НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН ІМЕНІ М.В. ЗУБЦЯ

ПРОВЕДЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ЗА МОНОЛОКУСНИМИ ТА МУЛЬТИЛОКУСНИМИ ДІЛЯНКАМИ ДНК У РІЗНИХ ВИДІВ ТВАРИН

Методичні рекомендації

Чубинське – 2023

УДК 636:575.113.2:577.21
П 78

Методичні рекомендації розробили:
Кирило Копилов, д-р с.-г. наук, проф., голов. наук. співроб.;
Андрій Шельов, д-р с.-г. наук, пров. наук. співроб.;
Наталія Мохначова, канд. с.-г. наук, пров. наук. співроб.;
Любов Стародуб, д-р с.-г. наук, пров. наук. співроб.;
Марія Добрянська, канд. с.-г. наук, ст. наук. співроб.

Методичні рекомендації розглянуто і схвалено вченою радою Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (протокол № 9 від 23.10.2023 року.)

П 78 **Проведення** молекулярно-генетичних досліджень за монолокусними та мультилокусними ділянками ДНК у різних видів тварин : метод. рек. / К. Копилов, А. Шельов, Н. Мохначова, Л. Стародуб, М. Добрянська. Чубинське, 2023. 40 с.

У методичних рекомендаціях висвітлено теоретичні основи і представлено методичні підходи з проведення молекулярно-генетичних досліджень за мультилокусними та монолокусними ділянками ДНК у різних видів.

Рекомендації розраховані на науковців та фахівців з генетики та розведення тварин, викладачів, аспірантів та студентів вищих навчальних закладів аграрного профілю.

Рецензенти:

Тетяна Супрович – доктор с.-г. наук, професор, завідувачка кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби національної поліції України Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»;

Роман Кулібаба – доктор с.-г. наук, ст. наук. співроб., професор кафедри біології тварин НУБіП України

УДК 636:575.113.2:577.21

© Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН, 2023 р.
© К. Копилов, А. Шельов, Н. Мохначова, Л. Стародуб, М. Добрянська, 2023

ЗМІСТ

ВСТУП 4

ПРОВЕДЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ БІОМАТЕРІАЛУ 9

1. ЗАГАЛЬНІ ВИМОГИ ДО ПЛР - ЛАБОРАТОРІЙ 9

1.1. Організація роботи ПЛР- лабораторії 9

1.2. Обладнання ПЛР- лабораторії 10

1.3. Вимоги до проведення ПЛР- аналізу 11

2. ВИДІЛЕННЯ ДНК З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ, ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ ПРОВЕДЕННЯ ПОЛІМЕРАЗНО ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ, ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ ТА КОНТРОЛЬ РОЗМІРІВ ПРОДУКТІВ АМПЛІФІКАЦІЇ 12

3. ПРОВЕДЕННЯ МІКРОСАТЕЛІТНОГО АНАЛІЗУ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ВІД ПРЕДСТАВНИКІВ РІЗНИХ ВИДІВ 16

3.1. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у великої рогатої худоби *(Bos Taurus)* 17

3.2. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у коней *(Equus caballus)* 22

3.3. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у собак *(Canis familliaris)* 24

3.4. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) свійської курки *(Gallus domesticus)* 25

4. ДОСЛІДЖЕННЯ МУЛЬТИЛОКУСНИХ (МІЖМІКРОСАТЕЛІТНИХ) ДІЛЯНОК ДНК У ПРЕДСТАВНИКІВ РІЗНИХ ВИДІВ 28

4.1. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у великої рогатої худоби *(Bos Taurus)* 28

4.2. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у кіз *(Capra aegagrus hircus)* 29

4.3. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у коней *(Equus caballus)* 31

4.4. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у водяного буйвола (*Bubalus bubalis)* 33

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 35

ВСТУП

Геном – сукупність ДНК виду, тобто сукупність всіх генів, некодуючих ділянок ядерної ДНК і позахромосомного генетичного матеріалу, в який входять мітохондріальна, пластидна ДНК, плазміди тощо. Екзон – ділянка ДНК в межах гену, яка переводиться у зрілу молекулу матричної РНК (мРНК) в процесах транскрипції і сплайсингу. Вони розділені некодуючими послідовностями (інтронами), тобто ділянками ДНК, які є частиною гену, але на відміну від екзонів, не містять інформації щодо послідовності амінокислот. Існують дві альтернативні теорії, що пояснюють походження й еволюцію інтронів. Це так звані теорії ранніх інтронів (РІ) і пізніх інтронів (ПІ). Теорія РІ передбачає, що численні інтрони були присутні у загальних предків представників всіх доменів і, відповідно, є дуже старими структурами. Згідно з цією моделлю, інтрони були практично втрачені з геному прокаріотів. Також вона передбачає, що ранні інтрони сприяли рекомбінації екзонів, які представляють домени білків. Друга теорія – інтрони з'явилися в генах відносно недавно, і були інсертовані (вставлені) в геном після розділення організмів на окремі домени. Ця модель ґрунтується на спостереженні, що сплайсосомні інтрони зустрічаються тільки у еукаріотів.

У багатьох організмах тільки мала частина 2%–6% загальної послідовності геному кодує білки, а понад 90% ДНК складається з некодуючих послідовностей ДНК, сателітної ДНК, інтронів, тандемних повторів, транспозонів тощо). Некодуючі послідовності – ділянки ДНК, послідовність яких не переводиться безпосередньо в амінокислотну послідовність білків. Ці ділянки більш мінливі, містять багато мутацій (нейтральний поліморфізм) і не мають фенотипового прояву та помітного впливу на життєздатність або репродуктивні функції. Причини існування такої великої кількості некодуючої ДНК в еукаріотичних геномах і величезна різниця в розмірах геномів (С-значення) – одна з нерозв'язаних наукових загадок. Частина некодуючої ДНК безпосередньо задіяна в регуляції активності кодуючих ділянок. Проте, функції її більшої частини невідомі. Численні проекти з сиквенування та аналізу ДНК в останні роки XX-го століття та

на початку XXI-го призвели до встановлення послідовностей та опису геномів багатьох організмів всіх головних таксономічних груп. Найбільшим та найвідомішим з них став проект геному людини.

Результати наукових досліджень, отримані при вивченні структури і організації геномної ДНК тварин, рослин і мікроорганізмів, істотно вплинули на методологію їх систематизації, раніше заснованої, головним чином, на аналізі фенотипових ознак. Проблема адекватного віднесення конкретного організму до тієї чи іншої групи не є чисто академічною. Точність критеріїв систематики живих організмів, що визначає еволюційну спорідненість між ними, крім суто теоретичного представляє і практичний інтерес. Зокрема, ідентифікація мікроорганізмів важлива не тільки для медичної практики, але також і в інших областях, наприклад, при сертифікації продуктів харчування, при визначенні екологічної чистоти води, ґрунтів і т. і. В даний час молекулярно-генетичні методи дозволяють здійснювати ідентифікацію особистості в судово-медичних дослідженнях, а також вирішувати в спірних випадках проблему визначення батьківства.

Застосування технологій генотипування в сільському господарстві дозволяють виявити особливості геному різних систематичних груп та встановити філогенетичні зв’язки між ними, спільність походження та наявність ідентичних ділянок у геномі різних видів дає можливість прогнозувати функції генів у одного виду, якщо ці функції відомі у близьких чи навіть віддалених видів, відкриває нові можливості для ефективного вирішення різних завдань сучасної селекції, таких як підтримка генетичних колекцій, підбір батьківських форм для схрещування, складання родоводів, контроль інтрогресії генетичного матеріалу, паспортизація і сертифікація сортів рослин та порід тварин, визначення ступеня гомозиготності, генетичної спорідненості, рівня внутрішньопородної та міжпородної генеалогічної диференціації, індивідуального генотипування, генетичного картування, паспортизації тварин, вивчення питань філогенії та походження видів [1–9].

Найбільш важливим підходом у дослідженні генетичного поліморфізму є використання методів молекулярного аналізу, які дозволяють отримувати індивідуальну характеристику окремого генотипу – ДНК-профіль. Існуючі методи ДНК-типування геномів відрізняються за складністю, надійності і обсягом одержуваної інформації. Для надійного розрізнення та ідентифікації генотипів, дослідження філогенетичних взаємозв'язків і інтрогресії генетичного матеріалу, найбільш перспективним є метод аналізу поліморфізму гіперваріабельних послідовностей геному, який дозволяє отримувати відтворювані, інформативні профілі фрагментів геному.

Послідовності ДНК розділяють на мультилокусні (RAPD, AFLP, ISSR) та монолокусні (STMS, SNP, SSCP) та інші. Дослідження мультилокусних маркерів засноване на застосуванні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Суть методу ISSR-ПЛР *(Inter-simple-sequence-repeats)* полягає у використанні мікросателітних локусів як ділянок випалу праймерів, комплементарних мікросателітним повторам (4–12 одиниць повтору) і мають на одному 5' чи 3'-кінці 1–4 якірних нуклеотиди, які визначають місце випалу праймера. Такі праймери уможливлюють ампліфікацію фрагментів ДНК, які розташовані між мікросателітними послідовностями. Отримані паттерни видоспецифічні. ISSR – маркери відносять до маркерів домінантного типу успадкування, поліморфізм яких виявляється наявністю чи відсутністю смуг. Спектр фрагментів істотно відрізнятися між таксонами залежно від переважання в них окремих варіантів мікросателітів локусів. Даний метод застосовується для вивчення генетичної структури, як на міжвидовому, так і на внутрішньовидовому рівнях, а також може використовуватися для генетичного картування, паспортизації тварин, і для вивчення питань філогенії та походження видів. [10–16].

