

2. Polischuk, F. Y., and A. L. Trofimenko. 2007. *Kinologiya – Cynology*. Irpen, VTO «Perun», 1000 (in Ukrainian).
3. Dzisiuk, V. V., V. M. Jashhenko, S. G. Kruglyk, O. V. Mel'nyk, A. V. Shel'ov, V. G. Spyrydonov, and S. D. Mel'nychuk. 2012. *Genetychna identyfikaciya sobak (metodychni rekomendacii) – Genetic identification of dogs (guidelines)*. Kyiv, 24 (in Ukrainian).
4. Ye, J. H, D. R. Ren, A. F. Xie, X. P. Wu, L. Xu, P. F. Fu, H. A. Zhao, and Q. Y. Yang. 2009. Microsatellite-based Genetic Diversity and Evolutionary Relationships of Six Dog Breeds Asian-Aust. *J. Anim. Sci.* 22 (8):1102–1106.
5. Lipinski, M. J., Y. Amigues, M. Blasi, T. E. Broad, C. Cherbonnel, Cho G.J., Corley S., P. Daftari, D. R. Delattre, S. Dileanis, J. M. Flynn, D. Grattapaglia, A. Guthrie, C. Harper, P. L. Karttunen, H. Kimura, G. M. Lewis, M. Logneri, J.-C. Meriaux, M. Morita, R. C. Morrin-O'Donnell, T. Niini, N. C. Pedersen, G. Perrotta, M. Polli, S. Rittler, R. Schubbert, M. G. Strillacci, H. Van Haeringen, and L. A. Lyons. 2007. An international parentage and identification panel for the domestic cat (*Felis catus*). *Animal Genetics*. 38:371–377.
6. Levontin, R. 1978. *Geneticheskie osnovy jevoljucii – Genetic basis of evolution*. Moskow, 351 (in Russian).

УДК 638.1:[577.213.3:591.34]

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ ДНК З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ БДЖІЛ РІЗНИХ СТАДІЙ МЕТАМОРФОЗУ

М. Д. ПАЛЬКІНА, О. І. МЕТЛИЦЬКА

Інститут розведення і генетики тварин ім. М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)
mariya_palkina@yahoo.com

Проведено порівняльний аналіз найбільш розповсюджених методів виділення ДНК а) механічна обробка зразків, 5% «Chelex-100», ІМ ДТТ, протеїназа К, час інкубування 30 та 180 хвилин; б) механічна обробка зразків, 20% «Chelex-100», тривалість інкубування 180 хвилин, в) виділення ДНК стандартним комерційним набором реагентів «ДНК-сорб Б», згідно з рекомендаціями виробника. Аналіз отриманих нами результатів виявив, що найбільш економічним підходом було інкубування зразків у розчині 20% «Chelex-100», але застосована методика поступається «ДНК Сорб-Б» за кількісними та якісними показниками екстрагованої ДНК із незначними відхиленнями, що не мають суттєвого впливу на результати проведення ПЛР.

Ключові слова: ДНК, «ДНК Сорб-Б», «Chelex -100», протеїназа К, екзувії, екстинкція

OPTIMIZATION OF DNA EXTRACTION METHODS FROM BIOLOGICAL MATERIALS OF HONEY BEES IN A DIFFERENT METAMORPHOSIS PHASE

M. Palkina, O. Metlitska

Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V. Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)

In recent comparative investigation analysis of most common methods of DNA extraction using ion exchange resin «Chelex-100» in different concentration this combination of reagents and incubation time in comparison of commercial kit «DNA Sorb B», content with recommendation of extraction protocol. The analysis of our results showed that the most economical approach would incubating samples in a solution of 20% «Chelex-100» time of incubation 180 minutes. It should be noted that applied method acquiesce to commercial kit «DNA Sorb B» for quality and quantitative scores of DNA solution that set in minor deviation that do not have significant impact in PCR results.

