

МЕТОДИКА ЗООЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 598.11:59.08

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БУККАЛЬНЫХ МАЗКОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
ОБРАЗЦОВ ДНК ЧЕШУЙЧАТЫХ ПРЕСМЫКАЮЩИХСЯ (SQUAMATA):
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ

© 2012 г. Е. П. Симонов^{1,2,3}, М. Винк²

¹ Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск 630091, Россия
e-mail: ev.simonov@gmail.com

² Institute of Pharmacy and Molecular Biotechnology, Heidelberg University, Heidelberg D-69120, Germany

³ National Centre for Biosystematics, Natural History Museum, University of Oslo, Oslo NO-0318, Norway

Поступила в редакцию 15.12.2011 г.

Проведен сравнительный анализ количественных и качественных характеристик образцов ДНК, выделенных с использованием проб трех типов: мазки буккального эпителия, фрагменты брюшных щитков и кончики хвостов. Образцы ДНК, выделенные из мазков, имеют в 2–3 раза меньшую концентрацию, чем образцы из других типов проб, тем не менее качество ДНК остается высоким. Выделенная ДНК была успешно использована для секвенирования митохондриальных генов, микросателлитного, ISSR и AFLP генотипирования. Использование буккальных мазков является эффективным, и в то же время наименее инвазивным и простым способом для получения проб ДНК у чешуйчатых пресмыкающихся.

Ключевые слова: выделение ДНК, буккальные мазки, пресмыкающиеся, Squamata.

В современных популяционно-генетических исследованиях большое внимание уделяется развитию минимально инвазивных методов получения образцов тканей для выделения ДНК, так как такие работы требуют большого количества проб от разных особей из одной популяции. В случае чешуйчатых рептилий для этих целей обычно используют остригание брюшных щитков (Marshall et al., 2008; Ferchaud et al., 2011) и кончика хвоста у змей (Jaggi, 2000; Manier, Arnold, 2005), а также концевых фаланг пальцев или кончиков хвостов у ящериц (Stow et al., 2001; Orpliger et al., 2007). У змей также возможен сбор образцов крови из хвостовой вены (Сиделева и др., 2004), но данный подход требует специальных навыков и не очень удобен для использования в полевых условиях. Кроме того, возможно использование неинвазивного метода получения образцов (без поимки животного) — выделение ДНК из сброшенной кожи (Fetzner, 1999), но, очевидно, что получить таким путем достаточное количество образцов из одной популяции часто невозможно.

