

Факультет тваринництва та водних біоресурсів
НУБІП України

УДК: 639.3.03:597.551

ПОГОДЖЕНО **ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**
Декан факультету тваринництва
та водних біоресурсів Завідувач кафедри
біології тварин
Кононенко Р.В. Сахачкий М.І.
«_»_ 2023 р. «_»_ 2023 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему: «Порівняльний аналіз популяції товстолоба за використанням
полілокусних ДНК-маркерів»

Спеціальність 207 «Водні біоресурси та аквакультура»
(шифр і назва)
Освітня програма Магістр 2-го року
(назва)

Магістерська програма
Орієнтація освітньої програми Освітньо-професійна
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми Н.Я. Рудик-Леуська
К.б.н., доцент (підпис)

Керівник магістерської роботи Кулібаба Р.О.
Д.с.-г.н., с.н.с. (підпис)
Виконав Павлоченко Д.А.
(підпис)

КИЇВ 2022
НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет тваринництва та водних біоресурсів

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біології тварин

д. б. н., професор

Сахацький М.І.

(науковий ступінь, вчене звання)

(підпис)

(ПШБ)

2023 року

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКО КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Павлюченко Данилу Андрійовичу

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 207 «Водні біоресурси та аквакультура»

(код і назва)

Орієнтація освітньої програми

освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Порівняльний аналіз популяцій товстолоба за використанням полілокусних ДНК-маркерів»

затверджена наказом ректора НУБіП України від 14.11.2022р. №1698 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру

(вказати місяць, число)

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи методи виділення ДНК з біологічного матеріалу, рівень ефективності ампліфікації за використання RAPD-маркерів, рівень поліморфності локусу, ступень інформативності окремих RAPD-маркерів

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

Оптимізація умов виділення ДНК та проведення ампліфікації;

Підбір інформативних поліморфних ДНК-маркерів для аналізу дослідної популяції товстолоба;

Ефективність ампліфікації та результативність використання RAPD-маркерів;

Внутрішньопопуляційний аналіз геному товстолоба за використання поліморфних RAPD-маркерів

Дата видачі завдання “ ” 20__ р.

Керівник магістерської
кваліфікаційної роботи

(підпис)

(ПШБ)

Завдання прийняв
до виконання

Кулібаба Р.О.

Павлюченко Д.А.

(підпис)

(ПШБ студента)

Реферат

Мета і завдання роботи: розгляд аналізу популяції товстолоба за допомогою RAPD маркерів, вивчення його застосування для оцінки генетичної структури товстолоба та встановлення зв'язків між популяціями.

Для досягнення поставленої мети сформульовано наступні завдання:

- провести дослідження щодо оптимізації умов виділення ДНК та складу реакційної суміші для проведення ампліфікації;
- підібрати інформативні поліморфні маркери на основі подібних досліджень;
- проаналізувати ефективність ампліфікації та результативність використання різних RAPD-маркерів;
- провести внутрішньопопуляційний аналіз геному товстолоба за використання виявлених поліморфних RAPD-маркерів;
- провести порівняння двох популяцій товстолобу за виявленими поліморфними маркерами.

Об'єкт досліджень – показники генетичної мінливості за різними RAPD-маркерами, рівень поліморфізму окремих дослідних маркерів.

Методи дослідження: молекулярно-генетичні – виділення ДНК з біологічного матеріалу, проведення ампліфікації, електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації в агарозному гелі; генетико-популяційні – визначення рівня поліморфізму за кожним окремим RAPD-маркером; статистичні – статистичний аналіз отриманих результатів.

Теоретична цінність отриманих результатів. Зібрані дані можуть керувати стратегіями збереження, включаючи ідентифікацію генетично відмінних популяцій і розробку відповідних планів щодо охорони водних ресурсів.

Практична значущість. RAPD маркери (K20, YPA-04 та B09) надали уявлення про структуру популяції даного виду. Аналізуючи генетичну подібність або відмінність між індивідами, ми можемо ідентифікувати

популяції, моделі міграції або потік генів, а при дослідженні особин з різних водойм, також генетичну диференціацію між різними географічними регіонами.

Можна включити отриману інформацію до генетичного паспорта роду:

метод генетичного типування; назва та послідовність праймера, який ефективно виділяє амплікони для ідентифікації породи; молекулярна маса ПЛР-фрагмента, який є генетичним маркером роду (у парах основ)

Особистий внесок. Магістрантом самостійно проведено

експериментальні дослідження та здійснено їх статистичну обробку і аналіз,

проаналізовано та узагальнено літературні джерела, самостійно описано отримані результати, сформульовано висновки роботи.

