

СЕЛЕКЦІЯ, ГЕНЕТИКА ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

Ribogospod. nauka Ukr., 2017; 4(42): 65-74

DOI: 10.15407/fsu2017.04.065

УДК 606:62:639.3:639.212

РОЗРОБЛЕННЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ПЛР ДЛЯ ГЕНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ ПОПУЛЯЦІЙ ВЕСЛОНОСА (*POLYODON SPATHULA WALBAUM, 1792*)

Х. М. Курта, khrystyna.kurta@gmail.com, Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК, смт Чабани

О. О. Малишева, malisheva.sirota@gmail.com, Інститут ветеринарної медицини НААН України, м. Київ

В. Г. Спиридонов, spurydonov@ukr.net, Інститут ветеринарної медицини НААН України, м. Київ

Мета. Розробити та відпрацювати мультиплексну—ПЛР мікросателітної ДНК веслоноса (*Polyodon spathula*) для проведення популяційно-генетичного моніторингу його стад, культивованих в умовах рибницьких господарств України.

Методика. Для проведення досліджень використовували мультиплекс ПЛР для чотирьох мікросателітних ДНК-маркерів: Psp12, Psp21, Psp26 та Psp28. Оцінку результатів ефективності розробленої мультиплексної ПЛР та опрацювання отриманих даних проводили шляхом фрагментного аналізу ДНК на генетичному аналізаторі «ABI Prism 3130» (Applied Biosystem, США).

Результати. За результатами поділу продуктів мультиплексної ПЛР методом капілярного електрофорезу було встановлено, що розміри ампліфікованих фрагментів для кожного з чотирьох досліджуваних локусів Psp12, Psp21, Psp26 та Psp28 в одній ПЛР відповідали очікуванім. Аналіз даних електрофореграми показав, що за локусом Psp21 спостерігалася найвища інтенсивність піку, яка була на рівні 611 флуоресцентних одиниць (ФО), а найнижча інтенсивність піку спостерігалася для локусу Psp26 і була на рівні 105 ФО. У мультиплексній ПЛР після відповідної інтерпретації отриманих даних нами було ідентифіковано алельні варіанти в гетерозиготному стані для локусів Psp12 (218/220 п.н.), Psp26 (144/146 п.н.) та Psp28 (256/258 п.н.). При цьому, локус Psp21 (150/150 п.н.) ідентифіковано в гомозиготному стані.

Наукова новизна. Проведено оптимізацію та розроблено методіку мультиплексної ПЛР для генотипування веслоноса за мікросателітними ДНК-маркерами.

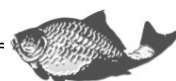
Практична значимість. Отримані результати досліджень можуть бути застосовані для генотипування веслоноса при виконанні програм з селекційно-племінної справи та штучного відтворення даного виду риб.

Ключові слова: веслоніс, мікросателіти, ДНК-маркери, мультиплекс, ПЛР, генотипування, генетичний аналіз.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ ТА АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

На сучасному етапі розвитку народного господарства одним із цінних та бажаних об'єктів аквакультури в Україні є представник ряду осетроподібних риб —

© Х.М. Курта, О. О. Малишева, В. Г. Спиридонов, 2017



веслоніс (*Polyodon spathula*). Цей вид риб поєднує цінні господарські та споживчі характеристики, а саме: він є продуцентом дороговартісної осетрової продукції — делікатесного м'яса та чорної ікри, за рахунок чого його культивування у штучних умовах є економічно обґрунтованим [1, 2].

Для нарощування чисельності популяцій веслоноса в умовах рибницьких господарств України в промислових масштабах вимагається ефективне вирішення завдань зі створення продуктивних стад плідників, а також визначення та збереження цінних генотипів [2].

Сучасні молекулярно-генетичні методи досліджень дозволяють ефективно проводити селекційно-плеєнну роботу щодо штучного відтворення веслоноса шляхом популяційно-генетичного моніторингу цінних генотипів та видової ідентифікації з використанням мікросателітних ДНК-маркерів [3–6]. Мікросателіти — це генетичні маркери з кодомінантним типом успадкування, які ефективно застосовуються для контролю за генетичною різноманітністю та еволюційними процесами у популяціях, а також для картування геномів в процесі роботи з рідкісними видами тварин [7–9]. Генетична ідентифікація за використання мікросателітів дозволяє виявляти індивідуальні відмінності та досліджувати рівень генетичного поліморфізму, що є важливою умовою при розробленні наукових основ для селекційно-плеєнних програм та розвитку аквакультури в Україні [8–12].

