УДК 575.595:577.633

ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ ПЦР-АНАЛИЗА ПОПУЛЯЦИЙ ЯБЛОННОЙ ПЛОДОЖОРКИ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ

Киль Владимир Ильич
д.б.н.
ВНИИ биологической защиты растений Россельхозакадемии, Краснодар, Россия

Приведена подробная технология ПЦР-анализа ДНК популяций яблонной плодожорки по микросателлитным локусам. Она включает в себя список оборудования, расходных материалов и реактивов, методики выделения ДНК, проведения ПЦР и электрофореза продуктов амплификации в полиакриламидном геле. Приведен пример ПЦР-анализа краснодарской популяции яблонной плодожорки по двум микросателлитным локусам

Ключевые слова: ЯБЛОННАЯ ПЛОДОЖОРКА, ПОЛИМОРФИЗМ, МИКРОСАТЕЛЛИТЫ, ПОПУЛЯЦИЯ, НАСЕКОМЫЕ, ДНК, ПЦР

UDC 575.595:577.633

DNA TECHNOLOGY OF PCR ANALYSIS OF CODLING MOTH POPULATIONS BY MICROSATELLITE LOCI

Kil Vladimir Ilyich
Dr.Biol.Sci.
All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection of RAAS, Krasnodar, Russia

The DNA technology of the PCR analysis of codling moth populations by microsattelite loci is adduced in detail. It includes a list of the equipment, consumable materials and chemical agents, methods of DNA extraction, PCR analysis and electrophoresis of amplification products in polyacrilamid gel. The example of the PCR analysis of codling moth population from Krasnodar region with two microsattelite loci is adduced

Keywords: CODLING MOTH, POLYMORPHISM, MICROSATELLITE LOCI, POPULATION, INSECTS, DNA, PCR

1. ВВЕДЕНИЕ

Популяционные исследования насекомых традиционно проводятся с использованием морфологических и фенетических маркеров. Однако с развитием молекулярных методов исследований, наряду с морфологическими, были предложены другие маркерные системы оценки генетической структуры популяций насекомых. В 80-х годах прошлого столетия при изучении полиморфизма популяций насекомых исследователи широко стали применять изоферментный анализ. Позднее, в 90-х годах, с развитием ДНК-технологий стало возможным оценить генетический полиморфизм популяций, в частности, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Метод полимеразной цепной реакции широко используется в последнее время в научных исследованиях самых разных групп организмов, в том числе и в опытах с насекомыми. ПЦР-анализ, в данном случае, имеет основной

своей целью оценить уровень генетического полиморфизма популяций насекомых вредителей сельскохозяйственных культур. При этом он позволяет проследить динамику частот отдельных генетических элементов и, таким образом, изучать механизмы изменчивости генетической структуры популяций вредителей на молекулярном уровне. Это важно с точки зрения совершенствования систем защиты растений, включая проблемы селекции устойчивых к вредителям сортов, и формирования у насекомых резистентности к инсектицидам. ПЦР-анализ используется и для маркирования интересующих исследователя признаков насекомых по ДНК-фрагментам, а также для оценки генетического сходства между особями, популяциями и различными таксонами насекомых.

2. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

2.1 **Оборудование.** Амплификатор типа «Терцик МС-2» под микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф вместимостью 0,2; 0,5; $см^3$ со скоростью нагрева /охлаждения активного элемента не менее 1,5 ^{o}C/с . Прибор для вертикального электрофореза с комплектом спейсеров и гребенок. Источник напряжения с диапазоном регулируемого напряжения 100 - 300 В. Видеосистема типа «Gel Doc 2000^{TM}», предназначенная для ввода в компьютер, анализа и документирования изображений люминисцирующих следов ДНК в гелях, окрашенных бромистым этидием: диапазон излучения 300-400 нм, чувствительность – не менее 10 нг ДНК (по бромистому этидию) или аналогичные системы. Холодильник бытовой электрический. Камера морозильная, обеспечивающая температуру минус 20^{o}С. Микроцентрифуга настольная типа Эппендорф (частота вращения не менее 13000 мин $^{-1}$). Термостат типа «TERMO 24-15» под пробирки типа Эппендорф вместимостью 0,5 и 1,5 $см^3$, диапазон