Структура та обсяг роботи. Випускна робота складається із вступу,

огляду літератури, загальної методики та основних методів досліджень,

результатів дослідження та їх обговорення, висновків, пропозицій

виробництву та списку використаних літературних джерел. Робота викладена

на 65 сторінках тексту, містить 3 таблиці та 5 рисунків. Список використаної літератури налічує 55 джерел з яких 42 латинцею.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ЗМІСТ
В
А
НУБІП України

В І
М І
Л І
І 2
НУБІП України

З 3
4
О Б
С
НУБІП України

Т 4
А 4
У 4
Н 4
Б 4
НУБІП України

Х 4
Д 4
В 4
О 4
А 4
НУБІП України

С 4
Л 4
О 4
Н 4
І 4
НУБІП України

Р 4
К 4
В 4
М 4
Н 4
Л 4
НУБІП України

М 4
НУБІП України

ВСТУП

Актуальність теми.

Дослідження генетичної структури та популяційних характеристик рибних видів є важливим аспектом у збереженні біорізноманіття та управлінні рибними ресурсами. Одним із потужних інструментів для таких досліджень є молекулярні методи, які дозволяють аналізувати генетичні відмінності і встановлювати зв'язки між популяціями. Один із таких методів - аналіз популяцій за допомогою RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) маркерів - надає можливість швидкого та ефективного визначення поліморфізму генетичних регіонів без необхідності використання епоспецифічних праймерів.

Метод RAPD базується на випадковій ампліфікації коротких фрагментів ДНК за допомогою одноланцюжкових праймерів. Цей метод дозволяє визначити поліморфізм геномних регіонів та отримати генетичні дескриптори, які можуть бути використані для аналізу генетичної структури популяцій товстолоба. Використання RAPD маркерів дозволяє виявляти генетичні відмінності між популяціями, оцінювати рівень генетичної різноманітності та встановлювати ступінь зв'язку між ними.

При аналізі літературних джерел зроблено висновок про недостатній рівень вивчення генетичних популяцій товстолоба за допомогою RAPD-ПІР.

Незважаючи на високий рівень досягнень у генетичних дослідженнях, в Україні вони дуже рідко використовуються для вирішення прикладних задач. Мое дослідження може внести вагомий внесок у розуміння генетичного розмаїття та збереження цього важливого виду риби.

Товстолоб (*Hypophthalmichthys nobilis*) є одним із видів прісноводної риби, який має велике господарське значення в рибному господарстві та є об'єктом досліджень з точки зору його біології та екології. Розуміння генетичної структури товстолоба та вивчення популяційних характеристик є

важливим для ефективного управління цим видом та збереження його біорізноманіття.

Дослідження генетичної різноманітності товстолоба за допомогою полілокусних ДНК-маркерів може додати нові дані до наукового знання про цей вид та його роль у екосистемах водойм. Розуміння генетичних характеристик популяцій товстолоба може сприяти вдосконаленню селекційних програм в аквакультурі та покращенню вирощування цього виду.

Також може допомогти визначити, наскільки здатний вид адаптуватися до змін в природному середовищі.

Суттєво важливим є паспортизація отриманих результатів. Паспортизація даних може бути важливою для контролю якості ПЛР. Це дозволяє виявити помилки або невідповідності у даних та виправити їх, якщо це необхідно. ПЛР дослідження часто включають в себе обробку великої кількості даних, таких як послідовності ДНК або РНК, результати ампліфікації, температурні режими та інші. Паспортизація даних дозволяє систематизувати та зберігати цю інформацію для подальшого аналізу та використання.

Суттєво важливим є паспортизація отриманих результатів.

Паспортизація даних може бути важливою для контролю якості ПЛР. Це дозволяє виявити помилки або невідповідності у даних та виправити їх, якщо це необхідно.

ПЛР дослідження часто включають в себе обробку великої кількості даних, таких як послідовності ДНК або РНК, результати ампліфікації, температурні режими та інші.

Паспортизація даних дозволяє систематизувати та зберігати цю інформацію для подальшого аналізу та використання.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 1

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ПУБЛІКАЦІЙ

1.1 Загальний опис представників виду *Hyporhamphichthys*.