Повторювальні послідовності розділяють на два класи: дисперсні послідовності та тандемні повтори. Дисперсні послідовності залежно від довжини класифікують на довгі інтерсперсіонні елементи (LINEs) довжиною більш як 1000 п. н. і короткі (SINEs) – менш як 500 п. н. Функція цих елементів наразі до кінця не відома. Тандемні повтори – багатократні повтори окремих послі-

довностей число яких у тварин різних видів дуже варіює і характеризується ступенем гетерозиготності понад 90%. Залежно від довжини повторюваних фрагментів їх ділять на декілька класів: максі – (довжина понад 5 х 10^5 п. н.), міні – (довжина тандемно повторюваної послідовності 10–60 п. н.) та мікросателіти з довжиною мотиву 1–6 п. н. Мінісателіти застосовують в «геномній дактилоскопії» (ДНК-фінгерпринт). Основним механізмом виникнення і існування поліморфізму в мінісателітах вважають нерівний кросинговер та генну конверсію, а високу варіабельність зв'язують з ініціатором мутацій, який фланкує повтор та активацією мутагенних систем геному. Мікросателіти диспергані тандемно повторювальні моно-, ди-, три-, тетра – та пентануклеотидні послідовності, розмір яких становить у середньому не більше 100 п. н. Ці маркери мають декілька назв: мікросателіти, STMS (Sequence Tagged Microsattelite Site), STR (short tandem repeat), SSR (simple sequence repeat). Поліморфізм STR маркерів визначається різним копіюванням мономерних одиниць у кластері. Перевагою мікросателітних локусів є їх велика гетерозиготність, наявність досить великої кількості алелів (в середньому 6–10 на локус), які мають кодомінантний характер успадкування. Це дає змогу чітко відрізняти гомозиготу від гетерозиготи і контролювати гени, що отримані від батьків. Частота мутацій мікросателітів 10^{-9}–10^{-10}. У роботах з визначення батьківства у людей встановлена середня частота мутацій на один локус (на одне покоління) і дорівнює 10^{-3} , а миші, вівці, свині 10^{-3}–10^{-4}, $1{,}3\cdot10^{-4}$, $7\cdot10^{-5}$, відповідно. Припускають, що така висока частота мутацій мікросателітів виникає або при помилках реплікації окремої ДНК, або в процесі рекомбінації між молекулами ДНК. Вони є універсальною системою генетичних маркерів для аналізу змін, що успадковуються на рівні ядерної ДНК і застосовуються у тваринництві, як для аналізу еволюційних зв'язків між різними породами сільськогосподарських тварин, визначення часу появи тієї чи іншої породи так і при експертизі походження, дослідженнях генетичного поліморфізму різних видів тварин [17–25]. Оскільки алельні варіанти поліморфних систем не змінюються протягом індивідуального розвитку особини, не залежить від віку, хвороб, фізіологічного стану

тварини і зовнішніх впливів оточуючого середовища генетичне тестування тварин проводять один раз за життя. Мікросателітні ДНК маркери використовують у дослідженнях генетичної мінливості, картографуванні геномів, аналізі взаємозв'язків особин та популяцій, оцінці рівнів інбридингу (Fis), аналізі генетичної структури субпопуляцій та популяцій, оцінці ефективного розміру популяції (Ne) і дрейфу генів між популяціями у різних видів – великої рогатої худоби, коня свійського [26–35], аналізі та досліджень з молекулярно-генетичної еволюції геному курки, оцінці мікроеволюційних процесів та генетичного різноманіття [36–44] дослідженнях собак [45–47] та багатьох інших видів. Відповідно до рекомендацій *International Society of Animal Gene*tics – *ISAG/FAO*, запропоновані панелі найбільш інформативних мікросателітних маркерів, для деяких видів сільськогосподарських тварин, які дають можливість оцінки достовірності походження племінних тварин та племінного матеріалу для їх паспортизації.

Безперечно, основна перевага молекулярних методів при вивченні мінливості геному в тому, що вони генерують величезні набори дискретних ознак, причому не тільки тих, які знаходяться під тиском відбору, а й селективно нейтральних. Безперечно й те, що молекулярні підходи дозволяють зіставляти дуже далекі організми. Важливо й те, що коло об'єктів, з яких може бути виділена ДНК, придатна для аналізу, продовжує розширюватися. Вони включають тепер вже і палеонтологічний матеріал (шкури мамонта, кістки неандертальця і т. і.) і, отже, існує можливість прямого порівняння послідовностей ДНК сучасних і принаймні недавно вимерлих тварин. Зрозуміло, що сама техніка аналізу геному, так само як і методи філогенетичної обробки даних будуть розвиватися і вдосконалюватися по шляху все більшої автоматизації експериментальної частини та ускладнення математичного апарату філогенетичних алгоритмів. Тому, планування майбутніх досліджень в галузі молекулярної філогенетики прямо пов'язане з накопиченням інформації про характер еволюції досліджених в філогенетиці ділянок геному. Останнє відноситься вже до області ге-

номіки, завдання якої – обґрунтування вибору генів, які з найбільшою достовірністю відображають еволюцію організмів.

ПРОВЕДЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ БІОМАТЕРІАЛУ

1. ЗАГАЛЬНІ ВИМОГИ ДО ПЛР-ЛАБОРАТОРІЙ

З метою організації ефективної роботи і запобігання контамінації реактивів та досліджуваних зразків до молекулярно-генетичних лабораторій висувається низка вимог.

Передусім лабораторія має розділятися на зони або кімнати, в яких проводять окремі етапи ПЛР - аналізу:

зона 1 – для підготовки досліджуваних проб;

зона 2 – для підготовки реакційної ПЛР - суміші та внесення ДНК досліджуваних проб;

зона 3 – для проведення детекції продуктів ампліфікації.

Роботу в лабораторії має бути організовано винятково в одному напрямі – від зони 1 до зони 3.

1.1. ОРГАНІЗАЦІЯ РОБОТИ ПЛР-ЛАБОРАТОРІЇ

Пробопідготовка досліджуваних зразків має здійснюватись у ламінарних шафах або ПЛР-боксах.

У кожному приміщенні ПЛР-лабораторії має бути індивідуальний набір реагентів, витратного матеріалу, дозаторів та лабораторного устаткування.

Увесь витратний матеріал (пробірки, наконечники, рукавички) слід використовувати одноразово.

Досліджувані проби та реагенти мають зберігатися окремо одні від одних.

На робочому місці необхідно постійно підтримувати чистоту.

Для боротьби з контамінацією застосовують фізичні та хімічні методи:

1. Робочі поверхні, оснащення та матеріали слід обробляти ультрафіолетом з максимумом випромінювання в ділянці 260 нм. Опромінення треба здійснювати впродовж 45 хв. до початку та після завершення роботи.

2. Використані наконечники для автоматичних піпеток, пробірки та інші забруднені ДНК матеріали необхідно обробляти реагентами, які спричиняють деградацію ДНК (1 М HCI, 10%-ний гіпохлорит натрію або 10% хлорне вапно).

Персонал, який працює в ПЛР-лабораторії, має пройти відповідне навчання.

1.2. ОБЛАДНАННЯ ПЛР-ЛАБОРАТОРІЇ

Зона 1

Настільний бокс з бактерицидною лампою 2-го рівня біозахисту; термостат для пробірок типу «еппендорф» на 25−100ºС; мікроцентрифуга до 12−14 тис. об/хв; центрифуга/вортекс; вакуумний відсмоктувач з колбою-вловлювачем; холодильник на 2−8ºС, з морозильною камерою на −20ºС; окремий набір автоматичних дозаторів змінного об`єму; одноразові наконечники з аерозольним бар`єром; одноразові поліпропіленові пробірки ємністю 1,5 мл типу «еппендорф»; окремий халат і одноразові рукавички; дезінфікуючі розчини.

Зона 2

Ампліфікатор; генетичний аналізатор, ПЛР-бокс; центрифуга/вортекс; окремий набір автоматичних дозаторів змінного об`єму; холодильник на 2−8ºС, з морозильною камерою на −20ºС; одноразові наконечники з аерозольним бар`єром; одноразові поліпропіленові пробірки ємністю 0,2/0,5 мл типу «еппендорф»; окремий халат і одноразові рукавички.

Зона 3

Центрифуга/вортекс; термостат на 25−100ºС; камера для горизонтального або вертикального електрофорезу, генетичний аналізатор; джерело постійного струму з напругою 150−500 В; ультрафіолетовий трансілюмінатор; відеосистема для візуалізації результатів (або цифровий фотоапарат); дистилятор; холодильник на 2−8ºС для зберігання продуктів ПЛР

і рестрикції; мікрохвильова піч для приготування агарозних гелів; посуд для приготування буферів і гелів (циліндри, колби з термостійкого скла та ін.); окремий набір автоматичних дозаторів змінного об`єму; одноразові наконечники і поліпропіленові пробірки ємністю 0,5 мл типу «еппендорф»; окремий халат і одноразові рукавички.

