

О. В. Череватов, Р. А. Волков

## Молекулярна організація 5S рДНК *Satyrus drias* (Lepidoptera)

(Представлено членом-кореспондентом НАН України В. А. Кунахом)

Досліджено молекулярну організацію і еволюцію 5S рДНК у метелика *Satyrus drias*. Виявлено, що вид має незвичайно довгий 5S рДНК повтор, який містить 120 пн, що належать кодуєчій ділянці, та 959 пн, що належать міжгенному спейсеру. Порівняння послідовностей показало, що спейсерна ділянка містить два інсерційні елементи — *E11* (265 пн) та *E12* (73 пн), які мають очевидну подібність (65–88%) до фрагментів, локалізованих у не кодуєчих ділянках геному різних видів метеликів. Згідно з отриманими даними, довгий міжгенний спейсер *Satyrus drias* вказує на появу в процесі еволюції двох транспозицій *E11* і *E12* з інших геномних регіонів.

Присутність великої кількості повторюваних послідовностей ДНК є характерною особливістю еукаріотичних геномів. Зручною моделлю для вивчення закономірностей молекулярної еволюції тандемно організованих повторюваних послідовностей є 5S рДНК, яка присутня в геномах усіх еукаріотів. Вона складається з повторюваних одиниць, кожна з яких містить консервативну послідовність, що кодує 5S рРНК та мінливу спейсерну ділянку. Аналіз структури і поліморфізму 5S рДНК широко застосовується в молекулярній таксономії багатьох груп організмів, особливо у вищих рослин [1–3]. Проте організація та еволюція цієї ділянки геному у тварин, зокрема у комах, досліджені недостатньо. У зв'язку з цим мета нашого дослідження полягала у вивченні молекулярної організації 5S рДНК у метелика *Satyrus drias* (Scopoli, 1763).

Для досліджень використовували метеликів *S. drias*, що були зібрані протягом липня 2008 р. на території с. Отроків (Новоушицький р-н Хмельницької обл.). Загальну ДНК екстрагували з тіла метелика згідно зі стандартним протоколом з використанням як детергента додецилсульфату натрію [4].

Для ампліфікації повторюваної ділянки 5S рДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували пару праймерів RV0803 (5'-catagcggccgctgtgacttggatgggtga-3') та RV0804 (5'-cattgcccgccttgcttacttcggtgatcgga-3'), які було розроблено нами раніше [5]. Ці праймери є комплементарними до ділянки, що кодує 5S рРНК у декількох видів членистоногих, та містять на 5'-кінці додатковий сайт впізнавання рестриктази *Not I*, який використовували для подальшого клонування ПЛР-продуктів. Кількість ДНК для ПЛР становила 50 нг на реакцію. Ампліфікацію ДНК проводили в середовищі такого складу: 1 × буфер для ПЛР (PCR-buffer, Qiagen, США), MgCl<sub>2</sub> — 0,75 мМ, суміш dNTP — 0,2 мМ кожного, праймери — 1 мМ кожного, ДНК-полімераза (HotStartTaq, Qiagen) — 1 од. активності на реакцію. Загальний об'єм реакційної суміші становив 20 мкл. ПЛР проводили з використанням приладу MiniCycler (MJ Research Inc, США) за такою програмою: 1) початкова активація ДНК-полімерази — 95 °C, 15 хв; 2) денатурація ДНК — 94 °C,

45 с; 3) посадка праймерів — 53 °С, 1 хв; 4) синтез ДНК — 72 °С, 2 хв; 5) закінчення ампліфікації — 72 °С, 8 хв.; 6) припинення реакції — 4 °С. Загальна кількість циклів ампліфікації — 32. Для аналізу результатів ПЛР використовували електрофорез у агарозному гелі.

Отримані ПЛР-продукти обробляли рестриктазою *Not I* та лігували по липких кінцях у плазміді рLitmus 38 з використанням Т4 ДНК-лігази (Fermentas, Литва). Трансформацію компетентних клітин лінії *Escherichia coli* XL-blue проводили методом електропорації. Присутність вставки у складі рекомбінантних плазмід перевіряли методом blue-white colony selection та підтверджували рестриктазним картуванням. Плазміди виділяли методом лужного лізису [4]. Ферментативні реакції проводили згідно з рекомендаціями фірми-постачальника.

