

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ЭКСТРАКЦИИ ДНК ИЗ ЛИЧИНОК *HERMETIA ILLUCENS**

Глеб Игоревич Сутула, младший научный сотрудник, ORCID: 0009-0002-2781-9035

Святослав Игоревич Лоскутов, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник,
ORCID: 0000-0001-9377-5515

Вениамин Юрьевич Ситнов, директор ВНИИПД, ORCID: 0000-0003-1927-1997

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок — филиал федерального государственного
бюджетного научного учреждения Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова РАН,
г. Санкт-Петербург, Россия
E-mail: capitals2016@yandex.ru

Аннотация. Муха черная львинка (*Hermetia illucens*) — перспективный источник корма для животных из-за высокого содержания белка и жира. В 2023 году решением Правительства РФ она была включена в перечень сельскохозяйственной продукции. Но в отечественной литературе очень мало данных по применению молекулярно-генетических методов в отношении черной львинки и практически полностью отсутствует информация о способах экстракции из нее ДНК. Цель исследования — сравнение эффективности существующих методов выделения ДНК и их адаптация для работы с личинками *Hermetia illucens*. Опробованы несколько способов экстракции ДНК, основывающихся на разных лизирующих (SDS, тиоцианат гуанидина, CTAB) и хелатирующих (EDTA) агентах, а также продолжительностях лизиса — 1, 2 и 3 ч. Установлено, что наибольшая концентрация ДНК (750 нг/мкл) достигается CTAB-методом, но в данном случае необходима дополнительная очистка. Комбинированное действие SDS и высоких концентраций EDTA приводит к меньшему выходу ДНК (50 нг/мкл), но не требует дополнительной очистки. Впервые применен метод, основанный на тиоцианате гуанидина, который оказался достаточно релевантным для данного объекта изучения. Все вышеперечисленные методы приводили к сопоставимому или более высокому выходу ДНК, по сравнению с коммерческим набором ГМО-SORB-B. Увеличение длительности лизиса до 3 ч при использовании методов, основанных на тиоцианате гуанидина и CTAB, повышает концентрацию ДНК.

Ключевые слова: черная львинка, *Hermetia illucens*, корма, выделение ДНК, CTAB, SDS, тиоцианат гуанидина, EDTA

COMPARISON OF METHODS OF DNA EXTRACTION FROM *HERMETIA ILLUCENS* LARVAE

G.I. Sutula, Junior Researcher

S.I. Loskutov, PhD in Agricultural Sciences, Senior Researcher

V. Yu. Sitnov, Director V.M. Gorbатов Research Center for Food Systems

All-Russian Research Institute for Food Additives — Branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS,
Saint Petersburg, Russia
E-mail: capitals2016@yandex.ru

Abstract. The black soldier fly (*Hermetia illucens*) is a promising and promising source of animal feed due to its high protein and fat content. For this reason, in 2023, by decision of the Government of the Russian Federation, it was included in the list of agricultural products. Currently, the active use of molecular genetic analysis methods for agricultural purposes continues, including for the study of feed and feed additives. However, today there is too little data in the domestic literature on their use against the black soldier fly. Thus, there is almost no information about DNA extraction methods — the very first stage of any genetic analysis. Thus, the purpose of this study is to compare the effectiveness of existing DNA extraction methods and adapt them to work with *Hermetia illucens* larvae. In this study, several DNA extraction methods were tested, based on different lysing (SDS, guanidine thiocyanate, CTAB) and chelating (EDTA) agents, as well as lysis durations (1, 2, 3 hours), in comparison with a commercial kit. As a result, it was found that the highest DNA concentration (750 ng/μl) is achieved using the CTAB method, however, when using this protocol, additional purification is necessary. The combined action of SDS and high concentrations of EDTA results in a lower DNA yield (50ng/μl), but does not require additional purification. For the first time, a method based on guanidine thiocyanate was used, which turned out to be quite relevant for this object of study. All of the above methods resulted in comparable or higher DNA yield compared to the commercial GMO-SORB-B kit. Increasing the lysis time to 3 hours when using methods based on guanidine thiocyanate and CTAB leads to increased DNA concentration.

