

УДК 638.2:636.082:577.21

ОПТИМІЗАЦІЯ ОСНОВНИХ ЕТАПІВ ПЛР-АНАЛІЗУ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ ГЕНОМА ШОВКОВИЧНОГО ШОВКОПРЯДА (*BOMBYX MORI L*)

Рецензенти: канд. біол. наук Литвин В.М.; канд. с.-г. наук Россоха В.І.

Ю.В. Ляшенко, А.П. Герілович, О.С. Солодянкін, В.В. Ляшенко
ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

Відпрацьовано методику виділення ДНК шовковичного шовкопряда, визначено оптимальні умови для проведення полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) та детекції продуктів ампліфікації. Встановлено, що якість очистки ДНК за фенол-хлороформним методом вища порівняно з іншими методами екстракції. Проведено апробацію розробленої методики ПЛР-аналізу з використанням двох пар синтетичних праймерів. Одержано попередні результати щодо наявності алелів локусів Sat211 і Sat2763, які вказують на необхідність проведення подальших досліджень з використанням поліакріламідного гелю (ПААГ).

Ключові слова: ПЛР-аналіз, мікросателітний локус, реагенти, ампліфікація, електрофорез, праймер, шовкопряд.

Дослідження унікальної колекції порід шовковичного шовкопряда ННЦ «ІЕКВМ» методом ПЛР-аналізу мікросателітних локусів геному є одним із пріоритетних напрямків у проведенні систематизації генетичних ресурсів шовкопряда України.

На сьогодні колекція налічує 122 породи і об'єднує спадковий матеріал з різним географічним походженням та, відповідно, з різними генетичними ознаками. Більша частина колекції – породи іноземного походження (63 %). Це переважно білококонні моновольтинні породи без характерних фенотипічних маркерів. Виключення складають породи, які мають типові морфологічні відмінності: кольорові кокони (Бонде, Зелена та ін.), характерне забарвлення гусениць (Бухарська та ін.), статеву диференціацію за кольором грени (№21 міч., С-8 НГЛ та ін.).

Шовковичний шовкопряд визнаний у світі одним із кращих об'єктів для генетичного аналізу. За останні роки особлива увага приділяється дослідженню поліморфних локусів і особливо – мікросателітним локусам, як джерелу породних генетичних маркерів [1–4].

Ми провели пошук і аналіз інформації за даною тематикою досліджень, який дозволив визначити перспективні маркерні системи для виявлення генетичних відмінностей між колекційними породами шовкопряда та дослідили можливість використання ПЛР-аналізу мікросателітних локусів [5]. Однак не вирішеним залишалось удосконалення методики проведення основних етапів ПЛР-аналізу мікросателітних локусів геному шовковичного шовкопряда, яка включає екстракцію ДНК, вибір оптимальних умов для ПЛР, детекцію продуктів ампліфікації.

Матеріали та методи досліджень. Об'єктом дослідження були породи шовковичного шовкопряда (*Bombyx mori L.*), марковані на стадії кокона (Бонде, Зелена), гусениць (Французька, Маргеланська) і грени (Білогренна). Підбір порід для апробації проводили за результатами аналізу їх родоводів і характерних морфологічних відмінностей. Критеріями добору були: наявність фенотипічних маркерів, відмінності за географічним походженням. У роботі використані загальні методичні рекомендації щодо проведення ПЛР [6-7].



Для виділення ДНК у період літньої вигодовлі були відібрані зразки шовкопряда на різних стадіях його розвитку (гусениця, лялечка, метелик). Кількість зразків – 50 шт для кожної стадії однієї породи. До початку проведення дослідів з виділення ДНК зразки зберігали в морозильній камері.

Тканини різних стадій розвитку шовкопряда (гусениці-«мураші», гусениця, метелик, лялечка) подрібнювали товкачиком у ступці. Поміщали 0,1-0,5 г тканини в 1,5 мл пробірки епендорфа. Додавали до тканин по 1 мл розчинного буфера і 5 мкл протеїнази К. Склад буфера, наведено в табл. 1 (застосовується для виділення ДНК із мух [8]).