1.3. ВИМОГИ ДО ПРОВЕДЕННЯ ПЛР-АНАЛІЗУ

Забір досліджуваних зразків треба проводити тільки в одноразові стерильні пробірки. Як консерванти не можна використовувати речовини, які інгібують ПЛР (наприклад, гепарин).

Працювати слід тільки в одноразових рукавичках та використовувати одноразовий витратний матеріал (пробірки, наконечники з аерозольним бар`єром).

Використані пробірки та наконечники утилізувати в спеціальні ємкості з 1 М розчином соляної кислоти.

Проведення ПЛР.

Працювати слід тільки в спецодязі та одноразових рукавичках. Використовувати одноразові пробірки та наконечники.

Готувати загальну реакційну суміш, розраховану на всі проби, включаючи контрольні, а потім розносити її у пробірки.

У всіх випадках проведення ПЛР слід обов`язково застосовувати негативні та позитивні контролі у відповідності з методичними вказівками чи інструкцією із застосування діагностичних наборів.

Підготовлені до ПЛР досліджувані проби ДНК у реакційні суміші мають вноситись одноразовими наконечниками з аерозольним бар`єром в останню чергу. Використані наконечники слід утилізувати в ємкість з 1 М розчином соляної кислоти.

Детекція продуктів ампліфікації

Працювати слід тільки в спецодязі та одноразових рукавичках.

Оснащення, реактиви, спецодяг, а також інвентар не повинні потрапляти до інших приміщень ПЛР-лабораторії.

2. ВИДІЛЕННЯ ДНК З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ, ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ ПРОВЕДЕННЯ ПОЛІМЕРАЗНО ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ, ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ ТА КОНТРОЛЬ РОЗМІРІВ ПРОДУКТІВ АМПЛІФІКАЦІЇ

Для молекулярно-генетичних досліджень придатним є різноманітний біологічний матеріал: кров, біоптати, волосся (шерсть), ембріони, молоко, ооцити, а також нативна, охолоджена та кріоконсервована сперма та інші тканини.

Забір *крові* проводиться з яремної вени одноразовим шприцем об'ємом 5–10 мл або вакуумними системами типу *Venoject, Vacutainer* і т. ін. (з ЕДТА або цитратом натрія). При заборі в шприц, кров переноситься в одноразові пробірки з антикоагулянтом (3% розчин ЕДТА (трилон Б) із розрахунку 10:1 або 3,8% розчином цитрата Na у співвідношенні 1:9). *Гепарин як антикоагулянт – не використовувати!*

Пробірку з кров'ю необхідно зберігати у холодильнику при температурі $\pm$4C^{o} до 5 годин. При неможливості швидкої доставки матеріалу для тривалого зберігання кров заморожують при -20C^{o}. Наступне транспортування здійснюється в замороженому стані.

Сперма відбирається в одноразові стерильні пробірки або паєти. Сперму для виділення ДНК можна використовувати як нативну, так і заморожену. Транспортування та зберігання аналогічне з вимогами зберігання крові.

Відбір біоптатів. Біоптати можуть мати різне походження. Для ДНК-аналізу можна використовувати вищипи з вуха, які залишаються при міченні тварин. Термін зберігання шматочків розміром від 5х5 мм при температурі 4°С – 3-4 доби, у замороженому стані (-20°С і нижче) – необмежений.

Під час відбору кожну пробу маркірують індивідуальним номером. Складають акт про відбір проб у довільній формі, в якому вказують повну назву підприємства/власника, де зроблено відбір біоматеріалу, час відбору, його вид, записують номери тварин та відповідні номери проб.

Виділення ДНК проводять за декількома методиками в залежності від мети дослідження. За умови, якщо метою дослідження є скринінговий експрес-аналіз певної групи тварин на наявність генетичних аномалій чи особливостей, ДНК виділяють експрес-методом у невеликій кількості, термін зберігання такої проби – 1-2 доби.

З метою зберігання проби тривалий час і використання для ряду аналізів – ДНК виділяють відповідним методом. Такий ДНК-зразок може зберігатися декілька років.

Методи виділення ДНК:

Експрес-метод виділення ДНК з різних тканин за допомогою реагента "Chelex-100".

Виділення ДНК із крові: до 2–500 мкл крові або гомогенізованих тромбів додають 1000 мкл стерильної дистильованої води та перемішують на мікрозмішувачі типу «Vortex»; суміш інкубують протягом 15–30 хв. за кімнатної температури, періодично перемішують шляхом струшування; центрифугують протягом 1 хв. при 6000 об/хв.; обережно видаляють надосадову рідину, залишають 20–30 мкл рідини над осадом додають 170–180 мкл 5%-ного стерильного водяного розчину «Chelex-100»; інкубують протягом 15–30 хв. за температури 56°С; ретельно перемішують шляхом струшування та витримують 8 хв. на водяній бані за температури 100°С; ретельно перемішують шляхом струшування; центрифугують протягом 5 хв. при 6 000 об/хв.

Для ампліфікації використовують 5 мкл надосадової рідини, яка містить ДНК. Зразки зберігають при температурі -20°С. Після кожного розморожування зразки перемішують та центрифугують протягом 5 хв. при 6000 об/хв.

Виділення ДНК із сперми:

до 3 мкл нативної сперми додають 200 мкл 5% стерильного водного розчину, «Che1ex-100»; до суміші додають 2 мкл протеїнази К концентрацією 10 мг/мл та 7 мкл дітіотрейтолу; обережно перемішують шляхом струшування та інкубують зразки 30–60 хв. за температури 56°С; перемішують вміст пробірок на мікрозмі-

шувачі та інкубують 8 хв. при температурі 100°С; перемішують на мікрозмішувачі та центрифугують 2–5 хв. при 8000–10000 об/хв.

Зразки зберігають за температури -20°С. Для ампліфікації використовують 5 мкл надосадової рідини, яка містить ДНК.

Концентрацію та ступінь очищення ДНК визначають спектрофотометрично (спектрофотометр СФ-46) при довжині хвилі 260 та 280 нанометрів. Нативність ДНК визначають шляхом електрофорезу в 1% агарозному гелі за умови відсутності "шлейфу" фрагментів ДНК та інтенсивності флуоресценції бромистого етидію при ультрафіолетовому опромінюванні електрофореграм.

Метод виділення ДНК за Соколовим-Джемелинським (для проведення ряду аналізів і тривалого зберігання препаратів ДНК): 5 мл крові, що містить антикоагулянт, змішують з 30 мл холодного (4°С) буферу для лізису клітин (0,32 М сахарози, 5 мМ $MgCl_2$, 1% Трилон Х-100, 0,01Мтрис-НС1/рН 7,6) і витримують при температурі 4°С протягом 30 хв.; ядра клітин осаджують шляхом центрифугування при 4000 об/хв. Термін осаджування 30 хв. при температурі 4°С; осад ресуспендують у розчині, що містить 1,5 мл солі ЕДТА (75 мМ NaCl, 25 mM ЕДТА /рН 8,0/), 200 мкл 10% SDS, 25 мкл (10 мг/мл) протеїнази К, та інкубують протягом 16 годин при температурі 37°С; до одержаного лізату додають 0,75 мл 5М ацетату калію (рН 4,8), обережно перемішують, витримують 30 хв. при температурі 4°С та центрифугують (40 хв., 5000 об/хв., 4°С); до супернатанту додають два об'єми холодного (4°С) 96% етанолу та вимотують ДНК на скляну паличку; підсушують за кімнатної температури, ДНК двічі промивають 70% етанолом та розчиняють у 0,5 мл буферу ТЕ (10 мМ Тріс-НСІ /рН 7,4/), 1 мМ ЕДТА (рН 8,0) або 0,5 мл деіонізованої води. Проби ДНК зберігають при температурі -20°С.

Виділення ДНК фенол–хлороформним методом. До прозорого лізату додають 1 об. (400 мкл) суміші (25 об. фенолу, еквілібрований з буфером ТЕ, рН = 7,5–8,0; 24 об. хлороформу; 1 об. ізоамілового спирту) і після інтенсивного струшування (біля 3 хв.) центрифугують при 14000 об/хв. протягом 10 хв. При цьому протеіни і жири, які присутні у розчині, переходять у нижню фенольну фазу, а ДНК залишається у верхній водній фазі. Обережно, не торкаю-

чись проміжної фази, фракцію, яка містить ДНК, переносять у чисту центрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл і додають 1 об. (400 мкл) суміші (24 об. хлороформу; 1 об. ізоамілового спирту). Інтенсивно струшують і центрифугують при 14000 об/хв. протягом 10 хв. для розділення фаз. Верхню фазу переносять у чисту пробірку.

Для осадження ДНК із розчину додають 1/10 об. 3М розчину ацетату натрію, pH = 5,2 (30 мкл) і 2,5 об. 96%-ного етанолу (800 мкл), обережно перемішують до появи кульки ДНК. Після видалення рідкої фази кульку ДНК промивають у 70% спирті, охолодженому до +4°С чи до -20°С, висушують при кімнатній температурі і додавали 50–100 мкл дистильованої/деіонізованої води.

Виділення ДНК можна проводити також з використанням стандартних наборів для виділення ДНК відповідно до протоколу виробника.

Для ДНК-ампліфікації використовують метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Суть методу – багатократний направлений синтез ДНК із дезоксирибонуклеотидтрифосфатів, in vitro, за допомогою термостабільної ДНК-полімерази. Специфічність синтезу (ампліфікації) вибраної ділянки ДНК визначається синтетичними праймерами-затравками.