Keywords: black soldier fly, *Hermetia illucens*, feed, DNA extraction, CTAB, SDS, guanidine thiocyanate, EDTA

Черная львинка *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) — муха, обитающая в тропических регионах. Ее начинают активно использовать в качестве альтернативного источника пищи для сельскохозяйственных

животных из-за большого содержания белка (42%) и жира (29%), высокой конверсии корма, способности личиночной стадии питаться вторичными органическими ресурсами (навоз, пищевые отходы, пшеничные

* Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № FGUS-2024-0010 и № FGUS 2022-0018 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук / This article was published as part of the research topic № FGUS-2024-0010 and № FGUS 2022-0018 of the state assignment of the V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS.

отруби и другие). [6, 11] Помимо экономических преимуществ, ее применение способно снизить неблагоприятное воздействие сельского хозяйства на окружающую среду из-за меньших затрат водных и земельных ресурсов. В 2023 году *Hermetia illucens*, согласно распоряжению Правительства № 2761-р, получила официальный статус сельскохозяйственной продукции в РФ и была включена в раздел «Кормовые культуры полевого возделывания, продукция кормопроизводства прочая». Но в отечественной литературе очень мало данных по применению молекулярно-генетических методов в отношении черной львинки и практически полностью отсутствует информация о способах выделения из нее ДНК. [7]

Для генетического анализа требуется достаточная концентрация ДНК, ее целостность и высокая степень очистки. Впервые ДНК была выделена в 1869 году, затем методика экстракции видоизменялась и модифицировалась. [10] Первый этап выделения нуклеиновых кислот (НК) — разрушение клеток физическими, химическими или ферментативными методами. [8] Нарушение целостности плазматической мембраны приводит к выходу содержимого клетки в экстракционный раствор. К физическим способам разрушения относят ультразвук, пропускание клеток через узкое отверстие под давлением (French-press), многократные циклы замораживания/оттаивания и другие, к химическим — использование различных поверхностно-активных веществ (ПАВ), таких как SDS, тиоцианат гуанидина, СТАВ, Triton X-100. Они способствуют высвобождению липидов и белков плазматической мембраны, приводя к ее разрушению. Существуют анионные, катионные и неионогенные ПАВ. [3] К первым относят додецилсульфат натрия (SDS) — мощный детергент, разрушающий липидно-белковые мембранные комплексы и приводящий к денатурации белков вследствие приобретения ими сильного отрицательного заряда. Классическое катионное ПАВ — бромид цетилтриметиламмония (СТАВ), который повышает проницаемость мембраны, что приводит к ее лизису. Также он способствует осаждению кислых полисахаридов и НК из растворов с низкой ионной силой. Если ионная сила растворов высокая, СТАВ образует комплексы с белками и не осаждает НК. Таким образом, выделение ДНК СТАВ-методом подходит для организмов, которые продуцируют большое количество полисахаридов: растения, насекомые, некоторые грамотрицательные бактерии. Triton-x — неионогенное ПАВ, обладающее менее сильным денатурирующим эффектом, что приводит к сохранению белками третичной структуры. Ферментативные методы включают применение различных ферментов, в том числе лизоцима, для лизиса бактериальных клеток. Выделению ДНК способствует присутствие в лизирующем буфере хелатирующих агентов, таких как EDTA. Они связываются с двухвалентными катионами кофакторов нуклеаз (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} и другие) и предотвращают деградацию ДНК этими ферментами. Следующий этап выделения ДНК — ее очистка. Известно, что НК в клетках связаны с различными высокоспецифичными белками. Для их удаления можно использовать протеазы — ферменты, расщепляющие белки (протеиназа К) или детергенты, вызывающие их денатурацию (SDS). Помимо ДНК, в клетках присутствует РНК, для ее удаления часто применяют на