1.Склад буфера на основі протеолітичних ферментів

Реагент	Концентрація	Сток	Робочий розчин
NaCl	0,1M	5M	20μl
Tris Cl, pH 8.0	10mM	1M	10μl
EDTA	25mM	0,5M	50μl
SDS	0,5%	10%	50μl
Proteinase K ¹⁾	0,1mg/ml	20mg/ml	5μl
H ₂ O			870μl

Примітка. ¹⁾ – перед використанням.

Екстракцію ДНК проводили різними методами:

а) за першим методом (протеїназа К, «Сорб А») виділення проводили з комплектом «ДНК – сорб – А» відповідно до інструкції;

б) за другим методом (протеїназа К, спін-колонки, етанол) до екстракту тканин у спін-колонки добавляли 500 мкл 70% етанолу, центрифугували 1 хв при 5 000 g. Промивання етанолом проводили 2 рази, кожного разу зливаючи етанол. Добавляли 50 мкл ТЕ-буферу. Витримували 3 хвилини в термостаті за 65 °С. Центрифугували 5 хвилин при 5 000g;

в) за третім методом (протеїназа К, AcNH₄, 2-пропанол) до екстракту тканин добавляли 100 мкл 10М AcNH₄. Змішували, поміщали на холод: t – 0 °С на 5 хвилин. Центрифугували 5 хвилин при 5 000g. Відбирали супернатант та промивали 2-пропанолом 2 рази. До осаду додавали 500 мкл етанолу та підсушували. Добавляли 50 мкл ТЕ-буфера та центрифугували 1 хвилину при 12 000g;

г) за четвертим методом (протеїназа К, фенол-хлороформ, AcNH₄, етанол) суміш екстрагували фенолом. Центрифугували 4 хвилини при 10 000g. Проводили екстракцію сумішню фенол-хлороформу. Центрифугували 4 хвилин при 10 000g. Відбирали супернатант та добавляли хлороформ, перемішували та центрифугували 4 хвилини при 10 000g. Відбирали водну фазу та добавили 125 мкл AcNH₄, а також 1 мкл 96 % етанолу (2,5 об'єму). Суміш поміщали на 12 годин за -20 °С. Центрифугували 20 хвилин при 10 000g. Осад промивали 3 рази етанолом (70 %). Центрифугували 5 хвилин при 10 000g. Осад висушували та розчиняли ТЕ-буфером;

д) за п'ятим методом (протеїназа К, SiO₂, хлороформ, AcNH₄, етанол) до 500 мкл екстракту додавали 30 мкл ресуспензованого на вортексі сорбенту (силікагель, SiO₂), суміш перемішували на вортексі відповідно до пункту 5 інструкції до «Сорб-А». Центрифугували 30 секунд при 10 000g, після чого видаляли супернатант. До осаду додавали 300 мкл хлороформу, перемішували на вортексі, центрифугували 4 хвилини при 10 000g, видаляли супернатант. Осад промивали 70 % етанолом двічі, обережно підсушували (5-10 хвилин за 65 °С).

Додавали 50 мкл ТЕ-буфера, перемішували на вортексі та поміщали на 5 хвилин у термостат (65 °С). Центрифугували 1 хвилину при 12 000g.

Концентрацію ДНК визначали спектрофотометричним методом за довжини оптичної хвилі 260, 280 і 320 нм за формулою (1):

$$C = (D_{260} - D_{320}) \times K, \quad (1)$$

де С – концентрація ДНК, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$;

D_{260} – оптична щільність при довжині хвилі 260 нм;

D_{320} – оптична щільність при довжині хвилі 320 нм;

К – коефіцієнт перерахунку ($K_{1:100} = 5,0$).

Розрахунок концентрації ДНК проводили з використанням спеціально розробленої форми [9].

Оптимізацію протоколу ПЛР проводили на основі підбору оптимальної температури відпалу праймерів, концентрації основних компонентів „Мастер-микс” та проби ДНК [6, 7]. Температуру відпалу праймерів визначали емпірично (± 5 °С від теоретичної температури). Оптимізацію концентрації праймерів проводили з розрахунку (15-50) рМ на пробу за умови 35-40 ампліфікаційних циклів.

Підбір оптимальної концентрації іонів магнію проводили в межах (1,0-4,5) мМ/мкл з кроком 0,5 мМ/мкл.

При підборі кількості проби ДНК використовували розбіг об’ємів від 0,5 мкл до 7 мкл.

Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР проводили в агарозному гелі. Для розділення ПЛР-продуктів ампліфікації досліджуваних мікросателітних локусів (90-200 пар нуклеотидів) використовували агарозу з концентрацією (2-4) %. Розгонку ДНК проводили за напруги поля (10-12) В/см.

Для апробації використали 2 пари синтетичних праймерів (для Sat211 – 5'-gatcgaactacgcaattacg-3' і 5'-cagcatccatcctatttat-3', для Sat2763 – 5'-acgcgtctacaaaataccatta-3' і 5'-gatcaccgggtctctctcg-3'). Застосування SSR-PCR з використанням вказаних праймерів дає змогу проаналізувати геномну ДНК шовкопряда на наявність алелів локусу, які вказують на ознаки вольтинності породи [3] (мікросателіт (GT)₁₀ з розмірами: 96 і 134 п.н. у моновольтинних порід, 99 і 146 – у полівольтинних), і високополіморфного (17 алелів) локусу Sat 2763 (мікросателіт (GT)₂₂(GT), розмір 105–179 п.н.).

Результати досліджень. У доступних літературних джерелах відсутня достатня інформація щодо методики екстракції ДНК шовковичного шовкопряда. Тому було проведено апробацію загальновідомих методів екстракції для тваринних типів тканин. Критерієм у дослідженнях була простота і надійність методу. У проведених дослідах з екстракції ДНК із тканин шовковичного шовкопряда на різних стадіях його розвитку не виникало ніяких технічних ускладнень. Було виділено ДНК із гусениць-«мурашів», гусениць 5-го віку, метеликів, лялечок.

З гусениць-«мурашів» екстраговано недостатню кількість ДНК – 445,77 мкг/мл, що ми відносимо не до складності виділення, а, скоріше, до методичних помилок. Екстракція ДНК із лялечок, на наш погляд, дещо ускладнювалась наявністю великої кількості жирових тканин. Найбільш вдалим було виділення ДНК із тканин гусениць 5-го віку та метеликів.

Концентрацію ДНК, одержаної різними методами екстракції у зразках тканин метеликів, було визначено спектрофотометричним методом (табл. 2).



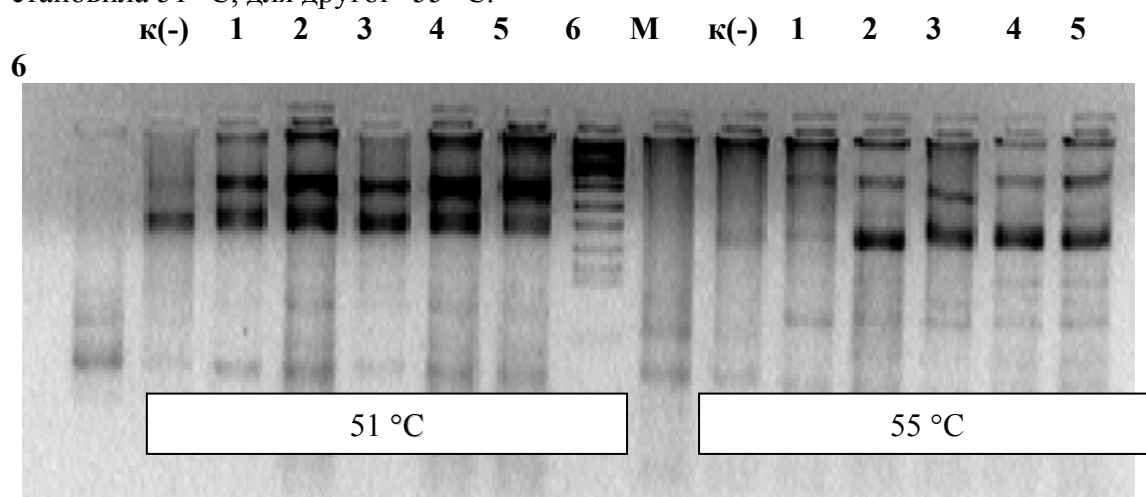
2. Концентрація ДНК за різних способів виділення