Вставки 5S рДНК відібраних клонів сиквенували з використанням Big Due Terminator Cycle Sequencing Kit на сиквенаторі ABI Prism 310 (PE Applied Biosystems, США). Отримані послідовності задепоновано у базі даних Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) під номерами HM042868 та HM042869. Первинну обробку та аналіз отриманої первинної нуклеотидної послідовності виконували за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакета програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR [6]. Пошук послідовностей у Genbank здійснювали за допомогою програми BLAST [7].

У результаті ПЛР-ампліфікації повторюваної ділянки 5S рДНК *S. drias* було виділено фрагменти ДНК завдовжки близько 100 та 1000 пн, які було клоновано в бактеріальний вектор. За результатами скринінгу з використанням рестриктазного картування було ідентифіковано чотири рекомбінантні плазміди, які містили вставку завдовжки близько 1000 пн. Дві з цих плазмід було сиквеновано. Аналіз отриманих нуклеотидних послідовностей показав, що обидва сиквеновані клони мають однакову довжину 1063 пн та відрізняються лише чотирма нуклеотидами, що відповідає рівню подібності між ними у 99,7%. Практична ідентичність цих двох випадково обраних клонів вказує на високий рівень концертної еволюції повторів 5S рДНК у геномі *S. drias*.

Отримані нами послідовності було порівняно з 5S рДНК тутового шовкопряда (*Bombyx mori* L.) — єдиною послідовністю 5S рДНК лускокрилих, яка наявна в базі даних Genbank. Завдяки цьому було визначено границі кодуючої ділянки та розраховано довжину міжгенного спейсера (МГС) 5S рДНК *S. drias* — 959 пн, яка виявилась набагато більшою, ніж у *B. mori* — 147 пн. Раніше із застосуванням ПЛР нами було оцінено довжину повторюваної ділянки у деяких інших представників булавоносих лускокрилих та встановлено, що в більшості випадків вона знаходиться в межах від 140 до 300 пн [5]. Порівняння наших нових даних з результатами, отриманими раніше для інших видів тварин [8–11] та рослин [1–3], свідчить про те, що 5S рДНК *S. drias* має один з найдовших МГС серед усіх досліджених еукаріотів.

Порівняння МГС *S. drias* з МГС *B. mori* виявило практично повну відсутність подібності між цими двома послідовностями. Проте пошук, проведений у базі даних Genbank з використанням програми BLAST [7], показав, що в межах МГС *S. drias* присутні два елементи — E11 та E12 (рис. 1), які мають подібність у 65–80% (E11, рис. 2) та 80–88% (E12, рис. 3) з декількома послідовностями ДНК з геномів метеликів, що належать до різних родин (табл. 1, 2). E11 та E12 мають розміри 265 та 73 пн і розташовані відповідно на відстані 75 та 718 пн від 5' кінця МГС. Гомологію між послідовністю МГС *S. drias* та послідовностями з Genbank було знайдено або по всій довжині, або лише в окремих частинах E11 та E12.

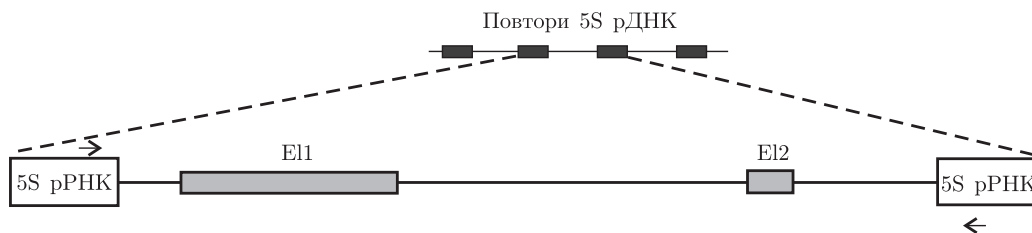


Рис. 1. Розташування елементів E1 та E2 у спейсерній ділянці 5S рДНК *Satyrus drias*

