

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОСАТЕЛІТНОЇ ДНК ВЕСЛОНОСА (*POLYODON SPATHULA*)

Х. М. Курта, О. О. Малишева, В. Г. Спиридонов
khrystyna.kurta@gmail.com

Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК,
Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Машинобудівників, 7, смт Чабани, Києво-Святошинський р-н,
Київська обл., 08162, Україна, info@quality.ua

Веслонос (*Polyodon spathula*) — цінний об'єкт штучного розведення та вирощування у рибницьких господарствах України. Визначення рівня генетичної мінливості його популяцій за допомогою нових молекулярно-генетичних підходів з використанням мікросателітних ДНК-маркерів є важливим завданням для оптимізації робіт з відтворення та збереження генофонду цього виду, ефективного культивування і підвищення обсягів виробництва цінної осетрової продукції.

Однією з умов успішної постановки полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) є оптимальний підбір режимів ампліфікації за температурою та тривалістю кожного з циклів, а також визначення складу реакційної суміші та концентрації відповідних реактивів. Варто зазначити, що ефективність ПЛР-реакції залежить передусім від таких складових: концентрація ДНК-матриці, концентрація йонів магнію (Mg^{2+}) та температура відпалу праймерів.

Метою досліджень була оптимізація умов ПЛР і їх оцінка шляхом підбору мікросателітних ДНК-маркерів, умов ампліфікації та складу реакційної суміші для забезпечення максимальної специфічності та ефективності ампліфікації мікросателітної ДНК веслоноса (*Polyodon spathula*).

На основі порівняльного аналізу попередніх досліджень поліморфізму мікросателітних ДНК-маркерів різних популяцій веслоноса нами було визначено, що найбільш інформативними для подальших досліджень є такі ДНК-маркери: *Psp12*, *Psp21*, *Psp26*, *Psp28*. Для підібраних маркерів визначено оптимальні умови ампліфікації, а саме температурні режими і тривалість циклів полімеразної ланцюгової реакції. Визначено оптимальний склад та концентрації компонентів реакційної суміші. Згідно з результатами досліджень, було визначено ефективну температуру відпалу праймерів (T_d) — 56 °С. Було встановлено оптимальні концентрації суміші праймерів по 5 рМ/мм³ кожного та кінцеву концентрацію йонів магнію (Mg^{2+}) на рівні 1,5 мМ у реакційній суміші загальним об'ємом 15 мм³. Отримані результати оптимізації умов ПЛР-ампліфікації мікросателітних локусів ДНК дозволять здійснювати подальші роботи з вивчення особливостей генетичної структури веслоноса для оцінки рівня генетичного поліморфізму цього виду риб в умовах сучасного ведення аквакультури.

Ключові слова: ВЕСЛОНОС, МІКРОСАТЕЛІТИ, ДНК-МАРКЕРИ, ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ, ГЕНОТИПУВАННЯ, ПОЛІМОРФІЗМ, ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА

OPTIMIZATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION CONDITIONS FOR STUDIES OF PADDLEFISH (*POLYODON SPATHULA*) MICROSATELLITE DNA

Kh. Kurta, O. Malysheva, V. Spyrydonov
khrystyna.kurta@gmail.com

Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products,
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
7 Mashynobudivnykiv str., Chabany village, Kyiv region, 08162, Ukraine, info@quality.ua

Paddlefish (*Polyodon spathula*) is a valuable object of artificial breeding in fish farms in Ukraine. The study of genetic variability of paddlefish populations using new molecular-genetic approaches with microsatellite DNA markers is an important task for optimization of reproduction and preservation of paddlefish gene pool, effective cultivation and production of valuable fish products.

The important conditions for successful polymerase chain reaction (PCR) are optimal temperature and duration of each cycle, components of the reaction mixture and their concentration. It should be noted that efficiency of PCR-reaction mainly depends on DNA-matrix concentration, concentration of magnesium ions (Mg^{2+}) and primer annealing temperature.

The objective of the studies was the optimization of PCR conditions and their assessment by selection of microsatellite DNA markers, amplification conditions and composition of the reaction mixture for maximum specificity and efficiency of paddlefish (*Polyodon spathula*) microsatellite DNA amplification.

Based on comparative analysis of previous studies of microsatellite DNA markers polymorphism of different paddlefish populations we have determined that Psp12, Psp21, Psp26, Psp28 DNA-markers are the most informative for further research. The optimal PCR-amplification conditions, namely a temperature regime and cycles duration of polymerase chain reaction were selected for mentioned DNA-markers. The optimal composition and concentration of components of the PCR stock mixture were defined. According to the results of the studies we have defined the effective annealing temperature of primers (T_A) is 56 °C, the optimal concentration of each primer is 5 pM/mm³ and the final concentration of magnesium ions (Mg^{2+}) is 1.5 mM. The total volume of the final PCR mixture is 15 mm³. The results of PCR conditions optimization for paddlefish microsatellite DNA loci allow us to conduct the further studies of the genetic structure for the evaluation of genetic polymorphism of this species in a modern aquaculture.