Розроблення протоколів ПЛР з одночасною ампліфікацією декількох локусів ДНК в одній реакції (мультиплекс-ПЛР) є одним із сучасних завдань для проведення масових генетичних досліджень популяцій, що значно зменшує вартість таких досліджень [13, 14]. Кількість локусів, що необхідно проаналізувати для отримання статистично достовірних даних, залежить від біологічної різноманітності та чисельності досліджуваних популяцій [13, 15, 16].

Згідно з результатами тривалої практики лабораторних досліджень, встановлено, що мультиплекс-ПЛР дозволяє знизити ризики контамінації дослідних зразків, скоротити час проведення досліджень та значно зменшити витрати реактивів при аналізі досліджуваних об'єктів [14, 15].

Тому розроблення та оптимізація мультиплекс-аналізу мікросателітної ДНК веслоноса є актуальним завданням для сучасних лабораторій з генетичного контролю з метою отримання достовірних даних в процесі генотипування та ДНК-паспортизації даного виду риб.

ВИДІЛЕННЯ ВИРШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ. МЕТА РОБОТИ

Для поліпшення якості генетичного матеріалу, контролю рівня інбридингу та зниження його впливу на виробництво товарної продукції необхідно застосовувати молекулярно-генетичні методи контролю [2, 8, 10].

Розроблення мультиплекс-ПЛР мікросателітної ДНК веслоноса дозволить максимально економічно здійснювати популяційно-генетичний аналіз штучно відтворюваних популяцій цього виду риб.



Метою представленої роботи було розроблення та відпрацювання мультиплексної ПЛР мікросателітної ДНК веслоноса для проведення популяційно-генетичного моніторингу його штучних стад, культивованих в умовах рибницьких господарств України.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для дослідження була ДНК (n=16), виділена з біологічних зразків веслоноса, відібраних на Виробничо-експериментальному Дніпровському осетровому рибовідтворювальному заводі ім. академіка С.Т. Артющика» (Херсонська обл., 2016 р.).

Виділення ДНК проводили за використання методу сорбції ДНК на диоксиді кремнію (SiO₂) [17, 18].

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили на ампліфікаторі Veriti 96 Well (Applied Biosystems, США) з попередньо оптимізованими параметрами: початкова денатурація — 5 хв, 95°C; 30 циклів денатурації — 15 с, 95°C; відпалювання праймерів — 25 с, 56°C; елонгація — 5 с, 72°C та пролонгування — 5 хв, 72°C [19].

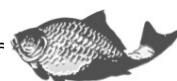
Реакційна суміш загальним об'ємом 20,0 мм³ містила наступні компоненти: 50,0 мМ Трис-НСІ (рН 8,3), 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP), по 5 рМ/мм³ форвардного і реверсного локус-специфічних праймерів та 1,5 од. Таq-ДНК-полімерази. Зразки виділеної ДНК вносили в кількості 5 мм³.

Продукти ампліфікації денатурували формамідом (Sigma, США) та розділяли шляхом капілярного електрофорезу на генетичному аналізаторі «ABI Prism 3130» Genetic Analyser (Applied Biosystems, США). Розміри алелів визначали за допомогою програми «Gene Mapper 3.7» (Applied Biosystems, США) з використанням стандарту LIZ-500 (Applied Biosystems, США).

Відображені на електрофореграмі показники розмірів алелів зводили до цілих чисел, що відображають розмір алелів у парах нуклеотидів, шляхом математичного округлення отриманих цифрових значень [20]. Визначення спектру частот ідентифікованих алелів проводили за методом підрахунку та аналізу отриманих генотипів досліджуваних особин із застосуванням програми Power Stats V12 (Promega) [21].

Для проведення досліджень використовували панель з чотирьох попередньо підібраних мікросателітних ДНК-маркерів: Psp 12, Psp 21, Psp 26 та Psp 28 (Applied Biosystems, США) [9,19]. Нуклеотидну послідовність для дизайну та синтезу олігонуклеотидних праймерів було взято з генетичної бази даних GenBank [9] (табл. 1).