соответствующем этапе РНКазу А или хлорид лития. Затем следует стадия очистки экстрагированной ДНК от белков, полисахаридов и ингибирующих веществ. В ряде методик для этой цели требуются органические растворители: фенол, хлороформ, изоамиловый спирт. [5] Применение смеси фенол-хлороформ приводит к разделению раствора на две фазы — водную и органическую. Таким образом, после центрифугирования в верхней водной фазе остаются НК, а в нижней органической — белки и гидрофобные липопротеины. Распространен способ очистки с использованием спин-колонок. Метод основан на избирательном связывании положительно заряженных частиц кремнезема (SiO_2) с отрицательно заряженными молекулами ДНК в растворах с высокой ионной силой. В результате нагревания в элюирующем буфере связи ослабевают, и очищенная ДНК выходит в раствор. [4] Последний этап выделения ДНК — осаждение в 96% этиловом спирте и растворение в дистиллированной воде или буфере TE.

Выделение ДНК из насекомых требует оптимизации и модификации существующих методов.

Цель работы — изучение основных методов экстрагирования ДНК из различных биологических материалов и возможности их использования в выделении ДНК из личинок *Hermetia illucens*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования — личинки *Hermetia illucens*, выращенные в лаборатории промышленных биотехнологических инноваций ВНИИПД. Развитие, рост и размножение насекомых происходило в оборудованном инсектарии со световыми лампами при постоянно заданных параметрах температуры ($25^{\circ}C$) и влажности воздуха ($55 \pm 5\%$). После достижения определенной стадии развития личинки помещали в морозильную камеру (минус $20^{\circ}C$). Перед началом экстракции ДНК замороженных насекомых взвешивали, на один образец брали 200 ± 20 мг, затем помещали в ступку, где гомогенизировали в жидком азоте. Полученную субстанцию переносили в пробирку для дальнейшей работы по выделению ДНК.

Для разрушения клеток использовали детергенты: тиоцианат гуанидина (Helicon, Россия), СТАВ, SDS (neoFroxx, Германия). В качестве вспомогательного хелатирующего агента был использован EDTA («neoFroxx», Германия). Длительность клеточного лизиса во всех случаях составила 1, 2 и 3 ч.

Выделяли ДНК с помощью коммерческого набора СОРБ-ГМО-Б («Синтол», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

К гомогенизированным личинкам добавляли 700 мкл лизирующего буфера (500 мМ Tris-HCl, 240 мМ тиоцианата гуанидина). Лизис проводили на автоматической мешалке при комнатной температуре.

— 1 мл СТАВ. Лизис — в твердотельном термостате с регулярным перемешиванием при $65^{\circ}C$. К некоторым образцам добавляли 1% SDS.

— 700 мкл лизирующего раствора (TE, 0,5M EDTA, 1% SDS). Лизис — на автоматической мешалке при комнатной температуре.

Очищали ДНК фенолом (Медиген, Россия) и хлороформом (ЭКОС-1, Россия), осаждали — с участием 96%-го этилового спирта.

К полученному лизату добавляли 1/10 объема 2M NaCl и равный объем охлажденного фенола. Активно перемешивали в течение 10 мин., центрифугировали 10 мин. при 4000 об/мин., супернатант переносили в отдельные пробирки. Добавляли равный объем фенола, активно перемешивали (10 мин.), центрифугировали 10 мин. при 4000 об/мин., супернатант переносили в отдельные пробирки. Добавляли равный объем смеси фенола и хлороформа в соотношении 1:1. Активно перемешивали в течение 10 мин., центрифугировали 10 мин. при 4000 об/мин., супернатант переносили в отдельные пробирки. Добавляли равный объем хлороформа. Активно перемешивали 10 мин., центрифугировали 10 мин. при 4000 об/мин., супернатант переносили в отдельные пробирки. Добавляли 1/10 объема 3M ацетата натрия и два объема 96% этанола. Образцы помещали в морозильную камеру (минус 20°C) на 24 ч. Центрифугировали 5 мин. при 13000 об/мин., супернатант переносили в отдельные пробирки и промывали 70%-м этиловым спиртом. Осадок сушили при комнатной температуре и растворяли в дистиллированной воде.

