

JAN PAWŁOWSKI, DARIUSZ KMIĘCIAK, RYSZARD SZADZIEWSKI, ADAM BURKIEWICZ

Próba izolacji DNA owadów z bursztynu bałtyckiego

TREŚĆ. Prace nad izolacją DNA z inkluzji owadów zatopionych w bursztynie bałtyckim nie doprowadziły do uzyskania pozytywnych wyników. Wszystkie produkty PCR uzyskane przy użyciu primerów uniwersalnych okazały się kontaminacjami przez DNA pochodzenia

Key words: Baltic amber, insects, PCR, DNA.

Odkrycie nowej techniki badań molekularnych polegającej na powielaniu śladowych ilości określonych fragmentów kwasów nukleinowych w reakcji łańcuchowej polimerazy, czyli PCR (polimerase chain reaction), pod koniec lat osiemdziesiątych spowodowało zrozumiałą rewolucję w wielu dziedzinach biologii.

Okazało się, że ta metoda pozwala również na badanie sekwencji nukleotydów wybranych regionów polimorficznych DNA zachowanego w martwych organizmach (Herrmann, Wilson 1994). Subfossylny DNA został wyizolowany po raz pierwszy z zamrożonych tkanek plejstocenijskiego mamuta sprzed 15 000 lat (Higuchi i in. 1984). Zbadane sekwencje nukleotydów wskazały, że mamut pod względem genetycznym jest jednakowo spokrewniony ze słoniem indyjskim, jak i afrykańskim. DNA wyizolowano również z kości tygrysa szablozębnego sprzed 14 000 lat (wg Grimaldiego 1993). Następnie odkryto dobrze zakonserwowany DNA w zmumifikowanych szczątkach ludzkich sprzed 2000-5200 lat, takich jak: skóra (Paabo i in. 1989), kości, zęby, mózg (Hagelberg i in. 1989, 1994).

Dalsze badania doprowadziły do wykrycia fosylnego DNA sprzed 17 mln lat w mioceńskich liściach z osadów jeziornych. Golenberg i inni (1990) zbadali DNA chloroplastu magnolii, natomiast Soltis i inni (1992) – cyprysa. Doniesienie Woodwarda i innych (1994) o pozytywnych próbach izolacji DNA ze skamieniałych górnokredowych kości dinozaura sprzed 80 mln lat zostało uznane za wątpliwe (Gibbons 1994). Woodward i inni (1994) uzyskali tylko 9 pozytywnych amplifikacji (na 494 przeprowadzone), a każda otrzymana sekwencja była inna.

Równocześnie przeprowadzono badania nad inkluzjami owadów z mioceńskiego bursztynu dominikańskiego (30 mln lat). DNA wyizolowano i zsekwenrowano u termitów *Mastotermes* (De Salle i in.

ludzkiego lub z zarodników grzybów. Natomiast produkty PCR otrzymane przy użyciu primerów specyficznych okazały się być artefaktami samego procesu amplifikacyjnego.

1992) oraz u bezżądłowej pszczoły *Proplebeia dominicana* (Cano i in. 1992). U *Proplebeia* uzyskano łańcuchy długie na 195, 555 i 597 par zasad (bp). Wszystkie próby były pozytywne, podobnie jak na materiale współczesnym z pszczoły rodzaju *Plebeia*.

Cano i inni (1993) opublikowali informację o uzyskaniu dotychczas najstarszego, liczącego bowiem 125-135 mln lat, DNA z ryjkowca (Coleoptera: Nemonychidae) z dolnokredowego bursztynu libańskiego. Uzyskane fragmenty DNA o długości 226 i 315 nukleotydów pochodziły z genu kodującego małą podjednostkę rybosomalnego RNA.

Zacytowane powyżej pozytywne wyniki uzyskane w badaniach nad subfossylnym i fossylnym DNA skłoniły nas do podjęcia próby wyizolowania DNA z owadów zatopionych w bursztynie bałtyckim.

Projekt ten zrealizowano w Laboratorium Paleobiologii i Systematyki Uniwersytetu Genewskiego.

Przeprowadzono ekstrakcje DNA z 26 muchówek (Diptera) należących do rodzin: Ceratopogonidae, Simuliidae, Mycetophilidae, Chironomidae, Limoniidae, Sciaridae, Rhagionidae, jak również z kilku mrówek (Hymenoptera: Formicidae) i dużego karalucha (Blattodea).

Bursztyn z inkluzją szlifowano tak, aby dotrzeć jak najbliżej owada, następnie skalpelem delikatnie zdejmowano warstwę powierzchniową aż do otwarcia inkluzji, której zawartość rozdrabniano cienką igiełką i wypłukiwano buforem TE za pomocą mikropipety. Czynności te wykonywano pod lupą w warunkach sterylnych (digestorium z laminarnym przepływem powietrza; bursztyn i narzędzia sterylizowano).

Izolowanie fosylnego DNA przeprowadzono trzema metodami: (1) z użyciem Chelex 100 (Bio-Rad, Richmond, CA) (Walsh i in. 1991), (2) z NaOH (Wang i in. 1993), (3) z proteinazą K.