Кожен із досліджуваних локусів ДНК, для яких проводили оптимізацію мультиплекс-ПЛР, підбирали таким чином, щоб мічені флуоресцентними барвниками ПЛР-продукти одного кольору не перекривалися за довжиною ампліфікованих фрагментів (табл. 1).



Таблиця 1. Мікросателітні ДНК-маркери для генотипування веслоноса [9]

Назва локусу	Структура повтору	Нуклеотидна послідовність праймерів (5' → 3')	Розмір (п.н.)	Флуоресцентний барвник
Psp12	(GA) ₁₅	F:GCATAGTTTTTGGGGGATGGC R:ACAAGTCTTCCACCGCATTC	218–228	FAM (синій)
Psp21	(GA) ₂₅	F:TTCAGCAGGTAGTGAGACAGGCAG R:TCAAGTCCCATCCACTCT	142–170	FAM (синій)
Psp26	(GT) ₂₅	F:TCGGTGTGTGTGTGTGTATGC R:TGGTTCAGTTTCGCTCATCC	130–160	TAMRA (жовтий)
Psp28	(GA) ₃₇	F:CAAAGGCATCCCSTACCAC R:GCTGGACAAAAAGTATGGAGTGC	224–260	TAMRA (жовтий)

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті досліджень були оптимізовані умови ПЛР (склад реакційної суміші, умови ампліфікації) для проведення мультиплексного ПЛР-аналізу мікросателітної ДНК веслоноса.

Попередньо оптимізовані умови ПЛР для ампліфікації мікросателітних локусів ДНК з детекцією продуктів ПЛР в агарозному гелі [19] враховували при розробці мультиплекс-ПЛР для детекції методом капілярного електрофорезу. Такий підхід дозволив проводити одночасну ампліфікацію чотирьох локусів мікросателітної ДНК веслоноса в одній реакційній суміші з достатньо високою ефективністю та відтворюваністю.

Наявність у складі ПЛР-суміші більше однієї пари олігонуклеотидних праймерів збільшує ймовірність виникнення неспецифічних вторинних структур — побічних продуктів ампліфікації. Тому, з метою мінімізації неспецифічних взаємодій між досліджуваними мікросателітними ДНК-локусами, нами емпірично було підбрано оптимальне співвідношення олігонуклеотидних праймерів у ПЛР-суміші, з концентрацією кожного по 5 пмоль.

Приклад отриманих даних мультиплекс-ПЛР за досліджуваними мікросателітними ДНК-маркерами веслоноса відображено на рис. 1.

За результатами поділу продуктів мультиплексної ПЛР методом капілярного електрофорезу було встановлено, що розміри ампліфікованих фрагментів для кожного з чотирьох досліджуваних локусів ДНК — Psp12, Psp21, Psp26 та Psp28 — відповідали очікуваним, згідно з табл. 1.

Результатом успішної ампліфікації алеля є наявність основного піку, який відповідає інтенсивності флуоресценції барвника, що асоціюється з наявністю ПЛР-продукту відповідного розміру. Аналіз даних електрофореграми вказує на те, що за локусом Psp21 спостерігалася найвища інтенсивність піку, яка була на рівні 611 флуоресцентних одиниць (ФО), а найнижча інтенсивність піку спостерігалася для локусу Psp26 — 105 ФО.