Keywords: PADDLEFISH, MICROSATELLITE, DNA-MARKERS, POLYMERASE CHAIN REACTION, GENOTYPING, POLYMORPHISM, GENETIC STRUCTURE

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ ДНК ВЕСЛОНОСА (*POLYODON SPATHULA*)

К. Н. Курта, О. А. Малышева, В. Г. Спиридонов
khrystyna.kurta@gmail.com

Украинская лаборатория качества и безопасности продукции АПК,
Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Машиностроителей, 7, пгт Чабаны, Киево-Святошинский район,
Киевская область, 08162, Украина, info@quality.ua

Веслонос (*Polyodon spathula*) — ценный объект искусственного разведения и выращивания в рыбодомных хозяйствах Украины. Определение уровня генетической изменчивости его популяций с помощью новых молекулярно-генетических подходов с использованием микросателлитных ДНК-маркеров является важной задачей для оптимизации работ по воссозданию и сохранению генофонда данного вида, эффективного культивирования и повышения объемов производства ценной осетровой продукции.

Одним из условий успешной постановки ПЦР является оптимальный подбор режимов амплификации за температурой и продолжительностью каждого из циклов, а также определения состава реакционной смеси и концентрации реактивов. Стоит отметить, что эффективность ПЦР-реакции главным образом зависит от таких составляющих, как концентрация ДНК-матрицы, концентрация ионов магния (Mg^{2+}) и температура отжига праймеров.

Целью исследований была оптимизация условий ПЦР и их оценка путем подбора микросателлитных ДНК-маркеров, условий амплификации и состава реакционной смеси для обеспечения максимальной специфичности и эффективности амплификации микросателлитной ДНК веслоноса (*Polyodon spathula*).

На основе сравнительного анализа предыдущих исследований полиморфизма микросателлитных ДНК-маркеров различных популяций веслоноса нами было определено, что наиболее информативными для дальнейших исследований являются следующие ДНК-маркеры: Psp12, Psp21, Psp26, Psp28. Для подобранных маркеров установлены оптимальные условия амплификации, а именно температурные режимы и продолжительность циклов полимеразной цепной реакции. Определен оптимальный состав и концентрации компонентов реакционной смеси. Согласно результатам исследований, было определено эффективную температуру отжига праймеров (T_A) — 56 °C. Было установлено оптимальные концентрации праймеров по 5 pM/mm³ каждого и конечную концентрацию ионов магния (Mg^{2+}) на уровне 1,5 mM в реакционной смеси общим объемом 15 мм³. Полученные результаты оптимизации условий ПЦР-амплификации микросателлитных локусов ДНК позволят осуществлять дальнейшие работы по изучению особенностей генетической структуры веслоноса для оценки уровня генетического полиморфизма данного вида рыб в условиях современного ведения аквакультуры.

Ключевые слова: ВЕСЛОНОС, МИКРОСАТЕЛЛИТЫ, ДНК-МАРКЕРЫ, ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ, ГЕНОТИПИРОВАНИЕ, ПОЛИМОРФИЗМ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА

Веслоніс (*Polyodon spathula*) — північноамериканський прісноводний вид ряду осетроподібних (*Acipenseriformes*), який є джерелом дороговартісної рибної продукції на вітчизняному та світовому ринках. Це швидко-ростучий, високопродуктивний вид, продуцент делікатесного м'яса та чорної ікри, тому він є цінним об'єктом штучного розведення та вирощування у рибницьких господарствах України [12]. Важливим завданням успішного ведення аквакультури веслоноса в Україні є нарощування чисельності та підвищення генетичної різноманітності його ремонтно-маточних стад, які попередньо формувалися з обмеженої кількості завезеного зі США іхтіологічного матеріалу 70–90-х рр. XX ст. За таких умов у штучно відтворюваних популяціях веслоноса може спостерігатися низький рівень генетичної мінливості, що призводить до зниження виживаності та продуктивності за рахунок близько-спорідненого схрещування (інбридингу) [11].

