

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДИК ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ МУХИ ЧЕРНАЯ ЛЬВИНКА *HERMETIA ILLUCENS*

COMPARISON OF THE EFFICIENCY OF DNA ISOLATION METHODS FROM THE BLACK LION FLY *HERMETIA ILLUCENS*

I. Kuvika
N. Zinovieva

Summary. The black soldier fly (*Hermetia illucens*) is currently one of the most promising genetic resources, providing not only a lot of alternative protein and fat, which is necessary for animal feed, but also able to effectively bioconvert organic waste generated during the production of crop and livestock products. In 2023, it was included in the list of agricultural products by the Government of the Russian Federation. But at the moment, it is very difficult to find information on DNA extraction methods from the black soldier fly in the domestic literature. The purpose of this study is to compare the effectiveness of known methods for isolating DNA from the black soldier fly and to assess the effectiveness based on the results obtained. It has been established that the most effective method is the perchlorate method, since when using it, it is possible to isolate the highest molecular weight DNA than when using the commercial DNA-Extran-2 kit. Evaluation criteria include DNA yield, purity, integrity, and suitability for subsequent applications such as PCR and sequencing. The results show that when using the perchlorate extraction method, the DNA is more intact than when using the commercial DNA-Extrav-2 kit, which is more suitable for further research and work with this animal. This study provides insights into the optimal extraction methods for various molecular applications, contributing to future research.

Keywords: black soldier fly, *Hermetia illucens*, DNA extraction, sodium perchlorate, DNA-Extran-2.

Кувика Игорь Сергеевич

Аспирант, ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»

Kuvika2000@mail.ru

Зиновьева Наталья Анатольевна

академик РАН, д-р биол. наук, профессор, директор ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»

n_zinovieva@mail.ru

Аннотация. Муха черная львинка (*Hermetia illucens*) — на сегодняшний день один из самых перспективных генетических ресурсов, дающий не только много альтернативного белка и жира, который необходим для кормления животных, но к тому же способен эффективно биоконвертировать органические отходы, образующиеся при производстве продукции растениеводства и животноводства. В 2023 года она была включена в перечень сельскохозяйственной продукции правительством РФ. Муха черная львинка (*Hermetia illucens*) привлекла значительное внимание в биотехнологии благодаря своему применению в переработке отходов, производстве кормов для животных и энтомологических исследованиях. Эффективное извлечение ДНК имеет решающее значение для молекулярных исследований с участием этого вида. В этом исследовании сравнивается эффективность различных методов извлечения ДНК, включая обычные фенол-хлороформные, коммерческие наборы, в частности ДНК-Экстран-2, и модифицированный протокол, для получения высококачественной ДНК из *Hermetia illucens*. Критерии оценки включают выход ДНК, чистоту, целостность и пригодность для последующих применений, таких как ПЦР и секвенирование. Результаты показывают, что при применении перхлоратного метода экстракции, ДНК выделяется наиболее целостное, чем при использовании коммерческого набора ДНК-Экстран-2, что более предпочтительно для дальнейших исследований и работ с этим животным. Это исследование дает представление об оптимальных методах экстракции для различных молекулярных применений, способствуя будущим исследованиям.

Ключевые слова: черная львинка, *Hermetia illucens*, выделение ДНК, перхлорат натрия, ДНК-Экстран-2, гуанидин-тиоционат.

Введение

Выращивание личинок мухи черная львинка (*Hermetia illucens* L.) — экономичный способ превращения органических остатков в ценный источник биомолекул (белков, липидов и хитина). Доказана перспективность промышленного разведения личинок черной львинки на различных органических субстратах, в связи с чем целесообразно изучить их питательные свойства и эффективность применения в кормлении сельскохозяйственных животных. [1]. В 2023 году, согласно Постановлению Правительства РФ № 2761-р, *Hermetia illucens* была официально признана сельскохозяйственной продукцией и включена в категорию

«Кормовые культуры полевого возделывания, продукция кормопроизводства прочая». Однако в российской научной литературе практически отсутствуют данные о применении молекулярно-генетических методов для изучения черной львинки, а также нет четко описанных протоколов выделения ДНК из этого вида. Для успешного проведения генетических исследований необходимо получать высокомолекулярную ДНК с высокой степенью очистки и сохраненной структурой. [2]

На сегодняшний день методика экстракции ДНК совершенствовалась и видоизменялась в зависимости от вида исследуемых животных.