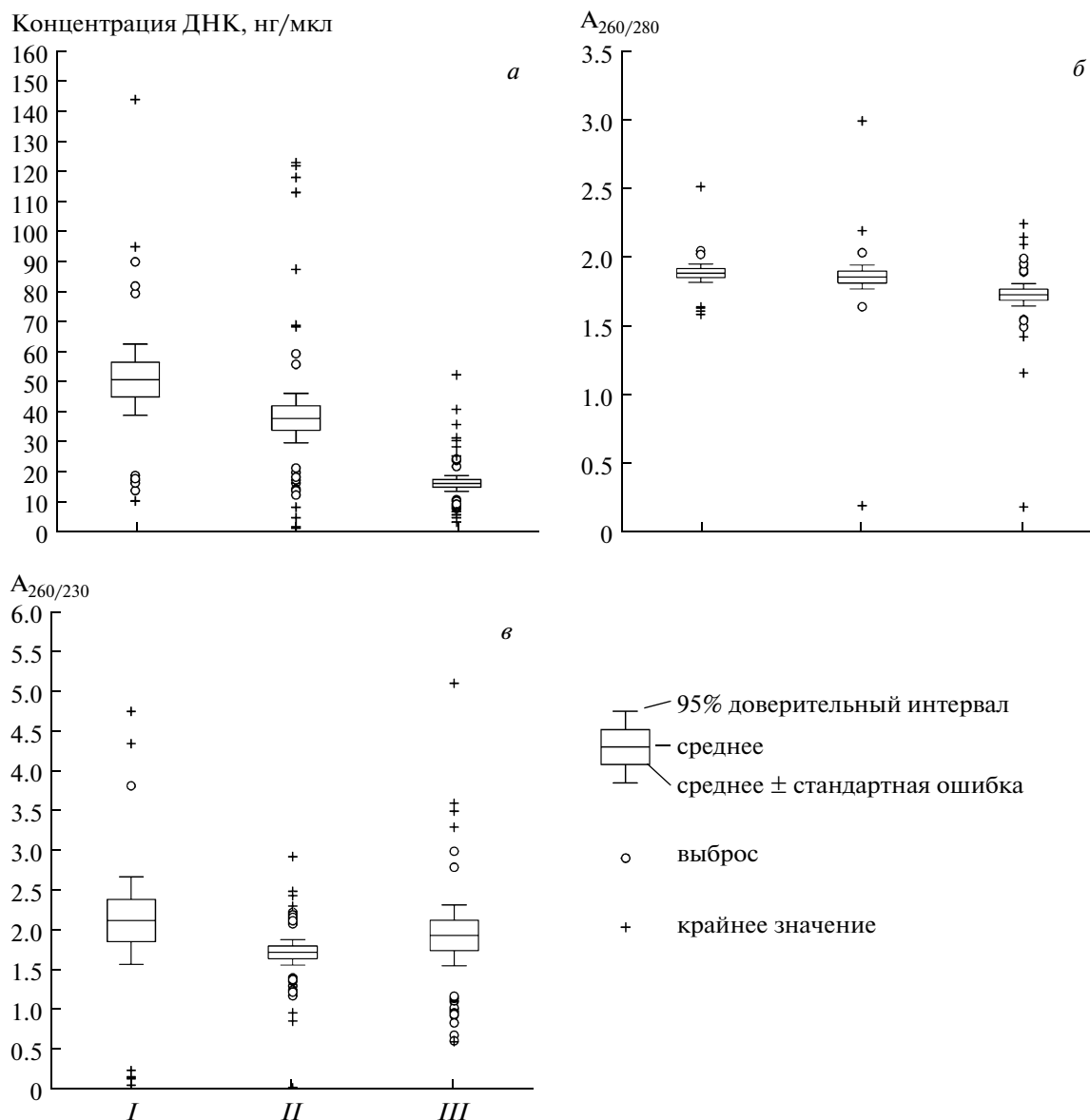
По всей видимости, наиболее простым и наименее инвазивным методом для получения образцов ДНК у рептилий является использование мазков буккального эпителия, взятых из ротовой полости при помощи ватной палочки (Poschadel, Moller, 2004; Veebee, 2008). Однако пригодность образцов, полученных таким способом, для анализов, требующих относительно больших коли-

честв недеградированной ДНК, ставится под сомнение (например, Broquet et al., 2007). В связи с этим возникает необходимость в проведении пилотных исследований выбранного метода сбора проб и выделения ДНК. Поэтому немалый интерес представляет анализ пригодности образцов ДНК, выделенных из различных типов проб, на материале, достаточно обширном для статистического анализа.

Целью настоящей работы является анализ результатов использования мазков буккального эпителия в сравнении с результатами взятия двух других распространенных типов проб (кончики хвостов и брюшные щитки) для получения и дальнейшего исследования образцов ДНК. Данные для анализа собраны в ходе популяционно-генетического исследования обыкновенного щитомордника (*Gloydius halys* (Pallas 1776), Squamata: Serpentes, Viperidae).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Сбор образцов и выделение ДНК. Материалом для данного исследования послужили 132 образца обыкновенного щитомордника (*G. halys*) собранных на территории Новосибирской обл. в 2008–2010 г. Из них 53 — мазки со слизистого эпителия ротовой полости, 51 — фрагменты брюшных щитков (5–7 × 2–3 мм) и 28 — кончики хвостов (3–5 × 1–2 мм). Фрагменты щитков собирались во



Диаграммы размаха концентрации ДНК в 100 мкл (а), коэффициентов $A_{260/280}$ (б) и $A_{260/230}$ (в) в зависимости от типа пробы: I – кончик хвоста, II – фрагмент брюшного щитка, III – мазок из ротовой полости.

время стандартной процедуры мечения змей путем подрезания брюшных щитков (Brown, Parker, 1976). Для взятия образцов слизистого эпителия были использованы обычные ватные палочки без предварительной обработки. Для получения мазка ватным наконечником проводили по слизистой оболочке рта в течение 5–7 с, после чего наконечник отрезали и также как и другие образцы помещали в пробирки объемом 2 мл, содержащие около 1 мл 96%-го этанола. Непосредственно после взятия пробы в течение 3–5 дней находились при температуре окружающей среды, а последующее хранение осуществлялось при +4°C.