температур от 15°С до 120°С, количество гнезд – не менее 20, точность поддержания температуры – 0,2 °С, разность температур между соседними ячейками – не более 0,5 °С. Аппарат для встряхивания типа «Вортекс», скорость вращения 250-3000 мин$^{-1}$. Печь микроволновая (мощностью не менее 400 W). Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности (условное обозначение) (II)) с наибольшим пределом взвешивания 200 г. pH – метр с набором электродов, с погрешностью ± 0,1 pH. Дозаторы с переменным объёмом дозирования: 0,2 – 2,0 мм^3, шагом 0,01 мм^3, точностью ±1,2%; 0,5 – 10,0 мм^3 , шагом 0,01 мм^3 точностью ±0,8%; 2 - 20 мм^3 шагом 0,01 мм^3 точностью ±0,8%; 20 – 200 мм^3, шагом 0,1 мм^3 точностью ±0,6%; 100 – 1000 мм^3, шагом 1 мм^3 точностью ±3 %; 2 – 10 см^3, шагом 0,1 см^3, с точностью ±0,5%.

2.2 **Расходные материалы.** Пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф вместимостью 0,2 (или 0,5, в зависимости от типа амплификатора) и 1,5 см^3. Наконечники с фильтром для дозаторов с переменным объёмом дозирования до: 10; 20; 200; 1000 мм^3; 10 см^3. Колбы стеклянные мерные плоскодонные конические вместимостью 25, 50, 100, 200, 1000 см^3. Цилиндры стеклянные мерные лабораторные на 25, 100, 1000 см^3. Пестик тефлоновый или стеклянная палочка под размер микроцентрифужной пробирки вместимостью 1,5 см^3. Бумага фильтровальная лабораторная.

2.3 Реактивы. Кислота соляная, х.ч. Кислота борная, х.ч. Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), х.ч. Гексадецилтриметиламмониум бромид (CTAB). Натрия гидроокись, х.ч. Натрий хлористый, х.ч. Спирт этиловый ректификованный, х.ч. Спирт изопропиловый, х.ч. Хлороформ, х.ч. Вода дистиллированная. Трис (оксиметил) аминометан, х.ч. Этидий бромистый, х.ч. Термостабильный

фермент Taq – ДНК полимераза. ПЦР буфер (10х). Раствор хлорида магния (50мМ). Смесь нуклеотидтрифосфатов (2,5мМ каждого). Праймеры. Вода бидистиллированная или деионизированная для ПЦР. Маркеры молекулярных масс ДНК для ПААГ. Бромфеноловый синий. Глицерин. Агароза. Акриламид и бисакриламид. Персульфат аммония. Темед.

3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

3.1 **Трис – HCl с концентрацией *с* = 1 моль/дм^3.** В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 12,11 г Трис (оксиметил) аминометана, растворяют в приблизительно 80 см^3 деионизированной воды. Концентрированной соляной кислотой доводят pH раствора до 7,5, затем доводят до метки деионизированной водой и перемешивают. Раствор простерилизовать. Срок хранения в холодильнике при температуре 4°С - не более 6 мес.

3.2 **NaCl с концентрацией *с* = 5 моль/дм^3 .** В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 29,22 г хлористого натрия, растворяют в приблизительно 80 см^3 деионизированной воды, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Раствор простерилизовать. Срок хранения при температуре 4° С - не более 6 мес.

3.3 **NaCl с концентрацией *с* = 1 моль/дм ^{3} .** В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 5,84 г хлористого натрия, растворяют в приблизительно 80 см^3 ТЕ буфера, доводят до метки ТЕ буфером и перемешивают. Раствор простерилизовать. Срок хранения при температуре 4°С - не более 6 мес.

3.4 **NaOH концентрацией *с* = 30%.** В колбу вместимостью 50 см^3 помещают 3 г гидроокиси натрия, растворяют в 7 см^3 деионизированной воды. Срок хранения при температуре 4°С - не более 6 мес.