Обладнання для проведення ПЛР: ампліфікатор (інша назва приладу – термоциклер або термостат, що програмується для проведення ампліфікації); генетичний аналізатор; автоматичні мікропіпетки (0,5 – 200 мкл) для відбору зразків; центрифуга для пробірок типу «Eppendorf» (частота обертання ротора до 14000 об/хв); прилади для вертикального (у поліакриламідному гелі) та горизонтального (в агарозному гелі) електрофорезу; трансілюмінатор; система для фото- або цифрової документації результатів.

Реакційна суміш для проведення ПЛР (уміщує реакційний буфер для проведення ПЛР з $MgCl_2$ або без нього, оптимізований для конкретної термостабільної ДНК-полімерази, та суміш чотирьох дезоксинуклеотид-трифосфатів; високоочищена (деіонізована) вода. Реактиви поставляються у готовому вигляді фірмами-виробниками.

Електрофоретичне розділення ISSR-маркерів проводять в 2%, 4% агарозному гелях у тріс-боратному електрофорезному буфері (TBE: 0.0879 М Tpic, 0.089 М борна кислота, 0.002 М ЕДТА pH 8.0). Для нанесення зразків на гель використовують буфер такого складу: 0,25% бромфеноловий синій, 0,25% ксилолцианол, 30% гліцерин. Електрофорез проводять 1–3 години при напрузі 2 v\см геля. Фарбування гелів здійснюють за допомогою бромистого етидію (0,5 мкг/мл) 10 хв. з послідуючою їх багаторазовою відмивкою у дистильованій воді. Візуалізація проводиться на трансілюмінаторі в УФ-світлі при довжині хвилі 380 нм після забарвлення гелю етидієм бромідом.

Розміри, отриманих в ПЛР або в результаті рестрикції продуктів, виявляють за допомогою маркеру молекулярних мас, наприклад, *GeneRuler DNA Ladder Mix ready-to-use, "Fermentas"*.

3. ПРОВЕДЕННЯ МІКРОСАТЕЛІТНОГО АНАЛІЗУ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ВІД ПРЕДСТАВНИКІВ РІЗНИХ ВИДІВ

На сьогодні, відповідно до рекомендацій ISAG/FAO *(International Society of Animal Genetics*), запропоновані панелі найбільш інформативних мікросателітних маркерів для різних видів тварин, в тому числі і для ВРХ , які дають можливість оцінки генетичної структури та достовірності походження тварин та племінного матеріалу з вірогідністю 99,99%;

Дослідження генетичної структури за мікросателітними маркерами проводять на генетичних аналізаторах, наприклад ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) з використанням, наприклад, наступного обладнання: програмований термостат (ампліфікатор) Applied BiosystemsVeriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, США), твердотільний термостат типу "Dray-block", t - 95°С ± 1°С; УФ-бокс для ПЛР UVC/T (Biosan, Латвія); центрифуга Eppendorff 5715R (Eppendorf, Німеччина); стерильна ламінарна шафа 2-го кл.захисту, БАВп-01- «Ламинар-С»-1,2; мікрозмішувач «Vortex»; магнітний змішувач з підігрівом IKA RH basic2 (IKA-WE3RKE, Germany);

SpeedVac Concentrator DNA 120 (Therma); набір дозаторів піпеточних змінного об'єму від 0,5 до 200 мкл відповідно до ДСТУ ISO 9001, (Eppendorf, Німеччина); пробірки пластикові одноразові для ПЛР ємністю 0,2 - 0,5 мл відповідно до ДСТУ ISO 9001, (Eppendorf, Німеччина); одноразові наконечники для ПЛР ємністю 0,2 - 1,0 мл відповідно до ДСТУ ISO 9001, (Eppendorf, Німеччина); реакційні планшети на 96 лунок, типу «Microamp» (Applied Biosystems, США); трансілюмінатор ТМ 36 LCF 900 122 V, (UVP, США); спектрофотометр СФ – 46; камери для горизонтального гель-електрофорезу; камера для фотодокументації результатів «SONY»; блок живлення (джерело постійного струму 300 ± 10В), «Б-5-50»; холодильна камера на -20°С, «NORD»; ваги «OHAUS»; термостати «ТС – 80М-2» на 28–60°С; магнітна мішалка МН; лабораторний посуд (колби 25 – 1000 мл, мірні стакани об'ємом 25 – 1000 мл).

3.1. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у великої рогатої худоби *(Bos Taurus)*

3.1.1. Постановка ПЛР. Аналіз проводять за різними мікросателітними локусами ДНК (табл. 1).

Таблиця 1

Мікросателітні ДНК-локуси для ідентифікації великої рогатої худоби

Назва локусу	Локалізація в геномі	Розмір алелів, п.н.	Структура мікросателітної послідовності
TGLA126	D20S1	111-127	(TG)n
TGLA122	D21S6	136-182	$(AC)_n(AT)_n$
INRA023	D3S10	201-225	$(AC)_n$
ETH003	D19S2	100-128	$(GT)_nAC(GT)_6$
ETH225	D9S2	139-157	$(TG)_4CG(TG)(CA)_n$
BM1824	D1S34	176-188	$(GT)_n$
TGLA227	D18S1	76-104	$(TG)_n$
BM2113	D2S26	124-146	$(CA)_n$
ETH10	D5S3	206-222	$(AC)_n$
SPS115	D15	247-261	$(CA)_nTA(CA)_6$

Для проведення ампліфікації використовують послідовності праймерів

до мікросателітних локусів, які містять відповідний мікросателіт. Олігонуклеотидні послідовності праймерів (табл. 2).

Таблиця 2

Послідовності праймерів для дослідження

Локус	Послідовність праймерів		Барвник
TGLA126	F: R:	CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT TTGGTCCTCTATTCTCTGAATATTCC	TAMRA
TGLA122	F: R:	AATCACATGGCAAATAAGTACATAC CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC	R6G
INRA023	F: R:	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC TAACTACAGGGTGTTAGATGAACTC	TAMRA
ETH003	F: R:	GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	R6G
ETH225	F: R:	GATCACCTTGCCACTATTTCCT ACATGACAGCCAGCTGCTACT	R6G
BM1824	F: R:	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC CATTCTCCAACTGCTTCCTTG	R6G
TGLA227	F: R:	GGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT ACAGACAGAAACTCAATGAAAGCA	FAM
BM2113	F: R:	GCTGCCTTCTACCAAATACCC CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	FAM
ETH10	F: R:	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	FAM
SPS115	F: R:	AAAGTGACACAACAGCTTCACCAG AACCGAGTGTCCTAGTTTGGCTGTG	FAM

3.1.2. Порядок проведення.

1. Відбирають і маркірують необхідну кількість пробірок об’ємом 0,2 мл;
2. По 10 мкл готової реакційної суміші (табл. 3) розносять в чисті пробірки;

Таблиця 3

Склад ПЛР-суміші

№ п/п	Компонент суміші	На 1 реакцію, (мкл)
1.	ПЛР-буфер 5х blue 1,5мМ Mg2+ кат № R4-1-B	3,00
2.	Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP) 1.76 мМ кат № R3-1	1,5
3.	Taq-polymerase 5 U/мкл кат № R1-3	0,25
4.	Суміш праймерів	2,75
5.	Деіонізована вода	1,50
6.	ДНК матриця	1,0
Всього		10,0

3. Використовуючи накінечник для дозатора з аерозольним фільтром додають по 1 мкл ДНК зразків в пробірки з реакційною сумішшю;

4. Вмикають ампліфікатор згідно інструкції до приладу і задають параметри ампліфікації (табл. 4.);

5. Після закінчення реакції пробірки охолоджують до +4 С та переносять для проведення аналізу результатів до генетичного аналізатора.

Таблиця 4

Умови та параметри ампліфікації

Температура, °С	Час	Кількість циклів
95	10 хв	1
95	45с	35
60	45с	
72	60 с	
72	60 хв	1
25	120 хв	1
4	Зберігання	

3.1.3. Проведення фрагментного аналізу (для всіх видів)

Після закінчення реакції пробірки переміщають в зону для проведення аналізу результатів на генетичному аналізаторі.

Порядок роботи.

1. Ампліфіковану ДНК готують до проведення аналізу на ABI Prism генетичному аналізаторі.

2. Готують суміш з 1 мкл ПЛР-зразку, 20,0 мкл Hi-Di™ формаміду (Sigma, США), 0,5 мкл GeneScan-500 LIZ™ стандарту (Applied Biosystems, США).

3. Суміш ретельно перемішують на вортексі і струшують краплі зі стінок пробірки центрифугуванням за 5 тис. об/хв. протягом 15 с.

4. Зразки 2 хв. денатурують за 94°С, після цього витримують 3 хв. за 0°С.

5. Зразки переносять в реакційну планшету на 96 лунок у відповідні лунки.

6. Планшету поміщають у *ABI Prism* генетичний аналізатор і виконують аналіз згідно інструкції виробника.

Визначення розмірів алелів здійснюють за допомогою програмного забезпечення “GeneMapper 3.7” (Applied Biosystems, США) із використанням розмірного стандарту GeneScan-500 LIZ™ стандарту (Applied Biosystems, США).