Электрофорез выделенной ДНК проходил в 1%-м агарозном геле при напряжении 90V в течение 1 ч в TAE буфере (2M Tris, 1M уксусная кислота, 50 mM EDTA, pH – 8). После растворения агарозы в TE буфере (10 mM Tris, 1 mM EDTA) в раствор вносили

5 мкл бромистого этидия. В одну лунку геля – 3 мкл образца. В работе использовали электрофоретическую камеру Biorad (США). В качестве стандартов молекулярного веса на одну дорожку наносили 3 мкл Lambda DNA/HindIII Marker (Thermo Scientific, США). Детекцию результатов осуществляли при помощи трансиллюминатора Super-Bright (Vilber, Франция) и геледокументирующей системы Doc-Print CX3 (Vilber, Франция). Концентрацию приблизительно определяли в программе ImageJ по интенсивности свечения полосы ДНК в сравнении со стандартами молекулярного веса известной концентрации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод экстракции с применением коммерческого набора ГМО-СОРБ-Б основан на лизисе клеток со СТАВ, очистке хлороформом, сорбции ДНК на силиконизированных частицах и ее последующем осаждении. Высокомолекулярная ДНК визуально заметна в образцах, которые были подвергнуты лизису в течение 1 ч, ее размер ориентировочно составляет 23 kb, концентрация – 580 нг/мкл (рис.1). В образцах с увеличением времени лизиса до 2 и 3 ч были выделены, в основном, низкомолекулярные фрагменты, а высокомолекулярная ДНК практически отсутствовала. Такие результаты, вероятно, связаны с низкой

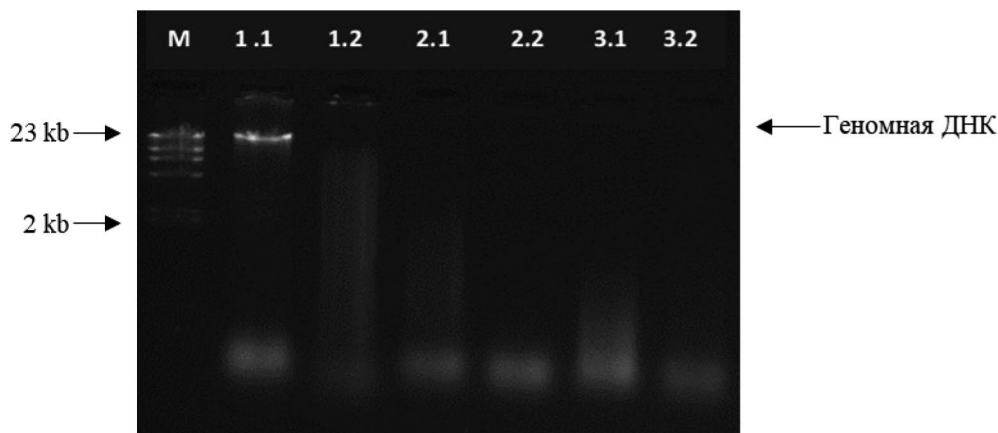


Рис. 1. Электрофореграмма результатов выделений ДНК *Hermetia illucens* с использованием коммерческого набора ГМО-СОРБ-Б. М – маркер: первая цифра образца обозначает длительность лизиса, вторая – номер повторности. То же на рис. 2–5.