Товстолоб (*Hyporhamphichthys*) відноситься до сімейства Коропових і представляє одну з його видових груп. Найпоширенішими видами товстолоба є білий товстолоб та строкатий товстолоб. Вони зустрічаються практично у всіх водоймах нашої країни. Товстолобик, англійською "silver carp," - це риба, що відзначається своєю характерною формою тіла, яка нагадує конус. Тіло цієї риби широким і плоским. Голова товстолобика має загострену форму, відсутні вуса, і рот, який відкривається вертикально вгору. Маленькі очі цієї риби розташовані нижче середньої лінії голови, створюючи враження дивної анатомічної особливості. Луска на тілі товстолобика дрібна. Дорослі особини цього виду можуть досягати до 100 сантиметрів у довжину і важити десятки кілограм [49].

Товстолобик мешкає в теплих та глибоких водах озер Китаю і Росії, здебільшого в річках, що входять до системи річки Амур. Також цей вид присутній в Тайвані та Таїланді. Зусиллями науковців та ентузіастів товстолобик активно розповсюджується в акваторіях Центральної та Східної Європи.

Розмноження товстолобика відбувається в літній період, коли температура води досягає 23-24°C. Ікра риби, виводиться в кількості близько 500 000 штук від однієї жіночої особини [51]. Після виведення ікри, молодь товстолобика поселяється у спокійних закрутах річок, де перші стадії їхнього розвитку включають споживання зоопланктону. З часом, довжина травного тракту збільшується та перевищує довжину тіла в шість - сім разів.

Природною особливістю товстолобика є його здатність до швидкого росту. У річці Янцзи товстолобик досягає статевої зрілості через 3-4 роки, в той час як у річках Центральної Європи, зокрема в Угорщині, цей процес займає 5-6 років [54].

Важливою рисою життя товстолобика є зміна харчувальних пріоритетів під час росту. На початку життя молодь цього виду споживає в основному фітопланктон, але по мірі зростання довжина їхнього травного тракту зростає і перевищує довжину тіла у шість - сім разів. Це сприяє їхньому переходу до фітотрофного способу життя, де фітопланктон стає основним джерелом їжі.

Надто слід відзначити, що проведені дослідження дозволили вивести гібриди товстолобика, які виникають в результаті спільного розмноження строкатого товстолобика і білого товстолобика. Ці гібриди, знайдені не лише в водах України, але й в Польщі, Німеччині та інших європейських країнах, стають об'єктом наукового дослідження та адаптації в різних аквакультурах.

М'ясо товстолобика відзначається своїми смаковими характеристиками та карболовою цінністю. У молодих рибах вміст жиру коливається від 8% до 13%, в той час як у дорослих особин він становить близько 23%. М'ясо цього виду риби високо ціниться завдяки його дієтичним якостям та багатому вмісту жиророзчинних вітамінів. Воно є смачним у будь-якому вигляді: свіжим, копченим, або приготованим гарячим чи холодним. Товстолобик, якого вирощують в штучних водоймах володіє певною стійкістю до коливань температур, що сприяє його поширенню в різних регіонах. Він не відноситься до хижих риба, тому різні вікові групи спокійно можуть існувати поруч.

Зовнішній вигляд товстолоба схожий на його родичів - карпів. Він має високе і подовжене тіло, покрите дрібною сріблястою лускою. Шкіра товста і міцна, а плавці мають темний колір і загострені вершини. Голова велика і широка, з великим опуклим чолом, яке виступає над низько розташованими очима - ця ознака є характерною тільки для товстолобів, від чого і походить їх назва. Рот великий, нижня щелепа трохи виступає вперед, а верхня - навпаки - назад [44].

У відміню від інших представників карпових, у товстолоба відсутні зуби. Однак його "щільний апарат" дозволяє фільтрувати воду і утримувати

в ній елементи живлення. Розміри товстолоба можуть сягати до 1 метра у довжину і ваги 20-25 кг.

Товстолобик відзначається своєю невимогливістю до харчування та може засвоювати як натуральну рослинну їжу, так і штучний корм. Ця риба виявляє певну гнучкість у виборі харчових джерел. Важливо також

відзначити, що в зимовий період товстолобик перебуває у стані летаргії, коли харчові потреби суттєво знижуються, а дихання сповільнюється до мінімуму.

Риба демонструє незвичайну стійкість до низького рівня кисню у воді, а також витримує значні коливання температури та кислотності води. Вона здатна

приспосовуватися до різних умов водойм і відзначається високою стійкістю до змін у водосередовищі, включаючи температури та хімічні фактори [35].