В процесі проведення капілярного електрофорезу досліджуваних зразків комп'ютерна програма «Genescan» (Applied Biosystems, США) визначає розмір флюоресцентно мічених ПЛР-продуктів (у парах нуклеотидів) і зберігає отримані дані. Потім збережені дані експортують в комп'ютерну програму GeneMapper (Applied Biosystems, США) для проведення генотипування.

Результати програмного опрацювання можуть бути надані у графічному вигляді (карта піків, з вказівкою розмірів фрагментів і відносною інтенсивністю піків) (Рис. 1) або таблиць.

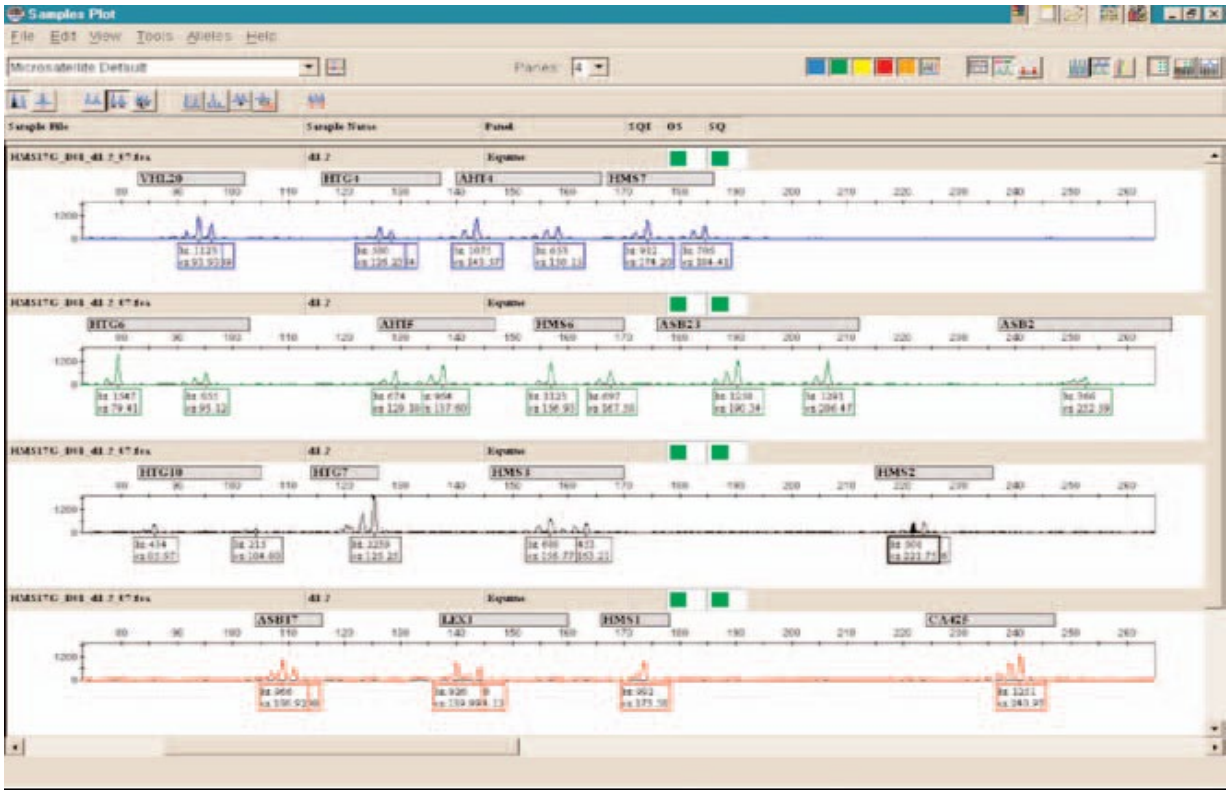


Рис. 1. Результат програмного опрацювання у графічному вигляді.

Результатом успішної ампліфікації алелю є основний пік, що асоціюється з цілою низкою додаткових піків меншої інтенсивності, що отримуються в результаті так званого «ковзання» полімерази. Кількість основних піків залежить від кількості алелів даного локусу в геномі досліджуваної тварини. Якщо кількість піків – один – гомозигота, якщо – два основних піки – гетерозигота (Рис. 2, 3).

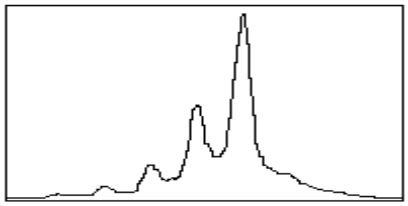


Рис. 2. Типовий малюнок піку гомозиготи.

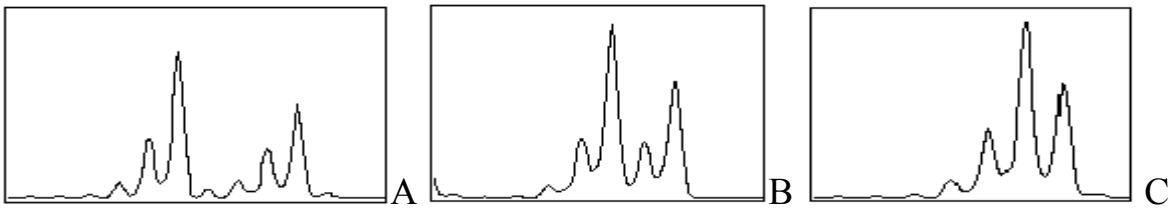


Рис. 3. Типовий малюнок піків гетерозиготи: A – різниця між піками 8 пар нуклеотидів, B – різниця в 4 пари нуклеотидів, C – різниця в 2 пари нуклеотидів.

З метою розробки ефективної системи генотипування за SSR-маркерами та дослідження ДНК-структури порід різних видів ми пропонуємо проведення мультиплексного ампліфікування генотипів за комплексом мікросателітних маркерів, що дозволяє оптимізувати процес аналізу. Для створення мультиплексу враховувано розміри мікросателітних локусів, що були обрані для типуванні генотипів тварин, барвник яким позначено маркер та співвідношення GC складу. Врахувавши ці показники нами розроблено та відпрацьовано наступні мультиплексні поєднання:

- *велика рогата худоба (Bos Taurus)* –3 мультиплексні комбінації:

1.TGLA227, BM2113, TGLA122, ETH003;

2. TGLA126, INRA023;

3. ETH225, BM1824;

- *коні (Equus caballus)* – 4 мультиплексні комбінації:

1. HTG04, HMS06, HTG06;

2. AHT04, HTG07, ASB23;

3. VHL20, CA425, HMS03;

4. HMS07; ASB17;

- *собаки (Canis familliaris)* –2 мультиплексні комбінації:

1. PEZ01, PEZ06, PEZ08;
2. FHC2010, FHC2054

- *свійська курка (Gallus domesticus)* –2 мультиплексні комбінації:

1. ADL0268, MCW0248, MCW0216;

2. ADL0278, LEI0094.

3.2. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у коней *(Equus caballus)*

3.2.1.Постановка ПЛР. Аналіз проводять за різними мікросателітними локусами ДНК (табл. 5).

Таблиця 5

Мікросателітні ДНК-локуси для ідентифікації коней

Назва локусу	Локалізація в геномі	Розмір алелів, п.н.	Структура мікросателітної послідовності
HTG04	9	127-139	$(TG)nAT(AG)_5AAG(GA)_5ACAG(AGGG)_3$
HMS06	4	151-169	(GT)n
AHT04	24q14	144-164	(AC)nAT(AC)n
ASB23	3q22.1-q22	128-154	(TG)n and $(TG)nTT(TG)_4$
HTG07	4	118-128	$(TG)_{19}$
HTG06	15q26-q27	84-102	(TG)n
CA425	28q18	226-246	(GT)n
VHL20	30	87-105	$(TG)_{17}$
HMS03	9	148-170	$(TG)_2(CA)_2TC(CA)n$ and $(TG)_2(CA)_2TC(CA)nGA(CA)_5$
HMS07	1q25	165-185	$(AC)_2(CA)n$
ASB17	2q14p15	87-129	(AC)n

Для проведення ампліфікації використовують послідовності праймерів до мікросателітних локусів, які містять відповідний мікросателіт. Олігонукле-

отидні послідовності праймерів (табл. 6).

Таблиця 6

Послідовності праймерів для дослідження

Назва локусу	Послідовність праймерів		Барвник
HTG04	F: R:	CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC	FAM
HMS06	F: R:	GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG CTCCATCTTGTGAAGTGTAACTCA	R6G
HTG06	F: R:	CCTGCTTGGAGGCTGTGATAAGAT GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCT	R6G
ATH04	F: R:	AACCGCCTGAGCAAGGAAGT GCTCCCAGAGAGTTTACCCT	FAM
ASB23	F: R:	GCAAGGATGAAGAGGGCAGC CGTGTGGGTTAGATGAGAAGTC	R6G
ASB17	F: R:	ACCAGTCAGGATCTCCACCG GAGGGCGGTACCTTTGTACC	TAMRA
CA425	F: R:	AGCTGCCTCGTTAATTCA CTCATGTCCGCTTGTCTC	R6G
HTG07	F: R:	CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT	TAMRA
HMS03	F: R:	CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT CCAACTCTTTGCACATAACAAGA	TAMRA
VHL20	F: R:	CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG	FAM
HMS07	F: R	CAGGAAACTCATGTTGATACCATC TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT	FAM

3.2.2. Порядок проведення.

