. Катохин¹, Н. А. Колчанов¹, К. Г. Скрябин^{2#}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, д. 10.

² Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, д. 7, корп. 1.

e-mail: office@biengi.ac.ru

РЕФЕРАТ Печеночная трематода *Opisthorchis felineus* является возбудителем описторхоза – опасного заболевания человека и животных, широко распространенного в России, в основном на территории Западной Сибири. В настоящей работе мы определили полную нуклеотидную последовательность митохондриальной ДНК этого плоского червя. Были использованы два метода: секвенирование методом капиллярного электрофореза фрагментов митохондриального генома, полученных специфической ПЦР-амплификацией, и параллельное пиросеквенирование препарата геномной ДНК. Обе методики позволили определить полную нуклеотидную последовательность митохондриального генома *O. felineus*. Он представляет собой кольцевую молекулу длиной 14277 нт с 35 генами, кодирующими 2 рРНК, 22 тРНК и 12 белков, включая 3 субъединицы цитохром С оксидазы, семь субъединиц NADH-дегидрогеназы, апоцитохром Б и субъединицу 6 АТФ синтетазы. Как и у других плоских червей, ген субъединицы 8 АТФ-синтетазы отсутствует. Из 22 тРНК 19 имеют типичную структуру «листа клевера». У тРНК-Ser(AGC) и тРНК-Cys отсутствуют DHU-петли, а для гена тРНК-Ser(UCA) возможны две альтернативные структуры, с DHU-петлей и без нее. Анализ результатов пиросеквенирования позволил идентифицировать 45 однонуклеотидных полиморфизмов в митохондриальном геноме. Данные о нуклеотидной последовательности митохондриального генома *O. felineus* могут быть использованы для разработки методов молекулярной диагностики описторхоза. Полученные результаты показывают, что метод пиросеквенирования может быть использован для быстрой расшифровки митохондриальных геномов животных.

ВВЕДЕНИЕ

Плоский червь *Opisthorchis felineus* (класс Trematoda, сем. Opisthorchiidae) – печеночная двуустка, является паразитом рыбоядных животных, а также человека. Описторхозом заражено около 2 млн людей, главным образом живущих на территории России и республик бывшего СССР – Украины, Белоруссии и Казахстана [1, 2]. В некоторых северных населенных пунктах описторхозом заражено до 90 % населения [1].

Несмотря на столетнюю историю изучения *O. felineus* и его огромную практическую важность, многие вопросы его популяционной и эволюционной биологии остаются неизученными, что объясняется главным образом малым количеством пригодных для исследований признаков. С развитием молекулярно-генетических методик начали широко применяться молекулярные маркеры. Исследования, проведенные на описторхидах молекулярными методами [3, 4, 5], показали недостаточное разнообразие

используемых на сегодняшний момент молекулярных маркеров. Для получения пригодных для широкого круга исследований молекулярных маркеров наиболее перспективным является исследование структуры полного митохондриального генома *O. felineus*.

У большинства видов животных митохондриальные геномы (мтДНК) отличаются рядом особенностей, которые делают их незаменимыми инструментами для филогенетических и филогеографических исследований: наследование по материнской линии, отсутствие рекомбинации и высокая по сравнению с ядерным геномом скорость эволюции [6]. С увеличением числа просеквенированных митохондриальных геномов они стали широко применяться для подбора генетических маркеров с высокой скоростью эволюции и для построения высокоразрешающих филогенетических деревьев, в которых в качестве признаков используются как сами последовательности, так и порядок расположения генов.

В данной работе мы представляем две методологии определения полной нуклеотидной последовательности митохондриального генома *O. felineus* и анализ его структуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ИСТОЧНИК БИОМАТЕРИАЛА И ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

Мариты *O. felineus* были выделены из зараженной кошки из д. Усть-Тула (Новосибирская область, Российская Федерация). Видовая принадлежность была определена по морфологическим признакам специалистами лаборатории паразитологии и ихтиологии Института систематики и экологии животных СО РАН. ДНК для обоих методов секвенирования была выделена из пулированных образцов фенол-хлороформным методом [7].

