

ЧТЕНИЯ ПАМЯТИ АЛЕКСЕЯ ИВАНОВИЧА КУРЕНЦОВА

A.I. Kurentsov's Annual Memorial Meetings

2014

вып. XXV

УДК 575.22:595.7

**ПЦР–АМПЛИФИКАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ COI И COII
ВИДОВ РОДА *DICHRORAMPHA* (LEPIDOPTERA, TORTRICIDAE)**

Л.М. Чупрова, А.А. Богунова

Амурский гуманитарно-педагогический государственный
университет, г. Комсомольск-на-Амуре
E-mail: LyuMiChuprova@mail.ru; ansyach@yandex.ru

Предложен метод выделения ДНК из бабочек рода *Dichrorampha* (Lepidoptera, Tortricidae). Подобраны олигонуклеотидные праймеры, условия ПЦР для амплификации митохондриальных генов COI и COII. Предложенные подходы были апробированы на трех видах рода *Dichrorampha*.

Интерес к проблеме филогенетических взаимоотношений видов чешуекрылых семейства Tortricidae обусловлен их значительным фенотипическим разнообразием и высокой географической изменчивостью. Листовертки, проявляя полиморфизм по окраске и рисунку на крыльях и переднеспинке и морфологии гениталий, могут служить в качестве модельных объектов для популяционно-экологических исследований. Результаты последних могут быть весьма полезны и для решения многочисленных вопросов систематики семейства.

Немногочисленные исследования митохондриальных маркеров показали перспективность этого направления (Keiichi et al., 2004; Водолажский, Страдомский, 2008; Сорокина, 2009). Расширению спектра и объемов исследований препятствует отсутствие универсальной методической базы. Проблемы, которые предстоит решить в ближайшее время – это повышение эффективности выделения ДНК из бабочек (малое содержание мышц, наличие плотного хитинового покрова), поиск эффективного метода фиксации объектов до выделения ДНК (медленное проникновение фиксатора в ткани), подбор универсальных группоспецифических праймеров для амплификации интересующих областей генома, полногеномное секвенирование и др.

В настоящей работе сделана попытка подобрать эффективный метод выделения ДНК, праймеров и условий амплификации участков митохондриального

генома бабочек рода *Dichrorampha*, кодирующих I и II субъединицы цитохром-оксидазы (COI и COII).

Материал и методы исследования

Материалом для исследования послужили фиксированные в 96%-ном спирте имаго, либо хранящиеся в течение 1-3 лет сухие коллекционные экземпляры бабочек рода *Dichrorampha* (Tortricidae), собранные в Николаевском районе Хабаровского края.

ДНК выделяли методом стандартной фенольной депротеинизации (Маниатис и др., 1984), отечественными коммерческими наборами НПФ «АТГ-Биотех», ООО «Лаборатория МЕДИГЕН», методом фенольной экстракции в присутствии дитиотрейтола (ДТТ). В соответствии с последним методом выделяли грудной отдел бабочки, который помещали в 250 мкл деионизированной воды, добавляли 250 мкл лизирующего раствора (10 мМ Трис-HCl, 5 мМ ЭДТА, 0,1 М NaCl, 2% SDS, pH 7.8), 8 мкл протеиназы К (20 мг/мл), 5 мкл 1М ДТТ. Инкубировали при 56°C в течение 6-16 ч (до полного лизиса материала). Добавляли 50 мкл 3 М ацетата натрия и далее проводили очистку по стандартной фенольной методике. ДНК осаждали изопропанолом.

Концентрацию и чистоту препаратов ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop2000 (Thermo), отсутствие ингибиторов – с помощью ПЦР.

Олигонуклеотидные праймеры синтезировали в ООО "Синтол". ПЦР проводили с помощью набора для амплификации ООО "Медиген" с праймерами, перечисленными в работе Schroeder et al. (2005). Параметры амплификации адаптировали для прибора Mastercycler Personal (Eppendorf). Анализ продуктов ПЦР проводили в агарозном геле.