Выделение ДНК осуществляли следующим образом. К измельченным образцам тканей (в

случае с кончиками хвостов или брюшными щитками; при этом объемы материала были одинаковы) или ватным наконечникам добавляли 600 мкл буфера STE (10 мМ Трис-НСl pH 8.0, 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA pH 8.0), 50 мкл 20% SDS (pH 7.2), 20 мкл протеиназы К (20 мг/мл) и инкубировали при 56°C в течение 12–14 ч. Дальнейшую очистку ДНК осуществляли по стандартной методике фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989). ДНК осаждали при помощи изопропанола в присутствии 0.3 М ацетата натрия. После сушки осадок ДНК растворяли в 100 мкл ТЕ буфера (100 мМ Tris-Cl, 10 мМ EDTA pH 8.0).

Качественный и количественный анализ ДНК. Для визуальной оценки качества выделенной

Характеристика образцов ДНК, выделенных из проб трех типов

Тип пробы	<i>N</i>	Медиана	<i>SD</i>	<i>LQ-UQ</i>	Min-Max
Концентрация ДНК в 100 мкл (нг/мкл)					
Кончик хвоста	28	50.3	30.51	24.3–67.5	10.5–144.0
Брюшной щиток	51	31.0	29.30	22.0–39.0	4.1–123.0
Мазок	53	14.0	9.43	10.5–19.5	1.3–52.5
$A_{260/A280}$					
Кончик хвоста	28	1.9	0.17	1.8–2.0	1.6–2.5
Брюшной щиток	50	1.9	0.31	1.8–1.9	0.2–3.0
Мазок	53	1.8	0.30	1.6–1.9	0.2–2.3
$A_{260/A230}$					
Кончик хвоста	24	2.4	1.29	1.6–2.9	0.05–4.75
Брюшной щиток	49	1.9	0.55	1.4–2.1	0.01–2.93
Мазок	52	1.4	1.36	1.1–2.5	0.61–7.20

N – размер выборки, *SD* – стандартное отклонение, *LQ* – нижняя квартиль, *UQ* – верхняя квартиль.

ДНК (степень деградации и наличие существенной примеси РНК) проводили ее электрофорез в 1% агарозном геле с добавлением этидиум бромида, используя 1% ТАЕ буфер при напряжении 85 V. Используя спектрофотометр NanoPhotometer (Implen GmbH, Германия) измеряли поглощение ультрафиолетового света в образцах ДНК при длинах волн 230 нм, 260 и 280 нм. Затем рассчитывали концентрацию ДНК (нг/мкл) по стандартной формуле (Sambrook et al., 1989), а также отношения поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм ($A_{260/A280}$) и 260 нм и 230 нм ($A_{260/A230}$). Коэффициент $A_{260/A280}$ отражает чистоту образца от белков, фенола и других веществ, поглощающих свет на 280 нм. Второй коэффициент $A_{260/A230}$ отражает чистоту образца от фенолят-ионов, тиоцианатов и других органических соединений (Sambrook et al., 1989).

Статистический анализ данных. Нами проведен сравнительный анализ следующих характеристик полученных образцов ДНК: концентрация ДНК в 100 мкл, соотношения $A_{260/A280}$ и $A_{260/A230}$. Данные разделены на три группы в соответствии с типом проб (кончик хвоста, брюшной щиток или мазок). Так как для экстракции ДНК в каждой группе проб использовалось несколько выделений, было проверено, существует ли значимая вариация между разными выделениями внутри каждой из групп. Односторонний дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса не выявил значимых различий ($p > 0.05$) медиан для всех трех параметров между разными выделениями в каждой из групп, поэтому образцы из разных выделений рассматривались вместе при дальнейшем анализе.