Табл. 1. Набор генов митохондриального генома *O. felineus*

ген	длина, п.н.	старт-кодон	стоп-кодон	ген	длина, п.н.	старт-кодон	стоп-кодон
cox3	642	ATG	TAG	nd3	354	GTG	TAG
tRNA-His	67			tRNA-Ser(AGN)	61		
cob	1110	ATG	TAG	tRNA-Trp	68		
nd4L	261	ATG	TAG	cox1	1560	GTG	TAG
nd4	1275	ATG	TAG	tRNA-Thr	63		
tRNA-Gln	63			16S rRNA	994		
tRNA-Phe	66			tRNA-Cys	60		
tRNA-Met	68			12S rRNA	780		
atp6	513	ATG	TAG	cox2	639	ATG	TAG
nd2	867	ATG	TAG	nd6	459	ATG	TAG
tRNA-Val	65			tRNA-Tyr	62		
tRNA-Ala	62			tRNA-Leu(CUN)	64		
tRNA-Asp	67			tRNA-Ser(UCN)	72		
nd1	900	GTG	TAG	tRNA-Leu(UUR)	65		
tRNA-Asn	71			tRNA-Arg	68		
tRNA-Pro	64			nd5	1602	ATG	TAG
tRNA-Ile	62			tRNA-Glu	72		
tRNA-Lys	65			tRNA-Gly	67		

РАСШИФРОВКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ мтДНК *O. FELINEUS* МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ПО СЭНДЖЕРУ

Путем сравнения митохондриальных геномов трематод *Fasciola hepatica* (AF216697), *Paragonimus westermani* (AF216698) и *Schistosoma mansoni* (AF216698) при помощи программ MEME/MAST (<http://meme.sdsc.edu/>) были обнаружены консервативные последовательности, характерные для геномов трематод. Используя эти последовательности, а также опубликованные последовательности *Clonorchis sinensis* (DQ116944, AY264851) и *O. viverrini* (DQ882172, DQ119551), подобрали универсальные праймеры. При помощи этих праймеров был получен набор ампликонов длиной около 1000 п.н., на основании последовательности которых были синтезированы новые праймеры. Таким образом, была амплифицирована оставшая часть митогенома в виде перекрывающихся фрагментов. Секвенирование большинства ампликонов проводилось напрямую; часть ампликонов были клонированы, после чего проводилось секвенирование минимум трех клонов. Секвенирование мтДНК проводилось на автоматическом секвенаторе фирмы Applied Biosystems ABI PRISM 3100 – Avant Genetic Analyzer в межинститутском центре секвенирования ДНК СО РАН. Полная последовательность мтДНК *O. felineus* представлена в GenBank (NC_011127).

РАСШИФРОВКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ мтДНК *O. FELINEUS* МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

Для определения нуклеотидной последовательности генома *O. felineus* методом пиросеквенирования нами была использована методология, реализованная компанией 454 Life Science на геномном анализаторе GS FLX. Получение библиотеки случайных фрагментов ДНК, клональную амплификацию связанных с микрочастицами молекул ДНК в водно-масляных эмульсиях и секвенирование на GS FLX проводили с использованием наборов реактивов и по протоколам фирмы-производителя (Roche). За один запуск прибора (12 ч) было определено около 100 млн нт, причем средняя длина «чтения» составляла около 220 нт.

Сборку полученного на GS FLX набора перекрывающихся последовательностей в объединяющие их «континги» осуществляли с помощью пакета программ *GS de novo Assembler* (Roche Diagnostics, Roche Applied Science). В результате была определена полная нуклеотидная последовательность контига длиной 14277 нт, представляющего собой митохондриальный геном. Средняя кратность чтения мтДНК составляла около 30 раз.

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

Анализ последовательностей и сборка генома проводились при помощи программы *Vector NTI 7* (Informax Inc.). Поиск сходных последовательностей был проведен в базах данных биологических последовательностей GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Для трансляции белок-кодирующих последовательностей был использован митохондриальный генетический код плоских червей [8]. Большинство тРНК были найдены программой *tRNAscan-SE* [9]; вторичные структуры остальных были найдены вручную.