Метод виділення	Оптична щільність розчину ДНК (OD), од.					Концентрація ДНК, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₃₂₀	OD ₂₆₀₋₃₂₀	OD _{260/280}	
Протеїназа К, "Сорб А"	0,92	0,61	0,31	0,61	1,51	3,06
Протеїназа К, колонки, етанол	1,23	0,68	0,37	0,86	1,82	4,38
Протеїназа К, AcNH_4 , 2-пропанол	1,23	0,57	0,27	0,96	2,15	4,88
Протеїназа К, фенол-хлороформ, AcNH_4 , етанол	0,93	0,58	0,31	0,62	1,60	3,18
Протеїназа К, SiO_2 , хлороформ, етанол	1,31	0,67	0,37	0,94	1,95	4,78

Найбільш продуктивними виявилися третій (протеїназа К, AcNH_4 , 2-пропанол) та п'ятий (протеїназа К, SiO_2 , хлороформ, AcNH_4 , етанол) способи екстракції. Дещо поступався за результативністю другий спосіб (протеїназа К, колонки, етанол), однак його застосування економічно не вигідне завдяки використанню колонок.

Оптимізацію протоколу ПЛР проводили на основі підбору оптимальної температури відпалу праймерів, концентрації основних компонентів „Мастер-микс” та проби ДНК.

У результаті проведених досліджень (рис. 1) підібрано оптимальну температуру відпалу праймерів, яка для першої пари праймерів (Sat211) становила 51 °C, для другої – 55 °C.



доріжки 1-6 – варіанти для різних способів екстракції ДНК;

М - маркер молекулярних мас;

к(-) – негативний контроль.

Рис.1. Вплив температури відпалу на специфічність ампліфікації.

Досить істотний вплив на перебіг реакції ампліфікації мала концентрація іонів магнію в реакційній суміші. Підвищення концентрації Mg^{2+} впливає на збільшення ПЛР-продукту, однак при цьому зменшується специфічність реакції (спостерігається збільшення кількості смуг неспецифічної ампліфікації [6]).

Так, на рис.2 зображено розподіл продуктів ампліфікації при концентрації Mg^{2+} 1mM/μl, яка є недостатньою для нормального перебігу реакції. Розходження ампліконів не відбулося.

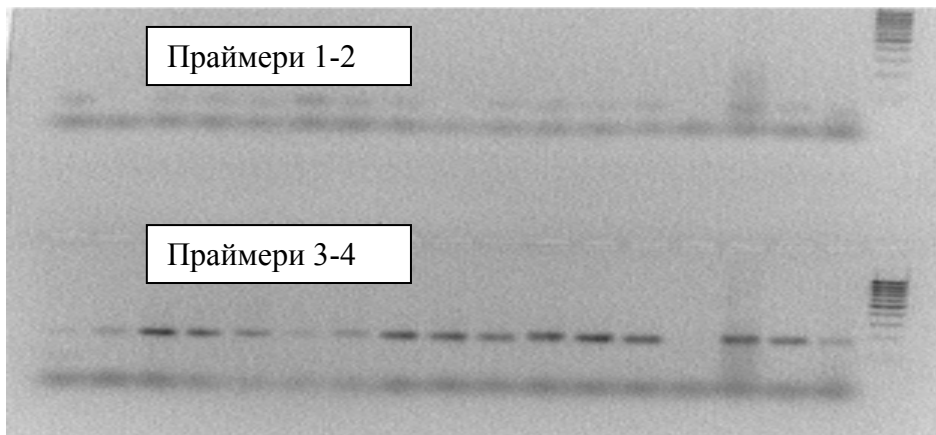


Рис.2. Вплив концентрації іонів магнію (1mM/μl) на специфічність ампліфікації.

Реакція ампліфікації, розподіл продуктів якої зображено на рис. 1, проходила при концентрації Mg^{2+} 5,5 mM/μl. Як бачимо, контрастність смуг і розходження ампліконів покращилися, однак з'явилися шлейфи та смуги неспецифічної довжини. Оптимальна концентрація Mg^{2+} була на рівні 3,5 mM/μl.