3.5 **ЭДТА концентрацией *с* = 0,5 моль/дм^3** . В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 14,62 г этилендиаминтетрауксусной кислоты, растворяют

в приблизительно 80 см^3 деионизированной воды. Раствором гидроокиси натрия, приготовленным по 3.4, доводят pH раствора до 8,0, деионизированной водой доводят до метки и перемешивают. Раствор простерилизовать. Срок хранения при температуре 4°С - не более 6 мес.

3.6 **CTAB буфер для экстракции (2 %-ный CTAB).** В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 2,0 г бромида гексадецилтриметиламмония, растворяют в 50 см^3 деионизированной воды, добавляют автоматическим микродозатором 10,0 см^3 раствора Трис – HCl, приготовленного по 3.1, 28,0 см^3 раствора хлористого натрия, приготовленного по 3.2, 4,0 см^3 раствора ЭДТА, приготовленного по 3.5 и доводят деионизированной водой до метки, перемешивают. Срок хранения при температуре 20°С - не более 6 мес. В случае выпадения осадка при хранении раствор выдерживают при комнатной температуре или подогревают в термостате при температуре 65^{o}С до полного растворения.

3.7 **CTAB буфер для осаждения (1 %-ный CTAB без NaCl).** В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 1,0 г бромида гексадецилтриметиламмония, растворяют в 50 см^3 бидистиллированной воды, добавляют автоматическим микродозатором 5,0 см^3 раствора 1МТрис – HCl, приготовленного по 3.1, 2,0 см^3 раствора ЭДТА, приготовленного по 3.5, и доводят бидистиллированной водой до метки, перемешивают. Срок хранения при температуре 20°С - не более 6 мес. В случае выпадения осадка при хранении раствор подогревают в термостате при температуре 65^{o}С до полного растворения.

3.8 **10 %-ный CTAB.** В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10,0г бромида гексадецилтриметиламмония, растворяют в 50 см^3 деионизированной воды, добавляют автоматическим микродозатором 14,0

$см^3$ раствора хлористого натрия, приготовленного по 3.2, и доводят деионизированной водой до метки, перемешивают. Срок хранения при температуре 4°С - не более 6 мес. В случае выпадения осадка при хранении раствор выдерживают при комнатной температуре или подогревают в термостате при температуре 65°С до полного растворения.

3.9 **Хлороформ, насыщенный водой.** В колбу вместимостью 200 $см^3$ вносят цилиндром 100 $см^3$ хлороформа, добавляют 20 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают и оставляют на 24 ч для насыщения. Срок хранения при температуре 4°С - не более 6 мес.

3.10 **70%-ный раствор этилового ректификованного спирта.** В колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят цилиндром 73 $см^3$ 96%-ного этилового ректификованного спирта, добавляют 27 $см^3$ деионизированной воды и перемешивают. Срок хранения при температуре 4°С - не более 6 мес.

3.11 **ТЕ буфер** (10 mM Трис pH 7.5; 1 mM ЭДТА). Для приготовления 100 мл буфера необходимо: 1 мл 1 М Трис-HCl (pH-7,5), 0,2 мл 0,5 М ЭДТА, раствор довести до метки бидистиллированной водой. Раствор простерилизовать. Срок хранения при температуре 4,0° С – не более одного месяца.

3.12 **5 х ТВЕ буфер для электрофореза.** В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ вносят 54,0 г Трис (оксиметил) аминометана, 27,5 г борной кислоты и 4,6 г этилендиаминтетрауксусной кислоты, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают до полного растворения. Срок хранения при комнатной температуре - не более 1 мес. Для приготовления электродного буфера 1х ТВЕ необходимо 5х ТВЕ буфер разбавить в 5 раз дистиллированной водой.

3.13 **Бромистый этидий концентрацией *с* ($C_{21}H_{20}N_3Br$) = 10 мг/$см^3$.** В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 1 г бромистого этидия,

растворяют и доводят до метки дистиллированной водой. Срок хранения при температуре 4°С - не более 12 мес.

3.14 **0,8 %-ный агарозный гель.** В плоскодонную стеклянную колбу вместимостью не менее 250 см^3 помещают 0,8 г агарозы, добавляют 100 см ^{3} буфера 1 х ТВЕ, тщательно перемешивают взбалтыванием. Колбу со смесью нагревают в микроволновой печи при температуре 100˚С и кипятят до полного плавления агарозы.