Keywords: DNA, «DNA Sorb - B», «Chelex® -100», proteinase K, exuviae, extinction

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДІВ ВИДЕЛЕННЯ ДНК ІЗ БІОЛОГІЧЕСЬКОГО МАТЕРІАЛУ ПЧЕЛ РАЗНИХ СТАДІЙ МЕТАМОРФОЗА

© М. Д. ПАЛЬКІНА, О. І. МЕТЛИЦЬКА, 2016

М. Д. Палькина, Е.И. Метлицкая

Институт разведения и генетики животных имени Н. В. Зубца НААН (с. Чубинское, Украина)

Проведен сравнительный анализ наиболее распространенных методов выделения ДНК а) механическая обработка образцов, 5% «Chelex-100», 1М ДТТ, протеиназа К, время инкубации 30 и 180 минут б) механическая обработка образцов, 20% «Chelex-100», продолжительность инкубации 180 минут, в) выделение ДНК с помощью стандартного коммерческого набора реагентов «ДНК-сорб Б», в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ полученных нами результатов показал, что наиболее экономичным подходом было инкубирование образцов в растворе 20% «Chelex-100», но использованная методика уступает «ДНК Сорб-Б» по количественным и качественным показателям экстрагированной ДНК с незначительными отклонениями, не имеющими существенного влияния на результаты проведения ПЦР.

Ключевые слова: ДНК, «ДНК Сорб-Б», «Chelex -100», протеиназа К, экзувий, экстинкция

Вступ. Важливим у вивченні особливостей живого організму є дослідження функціональної активності генетичного матеріалу клітини. Застосування фізико – хімічних методів у сучасній біології дозволяє отримувати у чистому вигляді генетичний матеріал клітини з метою подальшої ідентифікації як окремих його компонентів, так і геному організму в цілому. Саме тому одним із важливих етапів молекулярно-генетичного дослідження будь-яких біологічних об'єктів є вибір методики виділення ДНК із біологічного матеріалу.

Нині існують чотири основні методи виділення ДНК: класичний референтний метод фенол-хлороформної екстракції [1], метод із застосуванням цетилтриметіламонійброміду з наступною екстракцією хлороформом – ЦТАБ [2], виділення за допомогою сорбентів [3], сольовий метод [4], застосування іонообмінної смоли [5], різні модифікації стандартних комерційних наборів (AmpliSens, ThermoScientific, Qiagen). Певним чином, всі існуючі методи застосовують у різних комбінаціях та поєднаннях. При роботі зі зразками біологічного матеріалу бджіл (*Apis mellifera spp*), необхідно зауважити на існування особливостей анатомічного та хімічного складу тіла комахи, вміст пігментів та віскоподібних речовин у черевці бджоли, що можуть слугувати інгібіторами полімеразної ланцюгової реакції при проведенні молекулярних досліджень, залежно від ступеня очищення нуклеїнових кислот. Саме тому, при проведенні процедури екстрагування ДНК, рекомендується використовувати окремі фрагменти тіла комахи: голову, груди або тергіти [6]. Останнім часом рядом науковців було запропоновано метод життєвого визначення генотипу бджіл за використання для виділення ДНК екзувію щойно вилупленої матки чи фрагментів її крилець. Таким чином, вибір методики виділення ДНК науковцем, необхідність її оптимізації чи вдосконалення залежить від поставлених у дослідженні завдань: кількості вихідного біологічного матеріалу, його видової належності, швидкості проведення процедури, вартості реагентів на одне визначення, ступеня нативності і чистоти ДНК, терміну зберігання отриманого екстракту, подальшої методики дослідження (ПЛР, сиквенування, клонування) тощо.

Мета роботи. Адаптація, оптимізація та застосування в складних економічних умовах вітчизняних лабораторій існуючих методик виділення ДНК з біологічного матеріалу бджіл за допомогою реагенту «Chelex-100», що дасть можливість оптимізувати витрати праці та покращити економічні показники протоколу виділення ДНК.