Для идентификации потенциальных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) отдельные последовательности,

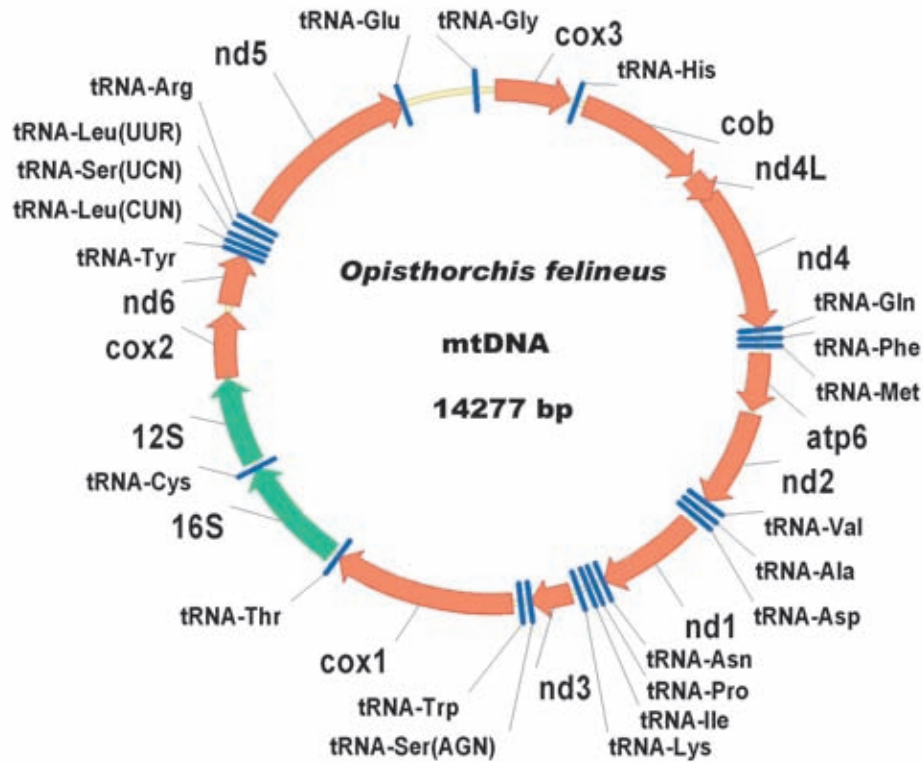


Рис. 1. Генетическая карта митохондриального генома *O. felineus*

определенные при проведении пиросеквенирования, выравнивали относительно «консенсусной» последовательности мтДНК *O. felineus* с помощью программы GS reference mapper (Roche). SNP определяли по наличию не менее чем трех индивидуальных чтений, последовательность которых отличается от «консенсусной» в данной точке. Также к SNP относили все точки несовпадения между полными последовательностями мтДНК, определенными с помощью капиллярного электрофореза и методом пиросеквенирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

МЕТОДОЛОГИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ мтДНК

Благодаря своей относительно небольшой длине митохондриальные геномы животных стали одними из первых объектов геномных исследований [10], а к настоящему времени известны полные последовательности сотен мтДНК.

Стандартный метод расшифровки митохондриального генома предполагает выделение митохондрий из клеток и получение препарата митохондриальной ДНК, максимально очищенного от геномной ДНК. Последующее «сэнджеровское» секвенирование предполагает разбиение генома на ряд случайно выбранных фрагментов, их клонирование в плазмидном векторе («библиотека случайных фрагментов») и секвенирование полученных клонов с помощью капиллярного электрофореза. Поскольку фрагменты являются перекрывающимися, полученные последовательности могут быть объединены в полную последовательность мтДНК. В данной работе для специфического выделения митохондриальных последовательностей мы использовали информацию о структуре мтДНК близ-

кородственных гельминтов, позволившую идентифицировать консервативные участки генома и амплифицировать с помощью ПЦП расположенные между ними фрагменты мтДНК *O. felineus*. Последовательности полученных фрагментов были определены с помощью капиллярного электрофореза и объединены в полную последовательность мтДНК длиной 14277 нт.

