

ВИКОРИСТАННЯ ДНК-ТЕХНОЛОГІЙ У ДОСЛІДЖЕННІ ГЕНЕТИЧНИХ РЕСУРСІВ ШОВКОВИЧНОГО ШОВКОПРЯДА УКРАЇНИ

Ю.В. Ляшенко, В.В. Ляшенко

Інститут шовківництва УААН

К.В. Копилова, К.В. Копилов, К.О. Арнаут

Інститут розведення і генетики тварин УААН

У статті наведено результати роботи з виділення ДНК шовковичного шовкопряда та ПЛР-аналізу поліморфних мікросателітних локусів (SSR). Виявлено відмінності за набором продуктів ампліфікації ДНК трьох порід шовкопряда. Одержані дані доводять можливість використання SSR-PCR для систематизації колекційних порід на основі молекулярно-генетичних маркерів.

Ключові слова: шовковичний шовкопряд, ДНК, ПЛР (PCR), мікросателітний локус, генетичний маркер.

Сучасні методологічні аспекти збереження генофонду сільськогосподарських тварин потребують використання нових підходів, серед яких важливе місце займають ДНК-технології [1].

Шовковичний шовкопряд визнаний одним із кращих об'єктів для генетичного аналізу і за останні 20 років зусиллями науковців Японії, Індії, Китаю та ін. країн проведено картування його геному більш ніж на 80 % [2]. Дослідження поліморфних локусів геному шовкопряда доводять можливість використання різних маркерних систем (RAPD, RFLP, ISSR-PCR, SSR-PCR) на міжпопуляційному та внутрішньогруповому рівнях [3]. Найбільш широко застосовується підхід на основі аналізу мікросателітних локусів [4-5], які виступають багатим джерелом кодомінантних генетичних маркерів для ідентифікації і встановлення походження генотипів та картування геному [6].

Подібні дослідження на шовковичному шовкопряді, представленому 122 колекційними породами Інституту шовківництва, не проводилися. Більшість порід, які ми щорічно відтворюємо в колекційному розпліднику, не мають характерних фенотипічних маркерів і це істотно ускладнює контроль їх генетичних особливостей. Тому дослідження з використанням молекулярно-генетичних маркерів є актуальними і необхідними для проведення генетичної паспортизації вітчизняних порід шовкопряда. У 2007 році розпочато пошук і аналіз інформації за даною тематикою, який дав змогу визначити перспективні маркерні системи для виявлення генетичних відмінностей між колекційними породами шовкопряда.

Матеріали та методи досліджень. У роботі були використані породи Дін-Гуан, Зелена, УС ч/м, Українська 1 та Українська 28. Добір порід для дослідів проводили з урахуванням географічного походження та наявних морфологічних відмінностей. Так, китайська порода Дін-Гуан має дрібні кокони яскраво-золотистого кольору, японська порода Зелена – гусінь сіро-білого кольору з характерним малюнком та кокони світло-зеленого кольору, породи української селекції УС ч/м (Українська станція чорний метелик) – метелики чорного кольору, Українська 1 (Укр.1) – гусінь білого кольору без малюнку та кокони овальної форми без перехоплень, Українська 28 (Укр.28 клон) – розмножується

партеногенетично, гусінь білого кольору з маскою на першому грудному сегменті та у вигляді ком на другому та п'ятому черевному сегментах.

Підготовку проб для екстракції ДНК від перших чотирьох порід проводили з тканин сухих метеликів та живої грени. Для породи Укр.28 клон використали зразки тканин сухої лялечки. Перед виділенням ДНК одну частину проб помістили в термостат при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 8 год із додаванням комплексу реагентів: 250 мкл лізуючого розчину, 20 мкл води, 30 мкл SDS (10%-вого розчину додецилсульфату натрію), 5 мкл протеїнази К, 10 мкл ДТТ (1М дитіотриетол). Іншу – піддали холодовій обробці (заморожували та розморожували декілька разів).

Відпрацювання методики виділення ДНК шовковичного шовкопряда проводили з використанням комплектів «ДНК-сорб-А», «ДНК-сорб-В» та 5%-вої суспензії Челекс-100% [2].

Для ампліфікації мікросателітних локусів використовували 2 пари праймерів (для Sat 211 – 5'-gatcgaactacgcaattacg-3' і 5'-cagcatccatccttattat-3', для Sat 2763 – 5'-acgcgctctacaaataaccatta-3' і 5'-gatcaccgggtctctctcg-3').