Розведення товстолобика може бути організовано на різних етапах, залежно від різних факторів, таких як розмір ставка, глибина, оксигенація

води, витрата води та система вилову риби. Також враховуються вікові категорії, розмір і стадія розвитку риби. Розділення риби на вікові категорії

допомагає попередити поширення хвороб та створює сприятливі санітарно-гігієнічні умови для її розведення та вирощування.

Нерестовища зазвичай облаштовуються в нижній частині водойми, де присутні різні види рослин, що сприяють склеюванню яєць. Процес нересту

зазвичай відбувається протягом двох тижнів у травні або червні. Перша пересадка риби відбувається після 4-6 тижнів перебування в нерестовищах,

і терміни залежать від інтенсивності виробництва [35]. Важливо також враховувати кількість риби на гектар водойми, забезпечуючи відповідну

витримку для її росту та розвитку відповідно до вимог та розмірів.

Історія полімеразної ланцюгової реакції.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) була розроблена в 1983 році американським вченим Карі Малісом. Вона стала одним з найвпливовіших

відкриттів в молекулярній біології. Маліс розробив ПЛР як метод швидкої ампліфікації конкретних фрагментів ДНК, що дозволяє отримати мільйони

копій цільової послідовності. Вперше Маліс запропонував використовувати термостабільну ДНК-полімеразу, отриману з бактерії *Thermus aquaticus*, яка мешкає у гарячих джерелах [20]. Цей фермент мав здатність витримувати високі температури, необхідні для денатурації ДНК.

Разом зі спеціально розробленими праймерами і дезоксинуклеотидами трифосфатами (dNTP), ПЛР відкрила шлях до швидкої та ефективної ампліфікації ДНК. Метод ПЛР був запатентований корпорацією Cetus, де працював Малліс, невдовзі після його відкриття. Використання Taq-полімерази також було захищене патентами. Проте, відбулося кілька високопрофільних судових процесів щодо цього методу, зокрема невдалий судовий процес, ініційований компанією DuPont. Фармацевтична компанія Hoffmann-La Roche придбала права на патенти в 1992 році і зараз має всі права на ПЛР.

Фермент ДНК-полімераза зустрічається природно в живих організмах. В живих клітинах він виконує функції реплікації ДНК протягом мітозу та мейозу. Полімераза працює, зв'язуючись з одним ланцюжком ДНК та синтезуючи інший, створюючи подвійну спіраль. У першому прототипі процесу ПЛР, фермент використовувався *in vitro* (у контрольованому оточенні за межами організму). Дволанцюгова молекула ДНК розділялася на окремі ланцюжки за допомогою нагрівання до 94 °C. Однак при цій температурі ДНК-полімераза, що використовувалася на той час денатурувалася, тому фермент доводилося додавати після стадії нагрівання на кожному циклі реакції [19].

Оригінальна процедура була дуже неефективна, тому що вимагала багато часу, великих кількостей ДНК-полімерази і безперервної уваги протягом всього процесу. Пізніше, цей оригінальний процес ПЛР був значно вдосконалений використанням ДНК-полімерази взятої з термофільних (теплолюбних) бактерій, що зазвичай ростуть в гейзерах за температури понад 110 °C. ДНК-полімераза, взята з цих організмів, стійка за високих температур, і при використанні у ПЛР не пошкоджується при нагріванні до

необхідної температури. З тих пір необхідність додавати нову ДНК-полімераза на кожному циклі зникла, процес копіювання ДНК був спрощений і автоматизований [18].

Одна з перших теплостійких ДНК-полімераз була отримана від бактерії *Thermus aquaticus* і стала відома під назвою «Taq». Taq-полімераза широко використовується для ПЛР і зараз. Проте, її недоліком є те, що через відсутність механізму корекції помилок у 3'→5' напрямку, вона робить відносно велику кількість помилок при копіюванні ДНК, що приводить до мутацій.

Нові полімерази, такі як Pwo[en] або Pfu, отримані з архей, мають необхідний механізм корекції і можуть значно скоротити число мутацій, які зустрічаються в відтвореній послідовності ДНК. Проте, ці ферменти полімеризують ДНК набагато повільніше, ніж Taq. Зараз доступні комбінації Taq і Pfu, що забезпечують як високу процесивність (протяжність ділянки, що синтезується за одне зв'язування ферменту, і в результаті швидкість синтезу), так і високу точність копіювання ДНК.