Новым методом, позволяющим определять de novo геномные последовательности, является метод пиросеквенирования [11], реализованный компанией 454 Life Science на геномном анализаторе GS FLX. Этот метод предполагает фрагментацию ДНК до 300–800 нт, амплификацию связанных с микрочастицами индивидуальных фрагментов ДНК в микрокаплях, образуемых в водно-масляных эмульсиях, нанесение наночастиц с иммобилизованными амплифицированными фрагментами в микроячейки на стеклянной пластине, параллельное проведение реакций «пиросеквенирования» и регистрацию результатов в каждой из нескольких сотен тысяч находящихся на пластине ячеек. Средняя длина чтения каждой реакции составляет около 200 нт, что позволяет за один запуск прибора определять последовательность до 100 млн нт. Большой объем последовательностей, определяемый с помощью этого метода, позволил нам отказаться от специфического выделения фрагментов митохондриального генома и использовать для секвенирования препарат «суммарной» геномной ДНК *O. felineus*. Несмотря на то, что доля последовательностей мтДНК в общем объеме секвенирования составила менее 1 %, этого оказалось достаточно для прочтения мтДНК с 30-кратным перекрытием, что обеспечило полную «сборку» последовательности митохондриального генома после одного запуска GS FLX.

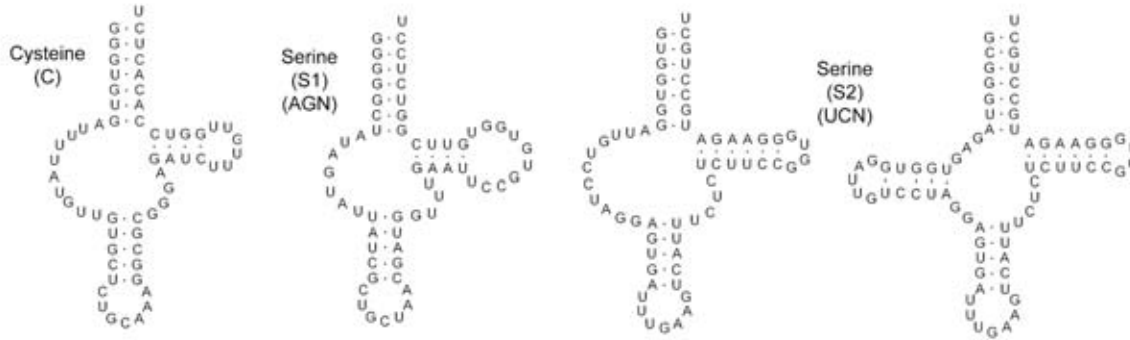


Рис. 2. Вторичные структуры тРНК: тРНК-Ser(AGN), тРНК-Cys, две возможные альтернативные структуры тРНК-Ser(UCN)

Табл. 2. Использование кодонов в митохондриальном геноме *O. felineus*

UUU	Phe	334	9.9 %	UCU	Ser	107	3.2 %	UAU	Tyr	146	4.3 %	UGU	Cys	89	2.6 %
UUC	Phe	40	1.2 %	UCC	Ser	22	0.7 %	UAC	Tyr	17	0.5 %	UGC	Cys	15	0.4 %
UUA	Leu	125	3.7 %	UCA	Ser	26	0.8 %	UAA	-	0	0 %	UGA	Trp	33	1.0 %
UUG	Leu	236	7.0 %	UCG	Ser	36	1.1 %	UAG	stop	12	0.4 %	UGG	Trp	80	2.4 %
CUU	Leu	107	3.2 %	CCU	Pro	43	1.3 %	CAU	His	49	1.5 %	CGU	Arg	47	1.4 %
CUC	Leu	14	0.4 %	CCC	Pro	19	0.6 %	CAC	His	7	0.2 %	CGC	Arg	4	0.1 %
CUA	Leu	26	0.8 %	CCA	Pro	7	0.2 %	CAA	Gln	12	0.4 %	CGA	Arg	3	0.1 %
CUG	Leu	41	1.2 %	CCG	Pro	21	0.6 %	CAG	Gln	21	0.6 %	CGG	Arg	23	0.7 %
AUU	Ile	103	3.1 %	ACU	Thr	60	1.8 %	AAU	Asn	44	1.3 %	AGU	Ser	72	2.1 %
AUC	Ile	18	0.5 %	ACC	Thr	11	0.3 %	AAC	Asn	7	0.2 %	AGC	Ser	15	0.4 %
AUA	Met	55	1.6 %	ACA	Thr	8	0.2 %	AAA	Asn	17	0.5 %	AGA	Ser	15	0.4 %
AUG	Met	101	3.0 %	ACG	Thr	16	0.5 %	AAG	Lys	44	1.3 %	AGG	Ser	47	1.4 %
GUU	Val	215	6.4 %	GCU	Ala	21	0.6 %	GAU	Asp	69	2.0 %	GGU	Gly	133	3.9 %
GUC	Val	15	0.4 %	GCC	Ala	76	2.3 %	GAC	Asp	3	0.1 %	GGC	Gly	35	1.0 %
GUA	Val	39	1.2 %	GCA	Ala	5	0.2 %	GAA	Glu	6	0.2 %	GGA	Gly	28	0.8 %
GUG	Val	138	4.1 %	GCG	Ala	36	1.1 %	GAG	Glu	71	2.1 %	GGG	Gly	105	3.1 %