В каждой из групп все переменные были протестированы на отклонения от нормального распределения при помощи критерия Колмогорова-

Смирнова. Достоверные отклонения ($p < 0.05$) от нормальности были обнаружены в одном тесте из трех для каждой из переменных. Проверка на равенство дисперсий между тремя группами проводилась с использованием критерия Левена. Нулевая гипотеза о равенстве дисперсий оказалась недействительной ($p < 0.001$) для двух переменных (концентрация ДНК и $A_{260/A230}$). В связи с выявленными отклонениями от нормальности распределения и неравенством дисперсий мы использовали непараметрический односторонний дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса для тестирования гипотезы о влиянии типа образца на медианы исследуемых переменных. Исключение из данного анализа выбросов и экстремальных значений не влияло на результаты тестов, в связи с чем мы приводим только результаты тестов, включающих все данные. Статистический анализ выполнен в программе STATISTICA 8.0 (StatSoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Описательная статистика использованных в анализе переменных (концентрация ДНК, коэффициенты $A_{260/A280}$ и $A_{260/A230}$) для каждой из групп образцов представлена в таблице и на рисунке. Односторонний дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса выявил значимое влияние типа образца на медианные значения концентрации ДНК ($H_{n=132} = 45.827, p < 0.001$) и соотношения $A_{260/A280}$ ($H_{n=131} = 12.634, p = 0.002$). Согласно апостериорным тестам в обоих случаях разница медиан объясняется значимыми различиями между образцами ДНК, полученными при помощи мазков, и образцами, полученными из фрагментов брюшных щитков и кончиков хвостов. В то же время не было обнаружено влияния типа образца на

$A_{260/A230}$ ($H_n = 125 = 4.496$, $p = 0.106$). Гель-электрофорез полученных образцов ДНК не выявил значительной примеси РНК. ДНК, выделенная из всех типов образцов, являлась высокомолекулярной, без заметной деградации.

Таким образом, образцы ДНК, выделенные из мазков, имеют в 2–3 раза меньшую концентрацию, чем образцы из брюшных щитков или кончиков хвостов. В то же время получаемых количеств (в среднем 16.4 ± 1.29 нг/мкл при растворении в 100 мкл) вполне достаточно для проведения анализов любого рода. Сходные результаты при использовании мазков ротового эпителия были получены для обыкновенной квакши (*Hyla arborea*) 14 ± 8.4 мкл/нг и альпийского тритона (*Triturus alpestris*) 8 ± 4.2 нг/мкл (Broquet et al., 2007). В предыдущих работах, посвященных тестированию на амфибиях и рептилиях методики использования мазков из ротовой полости, для выделения ДНК применяли только коммерческие наборы, специально предназначенные для выделения ДНК из мазков (Pidancier et al., 2003; Poschadel, Moller, 2004; Beebee, 2008). Нами был использован стандартный метод фенол-хлороформной экстракции, и он продемонстрировал хорошие результаты при выделении ДНК из мазков. Данный метод может быть полезен при ограниченном бюджете или большом масштабе исследований

Образец ДНК считается “чистым” при коэффициентах $A_{260/A280}$ и $A_{260/A230}$ равных 1.8 и 2.0 соответственно (Sambrook et al., 1989). ДНК выделенная из брюшных щитков и кончиков хвостов отличается достоверно более высокими значениями $A_{260/A280}$ по сравнению с ДНК из мазков. В то же время $A_{260/A230}$ не демонстрирует достоверных различий между группами, несмотря на более заметную разницу средних и медиан (таблица, рисунок) и изменяется от 1.4 (мазки) до 2.4 (кончики хвостов). Полученные образцы ДНК использовались нами для секвенирования митохондриальных генов (Simonov, Wink, 2012), микросателлитного генотипирования (Simonov, Wink, 2011, 2012), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) и AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) генотипирования (неопубликованные данные). Методы ISSR и AFLP наиболее чувствительны к качеству и количеству используемой ДНК из всех вышечисленных (Meudt, Clarke, 2007), тем не менее нами были успешно генотипированы все образцы, использованные в данной работе.

В заключение можно рекомендовать использование буккальных мазков как наименее инвазивный и простой способ для взятия проб ДНК у чешуйчатых пресмыкающихся. Несмотря на меньший “выход” ДНК при использовании мазков, ее качественные характеристики (степень деградации, пригодность для последующих анализов) остаются