ПЛР зараз може виконуватися на фрагментах ДНК розміром більше 10 kbp (тисяч пар основ), але середній розмір ділянки ДНК, що ампліфікується, від кількох сотень до кількох тисяч пар основ ДНК. Проблема з довгими фрагментами — у великій кількості помилок та довгому часі реакції, тому необхідно підтримувати баланс між точністю і процесивністю ферменту.

Зазвичай, чим довше ділянка, тим вища ймовірність помилок.

Значення ПЛР було швидко визнано, і вона стала важливим інструментом в багатьох галузях науки, включаючи генетику, медицину, судову експертизу та археологію. ПЛР дозволяє дослідникам виявляти генетичні хвороби, встановлювати родинні зв'язки, аналізувати давні скелетні рештки та виконувати багато інших завдань. Завдяки ПЛР були зроблені численні наукові відкриття і прориви, які суттєво змінили наше розуміння генетики та біології.

З часом ПЛР була вдосконалена та розширена, наприклад, застосуванням реал-тайм ПЛР, яка дозволяє одночасно ампліфікувати та кількісно визначати кількість ДНК-молекул. ПЛР відкрила нові можливості в науковому дослідженні і діагностиці, і її вплив на біологію та медицину залишається значним і в даний час.

На даний час існують такі види ПЛР:

Вкладена ПЛР — застосовується для зменшення частки побічних продуктів реакції. Використовують дві пари праймерів і проводять дві послідовні реакції. Друга пара праймерів ампліфікує ділянку ДНК усередині продукту першої реакції.

Інвертована ПЛР — використовується в тому випадку, якщо відома лише невелика ділянка усередині потрібної послідовності. Цей метод особливо корисний, коли потрібно визначити фланкуючі послідовності після вставки ДНК в геном. Для здійснення інвертованої ПЛР проводять ряд розрізів ДНК рестриктазами з подальшим лігуванням. В результаті відомі фрагменти утворюються на обох кінцях невідомої ділянки, після чого можна проводити звичайну ПЛР.

ПЛР із зворотною транскрипцією — використовується для ампліфікації, виділення або ідентифікації відомої послідовності з бібліотеки РНК. Перед звичайною ПЛР проводять транскрипцію молекули РНК за допомогою зворотної транскриптази і отримують комплементарну ДНК (кДНК). Цим методом часто визначають, де і коли експресуються певні гени.

Асиметрична ПЛР (англ. Assymetric PCR) — проводиться тоді, коли потрібно ампліфікувати переважно один з ланцюжків початкової ДНК. Використовується в деяких методиках секвенування і гібридаційного аналізу [26]. ПЛР проводиться за класичним сценарієм, за винятком того, що один з праймерів береться у великому надлишку.

Кількісна ПЛР — використовується для швидкого вимірювання кількості певної ДНК, кДНК або РНК у пробі. Цей метод зазвичай використовується «у реальному часі» (Кількісна ПЛР у реальному часі). При

щому застосовують флуоресцентно мічені реагенти для точного вимірювання кількості продукту реакції у міру його накопичення [37].

Touchdown ПЛР — за допомогою цього методу зменшують вплив неспецифічної гібридизації праймерів на утворення продукту. Перші цикли проводять при температурі, вищій за температуру відпалу, потім кожні декілька циклів температуру знижують. За певної температури система пройде через смугу оптимальної специфічності праймерів до ДНК [21].

Метод молекулярних колоній — поліакриламідний гель полімеризують зі всіма компонентами ПЛР на поверхні і проводять термоцикування. У точках, які містять ДНК, до якої підібрані праймери, відбувається ампліфікація з утворенням молекулярних колоній.

Геліказ-залежна ампліфікація — подібна до звичайної ПЛР, але реакція проходить при постійній температурі. Для роз'єднання ланцюжків ДНК використовується геліказа замість теплової денатурації.

ПЛР із швидкою ампліфікацією кінців кДНК — ампліфікація матричної РНК (мРНК) за допомогою відомого фрагмента усередині цієї молекули

ПЛР довгих фрагментів — модифікація ПЛР для ампліфікації протяжних ділянок ДНК (10 kbp і більше). Використовують дві полімерази, одна з яких — таа-полімераза з високою процесивністю (тобто полімераза здатна за один прохід синтезувати довгий ланцюг ДНК), а друга — ДНК-полімераза з 3'-5' ексонуклеазною активністю. Друга полімераза необхідна для того, щоб коригувати помилки, внесені першою [23].