Для каждого кодона указаны соответствующая ему аминокислота и частота использования этого кодона в генах мтДНК (число использований и соответствующая доля в процентах). Подчеркнуты отличия от стандартного генетического кода

ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА *O. FELINEUS*

Митохондриальный геном *O. felineus* представляет собой кольцевую молекулу ДНК длиной 14277 нт и, таким образом, является самым коротким из известных на данный момент митохондриальных геномов трематод [12]. Анализ последовательности генома выявил наличие типичных митохондриальных генов: 12 белок-кодирующих генов (отсутствует ген одной из субъединиц АТФазы, *atp8*), 22 гена тРНК и 2 гена рРНК (табл. 1).

Все гены транскрибируются с одной цепи, как и у других плоских червей (рис. 1). Порядок расположения генов идентичен с таковым у *F. hepatica* [13]. Гены *nd4L* и *nd4* перекрываются на 40 пн по различным рамкам считывания.

Все известные митохондриальные геномы плоских червей, за исключением генома *P. westermani*, являются А/Т-богатыми. Митохондриальный геном *O. felineus* содержит 60 % А + Т; кроме того, кодирующая цепь обогащена тиминном (43 %) по сравнению с аденином (17 %) и гуанином (28 %) по сравнению с цитозином (12 %). Нуклеотидный состав варьирует в различных частях генома, в особенности в третьих позициях кодонов белок-кодирующих генов, где цитозин составляет всего 8 %. Кодоны, оканчивающиеся на Т и G, встречаются значительно чаще, чем оканчивающиеся на А и С.

Самыми часто встречающимися кодонами являются ТТТ, ГТТ и ТТГ. Кодон ТТТ составляет почти 10 % от числа всех кодонов, в то время как все кодоны, составленные из А и С, занимают всего около 2 % (табл. 2). Как и в других митохондриальных геномах трематод, старт-кодонами являются АТГ и GTG, а стоп-кодоном – TAG. Кодон TGA используется для кодирования триптофана, а TAA не используется вообще. Укороченных стоп-кодонов в митохондриальном геноме *O. felineus* обнаружено не было (табл. 1).

Длина генов тРНК у *O. felineus* варьирует от 59 до 72 нуклеотидов. Большая часть генов тРНК организованы в кластеры, включающие до пяти генов. Для 19 из 22 тРНК можно теоретически реконструировать типичную структуру «листа клевера». Как и у всех трематод, DHU-петля отсутствует у тРНК-Ser(AGN). DHU-петля отсутствует и у тРНК-Cys, что характерно также для некоторых шистосом [14], а для гена тРНК-Ser(UCN) возможно считать две альтернативные структуры, с DHU-петлей и без нее (рис. 2).