На сучасному етапі розвитку досліджень генетичних особливостей риб одним з найбільш перспективних методів є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). За останні роки метод ПЛР набув широкого застосування у дослідженнях в галузі біотехнології, молекулярної біології та генетики [3]. ДНК-дослідження на основі ПЛР дозволяють здійснювати діагностику інфекційних та спадкових захворювань, проводити дослідження геному цінних сільськогосподарських тварин з визначення їх продуктивних якостей, вирішувати селекційні проблеми, ідентифікувати генотипи, забезпечувати контроль якості сировини та продуктів харчування [2]. Тому у вивченні генетичних особливостей цінних об'єктів аквакультури ПЛР є важливою складовою аналізу та оцінки внутрішньовидової генетичної мінливості, проведення молекулярно-генетичної ідентифікації та встановлення походження особин з використанням поліморфних ДНК-маркерів [8].

Нині для визначення рівня генетичної мінливості найпоширенішим є застосування мікросателітних ДНК-маркерів. Мікросателіти — короткі (від 2 до 6 пар нуклеотидів, п.н.) тандемні повтори ядерної ДНК, які характеризуються високим рівнем поліморфізму і кодомінантним характером успадкування, за рахунок чого є ефек-

тивними маркерами для проведення популяційно-генетичних досліджень живих організмів [1]. На сьогодні для аналізу та оцінки генетичного поліморфізму веслоноса зазвичай застосовують вісім мікросателітних ДНК-маркерів, розроблених та впроваджених Heist et al. з метою вивчення та управління генетичними процесами у природних та штучних популяціях цього виду риб [4, 5, 6]. Використання мікросателітних ДНК-маркерів є актуальним для вивчення генетичної структури українських популяцій веслоноса, оптимізації відтворення та збереження його генофонду, ефективного культивування та підвищення обсягів виробництва цінної осетрової продукції [10, 11].

Однією з умов успішної постановки ПЛР є оптимальний підбір режимів ампліфікації за температурою та тривалістю кожного з циклів, а також визначення складу реакційної суміші та концентрації відповідних реактивів. Варто зазначити, що ефективність ПЛР-реакції залежить в основному від таких складових, як концентрація ДНК-матриці, концентрація йонів магнію (Mg^{2+}) та температура відпалу праймерів.

У процесі оптимізації умов ПЛР одним з важливих першочергових етапів є підготовка проби для постановки реакції, а саме виділення геномної ДНК із досліджуваного зразка біологічного матеріалу. Ефективність такої пробопідготовки визначається якістю екстрагованої ДНК та її концентрацією. Варто зазначити, що параметри полімеразної ланцюгової реакції та концентрації компонентів необхідно оптимізувати для кожної пари праймерів так, щоб ампліфікований локус не мав побічних неспецифічних продуктів, що негативно впливає на подальшу інтерпретацію результатів [2, 10].

Таким чином, метою досліджень була оптимізація умов ПЛР і їх оцінка шляхом підбору мікросателітних ДНК-маркерів, умов ампліфікації та складу реакційної суміші для забезпечення максимальної специфічності та ефективності ампліфікації мікросателітної ДНК веслоноса (*Polyodon spathula*).

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження була ДНК, виділена з біологічних зразків біоптату грудних

або хвостових плавців веслоноса з ДУ «Виробничо-експериментальний Дніпровський осетровий рибовідтворювальний завод» (Херсонська обл.). Відібраний біологічний матеріал фіксували 96 % етанолом у спеціально промаркованих стерильних пробірках. Виділення ДНК проводили згідно з інструкцією виробника з використанням набору «ДНК-сорб-В» («Амплі-Сенс», Росія). Кількість і якість виділеної ДНК перевіряли шляхом спектрофотометричного визначення її концентрації з використанням спектрофотометра «BioSpec-nano» («Shimadzu», Японія).

Статистичну обробку даних для визначення середніх показників проводили за допомогою пакету комп'ютерної програми *Microsoft Excel 2007* і *Statistica 6.1* («Statsoft», США).

Для досліджень було підібрано чотири мікросателітні ДНК-маркери: Psp12, Psp21, Psp26, Psp28 [4] («Синтол», Росія), нуклеотидні послідовності яких депоновано в міжнародній генетичній базі даних *GenBank* (табл. 1).

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили з використанням ампліфікатора «Veriti 96 Well» («Applied Biosystems», США). Для оптимізації ПЛР проводили підбір концентрації йонів магнію (Mg^{2+}) та температури відпалу праймерів (T_A). Для ПЛР-ампліфікації використовували такі реактиви: ПЛР-буфер («Fermentas», Литва) з додаванням $MgCl_2$ (25 мМ); дезоксинуклеотидтрифосфати (dNTP) («Thermo Scientific», Литва) концентрацією по 0,2 мМ кожного; суміш форвардного і реверсного локус-специфічних праймерів; 1,5U *Taq*-полімераза («Thermo Scientific», Литва) та ДНК-матриця.