Випадкова ампліфікація поліморфної ДНК — використовується тоді, коли потрібно розрізнити близькі за генетичною послідовністю організми, наприклад, різні сорти культурних рослин, породи собак або близькоспоріднені мікроорганізми. У цьому методі зазвичай використовують

один праймер невеликого розміру (20—25 bp). Цей праймер буде частково комплементарний випадковим ділянкам ДНК досліджуваних організмів. Підбираючи умови (довжину праймера, його склад, температуру тощо), вдасться добитися задовільної відмінності картини ПЛР для двох організмів.

Мультиплексна ППР – використання великого числа унікальних праймерів в одній реакції ППР для отримання кількох продуктів ППР різної довжини [1]. Така реакція заміняє кілька окремих реакцій ППР, які вимагали

би більшої кількості реагентів та часу. Температури відпалу кожного з наборів праймерів повинні бути оптимізовані, щоби вони могли правильно працювати в межах однієї реакції. Крім того, розміри ділянок ДНК, які ампліфікуються, повинні достатньо відрізнятися, щоби їх можна було розрізнити за допомогою гелевого електрофорезу.

Мультиплексна ампліфікація проб за допомогою лігування дозволяє ампліфікувати кілька ділянок ДНК за допомогою однієї пари праймерів. Якщо нуклеотидна послідовність матриці відома лише частково або невідома зовсім, можна використовувати вироджені праймери, послідовність яких містить вироджені позиції, в яких можуть розташовуватися будь-які нуклеотиди [24].

Генетична різноманітність популяції тобто

Генетичний маркер – мутантний ген, або поліморфія унікальна ділянка геному, що використовується для генетичного картування з метою локалізації

положення інших генів. Під генетичними маркерами розуміють будь-які успадковані фенотипові ознаки, що розрізняються в окремих особин. ДНК-маркери або молекулярно-генетичні маркери, поліморфна ознака, що виявляється методами молекулярної біології на рівні нуклеотидної послідовності ДНК, для певного гена або для будь-якої іншої ділянки хромосоми при порівнянні різних генотипів, особин, порід, сортів, ліній [42].

Алелі – різні варіанти одного (того ж молекулярного маркера, розташовані в однакових ділянках (локусах) гомологічних хромосом. ДНК-маркер відповідає гену або некодуєчій ділянці геному, різні варіанти (алелі) якого відрізняються на рівні ДНК.

Відмінності на рівні ДНК (поліморфізм ДНК) можуть бути виявлені:

НУБІП УКРАЇНИ

- за допомогою гібридизації з відомими нуклеотидними послідовностями;

- при порівнянні довжини фрагментів, отриманих за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР);

НУБІП УКРАЇНИ

- в результаті обробки ДНК ендонуклеазами рестрикції.

Генетична різноманітність є мірою різноманітності генетичного матеріалу в межах популяції або між популяціями. Вона відображає кількісну та якісну варіацію генетичних характеристик в межах певного організмів

НУБІП УКРАЇНИ

виду.

Генетична різноманітність є результатом двох основних процесів: генетичної мутації, що створює нові генетичні варіанти, та генетичного обміну (генетичного потоку) між популяціями. Вона може бути визначена на

НУБІП УКРАЇНИ

різних рівнях організації, таких як генетичний рівень (різноманітність алелей в генах), популяційний рівень (різноманітність генотипів у популяції) та видовий рівень (різноманітність між видами).

Генетична різноманітність впливає на стійкість та пристосування популяцій та видів до змін у середовищі. Вона забезпечує резерв генетичного матеріалу, який може бути використаний під час еволюційних змін або змін у середовищі. Висока генетична різноманітність забезпечує популяцію з

НУБІП УКРАЇНИ

більшою потенційною адаптивною здатністю до нових умов, оскільки вона має більшу можливість наявності різних генетичних варіантів, здатних до

успішного пристосування.

НУБІП УКРАЇНИ

Зменшення генетичної різноманітності в популяціях може мати негативні наслідки. Втрата генетичної різноманітності може призвести до

зниження здатності популяції до адаптації до нових умов та забрудників, збільшення чутливості до хвороб та паразитів, зниження репродуктивної здатності та зниження загальної виживаності. Таким чином, збереження

НУБІП УКРАЇНИ

генетичної різноманітності є важливим аспектом сталого функціонування екосистем [38].

На генетичну різноманітність популяцій товстолоба можуть впливати наступні фактори:

Розмаїття середовища. Різноманітність генетичних характеристик може бути більшою в популяціях товстолоба, що населяють різні типи середовищ. Різні умови середовища можуть створювати різні селекційні тиски та сприяти збереженню різноманітності.