Кроме коротких межгенных промежутков, в геномах плоских червей имеются длинные некодирующие районы, которые, как считается, содержат последовательности, необходимые для инициации репликации и транскрипции мтДНК. Как и у *F. hepatica*, расположенный между генами

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Табл. 3. Однонуклеотидные полиморфизмы, обнаруженные в митогеноме *O. felineus*

№	Положение в мтДНК и аллель, определенная «сэнджеворским» секвенированием		Частоты аллелей в последовательностях, определенных при пиросеквенировании	Ген	Заменяемый кодон	Аминокислотная замена
1	361	T	C-3 / T-27	cox3	tgg/cgg	W/R
2	1068	C	T-3 / C-25	cytB	tac/tat	-
3	1195	C	T-8 / C-17	cytB	cta/tta	-
4	1300	C	T-4 / C-23	cytB	ctg/ttg	-
5	1524	A	A-1 / G-28	cytB	caa/cag	-
6	1599	T	C-5 / T-28	cytB	ctg/ccg	L/P
7	1860	C	C-1 / T-24	cytB	ggc/ggt	-
8	1899	C	T-4 / C-24	nd4L	cct/tct	P/S
9	2025	T	C-4 / T-28	nd4L	tta/cta	-
10	2034	C	T-4 / C-28	nd4L	cgg/tgg	R/W
11	2039	C	T-4 / C-28	nd4L	ggc/ggt	-
12	3104	T	C-5 / T-19	nd4	tgt/ctg	-
13	3228	C	T-3 / C-25	nd4	gcg/gtg	A/V
14	3245	T	C-3 / T-27	nd4	tta/cta	-
15	3260	C	T-3 / C-26	nd4	ctg/ttg	-
16	3674	A	G-6 / A-28	atp6	aat/agt	N/S
17	3827	G	G-0 / A-39	atp6	ggt/gat	G/D
18	3915	A	A-0 / G-34	atp6	cta/ctg	-
19	3921	T	C-6 / T-28	atp6	tat/tac	-
20	3935	T	T-0 / C-35	atp6	gtg/gcg	V/A
21	4507	A	A-1 / G-20	nd2	ata/gta	I/V
22	4548	C	T-11 / C-14	nd2	agc/agt	-
23	4707	T	T-0 / C-33	nd2	tct/tcc	-
24	4710	T	T-0 / G-33	nd2	cct/ccg	-
25	5390	T	T-0 / A-36	nd1	aat/aaa	N/K
26	5684	C	C-2 / T-21	nd1	gcc/gct	-
27	6158	C	T-5 / C-32	-	-	-
28	6175	C	T-5 / C-33	tRNA-Asn	-	-
29	6314	T	C-3 / T-24	tRNA-Ile	-	-
30	6650	A	A-2 / G-30	nad3	gta/gtg	-
31	6810	C	T-4 / C-30	-	-	-
32	7865	A	A-0 / G-31	cox1	tca/tcg	-
33	8669	A	G-4 / A-27	16S rRNA	-	-
34	10692	T	C-3 / T-17	cox2	ata/aca	I/T
35	11152	A	G-8 / A-23	nd6	cca/ccg	-
36	11880	C	T-4 / C-36	tRNA-Arg	-	-
37	12186	G	G-1 / C-25	nd5	gtt/ctt	V/L
38	12326	T	A-3 / T-24	nd5	cgt/cga	-
39	12533	G	A-5 / G-22	nd5	gtg/gta	-
40	13403	G	A-4 / G-23	nd5	tcg/tca	-
41	13589	G	G-0 / A-11	-	-	-
42	13993	C	C-0 / T-30	-	-	-
43	14001	G	G-0 / A-18	-	-	-
44	14007	C	C-0 / T-8	-	-	-
45	14212	C	C-0 / T-9	-	-	-

tRNA-Glu и *cox3* некодирующий район *O. felineus* разделен на две части геном тРНК-Gly. Эти некодирующие районы не содержат, в отличие от некодирующих районов митохондриальных геномов других плоских червей, ни длинных tandemных повторов, ни последовательностей, способных формировать длинные шпильчатые структуры.

В некодирующем регионе *O. felineus* была обнаружена открытая рамка считывания длиной 402 п.н. Поиск сходных последовательностей в базах данных биологических последовательностей при использовании как нуклеотидной, так и аминокислотной последовательностей результатов не дал. Довольно длинные открытые рамки считывания для пептидов без сходства с известными белками были так-

же обнаружены в «некодирующих» районах мтДНК у других представителей плоских червей: *F. hepatica*, цестоды *Hymenolepis diminuta* [15] и моногенеи *Microcotyle sebastis* [16]. Возможно, данные рамки считывания кодируют функциональные белки, однако, это требует дополнительных экспериментальных доказательств.