Оптимальну концентрацію форвардного і реверсного локус-специфічних праймерів було встановлено при безпосередньому підборі — по 5 рМ/мм³ кожного. Загальний об'єм реакційної суміші був на рівні 15,0 мм³.

Результати ефективності проведення ПЛР оцінювали за наявністю ПЛР-продуктів та їх інтенсивністю люмінесценції у 2 % агарозному гелі з бромистим етидієм в УФ-променях та порівнянням очікуваних розмірів ПЛР-продуктів з молекулярним маркером ДНК 10000 bp («Fermentas», Латвія) [9].

Результати й обговорення

Видоспецифічні ДНК-маркери для веслоноса було підібрано на основі результатів попередніх досліджень генетичної структури природних та штучних популяцій веслоноса [7]. Основним критерієм підбору найбільш інформативних маркерів було встановлення наявності поліморфізму за кожним відповідним локусом. Особливу увагу звертали на такі параметри, як кількість ідентифікованих алелів, показники теоретично очікуваної (*expected heterozygosity* — H_e) та фактичної (*observed heterozygosity* — H_o) гетерозиготності. Згідно з опрацьованими літературними джерелами, для визначення та оцінки генетико-популяційних особливостей веслоноса застосовуються 8 мікросателітних ДНК-маркерів (табл. 1) [4]. На основі аналізу та співставлення результатів дослідження генетичного поліморфізму штучних популяцій веслоноса [6] з природною популяцією цього виду [4] за мікросателітними

Характеристика мікросателітних ДНК-маркерів [4]
Characteristic of microsatellite DNA markers [4]

Таблиця 1

Назва локусу Name of loci	№ GenBank	Структура повтору Structure of repeat	Нуклеотидна послідовність праймерів The nucleotide sequence of primer (5'→3')	Розмір (п.н.) Size (b.p.)	Флуоресцентний барвник Fluorescent dye
Psp12	AF406735.1	(GA) ₁₅	F:GCATAGTTTTTGGGGGATGGC R:ACAAGTCTTCACCGCATTC	218–228	FAM
Psp21	AF406736.1	(GA) ₂₅	F:TTCAGCAGGTAGTGAGACAGGCAG R:TCAAGTCCCATCCACTCT	142–170	FAM
Psp26	AF406737.1	(GT) ₂₅	F:TCGGTGTGTGTGTGTGTGTATGC R:TGGTTCCAGTTTCGCTCATCC	130–160	TAMRA
Psp28	AF406738.1	(GA) ₃₇	F:CAAAGGCATCCCCTACCAC R:GCTGGACAAAAAGTATGGAGTGC	224–260	TAMRA

ДНК-маркерами було визначено середні значення досліджуваних параметрів (табл. 2).

За опрацьованими результатами таблиці 2 встановлено, що найбільш поліморфними були локуси Psp26 та Psp28, за якими ідентифіковано найбільшу кількість алелів. Згідно з аналізом досліджень Kaczmarczyk, за локусом Psp12 для штучних популяцій веслоноса результати не було отримано через виникнення неспецифічних продуктів під час ампліфікації [6]. Проте при дослідженні природної популяції було виявлено 6 алельних варіантів за досліджуваним локусом Psp12 [4]. За локусом Psp21 середня кількість ідентифікованих алелів становила 5. За локусами Psp18 та Psp29 було виявлено по 4 алельні варіанти. Локуси Psp20 та Psp32 були найменш поліморфними, середня кількість ідентифікованих алелів у цих локусах становила 3 і 2 відповідно [4, 6].

За оцінкою розрахованих середніх значень параметрів гетерозиготності визначено, що рівень фактичної гетерозиготності (H_o) коливався від 0,43 для локусу Psp18 та до 0,95 для локусу Psp28. Рівень теоретично очікуваної гетерозиготності (H_e) коливався в межах від 0,21 до 0,82 для локусів Psp32 та Psp28 відповідно.

На основі порівняльного аналізу попередніх досліджень поліморфізму мікросателітних ДНК-маркерів популяцій веслоноса нами було встановлено, що найбільш інформативними для подальших досліджень особливостей його генетичної структури є такі ДНК-маркери: Psp12, Psp21, Psp26, Psp28.

Після підбору найбільш поліморфних мікросателітних ДНК-маркерів наступним завданням було визначення оптимальних параметрів ПЛР та оцінка ефективності ампліфікації обраних мікросателітних локусів.

У процесі робіт з оптимізації ПЛР-аналізу першочергово визначали якість виділення ДНК з біологічного матеріалу. Згідно з отриманими результатами спектрофотометричного аналізу визначено середню концентрацію ДНК, що становила 58 нг/мм³ з урахуванням показників співвідношень поглинання УФ-променів при довжині хвилі 260 нм/280 нм на рівні 1,98 та 260 нм/230 нм — 1,96. Визначені показники свідчили про відносно високу чистоту екстрагованої ДНК, що відповідало вимогам щодо необхідної концентрації ДНК для подальшого успішного проведення ПЛР.