Матеріали та методи. З метою проведення дослідження було відібрано зразки біологічного матеріалу бджіл: екзувій лялечки маточки, личинки трутневого розплуду, окремі частини тіла імаго бджіл (голова та груди). Мисочки та трутневий розплід було отримано з дослідної пасіки ННЦ Інституту бджільництва імені П. І. Прокоповича НААН. Виділення ДНК із біопроб бджіл *Apis mellifera ssp.* проводили за використання іонообмінної смоли «Chelex-100» у різних концентраціях і комбінаціях. Кількісний і якісний аналіз проб ДНК порівнювали із параметрами зразків, отриманих комерційним набором «ДНК – Сорб Б» («Амплісенс», Росія) методами спектрофотометрії і візуалізації зразків після електрофоретичного розділення у 2% агарозному гелі. Перед постановкою проб на визначення кількісних та якісних показників,

проводили розведення зразків ДНК досліджуваного об'єкту у співвідношенні 1:40. Ступінь забруднення білковими, полісахаридними фракціями (ОД 260/230) та кількісний вміст ДНК (ОД 260/280) у виділених пробах проводили за допомогою спектрофотометру «BioSpec – папо» за умов об'єму досліджуваного зразку 2 мкл і довжиною оптичного шляху 0,7 мм. Отримані дані порівнювали з табличними нормами коефіцієнтів $ОД\ 260/280 = 1,8-2,0$; $ОД\ 260/230 = 1,8-2,2$. [7]. Перевірка зразків ДНК з біологічного матеріалу бджіл, виділених «Chelex-100» відбувалась після холодної витримки протягом 24 годин за температури мінус 20°C у ПЛР з праймерами до фрагмента гена локусу кількісних ознак (QTL) *Sting -2* наступної структури [8]:

3' - CTC GAC GAG ACG ACC AAC TTG – 5'

3' - AAC CAG AGT ATC GCG AGT GTT AC -5'

Програма ампліфікації: 94°C – 5 хв – 1 цикл; 94°C – 1 хв., 57°C – 1 хв , 72°C – 2 хв – 30 циклів; елонгація за 72°C протягом 2 хв – 1 цикл. Розділення отриманих ампліконів проводили за допомогою гель-електрофорезу за низького струму - 7 μ А, у 1,5% агарозному гелі (Sigma) у 1-но кратному ТАЕ буфері з додаванням у розчин і гель бромистого етидію [7]. Візуалізацію продуктів ПЛР-синтезу проводили на транслюмінаторі в ультрафіолетовому світлі за довжини хвилі 280 нм з наступною фотодокументацією електрофореграм через оранжевий світлофільтр.

Ступінь нативності та концентрації ДНК додатково проводили шляхом електрофорезу зразків нативної ДНК у 2% агарозному гелі, на доріжку гелю наносили по 4 мкл кожного зразка, змішаного з буфером для нанесення проб на основі бромфенолового синього [7] у кількості 2 мкл.

Результати досліджень. На момент проведення оптимізації методів виділення ДНК, відповідно до існуючих методик зарубіжних фахівців, було встановлено оптимальний об'єм розчину іонно-обмінної смоли у запропонованій концентрації : замість 60 мкл розчину використовували 120 мкл «Chelex-100», пробопідготовку у рідкому азоті було замінено на механічну обробку зразків (розтирання скляним товкачем), також було змінено час інкубації з 30хв на 180хв [9]. Застосування авторської комбінації методу «Chelex-100» з лізуючими ферментами, протеїназою К та детергентами (1М дітіотрейтол), також було внесено зміни щодо часу інкубації, який було зменшено до 180 хв замість запропонованих 12 годин [10]. Зміни якісних характеристик отриманої ДНК в пробах після зменшення часу інкубації не було виявлено.