3.15 **Буфер для нанесения образца (6х).** Для приготовления 10 см^3 буфера для нанесения требуется: 25 мг бромфенолового синего, 3 г глицерина, 0,1 см^3 1М Трис HCl pH-7,5, 0,02 см^3 0,5М ЭДТА pH-8,0. Раствор доводят до 10 см^3 дистиллированной водой. Срок хранения при температуре 4°С- не более 12 мес.

3.16 **30% раствор акриламида (АА).** Для приготовления 100 см^3 раствора требуется 29,0 г. АА + 1,0 г бисакриламида. Раствор доводят до 100 см^3 дистиллированной водой. Срок хранения при температуре 4°С- не более 12 мес.

3.17 **8% полиакриламидный гель (ПААГ).** Для приготовления 100 см^3 раствора требуется 26,7 мл. (30% АА) + 20 мл ТВЕ (5Х). Раствор доводят до 100 см^3 дистиллированной водой. Срок хранения при температуре 4°С- не более 12 мес.

3.18 **10% персульфат аммония (PSA)**. Для приготовления 1 см^3 раствора требуется к 100 мг PSA добавить 1 см^3 дистиллированной воды (хранить при + 4^{o}С не более 15 дней).

4. МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК

4.1 Насекомое (имаго яблонной плодожорки) помещают в микроцентрифужную пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 см^3. С помощью дозатора добавляют 600 мм^3 2 %-ного СТАВ буфера и немедленно

тефлоновым или стекляным пестиком растирают смесь до получения однородной массы. Затем смесь перемешивают в течение 30 с на аппарате для встряхивания типа «Вортекс».

4.2 Приготовленные смеси (в случае нескольких образцов) помещают в термостат, инкубируют при 65^{o}C 60 мин, после чего повторно перемешивают 30 с на аппарате для встряхивания.

4.3 В каждую микроцентрифужную пробирку добавляют равный объем хлороформа, перемешивают на аппарате для встряхивания 30 с до образования суспензии.

4.4 Полученные суспензии центрифугируют 10 мин на настольной микроцентрифуге типа Эппендорф при частоте вращения 13,5 тыс.об. мин $^{-1}$ при комнатной температуре.

4.5 Супернатант отбирают в чистые пробирки, не захватывая слой хлороформа, и добавляют 1/10 объема, предварительно нагретого 10 % CTAB. Повторяют п. 4.3, п.4.4.

4.6 Супернатант отбирают в чистые пробирки и добавляют 1,25 объема CTAB буфера для осаждения и оставляют на 1-3 ч при 25-37 ^{o}C.

4.7 Смесь центрифугируют согласно п. 4.4.

4.8 Супернатант отбрасывают и добавляют к осадку 200 мм^{3} раствора 1М NaCl в ТЕ, перемешивают до полного растворения осадка (при необходимости инкубируют 5 –15 мин при 65^{o}C.).

4.9 ДНК осаждают 0,6 объема холодного изопропанола и смесь центрифугируют согласно п. 4.4.

4.10 Осадок 2 раза промывают 500 мм^{3} 70%-ного этилового спирта, каждый раз перемешивая осадки на аппарате для встряхивания 15-20 с и центрифугируя их на микроцентрифуге 10 мин при частоте вращения 12000 об/мин$^{-1}$. Тщательно (до последней капли) удаляют надосадочную жидкость.

4.11 Осадок подсушивают и растворяют в 200 мм^3 бидистилированной воды, получают раствор ДНК.

Растворы ДНК непосредственно используют для проведения ПЦР или хранят при температуре минус 20^{o}С сроком до одного года в морозильной камере.

5. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР

Приготовление реакционных (ПЦР) смесей

5.1 Приготовление реакционной смеси на десять проб (для анализа девяти образцов ДНК). В микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 см^3, помещенную в кювету со льдом, вносят 90,625 мм^3 деионизированной воды, 12,5 мм^3 10х буфера для ПЦР, 7,5 мм^3 хлорида магния, 2,5 мм^3 смеси нуклеотидов, 1,25 мм^3 праймеров (концентрацией 20 мкмоль/дм^3 каждый), 0,625 мм^3 фермента Taq-ДНК полимеразы (концентрацией 5 ед/мм^3).