Подальші дослідження були спрямовані на пошук оптимальних умов проведення ПЛР шляхом підбору концентрації йонів магнію (Mg^{2+}) у реакційній суміші та температури відпалу праймерів (T_A).

Під час досліджень з підбору оптимальних параметрів полімеразної ланцюгової реакції було сформовано чотири варіанти досліду для кожної пари праймерів з відповідними температурами відпалу (T_A): 1 варіант — 56 °C; 2 варіант — 58 °C; 3 варіант — 60 °C; 4 варіант — 62 °C.

Для проведення ПЛР було проведено підбір оптимальних умов ампліфікації за температурою та тривалістю кожного з циклів.

Таблиця 2

Середні значення параметрів генетичного поліморфізму природних та штучних популяцій веслоноса (*Polyodon spathula*) [6]

Average parameters of genetic polymorphism of natural and artificial paddlefish (*Polyodon spathula*) populations [6]

Назва локусу / Name of loci	M±m		
	Кількість алелів / Number of alleles	H_o^{**}	H_e^{**}
Psp12*	6±0,000	0,57±0,000	0,61±0,000
Psp18	4±0,750	0,43±0,237	0,45±0,187
Psp20	3±0,479	0,66±0,068	0,52±0,021
Psp21	5±0,750	0,61±0,071	0,56±0,065
Psp26	8±1,250	0,79±0,029	0,75±0,024
Psp28	8±2,041	0,95±0,009	0,82±0,037
Psp29	4±0,000	0,66±0,026	0,47±0,017
Psp32	2±0,408	0,24±0,027	0,21±0,019

Примітка: * — показники поліморфізму для локусу Psp12, згідно з даними Heist et al., 2002, ** — $P \leq 0,05$.

Note: * — data of polymorphism of loci Psp12 according to Heist et al., 2002, ** — $P \leq 0.05$.

Умови проведення ПЛР
Conditions of PCR

Стадія / Stage	Температура / Temperature, °C				Час, хв. Time, min	Кількість циклів Number of cycles
Перша денатурація / The first denaturation	95				5	1
Денатурація / Denaturation	95				0,15	30
Відпал / Annealing	1 — 56	2 — 58	3 — 60	4 — 62	0,25	
Елонгація / Elongation	72				0,5	
Пролонгування / Prolongation	72				5	1
Зберігання / Storage	4					∞

Модель ампліфікатора «Veriti 96 Well» («Applied Biosystems», США) дозволила одночасно провести ПЛР ампліфікацію з різними дослідними температурами відпалу, що оптимізувало проведення реакцій за одну процедуру (табл. 3).

Наступним етапом робіт було оцінювання результатів ПЛР методом електрофорезу в агарозному гелі у присутності люмінесцентного барвника — бромистого етидію (рис. 1).

Згідно з результатами горизонтального електрофорезу, локуси Psp12, Psp21, Psp26, Psp28 були успішно ампліфіковані, а отримані ПЛР-продукти найкраще візуалізувалися в агарозному гелі за температури відпалу (T_A) 56 °C. При цьому очікувані розміри отриманих ПЛР-продуктів відповідали діапазону розмірів алелів, які спостерігалися у досліджуваних раніше популяцій веслоноса [4, 6]. Ампліфіковані фрагменти відрізнялися дещо нижчим рівнем люмінесценції, що вказувало на менш інтенсивне накопичення специфічних ПЛР-продуктів за температури відпалу праймерів (T_A) 58 °C. За отриманими даними, в результаті ампліфікації локусів за температур відпалу (T_A) 60 °C та 62 °C спостерігався низький вихід специфічних ПЛР-продуктів, а для локусу Psp28 за T_A 62 °C результату взагалі не було отримано, що вказує на низький рівень ампліфікації мікросателітних локусів веслоноса за цих температур відпалу.

Для оптимізації ПЛР, окрім підбору температури відпалу праймерів, проводили дослідні реакції зі змінною концентрацією йонів магнію (Mg^{2+}) у реакційній суміші.

На рис. 2 наведено результати ампліфікації мікросателітних локусів веслоноса з дослідними концентраціями Mg^{2+} у ПЛР-

суміші на рівні 1,5 мМ, 2 мМ і 3 мМ для кожної пари праймерів за температур відпалу (T_A) 56 °C та 58 °C.