высокими. Использование фрагментов брюшных щитков, совмещенное с процедурой мечения у змей, также можно считать одним из наиболее приемлемых способов сбора проб у змей. При этом количество получаемой ДНК не уступает таковому при использовании кончиков хвостов – гораздо менее щадящей процедуры.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы выражаем благодарность И.С. Долгову, А.П. Симонову и В.К. Зинченко за помощь при проведении полевых работ и сборе материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Сиделева О.Г., Смирнова Ю.А., Ананьева Н.Б., 2004. Модифицированный метод полимеразной цепной реакции без выделения ДНК и его преимущества // Зоол. журн. Т. 83. № 10. С. 1270–1274.
- Beebee T.J.C., 2008. Buccal swabbing as a source of DNA from squamate reptiles // Conserv. Genet. V. 9. P. 1087–1088.
- Broquet T., Berset-Braendli L., Emaresi G., Fumagalli L., 2007. Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians // Conserv. Genet. V. 8. № 2. P. 509–511.
- Brown W.S., Parker W.S., 1976. A ventral scale clipping system for permanently marking snakes (Reptilia, Serpentes) // J. Herpetol. V. 10. № 3. P. 247–249.
- Fetzner J.W., 1999. Extracting high-quality DNA from shed reptile skins: a simplified method // BioTechniques V. 26. P. 1052–1054.
- Ferchaud A.L., Lyet A., Cheylan M., Arnal V., Baron J.P., et al. 2011. High genetic differentiation among French populations of the Orsini’s viper (*Vipera ursinii ursinii*) based on mitochondrial and microsatellite data: implications for conservation management // J. Hered. V. 102. № 1. P. 67–78.
- Jaggi C., 2000. Genetic variability in subpopulations of the asp viper (*Vipera aspis*) in the Swiss Jura mountains: implications for a conservation strategy // Biol. Conserv. V. 94. № 1. P. 69–77.
- Manier M.K., Arnold S.J., 2005. Population genetic analysis identifies source-sink dynamics for two sympatric garter snake species (*Thamnophis elegans* and *Thamnophis sirtalis*) // Mol. Ecol. V. 14. № 13. P. 3965–3976.
- Marshall J.C., Kingsbury B.A., Minchella D.J., 2008. Microsatellite variation, population structure, and bottlenecks in the threatened copperbelly water snake // Conserv. Genet. V. 10. № 2. P. 465–476.
- Meudt H.M., Clarke A.C., 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances // Trends Plant Sci. V. 12. № 3. P. 106–117.
- Oppliger A., Degen L., Bouteiller-Reuter C., John-Alder H.B., 2007. Promiscuity and high level of multiple paternity in common wall lizards (*Podarcis muralis*): data from microsatellite markers // Amphibia-Reptilia V. 28. № 2. P. 301–303.

- Pidancier N., Miquel C., Miaud C.*, 2003. Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians // *Herpetol. J.* V. 13. P. 175–178.
- Poschadel J.R., Moller D.*, 2004. A versatile field method for tissue sampling on small reptiles and amphibians, applied to pond turtles, newts, frogs and toads // *Conserv. Genet.* V. 5. P. 865–867.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.*, 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Simonov E., Wink M.*, 2011. Cross-amplification of microsatellite loci revealed multiple paternity in Halys pit viper (*Gloydius halys*) // *Acta Herpetol.* V. 6. № 2. P. 289–295.
- Simonov E., Wink M.*, 2012. Population genetics of Halys pit viper (*Gloydius halys*) at the northern distribution limit in Siberia // *Amphibia-Reptilia* V. 33. P. 273–283.
- Stow A.J., Sunnucks P., Briscoe D.A., Gardner, M.G.*, 2001. The impact of habitat fragmentation on dispersal of Cunningham's skink (*Egernia cunninghami*): evidence from allelic and genotypic analyses of microsatellites // *Mol. Ecol.* V. 10. № 4. P. 867–878.

THE USE OF BUCCAL SWABS FOR DNA SAMPLING OF SCALED REPTILES (SQUAMATA): A COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODS

E. P. Simonov^{1,2,3}, M. Wink²

¹ *Institute of Animal Systematics and Ecology, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk 630091, Russia
e-mail: ev.simonov@gmail.com*

² *Institute of Pharmacy and Molecular Biotechnology, Heidelberg University, Heidelberg D-69120, Germany*

³ *National Center for Biosystematics, Natural History Museum, University of Oslo, Oslo NO-0318, Norway*

A comparative analysis of quantitative and qualitative characteristics of DNA isolated from various kinds of tissue samples (buccal swabs, ventral scales and tail tips) was carried out. DNA extracted from buccal swabs had 2–3 times smaller concentration, than DNA from other sample types; nevertheless, the DNA content remained high. The extracted DNA has been successfully used for a sequencing of mitochondrial genes, microsatellite, ISSR and AFLP genotyping. While buccal swabs are the least invasive and simple approach, it is a very efficient way for DNA sampling of scaled reptiles.