Результаты и обсуждение

При выделении ДНК из имаго чешуекрылых с использованием четырех методов стабильно удовлетворительные результаты были получены только при использовании лизирующего буфера, содержащего протеиназу К и ДТТ. Успешно получены препараты тотальной ДНК из имаго трех видов *Dichrorampha ambrosiana*, *D. cancellatana* и *D. peteverella* – 50 фиксированных в спирте экземпляров и трех коллекционных образцов. Средний выход ДНК из одной бабочки составил 810 нг и 465 нг соответственно (рис. 1).

Одна из причин неудач при очистке ДНК из членистоногих заключается в крайне низкой эффективности первого этапа – лизиса материала, связанной с наличием плотного полисахаридного покрова. Ранее было показано, что хитин экзоскелета, образующий комплекс с белками и другими полисахаридами, может быть разрушен физически, например, замораживанием в жидком азоте с последующим растиранием (Захаров и др., 2000). Метод эффективен, но трудно реализуем и сопряжен с высокой степенью перекрестной контаминации,

особенно в случае большого количества образцов. Нами использован ферментно-химический подход "мягкого" лизиса за счет совместного действия детергента (SDS), восстановителя (DTT) и фермента (протеиназа К). Такой подход длительное время используется в криминалистических ДНК-лабораториях при работе с «трудными» объектами (ногтями, волосами и т.п.).

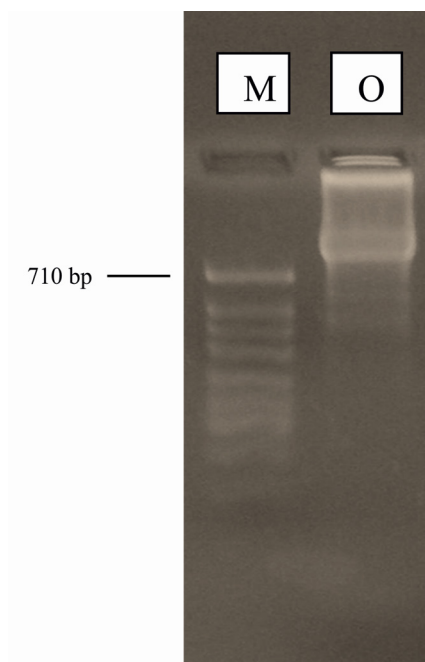


Рис. 1. Электрофоретический анализ суммарной ДНК *Dichrorampha okui*. М – маркер, О – образец ДНК.

С целью ПЦР-амплификации митохондриальных генов COI и COII испытано 11 пар праймеров, только три из которых успешно отжигались на ДНК исследуемых объектов (рис. 2). Праймеры позволяли амплифицировать оба гена в виде трех перекрывающихся фрагментов ДНК. При электрофоретическом анализе наблюдали наработку монофрагментов длиной около 700 п.н. для COI и 800 п.н. и 600 п.н. для COII (рис. 3), что соответствовало расчетным параметрам.

Праймеры из работы Н. Schroeder и Scholz (2005), сконструированные авторами для *Tortrix viridana*, позволили амплифицировать митохондриальные гены COI и COII для двух видов листоверток *D. ambrosiana* и *D. cancellatana*. Тем не менее, их нельзя признать универсальными, т.к. нам не удалось получить ампликоны для *D. peteverella*.

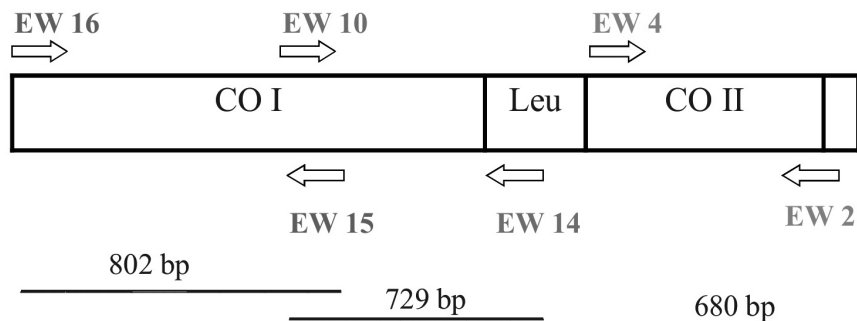


Рис. 2. Локализация использованных праймеров.