За результатами проведених досліджень, найбільш ефективно накопичення ПЛР-продуктів для чотирьох мікросателітних ДНК-маркерів спостерігалось за концентрації йонів магнію (Mg^{2+}) 1,5 мМ і температури відпалу T_A 56 °C. За аналогічної концентрації Mg^{2+} — 1,5 мМ, але за T_A 58 °C спостерігалось зниження інтенсивності накопичення специфічних продуктів ПЛР-ампліфікації для локусів Psp21 та Psp26, порівняно з локусами Psp12 та Psp28, для яких ефективність ПЛР-ампліфікації була досить високою за таких умов ПЛР.

За однакової концентрації Mg^{2+} на рівні 2 мМ, але за різних температур відпалу на рівні T_A 56 °C і T_A 58 °C спостерігалось зниження специфічності ПЛР порівняно з попередньою концентрацією йонів магнію (Mg^{2+}) 1,5 мМ, а також поява додаткових неспецифічних продуктів.

З підвищенням концентрації Mg^{2+} до 3 мМ за T_A 56 °C відзначалася дещо нижча специфічність ПЛР-реакції для локусів Psp12 та Psp28 і неінтенсивне накопичення специфічних продуктів ампліфікації для локусів Psp21 та Psp26. За температури відпалу T_A 58 °C та концентрації Mg^{2+} на рівні 3 мМ для усіх локусів спостерігалось аналогічне зниження інтенсивності накопичення ПЛР-продуктів. Це вказує на неефективну ампліфікацію досліджуваних локусів за такої концентрації йонів магнію і вказаних температур відпалу.

Таким чином, згідно з узагальненим аналізом результатів проведених досліджень для одночасного проведення ПЛР за чотирма досліджуваними ДНК-маркерами, оптималь-

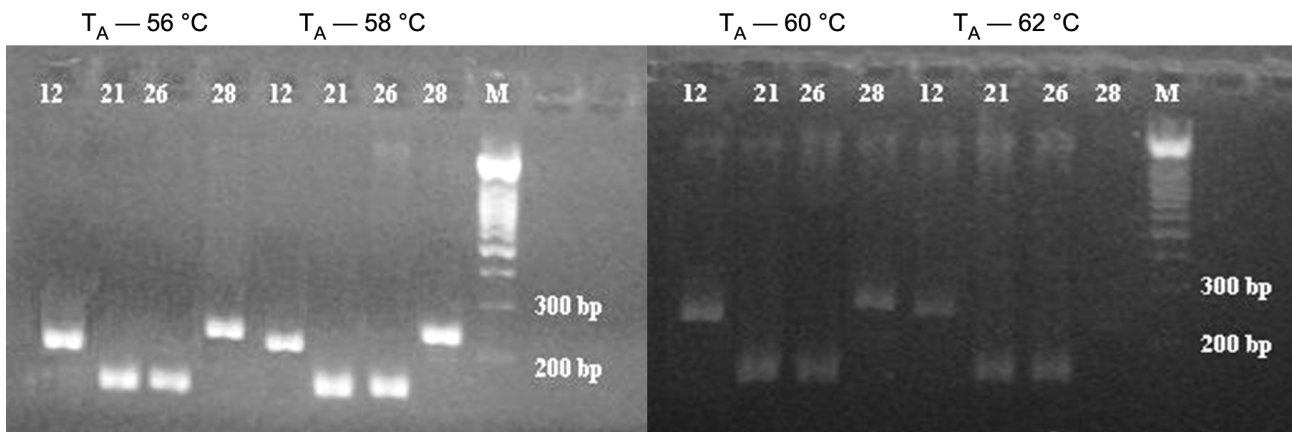


Рис. 1. Результати електрофорезу продуктів ампліфікації за різних температур відпалу досліджуваних праймерів Psp12, Psp21, Psp26, Psp28 відповідно: М — молекулярний маркер 10000 bp; концентрація йонів магнію Mg^{2+} — 1,5 mM
Fig. 1. The results of electrophoresis of amplification products at different annealing temperatures of investigated primers Psp12, Psp21, Psp26, Psp28 respectively: M — molecular marker 10000 bp; concentration of magnesium ions Mg^{2+} — 1.5 mM