Некодирующий участок мтДНК может быть использован для разработки методов специфической молекулярной идентификации *O. felineus*. Так, уровни гомологии нуклеотидных последовательностей мтДНК *O. felineus* и двух родственных трематод, для которых известны полные последовательности митохондриальных геномов, *S. sinensis* (FJ381664) и *F. hepatica* (AF216697), составляют

соответственно 78 % и 64 %. Однако последовательности не-кодировующих районов, расположенных между *tRNA-Glu* и *cox3*, у этих трех трематод не имеют значимой гомологии ни между собой, ни с другими представленными в GenBank последовательностями.

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ В мтДНК *O. FELINEUS*

В ходе определения нуклеотидной последовательности мтДНК методом пиросеквенирования каждый нуклеотид генома был «прочтен» в среднем 30 раз в результате секвенирования клонально-амплифицированных индивидуальных фрагментов молекул мтДНК *O. felineus*. Сравнение последовательностей индивидуальных чтений с консенсусной позволяет идентифицировать однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), присутствующие в различных молекулах мтДНК в одном организме. Поскольку «сэнджерское» секвенирование и пиросеквенирование проводились для ДНК, выделенной из нескольких особей *O. felineus*, сравнение соответствующих последовательностей мтДНК позволяет получить приблизительную оценку частот встречаемости гаплотипов по каждому SNP.

Данные о 45 детектированных SNP приведены в табл. 3. Большая часть SNP, как в мтДНК других животных и человека [17], представляют собой замены Т:С и А:G (соответствует Т:С по комплементарной цепи), в основном не приводящие к аминокислотным заменам в белковых продуктах соответствующих генов. Отметим, что несколько SNP выглядели специфическими для последовательности мтДНК, расшифрованной одной из двух технологий, и не встречались (или встречались с низкой частотой) в другой. Вероятно, различия в аллельных частотах являются отражением искажений, характерных для основанных на ПЦР методов амплификации и секвенирования гетерогенной смеси ампликонов, в то время как соотношение аллелей по SNP, полученное при пиро-

секвенировании индивидуальных фрагментов, должно быть более близким к реальному.

В будущем данные о специфических SNP и частотах известных SNP в мтДНК могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров при исследовании структур природных популяций *O. felineus* и анализе путей распространения патогена в окружающей среде и человеческих популяциях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы представили результаты определения полной нуклеотидной последовательности мтДНК плоского червя *O. felineus* двумя методами. В первом из них последовательности мтДНК были специфически амплифицированы и секвенированы методом капиллярного электрофореза. При использовании второго подхода, параллельного пиросеквенирования, образец геномной ДНК животного был просеквенирован без какого-либо предварительного обогащения последовательностями мтДНК, в результате чего была определена *de novo* полная последовательность митохондриального генома. Метод пиросеквенирования на геномном анализаторе GS FLX может быть использован для быстрой расшифровки митохондриальных геномов животных и идентификации полиморфизмов. Данные о нуклеотидной последовательности митохондриального генома *O. felineus* могут быть использованы для разработки методов молекулярной диагностики описторхоза. ●