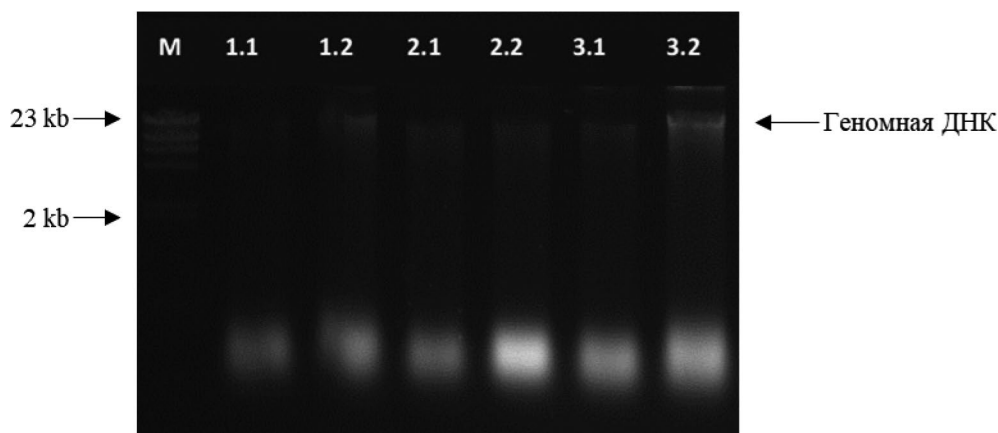


Рис. 2. Электрофореграмма результатов выделений ДНК *Hermetia illucens* с использованием тиоцианата гуанидина.

эффективностью данного набора в применении к насекомым, так как основная область его использования в соответствии с инструкцией — растительные и пищевые субстраты. Рекомендованная длительность лизиса для него составляет 1 ч, а увеличение времени могло негативно сказаться на результатах. В работе [7], где также был набор ГМО-СОРБ-Б, концентрация оказалась выше 70 нг/мкл. Преимущество этого способа выделения ДНК — быстрота и отсутствие необходимости работы с фенолом (токсичный реактив).

В научной литературе отсутствуют данные о выделении ДНК из насекомых с помощью тиоцианата гуанидина. Результаты электрофоретического разделения ДНК, выделенной при его применении, представлены на рисунке 2. Наибольшая концентрация ДНК характерна для образцов, подвергнутых лизису в течение 3 ч — 650 нг/мкл. Размер экстрагированной ДНК ориентировочно соответствует 23 kb. В образцах, подвергнутых лизису в течение меньшего количества времени, концентрация ДНК оказалась ниже — 300...350 нг/мкл. Во всех образцах видны низкомолекулярные фрагменты ДНК, что может быть следствием активности клеточных нуклеаз при отсутствии хелатирующих агентов.

Метод, основанный на СТАВ, преимущественно применяют при выделении ДНК из растений, но некоторые исследования показывают его эффективность в отношении насекомых. [1] Несмотря на схожесть

метода с коммерческим набором ГМО-СОРБ-Б, полученные результаты достаточно сильно различаются. Выделенная ДНК во всех образцах представлена в основном высокомолекулярным фрагментом размером 23 kb, что свидетельствует о низкой степени деградации (рис. 3). Наибольшая концентрация ДНК характерна для образцов, подвергнутых лизису в течение 3 ч — 750 нг/мкл. Во всех остальных образцах концентрация ДНК — 600...650 нг/мкл. В работе [9], где оценивали выделение ДНК из тли *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) с помощью данного метода, были получены похожие электрофореграммы, но концентрация ДНК оказалась меньше — 120 нг/мкл. В другой работе, где экстракцию ДНК осуществляли из *Holcocerrus hippophaecolus* (Lepidoptera: Cossidae), также были получены схожие электрофореграммы, но концентрация была выше — 2140 нг/мкл. [2]

В следующем эксперименте мы оценивали влияние совместного эффекта СТАВ и SDS на экстракцию ДНК (рис. 4). Размер экстрагированной высокомолекулярной ДНК примерно соответствует результатам предыдущего эксперимента (23 kb), однако концентрация оказалась значительно ниже — 380...460 нг/мкл. Возможно, совместное действие двух детергентов имеет негативный эффект на экстракцию ДНК. Полученные данные коррелируют с результатами работы. [2] Увеличение длительности лизиса в этом эксперименте несущественно повлияло на результаты.