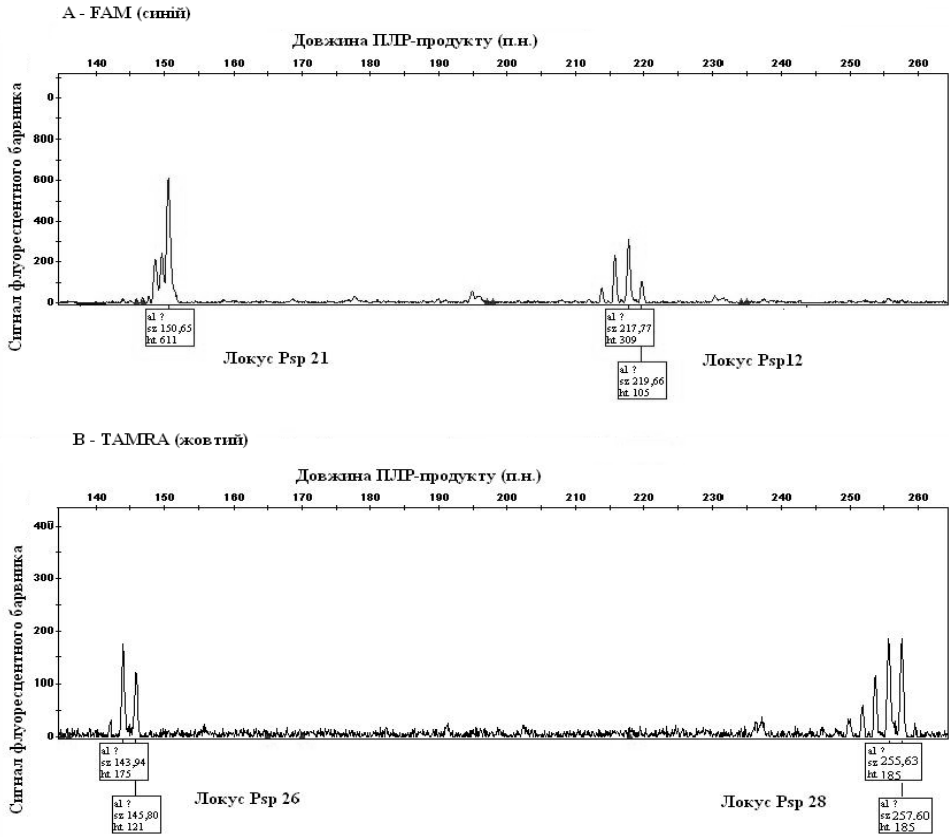


Рис. 1. Приклад електрофореграми поділу продуктів мультиплексної ПЛР-ампліфікації чотирьох досліджуваних локусів веслоноса: А — FAM (синій) — Psp12, Psp21 та В — TAMRA (жовтий) — Psp26 і Psp28

Кількість основних піків на електрофореграмі залежала від стану алеля відповідного локусу в геномі досліджуваного виду. Так, у мультиплексній ПЛР після відповідної інтерпретації отриманих даних нами було ідентифіковано алельні варіанти в гетерозиготному стані для локусів Psp12 (218/220 п.н.), Psp26 (144/146 п.н.) та Psp28 (256/258 п.н.). При цьому, локус Psp21 (150/150 п.н.) ідентифіковано в гомозиготному стані.

Таким чином, результати проведених досліджень показали, що розроблена мультиплексна ПЛР дозволяє здійснити генотипування одночасно чотирьох поліморфних локусів ДНК, з подальшою ідентифікацією алелів у досліджуваних зразках біологічного матеріалу веслоноса.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Розроблено та відпрацьовано мультиплексну ПЛР мікросателітної ДНК веслоноса з подальшою інтерпретацією результатів генотипування на генетичному аналізаторі «ABI Prism 3130» (Applied Biosystems, США).

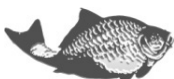


Розроблена та оптимізована мультиплексна ПЛР дозволила ідентифікувати гетерозиготні алелі для локусів Psp12, Psp26 та Psp28. Локус Psp21 представлений в гомозиготному стані.

Отримані результати досліджень можуть бути застосовані для подальшого популяційно-генетичного моніторингу племінних стад веслоноса, культивованих в умовах рибницьких господарств України.