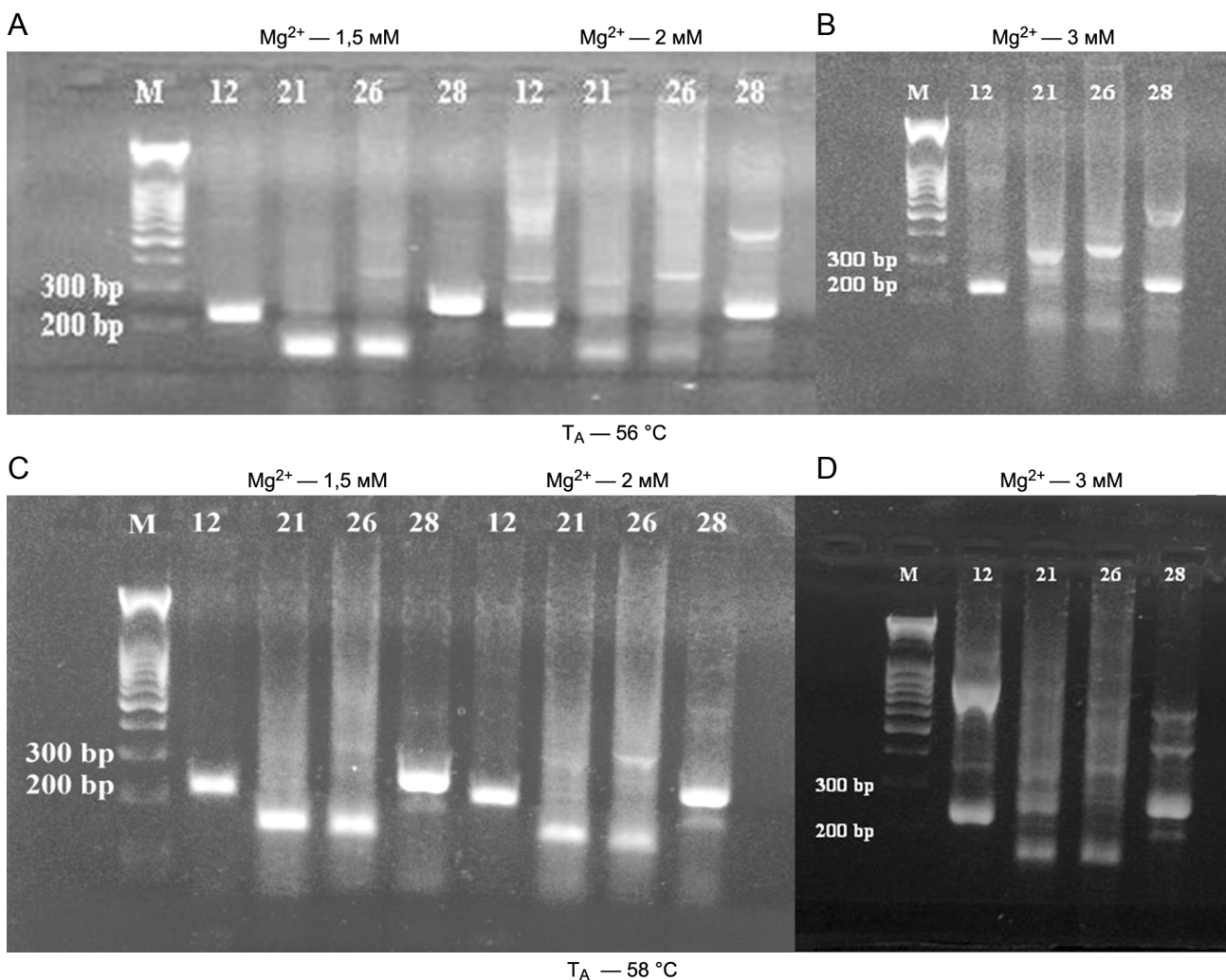


Рис. 2. Результати електрофорезу продуктів ампліфікації за різних концентрацій йонів магнію (Mg^{2+}) — 1,5 mM, 2 mM та 3 mM для досліджуваних праймерів Psp12, Psp21, Psp26, Psp28 відповідно: М — молекулярний маркер 10000; А, В — температура відпалу (T_A) 56°C ; С, D — температура відпалу (T_A) 58°C
Fig. 2. The results of electrophoresis of amplification products using with different concentrations of magnesium ions (Mg^{2+}) 1.5 mM, 2 mM та 3 mM for investigated primers Psp12, Psp21, Psp26, Psp28, respectively: M — molecular marker 10000 bp; А, В — annealing temperature (T_A) is 56°C ; С, D — annealing temperature (T_A) is 58°C

ною є концентрація йонів магнію у реакційній суміші на рівні 1,5 мМ і температура відпалу праймерів (T_A) 56 °С.

Отже, в процесі пошукових робіт з оптимізації умов ампліфікації мікросателітних локусів ДНК веслоноса (*Polyodon spathula*) було здійснено підбір та оцінку найбільш сприятливих параметрів і концентрацій компонентів реакційної суміші для ампліфікації мікросателітної ДНК веслоноса, що дозволить у подальшому досліджувати особливості генетичної структури даного виду риб у сучасних рибницьких господарствах України.