5.2 Реакционную смесь разливают по 11,5 мм^3 в девять чистых микроцентрифужных пробирок вместимостью 0,2 см^3 (или 0,5 см^3 в зависимости от типа используемого ДНК - амплификатора) для проведения ПЦР и добавляют по 1 мм^3 ДНК.

5.3 Пробирки маркируют и центрифугируют на настольной микроцентрифуге 10 с при частоте вращения 10000 об/мин $^{-1}$ для удаления пузырьков воздуха.

Проведение ПЦР-анализа

5.4 Пробирки со смесями помещают в ДНК-амплификатор для проведения ПЦР. SSR-PCR по локуса проводят по следующей программе: 1) 94°С– 2 мин., 2) 35 циклов: 94°С-30 сек., 58°С или 61°С (для локусов Ср2.39 и Ср1.63, соответственно) -40 сек., 72°С-40 сек., 3) 72°С-3 мин.

5.5 По окончании ПЦР в каждую пробирку добавляют по 2,5 мкл 6х-буфера для образцов и помещают на хранение в холодильник (+4^{o}С) или проводят электрофорез в 8% полиакриламидном геле (ПААГ).

6. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ (ПААГ)

6.1 Готовим разделяющий 8% ПААГ (осторожно – жидкий раствор полиакриламида токсичен, работать только в перчатках!). Для этого к 30 мл 8% АА, добавляем 113 мкл 10% PSA и 48 мкл. ТЕМЕД и немедленно заливаем в стеклянные пластины. Вставляем гребенку и оставляем полимеризоваться в течение 45-60 мин.

6.2 Осторожно вытаскиваем гребенку и промываем сформировавшиеся слоты геля 1х ТВЕ буфером для ЭФ. Наносим на слоты геля (с помощью микрошприца) по 5-7 мкл ДНК (предварительно добавив к 12,5 мкл. смеси амплификатов 2,5 мкл. буфера для нанесения образцов) и в крайние слоты - маркеры молекулярных масс.

6.3 Стеклянные пластины с гелем (желательно длиной не менее 20 см) помещают в камеру прибора для проведения вертикального электрофореза, заполненную буфером 1,0 х ТВЕ.

6.4 Электрофорез проводят при напряженности электрического поля 10-15 В/см геля в условиях стабилизации напряжения в течение 5-6 часов.

6.5 Снять *осторожно* гель с пластин, используя тонкую пластиковую подложку (гель толщиной 1мм легко рвется). Далее гель окрашивают бромистым этидием (концентрацией 0,5 мкг/мл 1хТВЕ) в течение 15-20 мин, отмывают в дистиллированной воде до исчезновения фона и фотографируют в УФ-свете с помощью видеосистемы по 3.4.

6.6 Результат ПЦР анализа сохраняется в виде фотопленки (фотографии) или файл-паспорта на жестком магнитном носителе и может быть выведен на видеомонитор или принтер.

7. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

7.1 При работе с химическими реактивами необходимо соблюдать требования техники безопасности по ГОСТ 12.1.007. При работе с раствором бромистого этидия и раствором полиакриламида работать в резиновых перчатках.

7.2 Помещение, в котором проводятся работы, должно быть оборудовано общей приточно - вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

7.3 При работе с электроустановками электробезопасность должна соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.019. Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. При работе с УФ-излучением необходимо пользоваться защитным экраном и защитными очками.

8. АПРОБАЦИЯ МЕТОДА НА ПРИМЕРЕ КРАСНОДАРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЯБЛОННОЙ ПЛОДОЖОРКИ *CYDIA POMONELLA*

SSR-PCR анализ проводили с парами праймеров для локусов *Cp1.63* (мотив повтора $(GA)_{19}$) и *Cp2.39* (мотив повтора $(TC)_4AC(TC)_{11}$) (таблица).