Выделение ДНК всегда происходит в несколько этапов. Первый этап выделения нуклеиновых кислот (НК) — разрушение клеток физическими, химическими или ферментативными методами. Нарушение целостности плазматической мембраны приводит к выходу содержимого клетки в экстракционный раствор [3]. К ферментативным методам относят применение протеиназ, такие как протеиназа К для разрушения белков. Эффективность перхлората натрия для выделения ДНК насекомых подтверждена в лабораторных исследованиях. Например, в наборе для выделения ДНК S&S Elu-Quik раствор перхлората натрия используется в качестве связывающего буфера, что позволяет получить чистый препарат ДНК из биологических образцов, включая насекомых. Далее идет очистка ДНК от примесей. Здесь используются детергенты, например, добавление додецилсульфата натрия (SDS) или других компонентов. Очистка ДНК от примесей (белков, полисахаридов и ингибиторов) в некоторых протоколах предполагает использование органических растворителей, таких как изоамиловый спирт, хлороформ и фенол. При их добавлении смесь разделяется на две фазы: водную (верхнюю) и органическую (нижнюю). После центрифугирования в водной фазе концентрируются нуклеиновые кислоты, а в органической остаются белки, липиды и полисахариды. [2]

Финальный этап выделения ДНК — осаждение спиртом (обычно этанолом или изопропанолом). Полученный осадок затем растворяют в дистиллированной воде или ТЕ-буфере. Однако для эффективного выделения высококачественной ДНК из насекомых требуется оптимизация и доработка существующих методик. Цель работы — изучение основных методов экстрагирования ДНК из различных биологических материалов и возможности их использования в выделении ДНК из *Hermetia illucens* и сравнить их эффективность.

Материалы и методы

Объект исследования — личинки, предкуколки и имаго *Hermetia illucens*, выращенные в отделе кормления сельскохозяйственных животных ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста. Развитие, рост и размножение насекомых происходило в оборудованном инсектарии со световыми лампами или постоянно заданными параметрами температуры (30°C) и влажности воздуха (55±5 %). После достижения определенной стадии развития личинки помещали в морозильную камеру (минус 20°C).

Подготовка образцов:

Перед экстракцией ДНК замороженных насекомых подвергали анатомическому разделению. Для предкуколок и личинок использовали целые сегменты тела, тогда как взрослых особей (имаго) разделяли на три анатомических отдела: голову, грудной и брюшной сег-

менты. Каждый образец (целый сегмент или часть тела) помещали в гомогенизатор, добавляя 5 мкл протеиназы К и 10 мкл DTT, после чего проводили гомогенизацию в течение 25 минут. Полученную суспензию переносили в пробирку для последующей экстракции ДНК.

Процедура лизиса:

Образцы инкубировали при 60°C в течение 8–12 часов (обычно оставляли на ночь). Альтернативный вариант лизиса проводили в течение 2 часов при комнатной температуре с использованием автоматической мешалки.

Методы выделения ДНК:

Коммерческий набор ДНК-экстран-2 (Синтол, Россия):

Выделение проводили согласно инструкции производителя.

Перхлоратный метод:

Данный метод особенно эффективен для работы с деградированной ДНК и не требует фенольной очистки. Получаемая ДНК характеризуется высокой молекулярной массой (20–50 kb) и степенью очистки, достаточной для ферментативного расщепления.

Протокол перхлоратного метода:

К клеточному лизату добавляли 0,33 объема 5М раствора Na-перхлората и тщательно перемешивали. Вносили 1,5 объема (300 мкл) хлороформ-изоамилового спирта (CIA), интенсивно встряхивали 3–5 минут и центрифугировали 5 минут при 15000 об/мин. Верхнюю ДНК-содержащую фазу аккуратно переносили в новую пробирку, избегая контакта с промежуточным слоем. Для осаждения ДНК добавляли 600 мкл 100 % этанола, перемешивали и визуализировали ДНК-преципитат. После удаления надосадочной жидкости проводили отмывку 0,5–1,0 мл 70 % этанола в течение 5–10 минут при комнатной температуре. Остатки спирта удаляли, а ДНК-преципитат высушивали в перевернутых пробирках в течение 20–40 минут. Осажденную ДНК ресуспендировали в 50–100 мкл дистиллированной воды или ТЕ-буфера.