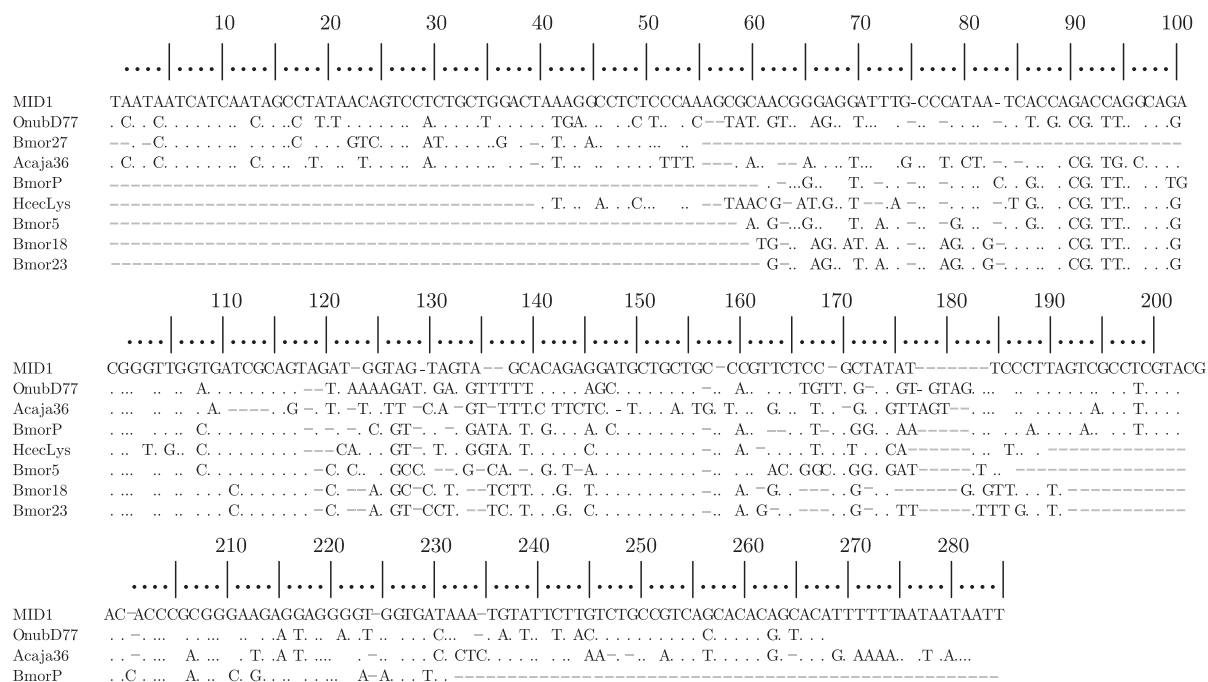


Рис. 2. Вирівнювання 5SR послідовностей ДНК, які мають подібність з елементом E1 5S рДНК *Satyrus drias*. Позначення послідовностей відповідають таким у табл. 1

Таблиця 1. Послідовності ДНК, які мають подібність з елементом E1 5S рДНК *Satyrus drias*

Умовне позначення послідовності	Номер послідовності в базі даних	Вид	Родина	Інформація про послідовність
Асаја36	AJ809379	<i>Arctia caja</i>	Arctiidae	Мікросателітний клон Асаја36
Bmor5	AP009029	<i>Bombix mori</i>	Bombycidae	Послідовність хромосоми 5 (ВАС клон 520F12)
Bmor18	AP009035	<i>B. mori</i>	Bombycidae	Послідовність хромосоми 18 (ВАС клон 535J11)
Bmor23	AP009022	<i>B. mori</i>	Bombycidae	Послідовність хромосоми 23 (ВАС клон 513P13)
Bmor27	AP008992	<i>B. mori</i>	Bombycidae	Послідовність хромосоми 27 (ВАС клон 001D20)
HcecLys	M60914	<i>H. cecropia</i>	Saturniidae	Інтрон 1 гена лізоциму
OnubD77	DQ354701	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Crambidae	Мікросателітна послідовність D77