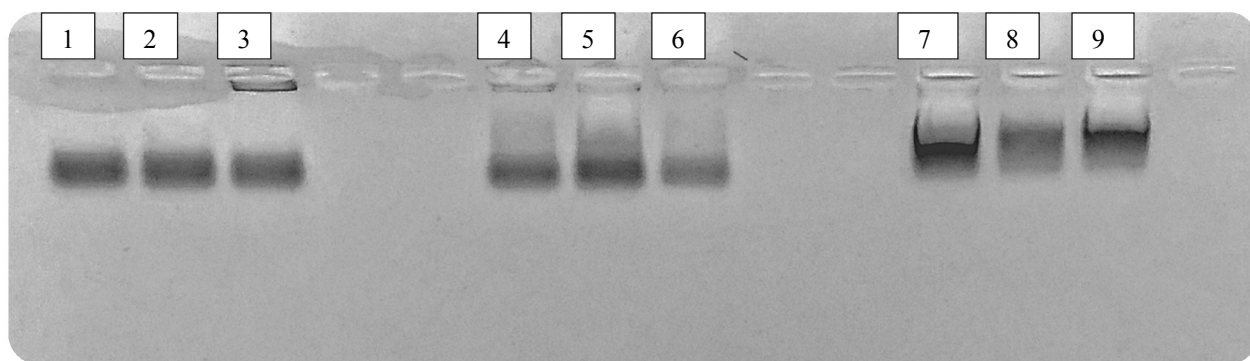


Рис. 1. Візуалізація нативної ДНК, отриманої з біологічного матеріалу бджіл, за різних методичних підходів : ДНК, одержана з: 1-екзувію, 2 – лялечки, 3 – імаго робочих бджіл, 5% «Chelex-100»; проби з 4-6 включно в тому ж порядку біологічного матеріалу із застосуванням 20% «Chelex-100»; проби 7-9 виділені із застосуванням комерційного набору «ДНК Сорб-Б».

Кількісні показники співвідношення кількісних (ОД 260/280) та якісних показників (ОД 260/230) отриманої ДНК представлено у графічному вигляді на рис. 2.

При опрацюванні протоколу комерційного набору «ДНК Сорб – Б» було встановлено, що незначне збільшення часу інкубації зразків у лізуючому розчині (3-5 хв), призводить до желювання зразка, що гальмує або унеможливорює процес подальшої роботи із пробом. Складність полягає у тому, що желеподібний агент неможливо відібрати автоматичним дозатором у рівних об'ємах, згідно зазначених рекомендацій виробника.