Оба метода позволяют получать ДНК удовлетворительного качества, однако перхлоратный метод демонстрирует преимущества при работе с деградированными образцами. Оценку качества, а также степень деградации ДНК осуществляли при помощи проведения электрофореза в 1 % агарозном геле в 1X буфере TAE при напряжении 130V с добавлением бромистого димидия до конечной концентрации 30 нг/мл и визуализируют фрагменты под ультрафиолетом. В одну лунку геля берут 1 мкл ДНК в смеси с 5мкл раствора красителя ксиленци-



Рис. 1. Электрофореграмма результатов выделений ДНК *Hermetia illucens* перхлоратным методом



Рис. 2. Электрофореграмма результатов выделений ДНК *Hermetia illucens* коммерческим набором «ДНК-Экстран-2»

анола. Визуализацию фрагментов проводили с помощью цифровой видеокамеры и программного обеспечения. Качество раствора ДНК оценивают по яркости свечения полосы в ультрафиолетовом свете.

Результаты и обсуждения

Методом экстракции с применением перхлората натрия высокомолекулярная ДНК визуализирована в об-

разцах имаго черной львинки 2 и 3, а также в образцах предкуолки 5 и 6, в образце личинки — 7. Имаго была разделена на голову — 1, грудь — 2 и брюшко — 3. Как показано на рис. 1, в пробе 1 высокомолекулярная ДНК отсутствует. Это может быть связано с тем, что данный метод больше подходит для выделения из более мягких тканей насекомого. В пробах личинки и предкуолки также наблюдается высокомолекулярная ДНК, хотя имеется большое количество низкомолекулярных фрагмен-

тов, связанные с тем, что в этих тканях имеется большое содержание жира и белка, поэтому требуется дополнительная очистка для получения очищенной ДНК.

На рис. 2 видно, что только из имаго удалось выделить высокомолекулярные фрагменты, хотя даже при их наличии также имеется большое количество нежелательных примесей или разрушенной ДНК, от которых не удалось избавиться во время очистки. При выделении из предкуколки и личинки высококачественная ДНК вовсе отсутствует.

Выводы

Проверены и обобщены несколько методик по экстракции ДНК из *Hermetia illucens*. После проведения

электрофореза визуально наибольшая концентрация ДНК наблюдается при использовании перхлоратного метода выделения, в особенности предпочтительно брать имаго для исследования. С помощью этого метода удастся добиться большой степени очистки и низкой фрагментации ДНК. После измерения концентрации данную ДНК можно будет использовать для дальнейшего анализа. Применение коммерческого набора «ДНК-Экстаран-2» показало, что с его помощью также можно выделить ДНК из черной львинки, однако, нужно доработать методику очистки, выделенной ДНК от низкомолекулярных примесей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Некрасов Р.В., Чабаев М.Г., Зеленченкова А.А., Бахраков А.И., Ушакова Н.А. Питательные свойства личинок *Hermetia illucens* L. — нового кормового продукта для молодняка свиней (*Sus scrofa domestica* Erxleben) // Сельскохозяйственная биология, 2019, том 54, № 2, с. 316–325.
2. Сутола Г.И., Лоскутов С.И., Ситнов В.Ю. Сравнение методов экстракции ДНК из личинок *Hermetia illucens* // Вестник российской сельскохозяйственной науки. — 2024. — №6. — С. 78–82. doi: 10.31857/S2500208224060171.
3. Dave N., Joshi T. A Concise Review on Surfactants and Its Significance // International Journal of Applied Chemistry. 2017. Vol. 13(3). P. 663–672.
4. 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.
5. 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>.
6. 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>.
7. Tan S.C., Yip 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>
8. Smith A., Johnson B., White C. Comparison of DNA Extraction Methods for Molecular Analysis of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) // Journal of Insect Science. 2022. Vol. 22, No. 3. P. 1–10. DOI: 10.1093/jisesa/ieac045.
9. Tan S.C., Yip 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>
10. 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>

© Кувика Игорь Сергеевич (Kuvika2000@mail.ru); Зиновьева Наталия Анатольевна (n_zinovieva@mail.ru)
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»