*Выполненные работы были поддержаны программой «Геномика, протеомика, биоинформатика» СО РАН и ИЦиГ СО РАН и Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК № 02.552.11.7045) в Центре «Биоинженерия» РАН. Авторы выражают благодарность сотрудникам ИСиЭЖ СО РАН Н. И. Юрловой и К. П. Федорову за помощь в идентификации *O. felineus*.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бээр С.А. Биология возбудителя описторхоза. М: Товарищество научных изданий КМК, 2005.
2. Ромашов Б.В., Ромашов В.А., Семенов В.А., Филимонова Л.В. Описторхоз в бассейне верхнего Дона (Воронежская область): фауна описторхид, эколого-биологические закономерности циркуляции и очаговость описторхозидозов. Воронеж: Воронежский государственный университет, 2003.
3. Катохин А.В., Шеховцов С.В., Konkow S., Юрлова Н.И., Сербина Е.А., Водяницкая С.Н., Федоров К.П., Локтев В.В., Муратов И.В., Охуяма Ф., Махнева Т.В., Пельтек С.Е., Мордвинов В.А. // Оценка генетических отличий *Opisthorchis felineus* от *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis* по ITS2- и CO1-последовательностям. Доклады Академии наук. 2008. Т. 421. № 4. С. 549-552.
4. Kang S., Sultana T., Loktev V.B., Wongratanacheewin S., Sohn W.-M., Eom K.S. and Park J.-K. // Molecular identification and phylogenetic analysis of nuclear rDNA sequences among three opisthorchid liver fluke species (Opisthorchiidae: Trematoda). Parasitology Research, 2008. V. 57. P. 191-197
5. Saijuntha W., Sithithaworn P., Wongkham S., Laha T., Chilton N.B., Petney T.N., Barton M. and Andrews R.H. // Mitochondrial DNA sequence variation among geographical isolates of *Opisthorchis viverrini* in Thailand and Lao PDR, and phylogenetic relationships with other trematodes. Parasitology. 2008. V. 135. P. 1479-1486.
6. Ballard J.W.O. and Whitlock M.C. // The incomplete natural history of mitochondria. Molecular Ecology. 2004. V. 13. P. 729-744.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М: Мир. 1984.
8. Telford M.J., Herniou E.A., Russel R.B. and Littlewood D.T.J. // Changes in mitochondrial genetic codes as phylogenetic characters: Two examples from the flatworms. Proceedings of the National Academic Society. 2000. V. 97. P. 11359-11364.
9. Lowe T.M., Eddy S.R. // tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nucleic Acids Research. 1997. V. 25. P. 955-964.
10. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J.,

- Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R., Young I.G. // Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 1981. V. 290. 457-465.
11. Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y.J., Chen Z., Dewell S.B., Du Lu L., Fierro J.M., Gomes X.V., Godwin B.C., He W., Helgesen S., Ho C.H., Irzyk G.P., Jando S.C., Alenquer M.L., Jarvie T.P., Jirage K.B., Kim J.B., Knight J.R., Lanza J.R., Leamon J.H., Lefkowitz S.M., Lei M., Li J., Lohman K.L., Lu H., Makhijani V.B., McDade K.E., McKenna M.P., Myers E.W., Nickerson E., Nobile J.R., Plant R., Puc B.P., Ronan M.T., Roth G.T., Sarkis G.J., Simons J.F., Simpson J.W., Srinivasan M., Tartaro K.R., Tomasz A., Vogt K.A., Volkmer G.A., Wang S.H., Wang Y., Weiner M.P., Yu P., Begley R.F., Rothberg J.M. // Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature. 2005. V. 437. P. 376-380.
12. Le T.H., Blair D. and McManus D P. // Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. Trends in Parasitology. 2002. V. 18. P. 206-213.
13. Le T.H., Blair D. and McManus D.P. // Complete DNA sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the liver fluke, *Fasciola hepatica* L. (Platyhelminthes; Trematoda). Parasitology. 2001. V. 123. P. 609-621.
14. Littlewood D.T.J., Lockyer A.E., Webster B.L., Johnston D.A. and Le T.H. // The complete mitochondrial genomes of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma spindale* and the evolutionary history of mitochondrial genome changes among parasitic flatworms. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2006. V. 39. P. 452-467.
15. von Nickisch-Roseneck M., Brown W.M. and Boore J.L. // Complete Sequence of the Mitochondrial Genome of the Tapeworm *Hymenolepis diminuta*: Gene Arrangements Indicate that Platyhelminths Are Eutrochozoans. Molecular Biology and Evolution. 2001. V. 18. P. 721-730.
16. Park J., Kim K., Kang S., Kim W., Eom K. S. and Littlewood D.T.J. // A common origin of complex life cycles in parasitic flatworms: evidence from the complete mitochondrial genome of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Platyhelminthes). BMC Evolutionary Biology. 2007. V. 7.
17. MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2007.