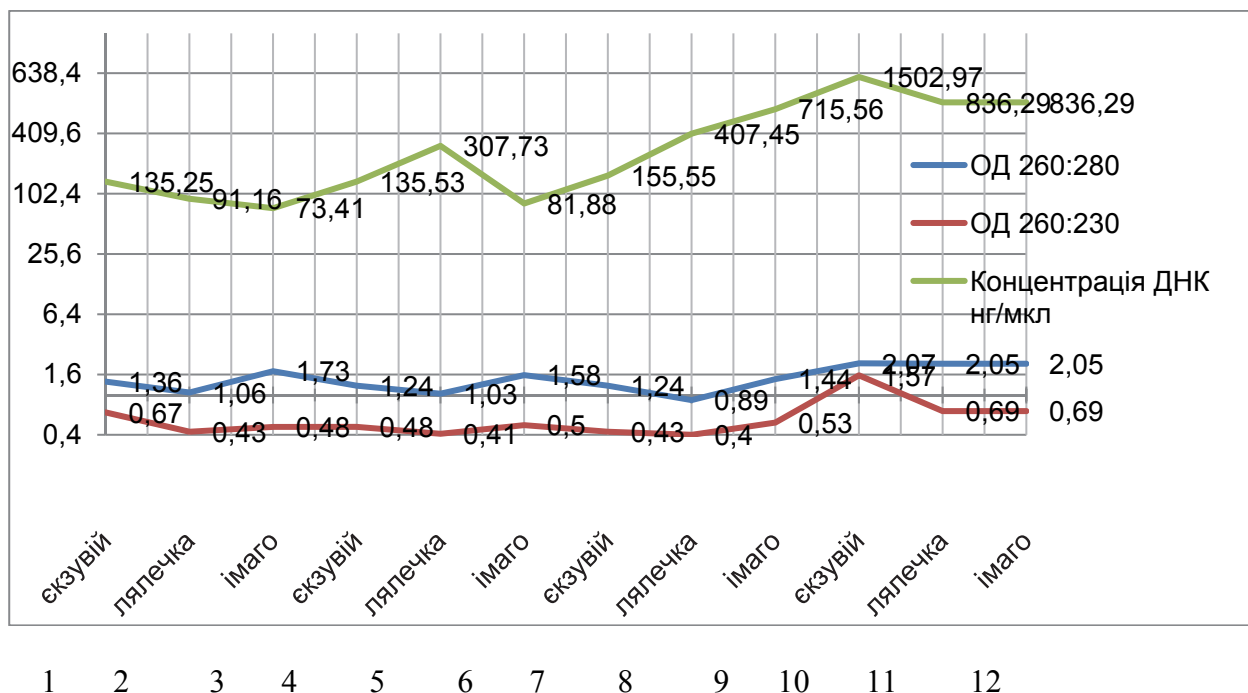


Рис. 2. Графічне зображення показників якості та кількості ДНК, залежно від використаного методу екстрагування: 1-3 кількісно-якісні показники екстрагованої ДНК за використання реагенту «Chelex-100» 5% концентрації у поєднанні з протеїназою К та 1М ДТТ, час інкубації 30 хвилин; 4-6 «Chelex-100» 5% концентрації у поєднанні з протеїназою К та 1М ДТТ, час інкубації 180 хвилин; 7-9 за використанням «Chelex-100» 20% концентрації, час інкубації 180 хвилин; 10-12 кількісно-якісні показники екстрагованої ДНК за використання комерційного набору ДНК – Сорб Б.

Згідно з побудованим графіком (рис. 2), найвища концентрація ДНК (1502,97 нг) з кращими показниками ступеня очищення (відношення ОД 260/230 = 1,57) показана для проб, отриманих за використання комерційного набору «Сорб - Б». Найнижчими показниками характеризуються проби, отримані за використання реагенту «Chelex-100» 5% концентрації у поєднанні з протеїназою К та 1М ДТТ із скороченим часом інкубації (30 хв) що відповідає таким показникам: кількість ДНК = 135,25 нг, ОД 260/280 = 1,36, ОД 260/230 = 0,67 (екзувій); кількість ДНК = 91,16 нг, ОД 260/280 = 1,06; ОД 260/230 = 0,43 (лялечка); кількість ДНК = 73,41 нг, ОД 260/280 = 1,73 ОД 260/230 = 0,48 (імаго).