ЛІТЕРАТУРА

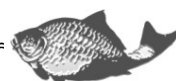
1. Курта Х. М., Малишева О. О., Спиридонов В. Г. Сучасний стан та перспективи досліджень генетичної структури веслоноса (*Polyodon spathula*) // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2016. № 6 (63). URL: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/issue/view/308> (21.10.2016).
2. Третяк О. М., Грициняк І. І., Тарасюк С. І. Використання ДНК-маркерів у дослідженнях генетичної структури племінного матеріалу веслоноса (*Polyodon spathula* (Walb.)) // Рибогосподарська наука України. 2012. № 4. С. 117—120.
3. Jennings C. A., Zigler S. J. Ecology and biology of Paddlefish in North America: historical perspectives, management approaches, and research priorities // Reviews in Fish Biology and Fisheries. 2000. Vol. 10. P. 167—181.
4. Status, trends, and management of sturgeon and paddlefish fisheries: correction / Pikitch E. K. et al. // Fish and Fisheries. 2006. Vol. 7. P. 78—79.
5. Mims S. Aquaculture of Paddlefish in the United States Aquat // Living Resour. 2001. Vol. 14. P. 391—398.
6. Genetic structure among four populations of paddlefish, *Polyodon spathula* (*Actinopterygii: Acipenseriformes: Polyodontidae*), based on disomic microsatellite markers / Zheng X. et al. // Acta Ichthyol. Piscat. 2014. Vol. 44(3). P. 213—219.
7. Nuclear Markers of Danube Sturgeons Hybridization / Duda A. et al. // Molecular Sciences. 2011. № 12. P. 6796—6809.
8. Малишева О. О., Спиридонов В. Г., Мельничук С. Д. Впровадження генетичної паспортизації осетрових в Україні // Тваринництво України. 2015. № 9. С. 12—15.
9. Microsatellite markers for the paddlefish (*Polyodon spathula*) / Heist E. J. et al. // Conservation Genetics. 2002. Vol. 3. P. 205—207.
10. Heist E. J., Mustapha A. Genetic Structure in Paddlefish Inferred from DNA Microsatellite Loci // Transactions of the American Fisheries Society. 2008. Vol. 137, iss. 3. P. 909—915.
11. Polymorphism of microsatellite loci – a tool in studying biodiversity of paddlefish aquaculture broodstock / Kaczmarczyk D. et al // Environmental Biotechnology. 2007. Vol. 3. P. 44—48.
12. Спиридонов В. Г. Розробка методики ДНК-ідентифікації осетрових видів риб з використанням полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі // Рибогосподарська наука України. 2017. № 2 (40). С. 68—77.
13. Microsatellite multiplex assay for the analysis of Atlantic sturgeon / Panagiotopoulou H. et al. // Appl. Genet. 2014. Vol. 55, iss. 4. P. 505—510.



14. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology / Elnifro E. M. et al. // Clin. Microbiol. Rev. 2000. № 13(4). P. 559—570.
15. Edwards M., Gibbs R. Multiplex PCR: advantages, development and applications // PCR Methods and Applications. 1994. Vol. 3. P. 65—75.
16. Визначення достовірності походження коней української верхової породи та мікросателітний аналіз ДНК / Спиридонов В. Г. та ін. // Біологія тварин. 2009. Т. 11, № 1–2. С. 265—269.
17. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids / Boom R. et al. // Journal of Clinical Microbiology. 1990. Vol. 28. P. 495—503.
18. Carter M. J., Milton I. D. An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles // Nucleic Acids Res. 1993. Vol. 21. P. 1044—1046.
19. Курта Х. М. Малишева О. О., Спиридонов В. Г. Оптимізація умов полімеразної ланцюгової реакції для дослідження мікросателітної ДНК веслоноса (*Polyodon spathula*) // Біологія тварин. 2017. Т. 19, № 2. С. 56—63.
20. DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis : User guide. [S. l.] : Thermo Fisher Scientific Inc., 2014. PN 4474504. P. 219.
21. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations / Marshall T. C. et al. // Molecular ecology. 1998. P. 639—655.

REFERENCES

1. Kurta, K., Malysheva, O., & Spirydonov, V. (2016). Suchasnyi stan ta perspektyvy doslidzhen henetychnoi struktury veslonosa (*Polyodon spathula*). *Naukovi dopovidi Natsionalnoho universytetu bioresursiv i pryrodokorystuvannia Ukrainy*, 63, 6. Retrieved from <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/issue/view/308>.
2. Tretiak, O., Hrytsyniak, I., Tarasiuk, S. (2012). Vykorystannia DNK-markeriv u doslidzhenniakh henetychnoi struktury pleminnoho materialu veslonosa (*Polyodon spathula* (Walb.)). *Rybohospodarska nauka Ukrainy*, 4, 117-120.
3. Jennings, C. A., & Zigler, S. J. (2000). Ecology and biology of Paddlefish in North America: historical perspectives, management approaches, and research priorities. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10, 167-181.
4. Pikitch, E. K., Doukakis, P., Lauck, L., Chakrabarty P., & Erickson, D. L. (2006). Status, trends, and management of sturgeon and paddlefish fisheries: correction. *Fish and Fisheries*, 7, 78-79.
5. Mims, S. (2001). Aquaculture of Paddlefish in the United States. *Aquat. Living Resour*, 14, 391-398.
6. Zheng, X., Schneider, K., & Lowe, J. et al. (2014). Genetic structure among four populations of paddlefish, *Polyodon spathula* (*Actinopterygii: Acipenseriformes: Polyodontidae*), based on disomic microsatellite markers. *Acta. Ichthyol. Piscat*, 44 (3), 213-219.
7. Duda, A., Suci, R., & Parashiv, M. et al. (2011). Nuclear Markers of Danube Sturgeons Hybridization. *Molecular Sciences*, 12, 6796-6809.
8. Malysheva, O., Spirydonov, V., Melnychuk, S. (2015). Vprovadzhennia henetychnoi pasportyzatsii osetrovkykh v Ukraini. *Tvarynnytstvo Ukrainy*, 9, 12-15.
9. Heist, E., Nicholson, E., & Sipiorski, J. et al. (2002). Microsatellite markers for the paddlefish (*Polyodon spathula*). *Conservation Genetics*, 3, 205-207.