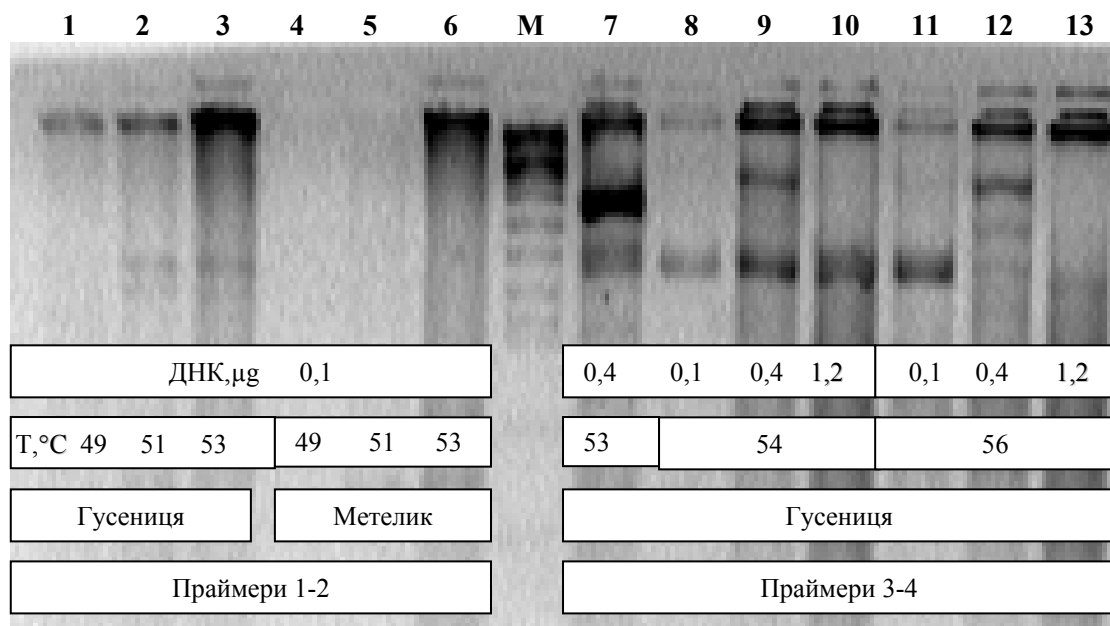


Рис.3. Вплив температури відпалу і концентрації проби на специфічність ампліфікації.

Оптимізацію за кількістю ДНК-матриці у реакційному середовищі проводили в інтервалі: від 0,1 до 1,2 μg/25μl (рис. 3). Кращий вихід специфічного продукту ПЛР спостерігався при концентрації ДНК – 0,1 μg/25μl.

Підбір концентрацій праймерів у реакційній суміші проводили в інтервалі від 15 pM до 50 pM на реакцію. Оптимальна концентрація для першої пари праймерів була 15 pM кожного, другої – 30 pM.



Отже, в результаті відпрацювання методики ПЛР-аналізу остаточний склад компонентів „Мастер-микс" мав такий вигляд (табл. 3):

3.Склад компонентів ПЛР з розрахунку на 25 μ л реакційної суміші

Компоненти	Кількість, μ л
Деіонізована вода (pH 7,0)	14,5
10x ПЛР-буфер	2,5
Суміш dNTP (25 mM кожного)	2,5
Mg Cl ₂ (1,5 mM/ μ л)	2,5
Праймер 1 (15 pM)	1,0
Праймер 2 (15 pM)	1,0
Tag-полімераза	0,5
Матриця геномної ДНК (4 μ g/ μ л)	0,5
Σ	25,0

З огляду на зазначене, програму ПЛР можна записати у такому вигляді (табл. 4):

4.Протокол програми ПЛР

№ циклу	Температура, °C	Час, с	Кількість циклів, шт
1	94	300	1
2	94	30	40
	51,55	45	
	72	60	
3	72	300	1