Висновки. Найбільш економічним способом виділення ДНК з біологічного матеріалу бджіл виявився 20% розчин іонно – обмінної смоли «Chelex-100» з тривалістю інкубаційного періоду 180 хвилин, та попередньою обробкою досліджуваних зразків у механічний спосіб шляхом подрібнення зразків у пробірці наконечником для самплеру V= 200 мкл. Згідно з отриманими результатами щодо показників ОД 260/280 при достатній кількості ДНК у розчині спостерігається забруднення проб, екстрагованих з личинок трутневого розплоду білковими та полісахаридними фракціями (ОД 260/230), що пояснює наявність у зразках маточного молочка, але заключна стадія протоколу передбачає термічну обробку за +99 °С протягом 8 хвилин, що забезпечує руйнування структур забруднюючих агентів, що в цілому не призводить до інгібування ПЛР. Також слід зауважити, що найкращий результат можна отримати з екзувію, відібраного одразу після виходу матки з маточнику, що знижує вірогідність руйнації молекул ДНК під впливом активізації нуклеаз, але не пізніше 12 годин з моменту виходу при застосуванні технології ізолюваного отримання маток.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Mathew, C. G. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA / C. G. Mathew // *Methods Mol Biol.* –1985. –N 2. – P. 231–34.
2. Doyle, J. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J. J. Doyle, J. L. DOYLE // *Phytochemical Bulletin.* – 1987. – N 19. – P. 11–15.
3. Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел/ И. В. Корниенко, Д. И. Водолажский, В. П. Вейко, В. В. Щербаков, П. Л. Иванов. Под общ. ред. проф. П. Л. Иванова. – Ростов-на-Дону: ООО «Ростиздат», 2001. – 256 с.
4. Соколов, Б. П. Выделение высокомолекулярной эукариотической ДНК с использованием ацетата калия / Б. П. Соколов, В. В. Джемелинский // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* –1989. – № 6. – С. 45-46.
5. Walsh P.S. Chelex 100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR – Based Typing from Forensic Material / P. S. Walsh, D.A. Metzger, R. Higuchi // *Bio Techniques.* –1991. – N 10. –P. 506-509.
6. Standart methods for molecular research in *Apis mellifera* / J. D. Evans, Ryan S. Schwartz, Yan Ping Chen, Gilles Budge, Robert S. Cornman, Pilar De la Rua, Joachim R. de Miranda, Sylvain Foret, Leonard Foster, Laurent Gauthier, Elke Genersch, Sebastian Gisder, Antje Jarosch, Robert Kucharski, Dawn Lopez, Cheng Man Lun, Robin F A Moritz, Ryszard Maleszka, Iren Munoz, M Alice Pinto // *Jornal of Apicultural Research.* – 2013. – 52(4). – P. 152–154.
7. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. М., «Мир», 1984. – 478с.
8. Ernesto Guzman-Novoa, Greg J. Hunt, Jose L. Uribe, Christine Smith, Miguel E. Arechavaleta – Velasco. Confirmation of QTL Effects and Evidence of Genetic Dominance of Honey Bee Defensive Behavior: Results of Colony and Individual Behavioral Assays // *Behavior Genetics.* – 2002. – 32 (2). P. 95-102.
9. Gregory, P. G. Non – destructive sources of DNA used to genotype honey bee (*Apis mellifera*) queens / P. G. Gregory, T. E. Rinderer // *The Netherlands Entomological Society, Entomologia Experimentalis et Applicata.* – 2004. – 3. P. 173-177.
10. Songkun Su, Stefan Albert, Shaowu Zhang, Sven Maier, Shenglu Chen, Honghu Du, Jurgen Tautz Non – destructive genotyping and genetic variation of fanning in a honey bee colony // *Journal of Insect Physiology.* – 2007. – 53 P. 411–417.

REFERENCES

1. Mathew, C. G. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. *Methods Mol Biol.* 2(1985):31–34.
2. Doyle, J. J., and J. L. Doyle. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin.* 19(1987):11–15.
3. Kornienko, I. V., D. I. Vodolazhskiy, V. P. Veyko, V. V. Scherbakov, and P. L. Ivanov. 2001. *Podgotovka biologicheskogo materiala dlya molekulyarno-geneticheskikh identifikatsionnykh issledovaniy pri massovom postuplenii neopoznannykh tel. – Preparation of biological material for molecular-genetic identification surveys at mass admission of unidentified bodies.* Rostov-na-Donu, ООО «Rostizdat», 256 (in Russian)
4. Sokolov, B. P., and V. V. Dzhemelinskiy. 1989. Vyidelenie vyisokomolekulyarnoy eukarioticheskoy DNK s ispol- zovaniem atsetata kaliya – Isolation of high molecular weight eukaryotic DNA using potassium acetate. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya – Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* (6):45–46.
5. Walsh, P. S., D. A. Metzger, and R. Higuchi. Chelex 100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR – Based Typing from Forensic Material *BioTechniques.* 10(1991):506-509.
6. Evans, J. D., Ryan S. Schwartz, Yan Ping Chen, Gilles Budge, Robert S. Cornman, Pilar De la Rua, Joachim R. de Miranda, Sylvain Foret, Leonard Foster, Laurent Gauthier, Elke Genersch, Sebastian Gisder, Antje Jarosch, Robert Kucharski, Dawn Lopez, Cheng Man Lun, Robin F A Moritz,

Ryszard Maleszka, Iren Munoz and M Alice Pinto. 2013. Standart methods for molecular research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 52(4):152–154.