1. Відбирають і маркірують необхідну кількість пробірок об’ємом 0,2 мл;

2. По 15 мкл готової реакційної суміші (табл. 7) розносять в чисті пробірки;

Таблиця 7

Склад ПЛР-суміші

№ п/п	Компонент суміші	На 1 реакцію, (мкл)
1.	ПЛР-буфер 5x blue 1,5мМ Mg2+ кат № R4-1-B	2,5
2.	Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP) 1.7(мМ кат № R3-1	4,0
3.	Taq-polymerase 5 U/мкл кат № R1-3	0,5
4.	Суміш праймерів, по 5рМ/мкл кожного	4,0
5.	Деіонізована вода	3,0
6.	ДНК матриця	1,0
Всього		15,0

3. Використовуючи накінечник для дозатора з аерозольним фільтром додають по 1 мкл ДНК зразків в пробірки з реакційною сумішшю;

4. Вмикають ампліфікатор згідно інструкції до приладу і задають параметри ампліфікації (табл. 8.);

5. Після закінчення реакції пробірки охолоджують до +4 С та переносять для проведення аналізу результатів до генетичного аналізатора.

Таблиця 8

Умови та параметри ампліфікації

Температура, °С	Час	Кількість циклів
95	10 хв	1
95	30с	30
60	30с	
72	60 с	
72	90 хв	1
4	Зберігання	

3.2.3. Проведення фрагментного аналізу відповідно до 3.1.3.

3.3. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у собак *(Canis familliaris)*

3.3.1.Постановка ПЛР. Аналіз проводять за різними мікросателітними локусами ДНК (табл. 9).

Таблиця 9

Мікросателітні ДНК-локуси для ідентифікації собак

Назва локусу	Локалізація в геномі	Розмір алелів, п.н.	Структура мікросателітної послідовності
PEZ01	CFA8	92-136	TACA
PEZ06	CFA16	164-216	(GAAA)n
PEZ08	CFA17	215-257	AAAG-
FHC2010	CFA24	208-260	(ATGA)n
FHC2054	CFA12	131-183	(GATA)n

Для проведення ампліфікації використовують послідовності праймерів

до мікросателітних локусів, які містять відповідний мікросателіт. Олігонуклеотидні послідовності праймерів (табл. 10).

Таблиця 10

Послідовності праймерів для дослідження

Назва локусу	Послідовність праймерів		Барвник
PEZ01	F: R:	GGCTGTCACTTTTCCCTTTC CACCACAATCTCTCTCATAAATAC	FAM
PEZ06	F: R:	ATGAGCACTGGGTGTTATAC ACACAATTGCATTGTCAAAC	FAM
PEZ08	F: R:	TATCGACTTTATCACTGTGG ATGGAGCCTCATGTCTCATC	FAM
FHC2010	F: R:	AAATGGAACAGTTGAGC ATGCCCCCTTACAGCTTCATTTTCC	FAM
FHC2054	F: R:	GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC	FAM

3.3.2. Порядок проведення.

1. Відбирають і маркірують необхідну кількість пробірок об’ємом 0,2 мл;

2. По 9 мкл готової реакційної суміші (табл. 11) розносять в чисті пробірки;

Таблиця 11

Склад ПЛР-суміші

№ п/п	Компонент суміші	На 1 реакцію, (мкл)
1.	ПЛР-буфер 5х blue 15мМ Mg2+ кат № R4-1-B	2,00
2.	Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP) 2 мМ кат № R3-1	0,50
3.	Taq-polymerase 1,5 U/мкл кат № R1-3	0,15
4.	Суміш праймерів, по 5рМ/мкл, кожного	1,0
5.	Деіонізована вода	4,35
6.	ДНК матриця	1,0
Всього		10,0

3. Використовуючи накінечник для дозатора з аерозольним фільтром додають по 1 мкл ДНК зразків в пробірки з реакційною сумішшю;

4. Вмикають ампліфікатор згідно інструкції до приладу і задають параметри ампліфікації (табл. 12.);

5. Після закінчення реакції пробірки охолоджують до +4 С та переносять для проведення аналізу результатів до генетичного аналізатора.

Таблиця 12

Умови та параметри ампліфікації

Температура, °С	Час	Кількість циклів
94	4 хв	1
94	15с	35
60	15с	
72	25 с	
72	5 хв	1
4	Зберігання	

3.3.3. Проведення фрагментного аналізу відповідно до 3.1.3.

3.4. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) свійської курки *(Gallus domesticus)*

3.4.1.Постановка ПЛР. Аналіз проводять за різними мікросателітними локусами ДНК (табл. 13).

Таблиця 13

Мікросателітні ДНК-локуси для ідентифікації свійської курки

Назва маркеру	Локалізація в геномі	Розмір алелів, п.н.	Структура мікросателітної послідовності
ADL0268	1	127-139	$(GT)_{12}$
ADL0278	8	108-122	$(TG)_{18}$
MCW0248	1	215-223	$(AC)_{9}$
LEI0094	4	259-283	$(AC)_{16}$
MCW0216	13	141-145	$(GT)_{9}$

Для проведення ампліфікації використовують послідовності праймерів до мікросателітних локусів, які містять відповідний мікросателіт. Олігонуклеотидні послідовності праймерів (табл. 14).

Таблиця 14

Послідовності праймерів для дослідження

Назва локусу	Послідовність праймерів		Барвник
ADL0268	F: R:	CTCCACCCCTCTCAGAACTA CAACTTCCCATCTACCTACT	FAM
ADL0278	F: R:	CCAGCAGTCTACCTTCCTAT TGTCATCCAAGAACAGTGTG	FAM
MCW0248	F: R:	GTTGTTCAAAAGAAGATGCAG TTGCATTAACTGGGCACTTTC	FAM
LEI0094	F: R:	GATCTCACCAGTATGAGCTGC TCTCACACTGTAACACAGTGC	FAM
MCW0216	F: R:	GGGTTTTACAGGATGGGACG AGTTTCACTCCCAGGGCTCG	FAM

3.3.2. Порядок проведення.

1. Відбирають і маркірують необхідну кількість пробірок об’ємом 0,2 мл;

2. По 9 мкл готової реакційної суміші (табл. 15) розносять в чисті пробірки;

Таблиця 15

Склад ПЛР-суміші

№ п/п	Компонент суміші	На 1 реакцію, (мкл)
1.	ПЛР-буфер 5х blue 15мМ Mg2+ кат № R4-1-B	2,0
2.	Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP) 2 мМ кат № R3-1	1,0
3.	Taq-polymerase 5 U/мкл кат № R1-3	0,15
4.	Суміш праймерів	2,5
5.	Деіонізована вода	1,85
6.	ДНК матриця	1,0
Всього		10,0

3. Використовуючи накінечник для дозатора з аерозольним фільтром додають по 1 мкл ДНК зразків в пробірки з реакційною сумішшю;

4. Вмикають ампліфікатор згідно інструкції до приладу і задають параметри ампліфікації (табл. 16);

5. Після закінчення реакції пробірки охолоджують до +4 С та переносять для проведення аналізу результатів до генетичного аналізатора.

Таблиця 16

Умови та параметри ампліфікації

Температура, °С	Час	Кількість циклів
94	4 хв	1
94	15с	35
60	15с	
72	25 с	
72	5 хв	1
4	Зберігання	

3.4.3. Проведення фрагментного аналізу відповідно до 3.1.3.

4. ДОСЛІДЖЕННЯ МУЛЬТИЛОКУСНИХ (МІЖМІКРОСАТЕЛІТНИПХ) ДІЛЯНОК ДНК У ПРЕДСТАВНИКІВ РІЗНИХ ВИДІВ

4.1. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у великої рогатої худоби *(Bos Taurus)*

Генотипування тварин за ISSR-маркерами проводять методом ISSR-ПЛР з використанням в якості праймерів мікросателітних локусів, при цьому відбувається ампліфікація ДНК-фрагментів, розташованих між інвертованими послідовностями мікросателітних локусів. В аналіз включають амплікони (фрагменти), які стабільно відтворюються не менш ніж у трьох повторах процедури ампліфікації.

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ISSR-ПЛР) в роботі використовували реакційну суміш об'ємом 10 мкл:

H_2O – 3,0 мкл,

5х буфер (67 мМ Трис-НС1 (рН 8,3), 17 мМ $(NH_4)_2$ SO_2, 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,1 % Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8 % гліцерин) – 1,0 мкл;

10-х dNTP суміш (по 2мМ кожного) – 1,0 мкл;

праймер (70 нг) – 0,8 мкл;

Taq-полімераза (1мол/1000 U) – 0,2 мкл;

ДНК 50-100 нг – 4,0 мкл.

Режим проведення ПЛР:

При використанні в якості праймерів фрагментів тринуклеотдних повторів мікросателітних локусів $(GAG)_6C$, та $(ACC)_6G$:

початкова денатурація – 2 хв. при 95ºС;

30 циклів:

денатурація - 95^0С – 30 сек ;

випал праймерів - 64^0С – 30 сек;

синтез - 72^0С – 1 хв.;

термінальна елонгація - 72^0С – 5 хв.

При використанні в якості праймерів динуклеотидних повторів $(GA)_9C$ та $(AG)_9C$

початкова денатурація – 2 хв. при 95ºС;

30 циклів:

денатурація - 95^0С – 30 сек ;

випал праймерів - 57^0С – 30 сек;

синтез - 72^0С – 1 хв.;

термінальна елонгація - 72^0С – 5 хв.