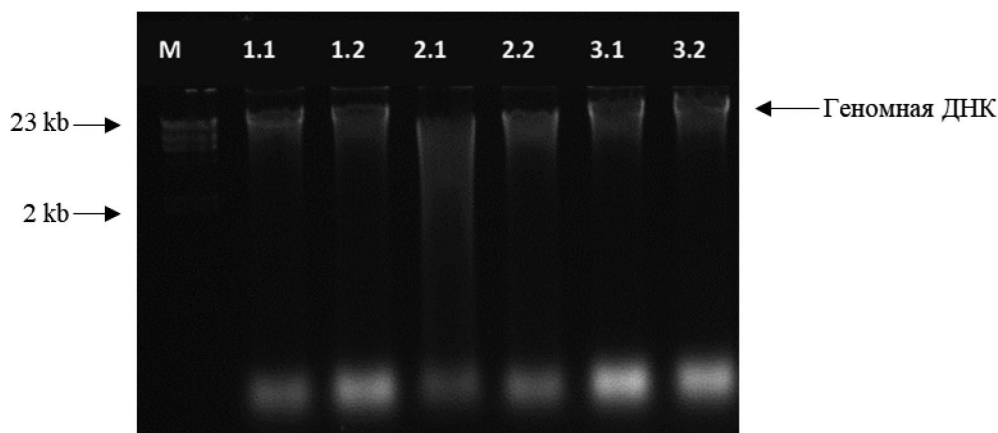


Рис. 3. Электрофореграмма результатов выделений ДНК *Hermetia illucens* с использованием СТАВ.

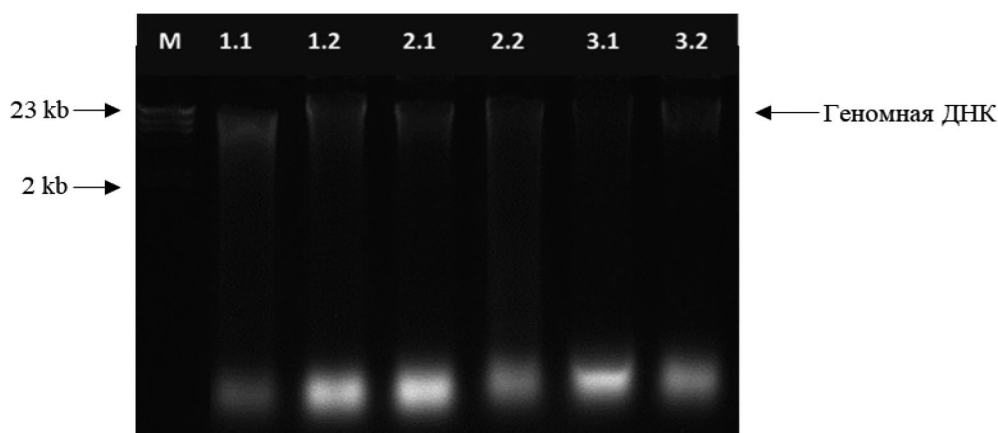


Рис. 4. Электрофореграмма результатов выделений ДНК *Hermetia illucens* с использованием СТАВ и SDS.

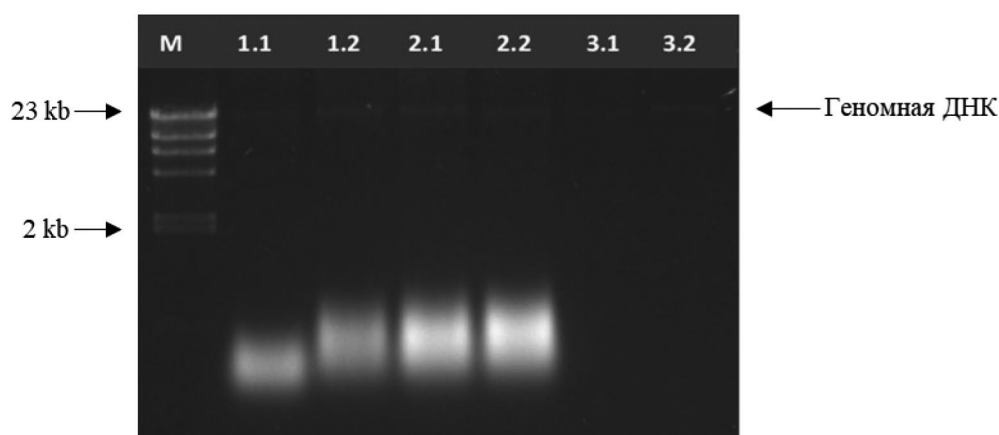


Рис. 5. Электрофореграмма результатов выделений ДНК *Hermetia illucens* с использованием SDS и EDTA.