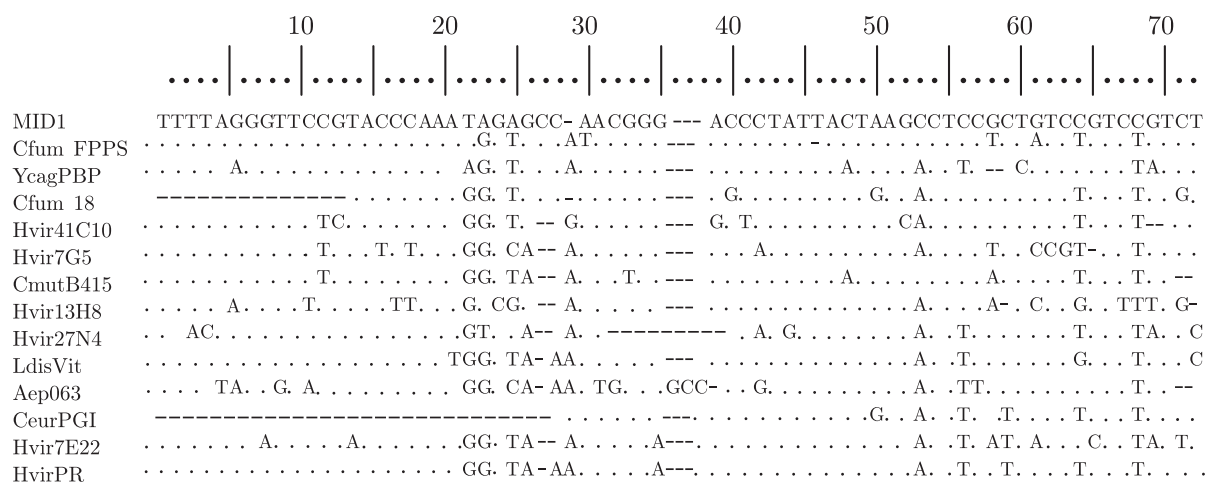


Рис. 3. Вирівнювання 5SR послідовностей ДНК, які мають подібність з елементом El2 5S рДНК *Satyrus drias*. Позначення послідовностей відповідають таким у табл. 2

Виявлені нами 5SR-послідовності (від англійського: 5S rDNA spacer related), що гомологічні до E11 та E12, знаходяться в некодуючих ділянках (промоторах, інтронах, 3' нетрансльованих зонах) різних генів, що кодують білки, у міжгенних районах або у фланкуючих зонах мікросателітних послідовностей (табл. 1, 2). У деяких видів знайдено по дві і більше ділянок у геномі, які мають подібність до E11 та E12. Наприклад, у *B. mori* 5SR-послідовності, гомологічні до E11, присутні на хромосомах 5, 6, 18, 23 та 27 (див. табл. 1). Отже, можна стверджувати, що ідентифіковані нами 5SR-ділянки належать до групи диспергованих повторюваних послідовностей. Оскільки 5SR-по-

Таблиця 2. Послідовності ДНК, які мають подібність з елементом El2 5S рДНК *Satyrus drias*

Умовне позначення послідовності	Номер послідовності в базі даних	Вид	Родина	Інформація про послідовність
Aep063	DQ380840	<i>Arhopala epimuta</i>	Lycaenidae	Мікросателітний клон AEP063
CmutB415	EF187470	<i>Calephelis mutica</i>	Riodinidae	Мікросателітний клон CMB415
CfumFPPS	AY962308	<i>Choristoneura fumiferana</i>	Tortricidae	Міжгенна ділянка після гена фарнезил дифосфат синтази
Cfum18	FJ542026	<i>Ch. fumiferana</i>	Tortricidae	Мікросателітний клон Fum18
CeurPGI	DQ205092	<i>Colias eurytheme</i>	Pieridae	Інtron 9 гена фосфоглюкозоізомерази (PGI)
HvirPR	AJ748325	<i>Heliothis virescens</i>	Noctuidae	3'-UTR (нетрансльована ділянка) гена рецептора феромону
Hvir7E22	CU856076	<i>Heliconius melpomene</i>	Nymphalidae	Геномний клон AENM-7E22
Hvir7G5	CU462858	<i>H. melpomene</i>	Nymphalidae	Геномний клон AENM-7G5
Hvir13H8	CU525306	<i>H. melpomene</i>	Nymphalidae	Геномний клон AENM-13H8
Hvir27N4	CU468009	<i>H. melpomene</i>	Nymphalidae	Геномний клон AENM-27N4
Hvir41C10	CR974474	<i>H. melpomene</i>	Nymphalidae	Геномний клон AENM-41C10
LdisVit	U90756	<i>Lymantria dispar</i>	Lymantriidae	Промоторна ділянка гена вітелогеніну
YcagPBP	AF177661	<i>Yponomeuta cagnagellus</i>	Yponomeutidae	Інtron 1 гена білка зв'язування феромону (PBP)