ПЛР-продукти розділяли в 2% агарозному гелі методом електрофорезу в 1 х ТВЕ-буфері. Візуалізацію проводили на трансілюмінаторі в УФ-світлі при довжині хвилі 380 нм після забарвлення гелю етидієм бромідом. Розміри ДНК-продуктів визначали за допомогою маркера молекулярних мас ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use-75-20000 bp.

4.2. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у **кіз (*Capra aegagrus hircus*)**

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ISSR-ПЛР) в роботі використовували реакційну суміш об’ємом 10 мкл:

H_2O – 3,0 мкл,

5х буфер (67 мМ Трис-HC1 (pH 8,3), 17 мМ $(NH_4)_2$ SO_2, 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,1 % Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8 % гліцерин) – 1,0 мкл;

10-х dNTP суміш (по 2мМ кожного) – 1,0 мкл;

праймер (70 нг) – 0,8 мкл;

Taq-полімераза (1мол/1000 U) – 0,2 мкл;

ДНК 50-100 нг – 4,0 мкл.

Режим проведення ПЛР:

При використанні в якості праймерів фрагментів тринуклеотдних повторів мікросателітних локусів $(GAG)_6C$, $(CTC)_6C$ та $(ACC)_6G$:

початкова денатурація – 2 хв. при 95ºС;

30 циклів:

денатурація - 95^0C – 30 сек ;

випал праймерів - 64^0C – 30 сек;

синтез - 72^0C – 1 хв.;

термінальна елонгація - 72^0C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів динуклеотидних повторів $(GA)_9C$ та $(AG)_9C$

початкова денатурація – 2 хв. при 95ºС;

30 циклів:

денатурація - 95^0C – 30 сек ;

випал праймерів - 57^0C – 30 сек;

синтез - 72^0C – 1 хв.;

термінальна елонгація - 72^0C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів повторів $(GA)_6CC$ та $(AG)_8CA$

початкова денатурація – 2 хв. при 95ºС;

30 циклів:

денатурація - 95^0C – 30 сек ;

випал праймерів - 54^0C – 30 сек;

синтез - 72^0C – 1 хв.;

термінальна елонгація - 72^0C – 5 хв.

При використанні в якості праймера повтору $(AG)_8CG$

початкова денатурація – 2 хв. при 95ºС;

30 циклів:

денатурація - 95^0C – 30 сек ;

випал праймерів - 56^0C – 30 сек;

синтез - 72^0C – 1 хв.;

термінальна елонгація - 72^0C – 5 хв.

ПЛР-продукти розділяли в 2% агарозному гелі методом електрофорезу в 1 х ТВЕ-буфері. Візуалізацію проводили на трансілюмінаторі в УФ-світлі при довжині хвилі 380 нм після забарвлення гелю етидієм бромідом. Розміри ДНК-продуктів визначали за допомогою маркера молекулярних мас ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use-75-20000 bp.

4.3. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у коней (*Equus caballus*).

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ISSR-ПЛР) в роботі використовували реакційну суміш об'ємом 10 мкл:

H_2O – 3,0 мкл,

5х буфер (67 мМ Трис-HC1 (pH 8,3), 17 мМ $(NH_4)_2$ SO_2, 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,1 % Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8 % гліцерин) – 1,0 мкл;

10-х dNTP суміш (по 2мМ кожного) – 1,0 мкл;

праймер (70 нг) – 0,8 мкл;

Taq-полімераза (1мол/1000 U) – 0,2 мкл;

ДНК 50-100 нг – 4,0 мкл.

Режим проведення ПЛР:

При використанні в якості праймерів фрагмену тринуклеотдного повтору мікросателітного локусу $(CTC)_6C$

початкова денатурація – 2 хв. при 95ºС;

30 циклів:

денатурація - 95^0C – 30 сек ;

випал праймерів - 64^0C – 30 сек;

синтез - 72^0C – 1 хв.;

термінальна елонгація - 72^0C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів динуклеотидних повторів $(GA)_9C$ та $(AG)_9C$

початкова денатурація – 2 хв. при 95ºС;

30 циклів:

денатурація - 95^0C – 30 сек ;

випал праймерів - 57^0C – 30 сек;

синтез - 72^0C – 1 хв.;

термінальна елонгація - 72^0C – 5 хв.

При використанні $(AG)_8CA$

початкова денатурація – 2 хв. при 95ºС;

30 циклів:

денатурація - 95^0C – 30 сек ;

випал праймерів - 54^0C – 30 сек;

синтез - 72^0C – 1 хв.;

термінальна елонгація - 72^0C – 5 хв.

При використанні $(AG)_8CG$

початкова денатурація – 2 хв. при 95ºС;

30 циклів:

денатурація - 95^0C – 30 сек ;

випал праймерів - 56^0C – 30 сек;

синтез - 72^0C – 1 хв.;

термінальна елонгація - 72^0C – 5 хв.

ПЛР-продукти розділяли в 2% агарозному гелі методом електрофорезу в 1 х ТВЕ-буфері. Візуалізацію проводили на трансілюмінаторі в УФ-світлі при довжині хвилі 380 нм після забарвлення гелю етидієм бромідом. Розміри ДНК-продуктів визначали за допомогою маркера молекулярних мас ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use-75-20000 bp.

4.4. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у водяного буйвола (*Bubalus bubalis)*.

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ISSR-ПЛР) в роботі використовували реакційну суміш об'ємом 10 мкл:

H_2O – 4,4 мкл,

5х буфер (67 мМ Трис-HC1 (pH 8,3), 17 мМ $(NH_4)_2$ SO_2, 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,1 % Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8 % гліцерин) – 2,0 мкл;

10-х dNTP суміш (по 2мМ кожного) – 1,0 мкл;

праймер (70 нг) – 0,4 мкл;

Taq-полімераза (1мол/1000 U) – 0,2 мкл;

ДНК 50-100 нг – 2,0 мкл.

Режим проведення ПЛР:

При використанні в якості праймерів фрагментів тринуклеотдних повторів мікросателітних локусів $(GAG)_6C$, $(CTC)_6C$ та $(ACC)_6G$:

початкова денатурація – 2 хв. при 95ºС;

35 циклів:

денатурація - $94,5^0C$ – 30 сек ;

випал праймерів - 64^0C – 30 сек;

синтез - 72^0C – 2 хв.;

термінальна елонгація - 72^0C – 5 хв.

При використанні в якості праймера динуклеотидного повтору $(AG)_9C$

початкова денатурація – 2 хв. при 95ºС;

35 циклів:

денатурація - $94,5^0C$ – 30 сек ;

випал праймерів - 57^0C – 30 сек;

синтез - 72^0C – 2 хв.;

термінальна елонгація - 72^0C – 5 хв.

термінальна елонгація - 72^0C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів повторів $(GA)_6CC$ та $(AG)_8CA$

початкова денатурація – 2 хв. при 95ºС;

35 циклів:

денатурація - 94,5^{0}C – 30 сек.;

випал праймерів - 54^{0}C – 30 сек.;

синтез - 72^{0}C – 2 хв.;

термінальна елонгація - 72^{0}C – 5 хв.

термінальна елонгація - 72^{0}C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів повтора $(AG)_8CG$

початкова денатурація – 2 хв. при 95ºC;

35 циклів:

денатурація - 94,5^{0}C – 30 сек.;

випал праймерів - 56^{0}C – 30 сек.;

синтез - 72^{0}C – 2 хв.;

термінальна елонгація - 72^{0}C – 5 хв.

термінальна елонгація - 72^{0}C – 5 хв.

ПЛР-продукти розділяли в 2% агарозному гелі методом електрофорезу в 1 х ТВЕ-буфері. Візуалізацію проводили на трансілюмінаторі в УФ-світлі при довжині хвилі 380 нм після забарвлення гелю етидієм бромідом. Розміри ДНК-продуктів визначали за допомогою маркера молекулярних мас ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use-75-20000 bp.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Poultry genetics, breeding, and biotechnology / ed. : W. M. Muir, S. E. Aggrey. Wallingford : CABI publishing, 2003. 744 p.

2. Fulton J. E. Molecular genetics in a modern poultry breeding organization. *World's poultry science journal*. 2008. Vol. 64. P. 171–176.

4. Duran C., Appleby N., Edwards D., Batley J. Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualization. *Current bioinformatics*. 2009. Vol. 4. P. 16–27.

5. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994. Vol. 20. P. 176–183.

6. Ye C., Yu Z., Kong F., Wu S., Wang B. R-ISSR as a new tool for genomic fingerprinting, mapping, and gene tagging. *Plant molecular biology reporter*. 2005. Vol. 23. P. 167–177.

7. Schlotterer C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion. *Nature reviews: genetics*. 2004. Vol. 5. P. 63–69.

8. Rajendrakumar P., Biswal A. K., Balachandra S. M., Srinivasarao K., Sundaram R. M. Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. *Bioinformatics*. 2007. Vol. 23. P. 1–4.

9. Li Y., Korol A. B., Fahima T., Nevo E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol. Biol. Evol*. 2004. Vol. 21 (6). P. 991–1007.

10. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994. Vol. 20. P. 176–183.

11. Habza-Kowalska E., Grela M., Gryzińska M., Listos P. Molecular techniques for detecting food adulteration. *Med. Weter*. 2019. Vol. 75 (7). P. 404–409.