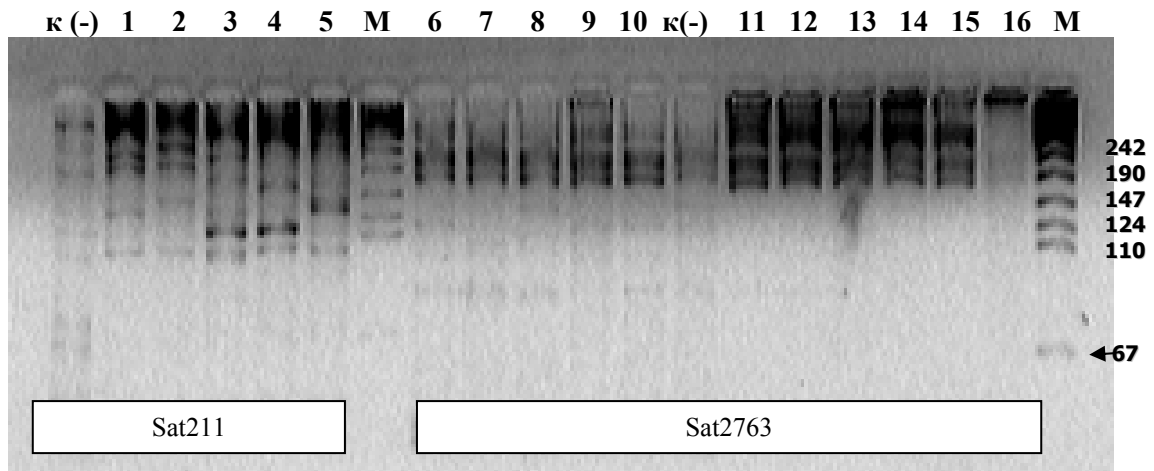
У дослідженнях з апробації SSR-PCR (simple sequence repeats – короткі тандемні повтори) на шовковичному шовкопряді проводили ампліфікацію високополіморфних мікросателітних локусів Sat211 і Sat2763, поліморфізм яких полягає у відмінностях кількості тандемних повторів (GT)₁₀ для Sat211 і (GT)₂₂(GT)₇ для Sat2763), що розміщені між консервативними послідовностями кожного локусу [3-4].

У результаті реакції ампліфікації з використанням синтетичних пар праймерів ми мали одержати для Sat211 ПЛР-продукти з розмірами: 96 і 134 п.н. у моноальельних порід; 99 і 146 – у поліальельних. Для високополіморфного (17 алелів) локусу Sat 2763 – мікросателіти розміром (105-179) п.н. Об'єктом дослідження були 5 порід шовкопряда: Бонде, Зелена, Французька, Маргеланська, Білогренна, які мали різне географічне походження і фенотипічні маркери.

Аналіз одержаних результатів (рис. 4) свідчить, що негативна контрольна реакція для Sat211 вказує на певну контамінацію при проведенні ПЛР. Тому, з аналізу детекції продуктів ампліфікації виключили ті амплікони, що співпадають за розміром із контрольними.

Серед ПЛР-продуктів, специфічних для локусу Sat211, були виділені амплікони розміром 96 і 134 п.н. у № 2 (Зелена), що характерні для моноальельних порід шовкопряда. Для № 4, 5 (Маргеланська, Білогренна) можна вказати на наявність мікросателітів розміром 99 і 150 п.н. Серед ПЛР-продуктів, специфічних для локусу Sat2763, усім варіантам властиві амплікони розміром ~180 п.н. До неспецифічних ПЛР-продуктів можна віднести амплікони розміром ~115 п.н. для № 4 (Маргеланська), ~128 п.н. для № 5 (Білогренна).

Не зважаючи на порівняно низьку концентрацію ДНК за фенол-хлороформним методом екстракції (3,18 μ g/ μ л, див. табл. 2), якість її очистки була вищою, що наочно можна спостерігати на електрофореграмі за зменшенням шлейфів і смуг неспецифічної довжини для доріжок 6-10 (див. рис.4).



доріжки 1-5 //локус Sat211// мікросателіт (GT)¹⁰ розмір 96, 134 і 146 п.н.;
6-16 //локус Sat2763// мікросателіт (GT)²²(GT)⁷ розмір 105-179 п.н.;
6-10 – фенол-хлороформний метод екстракції;
1-5 і 11-15 – комбінований (силікагель, хлороформ, етанол);
М – маркер молекулярних мас DNA Marker VIII, 19-1114 bp;
к(-) – негативний контроль;
1-5, 6-10, 11-15 – породи шовкопряда Бонде, Зелена, Французька,
Маргеланська, Білогренна.

Рис. 4. Спектр продуктів ампліфікації мікросателітних локусів шовковичного шовкопряда.

Висновки:

1.Проведено оптимізацію основних етапів ПЛР-аналізу мікросателітних локусів геному шовковичного шовкопряда, яка включає екстракцію ДНК, вибір оптимальних умов для ПЛР, детекцію продуктів ампліфікації.