Розміщення та рух популяцій. Географічні фактори, такі як географічна ізоляція, міграція та переміщення, можуть впливати на генетичну різноманітність. Географічна ізоляція може призводити до формування

е Ефекти засновника та генетичний дрейф. При формуванні нових популяцій або колонізації нових територій генетична різноманітність може бути обмежена ефектами засновника та генетичним дрейфом. Обмежена кількість початкових особин може призвести до випадкового зміщення генетичних частот і зменшення різноманітності [16].

ф Антропогенний вплив. Людська діяльність, така як рибальство, аквакультура, забруднення природного середовища, може впливати на генетичну різноманітність товстолоба. Неврегульоване рибальство може призвести до зниження генетичної різноманітності через зміну розмірної вікової структури популяцій та зменшення кількості особин.

Мономорфність та поліморфність - це терміни, які використовуються для опису генетичної різноманітності в популяціях організмів [31].

і Мономорфність вказує на стан, коли всі особини в популяції мають однакові генетичні або морфологічні властивості. У мономорфній популяції відсутні значущі генетичні або фенотипові варіації між особинами. Мономорфна рибна популяція означає, що всі риби в цій популяції мають однаковий генетичний або морфологічний профіль. У такій популяції може

бути високій рівень гомогенності, що може бути корисним для комерційних аквакультурних проєктів, де однаковий фенотип може бути бажаним [28].

Поліморфізм вказує на наявність генетичних або морфологічних варіацій серед осіб в популяції. У поліморфній популяції можуть існувати різні алельні варіанти генів або різні фенотипи, які виражаються в зовнішньому вигляді чи інших властивостях. Поліморфна риба популяція включає в себе риби з різними генетичними або морфологічними характеристиками [8]. Ця різноманітність може виникати внаслідок генетичних мутацій, адаптації до різних середовищ або інших факторів.

Важливо враховувати, що в рибних популяціях поліморфізм може мати значущий екологічний контекст. Різноманітність генетичних або фенотипових властивостей може бути корисною для виживання риб у різних умовах середовища та для адаптації до змін у природних умовах. Також це може впливати на біологічні взаємодії в екосистемах, такі як харчові відносини та конкуренція.

Розуміння факторів, що впливають на генетичну різноманітність товстолоба, є важливим для ефективного управління та збереження цього виду та його природних популяцій.

Етапи ПЛР

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) є потужним інструментом в молекулярній біології, який дозволяє збільшити кількість конкретного фрагмента ДНК в багато мільйонів разів. Цей процес включає кілька етапів, які ми розглянемо докладно.

Перший етап - підготовка реакційної суміші

Першим кроком в ПЛР є підготовка реакційної суміші, яка містить всі необхідні компоненти для ампліфікації ДНК-шаблону. Основні компоненти реакційної суміші включають:

1. ДНК-шаблон - це початкова ДНК-молекула, з якої хочуть отримати більшу кількість копій. Вона може бути геномною ДНК, мітохондріальною ДНК,

або комплементарною ДНК (сDNA), яка синтезована з РНК шляхом зворотної транскрипції. Під час реплікації ДНК, двострунна молекула ДНК розділяється, і кожна зі стрічок служить як матриця для синтезу нової двострунної ДНК. Під час транскрипції, один із ланцюгів ДНК виступає як шаблон для створення РНК, яка містить інформацію, що кодує для білка або іншого функціонального продукту. ДНК-шаблон визначає послідовність нуклеотидів у синтезованій РНК або ДНК і, таким чином, грає ключову роль у збереженні та передачі генетичної інформації під час біологічних процесів.

2. Праймери - короткі одониткові олігонуклеотиди, що комплементарні до послідовності ДНК, яку потрібно ампліфікувати. Вони служать посадочними точками для полімерази під час синтезу нових нуклеотидів [33]. Праймери є суттєвими компонентами в молекулярних біологічних дослідженнях і використовуються для завдань, таких як ампліфікація генів, клонування ДНК, визначення послідовностей генетичних фрагментів, ідентифікація організмів за ДНК та багато інших додаткових досліджень. Праймери дозволяють досліджувати потрібні області геному або РНК, що робить їх точними інструментами в генетиці.