Таким образом, предложенные методические подходы позволяют начать популяционно-генетические исследования на видах рода *Dichrorampha*. Однако отметим, что в ближайшее время не следует ожидать большого числа статей, т.к. для этого необходимо накопление данных о первичной последовательности митохондриальной ДНК большого числа представителей систематических групп Lepidoptera.

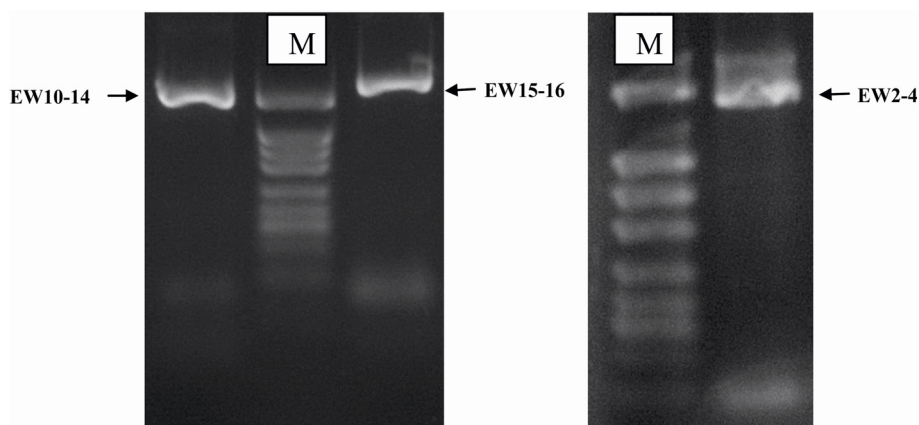


Рис. 3. Электрофоретический анализ продуктов амплификации. 1%-ный агарозный гель. М – маркер *pBlueScript DNA / MspI*.

Благодарности

Авторы искренне признательны к.б.н. Богунову Ю.В. (ФГБОУ ВПО "Ам-ГПГУ", г. Комсомольск-на-Амуре) за предоставление лабораторной базы, а также за консультации и ценные замечания при подготовке рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

Keiichi O. Molecular systematics and evolution of the “Apollo” butterflies of the genus *Parnassius* (Lepidoptera: Papilionidae) based on mitochondrial DNA sequence data // *Gene*. 2004. N 326. P. 141–147.

Schroeder H. Identification of PCR-RFLP Haplotypes For Assessing Genetic Variation in the Green Oak Leaf Roller *Tortrix viridana* L. (Lepidoptera, Tortricidae) // *Silvae Genetica*. 2005. N 54. P. 17–24.

Водолажский Д.И., Страдомский Б.В. Исследование голубянок группы *Lysandra corydonius* (Lepidoptera: Lycaenidae) с использованием маркеров мтДНК // *Кавказский энтомол. бюлл.* 2008. Т. 4, вып. 3. С. 353–355.

Захаров Е.В. Выделение ДНК из музейных экспонатов бабочек (Lepidoptera, Papilionidae) и ПЦР-анализ со случайными и универсальными ген-специфичными праймерами // *Генетика*. 2000. Т. 36, вып. 9. С. 1221–1229.

Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 479 с.

Сорокина С.Ю. Видоспецифичность полиморфизма митохондриальной ДНК у близкородственных видов дрозофил группы *virilis* (Diptera: Drosophilidae). Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2009. 24 с.

PCR-AMPLIFICATION OF THE COI AND COII MITOCHONDRIAL DNA OF *DICHRORAMPHA* SPECIES (LEPIDOPTERA, TORTRICIDAE)

L.M. Chuprova, A.A. Bogunova

Amurskii Humanitarian-Pedagogical State University,
Komsomolsk-na-Amure, Russia

The method of the DNA purification of imago of the genus *Dichrorampha* (Lepidoptera, Tortricidae) was proposed. The primers, conditions for the amplification of COI and COII cytochrome genes of mitochondrial DNA were selected. The proposed methods were approved on three species of genus *Dichrorampha*.