2.Найбільш продуктивними виявилися третій (протеїназа К, AcNH_4 , 2-пропанол) та п'ятий (протеїназа К, SiO_2 , хлороформ, AcNH_4 , етанол) способи екстракції ДНК (4,88 та 4,78 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, відповідно). Якість очистки ДНК за фенол-хлороформним методом (3,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) вища порівняно з іншими застосованими методами.

3. Одержано попередні результати щодо наявності алелів локусів Sat211 та Sat2763 у п'яти порід шовкопряда. Розділення ПЛР-продуктів поліморфних мікросателітних локусів, які різняться за довжиною на декілька пар основ, доцільно проводити в поліакріламідному гелі.

Бібліографічний список

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

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

3. Reddy K. D. Microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*: Abundance, polymorphism, and strain characterization / K.D. Reddy, E.G. Abraham, J. Nagaraju //Genome. – 1999. – Vol.42. – P. 1057–1065.

4. Survey and Analysis of Microsatellites in the Silkworm, *Bombyx mori*: Frequency, Distribution, Mutations, Marker Potential and Their Conservation in



Heterologous Species [Текст] / М. Dharma Prasad, M. Muthulakshmi, M. Madhu et al.] // Genetics. – 2005. – № 169. – Р. 197–214.

5. Ляшенко, Ю.В. Використання ДНК-технологій у дослідженні генетичних ресурсів шовковичного шовкопряда України / Ю.В. Ляшенко [та ін.]. // Науково-технічний бюлетень, № 96 /ІТ УААН. – Х.,2008. – С. 232–235.

6. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини : [наук.-метод. посібник] / [Б.Т Стегній та ін.] ; під заг. ред. Б.Т. Стегнія, А.П. Геріловича – Х.: ННЦ «ІЕКВМ», 2006. – 110 с.

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

8. Фенольный метод выделения DNA из мух [Электронный ресурс] / Практическая Молекулярная Биология. – Режим доступа : [www/ URL: http://www.molbiol.edu.ru/protocol/14_03.html/](http://www.molbiol.edu.ru/protocol/14_03.html/) - 10.11.2008 г. - Загл. с экрана.

9. Спектрофотометрическое измерение концентрации нукл. кислот [Электронный ресурс] / Практическая Молекулярная Биология. – Режим доступа : [www/ URL: http://www.molbiol.edu.ru/protocol/10_01.html](http://www.molbiol.edu.ru/protocol/10_01.html) / - 12.11.2008 г. - Загл. с экрана.

ОПТИМИЗАЦИЯ ОСНОВНЫХ ЭТАПОВ ПЦР-АНАЛИЗА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОМА ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА (*Bombyx mori* L)

Ляшенко Ю.В., Герілович А.П., Солодянкин А.С., Ляшенко В.В., Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины»

Отработано методику выделения ДНК тутового шелкопряда. Определены оптимальные условия проведения полимеразно-цепной реакции (ПЦР) и детекции продуктов амплификации. Установлено, что качество очистки ДНК с использованием фенол-хлороформного метода выше в сравнении с другими методами экстракции. Проведено апробацию методики ПЦР-анализа с использованием двух пар синтетических праймеров. Получены предварительные результаты относительно наличия аллелей локусов Sat211 и Sat2763, указывающих на необходимость проведения дальнейших исследований с использованием денатурированного полиакриламидного геля (ПААГ).

Ключевые слова: ПЦР-анализ, микросателлитный локус, реагенты, амплификация, электрофорез, праймер, шелкопряд.

THE BASIC POLYMERASE CHAIN REACTION STAGES OPTIMIZATION ON MICRO-SATELLITE SILKWORM GENE LOCUS

Lyashenko Yu., Gerilovich A., Solodyankin O., Lyashenko V.; National scientific center affiliated to the Institute of experimental and clinical veterinary medicine

This article presents the elaborated technique on silkworm DNA extraction. The optimization procedure was elaborated for polymerase chain reaction execution and amplification product detection. DNA purification quality proved to be bettered by phenol-chloride method application. The above-mentioned technique advantages the other conventional extraction methods. The elaborated polymerase chain reaction analysis technology was tested by the two pairs of synthetic primers. The preliminary results were obtained on Sat2118 & Sat2763 locus allele presence. The experimental research results form the basis for the further tests with the poly-acryl-amide gel application.

Key words: polymerase chain reaction(PCR) analysis, micro-satellite locus, reagents, amplification, electrophoresis, primer, silkworm.