Otrzymany produkt ekstrakcji był użyty do prób amplifikacji za pomocą PCR. W próbach tych wykorzystano 14 primerów uniwersalnych i specyficznych, skonstruowanych na podstawie sekwencji rybosomalnego DNA współczesnych owadów. Przeprowadzono ponad 100 amplifikacji, w wyniku których otrzymano kilkanaście fragmentów DNA, które zostały sklonowane i zsekwenjonowane.

Nie uzyskano żadnego fragmentu DNA, który by wskazywał, że pochodzi on z inkluzji owadziej. Wszystkie produkty PCR uzyskane przy użyciu primerów uniwersalnych okazały się kontaminacjami przez DNA pochodzenia ludzkiego lub z zarodników grzybów. Nato-

miast produkty PCR otrzymane przy użyciu primerów specyficznych okazały się być artefaktami samego procesu amplifikacyjnego.

Ponad półroczna praca nad realizacją tego projektu zakończyła się brakiem wyników pozytywnych. Nie można wykluczyć, że chemiczne właściwości bursztynu bałtyckiego, a szczególnie jego kwaśny odczyn, powodują całkowitą degradację fosylnego DNA. Niemniej jednak brak jakichkolwiek nowych doniesień dotyczących izolacji DNA z bursztynu dominikańskiego, które by uwierzytelniły poprzednie wyniki, zdaje się wskazywać na szczególne trudności uniemożliwiające, jak na razie, nadanie tego typu badaniom charakteru rutynowego.

Jan Pawłowski
 Université de Genève
 Département de Zoologie et Biologie Animale
 154 Rte de Malagnou
 CH-1224 Chêne-Bougeries, Szwajcaria

Dariusz Kmiecik
 Zakład Genetyki Człowieka PAN
 ul. Strzeszyńska 32
 60-479 Poznań

Ryszard Szadziwski
 Uniwersytet Gdański
 Katedra Zoologii Bezkręgowców
 al. Marszałka J. Piłsudskiego 46
 81-378 Gdynia

Adam Burkiewicz
 ul. Bliźniąt 5/3
 80-299 Gdańsk

LITERATURA

- Cano, R. J., Poinar, H. N., Roubik, D. W. & Poinar, G. O. 1992: Enzymatic amplification and nucleotide sequencing of portions of the 18S rRNA gene of *Proplebeia dominicana* (Apidae: Hymenoptera) isolated from 25-40 million year old Dominican amber. *Medical Scientific Research* **20**, 619-622.
- Cano, R. J., Poinar, H. N., Pieniazek, N. J., Acra, A. & Poinar, G. O. 1993: Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature* **363**, 536-538.
- DeSalle, R., Gatesy, J., Wheeler, W. & Grimaldi, D. 1992: DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science* **257**, 1933-1936.
- Gibbons, A. 1994: Possible Dino DNA find is greeted with skepticism. *Science* **266**, 1159.
- Golenberg, E. M., Giannasi, D. E., Clegg, M. T., Smiley, C. J., Durbin, M., Henderson D. & Zurawski, G. 1990: Chloroplast DNA sequence from a Miocene *Magnolia* species. *Nature* **344**, 656-658.
- Grimaldi, D. 1993: Forever in amber. *Natural History* **6**, 59-61.
- Hagelberg, E., Sykes, B. & Hedges, R. 1989: Ancient bone DNA amplified. *Nature* **342**, 485.
- Hagelberg, E., Quevedo, S., Turbon, D. & Clegg, J. B. 1994: DNA from ancient Easter Islander. *Nature* **369**, 25-26.
- Herrmann, B. & Wilson, A. C. (red.) 1994: *Ancient DNA*. 263 ss. Springer-Verlag. New York.
- Higuchi, R., Bowman, B., Friedberg, M., Ryder, O. A. & Wilson, A. C. 1984: DNA sequences from the Quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* **312**, 282-284.
- Paabo, S., Higuchi, R. G. & Wilson, A. C. 1989: Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 9709-9712.
- Poinar, G. O. & Hess, R. 1982: Ultrastructure of 40-million-year-old insect tissue. *Science* **215**, 1241-1242.
- Soltis, P. S., Soltis, D. E. & Smiley, C. J. 1992: An rbcL sequence from a Miocene *Taxodium* (bald cypress). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 449-451.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. & Higuchi, R. 1991: Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **10**, 506-513.
- Wang, H., Meiqing, Qi. & Cutler, A.J., 1993: A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acid Research* **21**, 4153-4154.
- Woodward, S. R., Weyard, N. J. & Bunnell, M. 1994: DNA sequence from Cretaceous period bone fragments. *Science* **266**, 1229-1232.

JAN PAWŁOWSKI, DARIUSZ KMIECIK, RYSZARD SZADZIEWSKI & ADAM BURKIEWICZ

Attempted isolation of DNA from insects embedded in the Baltic amber

Summary

The isolation of DNA from 26 insects embedded in the Baltic amber, mostly of the infraorder Culicomorpha, was not successful.

All DNA fragments amplified by polymerase chain reaction (PCR) were either artefacts or products of contamination.