Мы провели лизирование клеток с участием SDS в присутствии хелатирующего агента EDTA высокой концентрации (рис. 5). Высокмолекулярная геномная ДНК светится в виде компактной узкой полосы, что свидетельствует о высоком качестве очистки и низкой степени фрагментации. Ее размер ориентировочно составляет 23 kb. Концентрация ДНК во всех пробах примерно одинаковая – 50 нг/мкл. Для данного метода характерно отсутствие низкомолекулярных фрагментов, вероятно, из-за инактивации клеточных нуклеаз посредством EDTA.

Выводы. Обобщены и оценены разные методы экстрагирования ДНК из личинок *Hermetia illucens*. Наибольшая концентрация ДНК наблюдается при использовании СТАВ-метода – 750 нг/мкл. Для дальнейшего использования этой ДНК в молекулярно-генетических анализах необходима дополнительная очистка, что приведет к снижению концентрации. С SDS в присутствии большого количества EDTA удается добиться высокой степени очистки и низкой фрагментации, однако выход ДНК существенно снижен (50 нг/мкл). Таким образом, такую ДНК можно использовать для генетических анализов. Впервые получены данные о применении тиоцианата гуанидина для выделения ДНК из насекомых, свидетельствующие о достаточной степени его релевантности относительно *Hermetia illucens*. Все вышеперечисленные методы приводили к сопоставимому или более высокому выходу ДНК, по сравнению с коммерческим набором ГМО-СОРБ-Б. Увеличение длительности лизиса до 3 ч в методах, основанных на тиоцианате гуанидина и СТАВ, повышает концентрации ДНК.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Calderón-Cortés N., Quesada M., Cano-Camacho H., Zavala-Páramo G. A Simple and Rapid Method for DNA Isolation from Xylophagous Insects // International Journal of Molecular Sciences. 2010. Vol. 11(12). P. 5056–5064. <https://doi.org/10.3390/ijms11125056>
- Chen M., Zhu Y., Tao J., Luo Y. Methodological comparison of DNA extraction from *Holococerrus hippophaecolus* (Lepidoptera: Cossidae) for AFLP analysis // Forestry Studies in China. 2008. Vol. 10(3). P. 189–192. <https://doi.org/10.1007/s11632-008-0035-5>
- Dave N., Joshi T. A Concise Review on Surfactants and Its Significance // International Journal of Applied Chemistry. 2017. Vol. 13(3). P. 663–672. <https://doi.org/10.37622/IJAC/13.3.2017.663-672>
- Esser K.-H., Marx W.H., Lisowsky T. MaxBbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices // Nature Methods. 2006. Vol. 3(1). <https://doi.org/10.1038/nmeth845>
- Gautam A. Phenol-Chloroform DNA Isolation Method. Springer International Publishing. 2022. P. 33–39. https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4_3
- Green T.R., Popa R. Enhanced Ammonia Content in Compost Leachate Processed by Black Soldier Fly Larvae // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2012. Vol. 166(6). P. 1381–1387. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9530-6>
- Sadykova E.O., Tyshko N.V., Nikitin N.S. et al. Monitoring methods for novel insect-derived food: the PCR protocol for the detection and identification of *Hermetia illucens* insects based on the HEI-COI probe and primer system // Problems of Nutrition. 2023. Vol. 92(1). P. 36–44. <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2023-92-1-36-44>
- Shehadul Islam M., Aryasomayajula A., Selvaganapathy P. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods // Micromachines (Basel). 2017. Vol. 8(3) P. 83. <https://doi.org/10.3390/mi8030083>
- Suganthi M., Abirami G., Jayanthi M. et al. A method for DNA extraction and molecular identification of Aphids // MethodsX. 2023. Vol. 10. P. 102100. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102100>
- Tan S.C., Yiap B.C. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present // Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2009. Vol. 2009. P. 1–10. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>
- Zheng L., Hou Y., Li W. et al. Biodiesel production from rice straw and restaurant waste employing black soldier fly assisted by microbes // Energy. 2012. Vol. 47(1). P. 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2012.09.006>

Поступила в редакцию 05.06.2024
Принята к публикации 19.06.2024