Висновки

На основі порівняльного аналізу попередніх досліджень було визначено 4 найбільш інформативних мікросателітних ДНК-маркери для оцінки генетичного поліморфізму популяцій веслоноса: Psp12, Psp21, Psp26, Psp28. Для підібраних маркерів встановлено найбільш сприятливі умови ампліфікації, а саме температурні режими і тривалість циклів полімеразної ланцюгової реакції. Визначено оптимальний склад і концентрації компонентів реакційної суміші. Згідно з результатами досліджень, було визначено ефективну температуру відпалу праймерів (T_A) — 56 °С. Було встановлено оптимальні концентрації праймерів по 5 рМ/мм³ кожного і кінцеву концентрацію йонів магнію (Mg^{2+}) на рівні 1,5 мМ у реакційній суміші загальним об'ємом 15 мм³. Отримані результати оптимізації умов ПЛР-ампліфікації мікросателітних локусів ДНК дозволять здійснювати подальші роботи з вивчення особливостей генетичної структури веслоноса для оцінки рівня генетичного поліморфізму цього виду риб в умовах сучасного ведення аквакультури.

Перспективи подальших досліджень.

Проведення подальших досліджень обумовлене необхідністю моніторингу генетичних процесів, які відбуваються у штучно відтворюваних популяціях веслоноса. Наступним етапом подібних досліджень є розробка мультиплексного складу праймерів у ПЛР-суміші для оптимізації робіт за кожним окремим досліджуванним зразком ДНК на генетичному аналізаторі «ABI Prism 3130 Genetic Analyzer»

(«Applied Biosystems», США). Доцільність таких науково-дослідних робіт полягає у можливості встановлення походження культивованих стад веслоноса, визначенні рівня інбридингу та ступеня його впливу за умов вирощування в сучасних рибницьких господарствах України під контролем ДНК-маркерів.

1. Dudu A., Suciu R., Parashiv M. Nuclear Markers of Danube Sturgeons Hybridization. *Molecular Sciences*, 2011, vol. 12, pp. 6796–6809.

2. Dyman T. M., Hlazko V. I. *Polymerase chain reaction*. Methodical recommendations. Bila Tserkva, 2004, 62 p. (in Ukrainian)

3. Glazko V. I., Glazko T. T. *DNA-technology in genetics and breeding*. Lectures, Krasnodar, VNII risa publ., 2006, 399 p. (in Russian)

4. Heist E. J., Nicholson E. H., Sipiorski J. T., Keeney D. B. Microsatellite markers for the paddlefish (*Polyodon spathula*), *Conservation Genetics*, 2002, vol. 3, pp. 205–207.

5. Kaczmarczyk D., Kohlmann K., Kersten P., Luczynski M. Polymorphism of microsatellite loci — a tool in studying biodiversity of paddlefish aquaculture brood stock. *Environmental Biotechnology*, 2007, vol. 3, pp. 44–48.

6. Kaczmarczyk D., Luczynski M., Brzuzan P. Genetic variation in three paddlefish (*Polyodon spathula*, Walbaum) stocks based on microsatellite DNA analysis. *Czech J. Anim. Sci.*, 2012, vol. 57 (8), pp. 345–352.

7. Kurta K. M., Malysheva O. O., Spyrydonov V. G. Contemporary state and prospects of research of paddlefish (*Polyodon spathula*) genetic structure (a review). *Scientific reports of NULES of Ukraine*. 2016, no. 6 (63), 25 p. Available at: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidni/issue/view/308>. (in Ukrainian)

8. Malysheva O. O., Spyrydonov V. G., Melnychuk S. D. Modern molecular genetics approaches for optimization of artificial reproduction of sturgeon species (for example, Sturgeon, *Acipenser ruthenus*, Linnaeus). *Journal of the Institute of Animal Breeding and Genetics*, 2014, no. 48, pp. 202–208. (in Ukrainian)

9. McPherson M. J., Moller S. G. *PCR basics: From background to bench*. New York, BIOS scientific Publishers Ltd, 2000, p. 276.

10. Tarasiuk S. I., Hrytsyniak I. I. *Molecular-genetic studies in fish culture*. A monograph. Kyiv, Agricultural Science, 2013, 312 p. (in Ukrainian)

11. Tretiak O. M., Hrytsyniak I. I., Tarasiuk S. I. Using DNA markers for studying the genetic structure of paddlefish (*Polyodon spathula* (Walb.)) brood stocks. *Fisheries science of Ukraine*, 2012, vol. 4, pp. 117–120. (in Ukrainian)

12. Tretiak O. M., Tarasiuk S. I. Analysis of the genetic structure of paddlefish's brood stock for certain genetic and biochemical systems. *Fisheries science of Ukraine*, 2011, no. 1, pp. 50–57. (in Ukrainian)