Таблица – Нуклеотидная последовательность праймеров, фланкирующих микросателлитные локусы яблонной плодожорки

Локус	Последовательность нуклеотидов
Cp1.63 F	5’-GTC-ACA-TGA-GGG-CAC-ACG -3’
Cp1.63 R	5’-TTG-CCT-ACT-CGG-ACC-AAA-C -3’
Cp2.39 F	5’-ATC-AAC-GCC-CTG-TGG-AAG -3’
Cp2.39 R	5’-CCC-AAT-CTT-CTA-AAC-TCG-AAC-G -3’

Результаты ПЦР анализа приведены на рисунке.

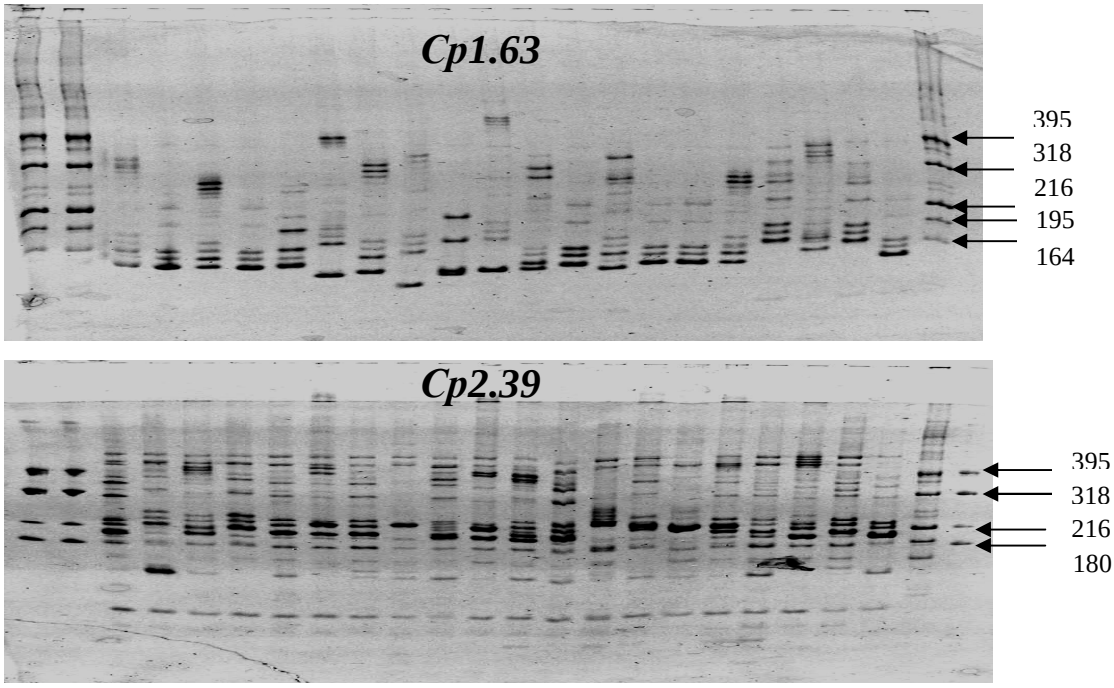

Рисунок – Электрофореграмма ампликонов краснодарской популяции *C. pomonella* в 8% ПААГ (ПЦР анализ по двум микросателлитным локусам *Cp1.63* и *Cp2.39*). М-маркеры молекулярных масс, пар нуклеотидов (п.н.).

Работа выполнена при поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края (грант № 09-04-96514).

Список литературы

1. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер. с англ./ под ред. Дж.Дрейпера, Р.Скотта, Ф.Армитиджа, Р.Уолдена.- М.: Мир, 1991: 408 с., ил. ISBN 5-03-001854-9.

2. Киль В.И. Методика оценки ДНК полиморфизма популяций насекомых с помощью ПЦР (RAPD- и ISSR-PCR) // Методические рекомендации. «ООО Просвещение-Юг». Краснодар. 2009. 16 с.

3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ.-М.: Мир, 1984.-480 с.

4. Franck P., Guérin F., Loiseau A., Sauphanor B. Isolation and characterization of microsatellite loci in the codling moth Cydia pomonella L. (Lepidoptera, Tortricidae) // Molecular Biology Notes. 2005. Vol.5. N 1. P. 99-102.