Результати досліджень. Враховуючи, що в доступних літературних джерелах відсутня достатня інформація щодо методики виділення ДНК з шовковичного шовкопряда, дослідження проводили на тканинному матеріалі відповідно до різних стадій розвитку шовкопряда (грена, лялечка, метелик) зі застосуванням

1.Склад компонентів полімеразної ланцюгової реакції з розрахунку на 25 мкл реакційної суміші

Компоненти	Об'єм, мкл
Деіонізована вода (рН 7,0)	16,9
10х-ний ПЛР-буфер	2
Суміш dNTP	2
Mg Cl ₂	0,8
Суміш праймерів (50 пкмоль кожного)	1
Матриця геномної ДНК	2
Tag-полімераза	0,3

загальноприйнятих методів виділення для тваринних типів клітин [7].

З метою кращого перебігу ПЛР нами були підбрані склад реакційної суміші (табл.1), а також температурний та часовий режими ампліфікації (табл.2).

Перевірка на гель-електрофорезі показала, що у пробах порід Дін-Гуан та УС ч/м, які знаходились у термостаті, а

також у пробах усіх п'яти порід, яких піддавали холодовій обробці, була присутня виділена ДНК у кількості, приблизно, 100 нг.

Усі проби, що мали виділену ДНК, готувалися зі застосуванням комплексу «ДНК-сорб-А». При цьому проби тканин лялечки показали в гель-електрофорезі більшу кількість виділеної ДНК порівняно з пробами метеликів і грени.

2. Протокол програми ПЛР*

Назва	Температура, $^{\circ}\text{C}$	Тривалість
Перша денатурація	94	2 хв
Денатурація	94	30 с
Випал	51	30 с
Синтез	72	45 с
Пролонгування	72	10 хв

*Примітка. * – ПЛР відбувалась 30 циклів.*

Застосування SSR-PCR із використанням двох пар штучно синтезованих праймерів дало змогу проаналізувати геномну ДНК порід на наявність алелів двох мікросателітних локусів – Sat 211 та Sat 2763. Для постановки ПЛР були взяті проби матричної ДНК, виділеної з тканин метеликів (Дін-Гуан, УС ч/м, див. рис., доріжки 2, 3, 6, 7, 9, 10) та лялечки (Укр.28, доріжки 1, 5, 8).

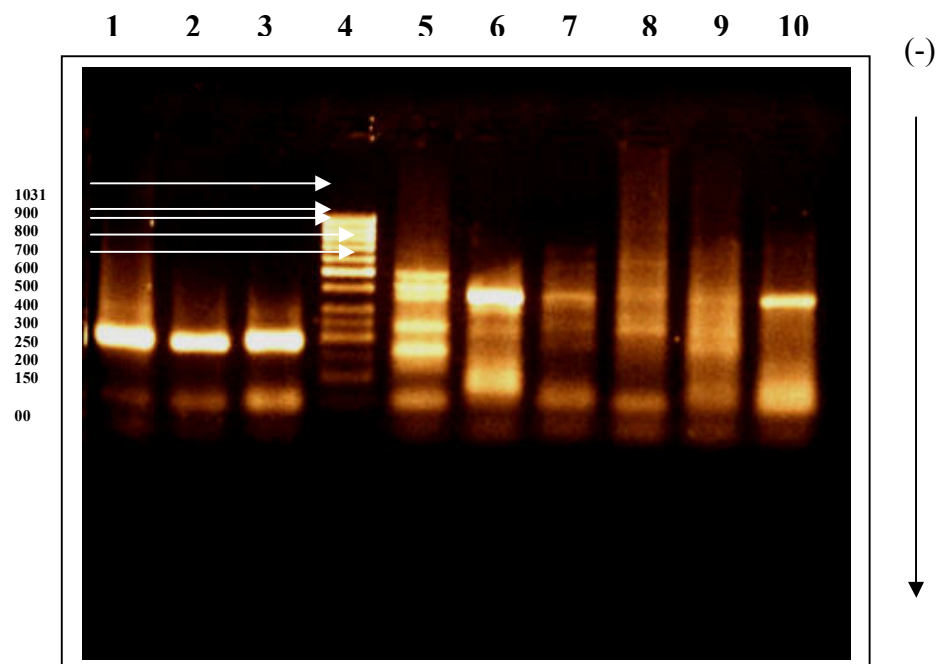


Рис. Спектр продуктів ампліфікації отриманий при аналізі мікросателітних локусів шовковичного шовкопряда

Примітки: доріжки 1-3 //локус Sat211// мікросателіт (GT)₁₀ розмір 68-146 п.н.;
 4 – маркер молекулярних мас GeneRuler™ 50 bp;
 5-10 //локус Sat 2763// мікросателіт (GT)₂₂(GT)₇ розмір 105-179 п.н.;
 1, 5, 8 – личинка – порода Укр.27 клон;
 2, 7, 9 – метелик – порода Дін-Гуан;
 3, 6, 10 - метелик – порода УС-ч/м.