слідовності присутні в геномах метеликів з різних родин, можна висунути припущення, що ця група повторюваних послідовностей виникла на ранніх етапах еволюції ряду лускокрилих, ще до дивергенції відповідних родин. На користь такої точки зору свідчить те, що виявлені нами варіанти 5SR-послідовностей досить сильно відрізняються між собою (див. рис. 2, 3), тобто встигли дивергувати за рахунок накопичення мутацій. На більш пізніх етапах еволюції відбулося перенесення 5SR-послідовностей у спейсерну ділянку 5S рДНК *S. drias*, що спричинило збільшення її довжини. Цікаво, що в геномі *S. drias* нам не вдалось виявити варіантів 5S рДНК малої довжини, крім варіантів розміром у 100 пн, які виявились псевдогенами (дані не наводяться). Це означає, що після інсерції в МГС 5SR-послідовності розповсюдились по всіх копіях 5S рДНК, що можна пояснити концертним характером еволюції цієї родини тандемно організованих повторюваних послідовностей.

Зважаючи на те, що сиквенований нами варіант МГС має незвичайно великий розмір у порівнянні з іншими лускокрилими, може постати питання про функціональність такого гена. Оскільки при проведенні ПЛР з ДНК *S. drias* утворювались лише два продукти з довжинами близько 100 та 1000 пн, менший з яких є ампліфікатом псевдогенів, то можна вважати, що кодування 5S рРНК мають забезпечувати саме ділянки, які містять МГС великої довжини. Отже, поява протягом еволюції у складі МГС послідовностей E11 та E12 не порушила функціональну активність 5S рДНК у *S. drias*.

1. Scoles C. J., Gill G. S., Xin Z.-Y. et al. Frequent duplication and deletion events in the 5S RNA genes and the associated spacer region of the *Triticeae* // Plant Syst. and Evol. – 1988. – **160**. – P. 105–122.
2. Volkov R. A., Zanke C., Panchuk I. I., Hemleben V. Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding // Theor. and Appl. Genet. – 2001. – **103**. – P. 1273–1282.
3. Grimm G. W., Denk T. The reticulate origin of modern plane trees (*Platanus*, Platanaceae): A nuclear marker puzzle // Taxon. – 2010. – **59**, No 1. – P. 134–147.
4. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – Vol. 1–3.
5. Череватов О. В., Волков Р. А. Поліморфізм 5S рДНК комах ряду Lepidoptera // Біол. системи. – 2009. – **1**. – С. 7–10.
6. DNASTAR, 1998. – MegAlign 3.18 edit. Software distributed by DNASTAR Inc., Madison, WI, USA.
7. Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A. et al. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. – 1997. – **25**. – P. 3389–3402.
8. Nielsen J., Hallenberg C., Frederiksen S. et al. Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by an upstream DNA sequence // Ibid. – 1993. – **21**. – P. 3631–3636.
9. Suzuki H., Moriwaki K., Sakura S. Sequences and evolutionary analysis of mouse 5S rDNAs // Mol. Biol. Evol. – 1994. – **11**. – P. 704–710.
10. Robles F., Herrán R., Ludwig A. et al. Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in the ancient fish sturgeon // Genome. – 2005. – **48**. – P. 18–28.
11. Vierna J., Gonzalez-Tizon A. M., Martinez-Lage A. Long-term evolution of 5S ribosomal DNA seems to be driven by birth-and-death processes and selection in *Ensis* razor shells (Mollusca: Bivalvia) // Biochem. Genet. – 2009. – **47**. – P. 635–644.

O. V. Cherevatov, R. A. Volkov

### Molecular organization of 5S rDNA of *Satyrus drias* (Lepidoptera)

*The molecular organization and the evolution of 5S rDNA of Satyrus drias are studied. It is shown that this species possesses unusually long 5S rDNA repeats, which are composed of a 120-bp long coding region and a 959-bp long intergenic spacer. The comparison of sequence revealed that the spacer region contains two sequence elements, El1 (265 bp) and El2 (73 bp), which demonstrates a similarity (65–88%) to the sequences located in non-coding regions in genomes of several butterfly species. The results suggest that the long intergenic spacer of Satyrus drias appeared in the evolution as a result of the transposition of El1 and El2 from other genomic regions.*