10. Heist, E. J., & Mustapha, A. (2008). Genetic Structure in Paddlefish Inferred from DNA Microsatellite Loci. *Transactions of the American Fisheries Society*, 137, 3, 909-915.
11. Kaczmarczyk, D., Kohlmann, K., & Kersten, P. et al. (2007). Polymorphism of microsatellite loci – a tool in studying biodiversity of paddlefish aquaculture broodstock. *Environmental Biotechnology*, 3, 44-48.
12. Spyrydonov, V. (2017). Rozrobka metodyky DNK-identyfikatsii osetrovkykh vydiv ryb z vykorystanniam polimeraznoi lantsiuhovoi reaktsii v realnomu chasi. *Rybohospodarska nauka Ukrainy*, 2, 68-77.
13. Panagiotopoulou, H., Popovich, D., & Zalewska, K. et al. (2014). Microsatellite multiplex assay for the analysis of Atlantic sturgeon. *Appl. Genet.*, 55 (4), 505-510.
14. Elnifro Elfath, M., & Ashshi Ahmed, M. et al. (2000). Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13(4), 559-570.
15. Edwards, M., & Gibbs, R. (1994). Multiplex PCR: advantages, development and applications. *PCR Methods and Applications*, 3, 65-75.
16. Spyrydonov, V. H., Shelov, A. V., Melnychuk, S. D., & Ilnytska, T. Ye. (2009). Vyznachennia dostovirnosti pokhodzhennia konei ukrainskoi verkhovoi porody ta mikrosatelitnyi analiz DNK. *Biolohiia tvaryn*, 11(1-2), 265-269.
17. Boom, R., Sol, C. J. A., & Salimans, M. et al. (1990). Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 495-503.
18. Carter, M. J., & Milton, I. D. (1993). An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles. *Nucleic Acids Res.*, 21, 1044-1046.
19. Kurta, K., Malysheva, O., & Spyrydonov, V. (2017). Optymizatsiia umov polimeraznoi lantsiuhovoi reaktsii dlia doslidzhennia mikrosatelitnoi DNK veslonosa (*Polyodon spathula*). *Biolohiia tvaryn*, 19, 2, 56-63.
20. DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis: User guide (2014). Thermo Fisher Scientific Inc., PN 4474504, 219.
21. Marshall, T. C. et al. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.*, 639-655.

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ПОПУЛЯЦИЙ ВЕСЛОНОСА (*POLYODON SPATHULA WALBAUM, 1792*)

Х. М. Курта, khrystyna.kurta@gmail.com, Украинская лаборатория качества и безопасности продукции АПК, пгт Чабаны

О. А. Малышева, malisheva.sirota@gmail.com, Институт ветеринарной медицины НААН Украины, г. Киев

В. Г. Спиридонов, spyrydonov@ukr.net, Институт ветеринарной медицины НААН Украины, г. Киев

Цель. Разработать и отработать мультиплексную ПЦР микросателлитной ДНК веслоноса (*Polyodon spathula*) для проведения популяционно-генетического мониторинга его стад, культивируемых в условиях рыбоводных хозяйств Украины.

Методика. Для проведения исследований использовали мультиплексную ПЦР. Разработку и отработку мультиплекс-ПЦР-анализа осуществляли для четырех



мультиплекс–ПЦР микросателлитных ДНК-маркеров: Psp12, Psp21, Psp26 и Psp28. Оценку результатов эффективности разработанной мультиплексной ПЦР и обработку полученных данных проводили путем фрагментного анализа ДНК на генетическом анализаторе "ABI Prism 3130" (Applied Biosystem, США).