Перші три проби дали чітку доріжку, що відповідає ПЛР-продуктам поліморфного локусу Sat 211.

Розподілення ампліфікованих фрагментів ДНК локусу Sat 2763 у гелелектрофорезі відрізнялося порівняно високим поліморфізмом. Найбільш чітке розподілення ПЛР-продуктів одержали в пробі, обробленій холодним способом із тканин лялечки породи Укр.28 (див. рис., доріжка 5).

Наведені дані доводять можливість використання ПЛР-аналізу мікросателітних локусів шовкопряда з метою систематизації колекційних порід на основі молекулярно-генетичних маркерів.

Висновки:

1.Проведений перший етап робіт з підбору методів молекулярної діагностики та розробити методики їх проведення на шовковичному шовкопряді.

2.Одержані результати свідчать про необхідність продовження досліджень із відпрацювання методики виділення ДНК із різних типів тканин шовкопряда, визначення оптимальних умов для проведення ПЛР, детекції продуктів ампліфікації.

Бібліографічний список

1.Методологічні аспекти збереження генофонду сільськогосподарських тварин / Зубець М.В., Буркат В.П., Мельник Ю.Ф. та ін. – К.: Аграрна наука, 2007. – 120 с.

2. Xue-Xia Miao, Shi-Jie Xub, Ming-Hui Li, Lian-Hua Huang and all. Simple sequence repeat-based consensus linkage map of *Bombyx mori*. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005. – Vol. 102. – № 45. – P. 16303-16308.

3. Nagaraja G.M., Nagaraju J. Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori*, using random arbitrary primers // Electrophoresis. – 1995. – № 16. – P. 1633-1638.

4. Reddy K. D., Nagaraju J., Abraham E.G. Genetic characterization of the silkworm, *Bombyx mori*, by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR // Heredity. – 1999a. – № 83. – P. 681-687.

5. Survey and Analysis of Microsatellites in the Silkworm, *Bombyx mori*: Frequency, Distribution, Mutations, Marker Potential and Their Conservation in Heterologous Species / M. Dharma Prasad, M. Muthulakshmi, M. Madhu et al. // Genetics. – 2005. – № 169. – P. 197-214.

6. Tautz D. Hypervariability of simple sequence repeats as a general source for polymorphic DNA markers // Nucleic Acids Research. – 1989. – V. 17. – P. 6463-6471.

7. Полімеразна ланцюгова реакція: Методичні рекомендації / Димань Т.М., Глазко В.І. – Біла Церква, 2004. – 62 с.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА УКРАИНЫ

Ю.В. Ляшенко, В.В. Ляшенко – Институт шелководства УААН

Е.В. Копилова, К.В. Копилов, Е.О. Арнаут – Институт разведения и
генетики животных УААН

В статье приведены результаты работы по выделению ДНК тутового шелкопряда и постановке ПЦР-анализа полиморфных микросателлитных локусов (SSR). В статье приведены результаты работы по выделению ДНК тутового шелкопряда и постановке ПЦР-анализа полиморфных микросателлитных локусов (SSR). Выявлены отличия в наборе продуктов амплификации ДНК трех пород шелкопряда. Полученные данные подтверждают возможность использования SSR-PCR для систематизации коллекционных пород на основе молекулярно-генетических маркеров

Ключевые слова: шелковичный шелкопряд, ДНК, ПЦР (PCR), микросателлитный локус (SSR), генетический маркер.

DNA EXTRACTION FOR INVESTIGATION OF GENETIC RESOURCES OF SILKWORM IN UKRAINE

Yu. Lyashenko, V. Lyashenko, the Institute of silkworm breeding, UAAS

E. Kopylova, K. Kopylov, E. Arnaut, the Institute of breeding & genetics of the
animals, UAAS

This article highlights the experimental research results on silkworm DNA extraction. Polymorphic analysis of the micro-satellite locus was fulfilled. Three silkworm breed types were tested. DNA amplification component variance was identified. System analysis was executed on the basis of the test data obtained by the polymorphic micro-satellite locus examination. System analysis was fulfilled by the molecular-genetic markers use. The silkworm matrix systematic was carried out.

Key words: silkworm, DNA, micro-satellite locus, genetic marker