12. Tanchev Sv. Conservation of genetic resources of autochthonous domestic livestock breeds in Bulgaria. A review. *Bulg. J. Agric. Sci*. 2015. Vol. 21. P. 1262–1271.

13. Xi M., Sun L., Qiu, S., Liu J., Xu J., Shi J. In vitro mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (Lilium longiflorum). *Plant Cell Rep*. 2012. Vol. 31. P. 1043–1051. doi: 10.1007/s00299-011-1222-8.

14. Nahid A., Mohammadreza M.A., Amin B. ISSR markers for assessing dna polymorphism and genetic characterization of cattle, goat

and sheep populations. *Iranian journal of biotechnology.* 2011. Vol. 9 (3). P. 222–229.

15. Pradeep Reddy M., Sarla N., Siddiq E. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica.* 2002. Vol. 128. P. 9–17. doi: 10.1023/A:1020691618797.

16. Li S., Jia J., Wei X., Zhang X., Li L., Chen, H., Fan Y. D., Sun H., Zhao X., Lei T., Xu Y., Jiang F., Wang H. Li L. A intervarietal genetic map and QTL analysis for yield traits in wheat. *Mol. Breeding*. 2007. Vol. 20. P. 167–178. doi: 10.1007/s11032-007-9080-3.

17.Vieira M. L., Santini L., Diniz A. L., Munhoz C. F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol*. 2016. Vol. 39 (3). P. 312–328. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027

18. Powell W., Machray G. C., Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci*. 1996. Vol. 1. P. 215–222.

19. Orr H. T., Zoghbi H. Y. Trinucleotide repeat disorders. Annu. Rev. *Neurosci*. 2007. Vol. 30. P. 575–621.

20. Gymrek M., Golan D., Rosset S., Erlich Y. lobSTR: A short tandem repeat profiler for personal genomes. *Genome Res.* 2012. Vol. 22. P. 1154–1162.

21. Kashi Y., King D. G. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends Genet*. 2006. Vol. 22. P. 253–259.

22. Neff B. D., Gross M. R. Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution*. 2001. Vol. 55 (9). P. 1717–1733.

23. Pei J., Bao P., Chu M., Liang C., Ding X., Wang H., Wu X., Guo X., Yan P. Evaluation of 17 microsatellite markers for parentage testing and individual identification of domestic yak (Bos grunniens). *Peer J*. 2018. Vol. 6 (1). e5946. doi: 10.7717/peerj.5946

24. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet*. 2004. Vol. 5 (6). P. 435–45.

25. Jin L., Macaubas C., Hallmayer J., Kimura A., Mignot E. Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996. Vol. 93. P. 15285–15288.

26. Selkoe K. A., Toonen R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett.* 2006. Vol. 9 (5). P. 615–629.

27. Jakabová D., Trandžík J., Chrastina J., Hudecová L'., Zetochová E., Bulla J., Bugarský A., Jakab F., Kozlík P. Effectiveness of six highly polymorphic microsatellite markers in resolving paternity cases

in Thoroughbred horses in Slovakia. *Czech Journal of Animal Science*. 2002. Vol. 47. P. 497–501.

28. Tozaki T., Kakoi H., Mashima S., Hirota K., Hasegawa T., Ishida N., Miura N., Choi-Miura N.H., Tomita M. Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. *J Vet Med Sci*. 2001. Vol. 63 (11). P. 1191–1197. doi: 10.1292/jvms.63.1191.

29. Vostrá Vydrová H., Vostrý L., Hofmanová B., Veselá Z., Schmidová J., Majzlík I. Population studies of Czech Hucul horses. *PoljoPrivreda.* 2015. Vol. 21 (1). P. 41–43.

30. Khanshour A., Juras R., Blackburn R., Cothranet G. The legend of the Canadian horse: genetic diversity and breed origin. *J. Heredity*. 2015. Vol. 106 (1). P. 37–44. doi:10.1093/jhered/esu074.

31. Mackowski M., Mucha S., Cholewinski G., Cieslak J. Genetic diversity in Hucul and Polish primitive horse breeds. *Arch. Anim. Breed*. 2015. Vol. 58 (1). P. 23–31. doi: 10.5194/aab-58-23-2015.

32. Kusza S., Priskin K., Ivankovic A., Jedrzejewska B., Podgorski T., Javor A., Mihok S. Genetic characterization and population bottleneck in the Hucul horse based on microsatellite and mitochondrial data. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2013. Vol. 109. P. 54–65. doi: 10.1111/bij.12023.

33. Dimsoski P. Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses. *Croat Med J*. 2003. Vol. 44 (3). P. 332–5.

34. Cho G. J. Genetic relationship and characteristics using microsatellite DNA loci in horse breeds. *J Life Sci*. 2007. Vol. 17. P. 699–705.

35. van de Goor, L. H. P., van Haeringen, W. A. and Lenstra, J. A. Population studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetic analysis. *Animal Genetics*. 2011. Vol. 42. P. 627–633. doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02194.x.

36. Nedup D., Monchai D., Yupin P. Genetic characterization of Bhutanese native chickens based on an analysis of Red Junglefowl (Gallus gallus gallus and Gallus gallus spadecieus), domestic Southeast Asian and commercial chicken lines (Gallus gallus domesticus). *Genetics and Molecular Biology.* 2012. Vol. 35 (3). P. 603–609. doi: 10.1590/S1415-475720120050000039.

37. Romanov M. N, Weigend S. Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and Jungle fowl using microsatellite markers. *Poult Sci.* 2001. Vol. 80. P. 1057–1063.

38. Mahammi F., Gaouar S., LaloÖe D., Faugeras R., Tabet-Aoul N., Rognon X., Tixier-Boichard M., Saidi-Mehtar N. A molecular analysis of the patterns of genetic diversity in local chickens from western Algeria in comparison with commercial lines and wild jungle fowls. *J. Anim. Breed. Genet*. 2016. Vol. 33. P. 59–70.

39. Hariyono D. N. H., Maharani D., Cho S., Manjula P., Seo D., Choi N., Sidadolog J. H. P., Lee J. H. Genetic diversity and phylogenetic relationship analyzed by microsatellite markers in eight Indonesian local duck populations. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2019. Vol. 32. P. 31–37.

40. Huo J. L., Wu G. S., Chen T., Huo H. L., Yuan F., Liu L. X., Ge C. R., Miao Y. W. Genetic diversity of local Yunnan chicken breeds and their relationships with Red Junglefowl. *Genet Mol Res*. 2014. Vol. 13 (2). P. 3371–3383. doi: 10.4238/2014.April.29.16.

41. Crittenden L. B., Provencher L., Levin I., Abplanalp H., Briles R. W. Characterization of a Red Jungle Fowl by White Leghorn back crossreference population for molecular mapping of the chicken genome. *Poult Sci*. 1993. Vol. 72. P. 334–348.

42. Hillel J., Groenen M. A. M., Tixier-Boichard M., Korol A. B., David L., Kirzhner V. M. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genet Sel Evol*. 2003. Vol. 35. P. 533–557.

43. Carvalho D. A., Martínez A. M., Carolino I., Barros M. C., Vallejo M. E. C., Santos-Silva F., de Oliveira Almeida M. J., Carolino N., Delgado Bermejo Bermejo J. V., Sarmento J. L. R. Diversity and Genetic Relationship of Free-Range Chickens from the Northeast Region of Brazil. Animals. *Open Access Journal From MDPI*. 2020. Vol. 10 (10). P. 1857. doi: 10.3390/ani10101857.

44. Agatep R. C., Lambio A. L., Vega R. S. A., Capitan S. S., Mendioro M. S., Yebron M. G. N. Microsatellite-based genetic diversity and relationship analyses of three genetic groups of domesticated Mallard ducks (Anas Platyrhynchos Domesticus L). *Philipp J Vet Anim Sci*. 2016. Vol. 42 (2). P. 102–111.

45. Savolainen P., Zhang Y. P., Luo J., Lundeberg J., Leitner T. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*. 2002. Vol. 298. P. 1610–1613.

46. Yilmaz O. Controversies of Origin of Domestic Dog-III-References of Modern Dogs until 2006. *Sch J Agric Vet Sci*. 2017. Vol. 4 (11). P. 484–490.

47. Ye J.-H., Ren D., Xie A.-F., Wu X.-P., Xu L., Fu P.-F., Zhao H.-A., Yang Q.-Y. Microsatellite-based Genetic Diversity and Evolutionary Relationships of Six Dog Breeds. *Psychology Faculty Publications*. 2009. Vol. 22 (8). P. 112–1106.

Науково-практичне видання

Копилов К. В.
Шельов А. В.
Мохначова Н. Б.
Стародуб Л. Ф.
Добрянська М. Л.

ПРОВЕДЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ЗА МОНОЛОКУСНИМИ ТА МУЛЬТИЛОКУСНИМИ ДІЛЯНКАМИ ДНК У РІЗНИХ ВИДІВ ТВАРИН

Методичні рекомендації

Підписано до друку 23.10.23 р.
Формат 60x84$^{1}/_{16}$. Папір офсетний.
Гарнітура Times New Roman.
Ум. друк. арк. 2,3
Наклад 100 прим.

Видання та друк – Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН,
08321, Київська обл., Бориспільський район, с. Чубинське, вул. Погребняка, 1.
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 7292 від 25.03.2021 р.