Результаты. По результатам разделения продуктов мультиплексной ПЦР методом капиллярного электрофореза было установлено, что размеры амплифицированных фрагментов для каждого из четырех исследуемых локусов Psp12, Psp21, Psp26 и Psp28 в одной ПЦР соответствовали ожидаемым. Анализ данных электрофореграммы показал, что по локусу Psp21 наблюдалась самая высокая интенсивность пика, которая была на уровне 611 флуоресцентных единиц (ФЕ), а самая низкая интенсивность пика наблюдалась для локуса Psp26 — 105 ФЕ. В мультиплексной ПЦР после соответствующей интерпретации полученных данных нами было идентифицировано аллельные варианты в гетерозиготном состоянии для локусов Psp12 (218/220 п.н.), Psp26 (144/146 п.н.) и Psp28 (256/258 п.н.). При этом, локус Psp21 (150/150 п.н.) идентифицирован в гомозиготном состоянии.

Научная новизна. Проведена оптимизация и разработана методика мультиплексной ПЦР для генотипирования веслоноса по микросателлитным ДНК-маркерам.

Практическая значимость. Полученные результаты исследований могут быть применены для генотипирования веслоноса при выполнении программ по селекционно-племенному делу и искусственному воспроизводству данного вида рыб.

Ключевые слова: веслонос, микросателлиты, ДНК-маркеры, мультиплекс, ПЦР, генотипирование, генетический анализ.

DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX PCR FOR THE GENETIC ANALYSIS OF PADDLEFISH (*POLYODON SPATHULA WALBAUM, 1792*) POPULATIONS

K. Kurta, khrystyna.kurta@gmail.com, Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products, Chabany village

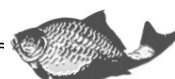
O. Malysheva, malysheva.sirota@gmail.com, Institute of Veterinary Medicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

V. Spyrudonov, spyrudonov@ukr.net, Institute of Veterinary Medicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

Purpose. Paddlefish is commercially important species owing to its biological features and consumer characteristics, namely it produces valuable and delicious fish products, such as high quality meat and black caviar. Consequently, its cultivation under Ukrainian fish farm conditions and further realization in domestic and foreign markets are economically efficient. However, the paddlefish broodstock in Ukraine requires the efficient solution of increasing its productivity, identification and assessment of its genetic variation. Thus, the aim of our study was to develop and implement a multiplex PCR-analysis of paddlefish (*Polyodon spathula*) for population-genetic monitoring of its artificial broodstocks in Ukraine.

Methodology. A multiplex PCR was used for the study. The multiplex PCR development was performed for four microsatellite DNA markers: Psp12, Psp21, Psp26 and Psp28. Each investigated DNA loci, for which the multiplex PCR was optimized, was selected in such a way that the colored PCR products labeled with fluorescent dye did not overlap the length of the amplified fragments. Evaluation of the multiplex PCR effectiveness and processing of the data were performed by fragment analysis of DNA on the genetic analyzer ABI Prism 3130 (Applied Biosystem, USA). The size of the identified alleles was determined using the "Gene Mapper 3.7" program (Applied Biosystems, USA) and LIZ-500 size standard (Applied Biosystems, USA).

Results. Based on the results of capillary electrophoresis of multiplex PCR products, it was found that the amplified fragments for each of the four studied loci: Psp12, Psp21, Psp26 and Psp28 in one PCR reaction were within the expected size range. Data analysis on the electrophoregram



demonstrated that Psp21 had the highest peak intensity at 611 fluorescent units (FU) and the lowest peak intensity at 105 FU was observed for Psp26 locus. In the multiplex PCR after proper interpretation of the data we identified heterozygous allelic variants for Psp12 (218/220 bp), Psp26 (144/146 bp) and Psp28 (256/258 bp). Herewith, the Psp21 locus (150/150 bp) is identified in the homozygous state.

Originality. The optimization was conducted and a multiplex PCR was developed for paddlefish genotyping using microsatellite DNA markers.

Practical value. The obtained results can be used for paddlefish genotyping within selective-breeding programs for artificial reproduction of this fish species.

Keywords: paddlefish, microsatellite DNA markers, multiplex, PCR, genotyping, genetic analysis.