7. Maniatis, T., E. Fritch, and Dzh. Sembruk. 1984. *Metody geneticheskoy inzhenerii. Molekulyarnoe klonirovanie*. Moskow, Mir, 478.

8. Ernesto Guzman-Novoa, Greg J. Hunt, Jose L. Uribe, Christine Smith, and Miguel E. Arechavaleta. 2002. Velasco Confirmation of QTL Effects and Evidence of Genetic Dominance of Honey Bee Defensive Behavior: Results of Colony and Individual Behavioral Assays. *Behavior Genetics*. 32(2):95–102.

9. Gregory, P. G., and T. E. Rinderer. 2004. Non – destructive sources of DNA used to genotype honey bee (*Apis mellifera*) queens. The Netherlands Entomological Society. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 3:173–177.

10. Songkun Su, Stefan Albert, Shaowu Zhang, Sven Maier, Shenglu Chen, Honghu Du, and Jurgen Tautz. 2007. Non – destructive genotyping and genetic variation of fanning in a honey bee colony. *Journal of Insect Physiology*. 53:411–417.

УДК 636.082:575

ГЕНЕТИКО-ПОПУЛЯЦІЙНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ДОЦІЛЬНОСТІ ВИКОРИСТАННЯ *LEPR* (с.232Т>А) У ВІТЧИЗНЯНІЙ МАРКЕРНІЙ СЕЛЕКЦІЇ ВЕЛИКОЇ БІЛОЇ І МИРГОРОДСЬКОЇ ПОРІД СВИНЕЙ

Н. К. САРАНЦЕВА, В. М. БАЛАЦЬКИЙ, В. Ю. НОР, Є. К. ОЛІЙНИЧЕНКО
Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН (Полтава, Україна)
maestropoltava@rambler.ru

*Проведено дослідження поліморфізму гена рецептора лептину (*LEPR* 232Т>А), що асоційований з рядом господарськи корисних ознак, зокрема показниками якості м'яса свиней. Молекулярно-генетичний аналіз проведено на вибірці тварин великої білої (українська велика біла тип 1) та миргородської порід. Встановлені основні генетико-популяційні параметри свиней досліджуваних порід за однонуклеотидною заміною *LEPR* (с.232Т>А) для кожної мікропопуляції.*

Розподіл частот алелів показав переважання потенційно небажаного алелю А серед досліджуваних популяцій свиней.

Ключові слова: маркерна селекція, свині, популяція, поліморфізм, ДНК-маркер, ген рецептора лептину

GENETICS AND POPULATION PRACTICABILITY OF USING SNP (C. 232T>A) OF *LEPR* GENE AS A MARKER FOR FURTHER SELECTION FOR LARGE WHITE AND MYRGOROD PIG BREEDS

N. K. Sarantseva, V. M. Balatsky, V. Y. Nor, Ye. K. Oliinychenko
Institute of Pig Breeding and Agroindustrial Production of NAAS (Poltava, Ukraine)

*The study of polymorphism in *LEPR* gene (c. 232T>A) was conducted; it associates with several productive traits, especially it influences on meat traits. Molecular-genetic analysis was carried out on the Large White population (bred in Ukraine) and Myrgorodska breeds. The basic genetic-population parameters with *LEPR* polymorphism (c.232T>A) in studied pig populations were studied for each micro population.*

Keywords: marker assisted selection, pigs, population, polymorphism, DNA marker, leptin gene receptor

© Н. К. САРАНЦЕВА, В. М. БАЛАЦЬКИЙ, В. Ю. НОР,
Є. К. ОЛІЙНИЧЕНКО, 2016