3. Дезоксинуклеотиди трифосфати (dNTP). Мономерні будівельні блоки ДНК, які використовуються полімеразою для синтезу нових нуклеотидів. Вони представляють собою молекули, що складаються з дезоксирибози (цукрового компонента), фосфатної групи і одного з чотирьох можливих азотистих основ: аденіну (А), тиміну (Т), цитозину (С) та гуаніну реплікації ДНК (копіювання ДНК) і синтезу нових ДНК-ланцюгів. Під час реплікації, ферменти ДНК-полімерази використовують dNTPs для додавання нових нуклеотидів до зростаючого ДНК-ланцюга. Кожен дезоксинуклеотид трифосфат відповідає одному з чотирьох можливих азотистих основ і повинен бути правильно спарений зі своєю комплементарною основою на матриці ДНК [27;40]

4. Термостабільна ДНК-полімераза - фермент, який копіює ДНК, здатний працювати при високих температурах. Ця стійкість дозволяє проводити ПЛР (полімеразну ланцюгову реакцію) при високих температурах, що потрібно для розділення двострунної ДНК під час реплікації.

Найпоширенішою полімеразою для ПЛР є Taq-полімераза, отримана з бактерії *Thermus aquaticus*. Термостабільні ДНК-полімерази здатні працювати при температурах до 95-98 градусів Цельсія, без того, втрати активності. Ця властивість робить їх ідеальними для ПЛР, особливо для ампліфікації ДНК зі зразків, де потрібно розділити двострунні ланцюги.

Буферна суміш - це розчин, який містить буфери, солі та інші компоненти, які допомагають підтримувати сталість рН та інші оптимальні умови для проведення певних біологічних або хімічних реакцій. Буфери в буферній суміші допомагають уникнути змін у рН середовищі під час проведення реакцій, що може бути критичним для багатьох біологічних процесів.

Буферні суміші використовуються в ПЛР, електрофорезі ДНК, імунокількісних та імуноблот-дослідження, біологічних культурах та інших додаткових процесах. Буферні суміші допомагають забезпечити сталість умов для проведення експериментів та зберігання зразків. Вони можуть містити в своєму складі різні солі, буферні розчинники, кофактори, інгібітори та інші речовини, які підтримують оптимальні умови для конкретного дослідження.

6. Додаткові компоненти: До реакційної суміші можуть додаватись додаткові речовини, такі як DMSO (диметилсульфоксид), BSA (сульфоциловий альбумін) або DTT (дитіотреїтол), які можуть поліпшити роботу полімерази та забезпечити оптимальні умови для ампліфікації.

Другий етап – денатурація.

Денатурація (полімеразно ланцюгової реакції) - це етап реакції, під час якого температура підвищується від 94°C до 98°C. Головна мета цього етапу

роз'єднати подвійний генетичний ланцюг ДНК, тобто роз'єднати комплементарні нитки і отримати одноланцюгову ДНК, яка буде використовуватися для подальшого аналізу.

Для високої температури розплавляє водневі зв'язки між комплементарними нуклеотидами і роз'єднує дві нитки ДНК. Цей процес називається денатурацією ДНК [34].

Під час денатурації дволанцюгова ДНК перетворюється на одноланцюгову ДНК (ssDNA). Це стає можливим завдяки високій

температурі, яка руйнує водневі зв'язки між азотистими основами, що знаходяться на протилежних ланцюгах ДНК. Як результат дві нитки розділяються і утворюють два одностанцюгові шаблони для подальшого продовження реакції.

Етап денатурації є найважливішим у ПЛР, оскільки він дозволяє отримати одноланцюгову ДНК, яка буде використовуватися під час наступних етапів ампліфікації. Після денатурації настає етап аннеалінгу, коли праймери (короткі одноланцюжкові олігонуклеотиди) зв'язуються з комплементарними послідовностями на шаблонній ДНК, і розпочинається синтез нових ДНК-ланцюжків за допомогою полімерази.

Отже, етап денатурації в ПЛР грає важливу роль у підготовці ДНК для подальшого ампліфікаційного процесу шляхом розплутування подвійного генетичного ланцюга і отримання одноланцюгових шаблонів.

Третій етап - відпал (аннеалінг).

Етап відпалу, також відомий як етап аннеалінгу, є одним з ключових кроків у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР). Цей етап дозволяє праймерам (коротким фрагментам ДНК, що служать початковими точками для реплікації) зв'язатися з комплементарними послідовностями на молекулі ДНК [9].

Після етапу денатурації, коли дволанцюгова ДНК розплутується на окремі ланцюги, температура знижується, щоб дозволити праймерам

зв'язатися зі своїми спареними послідовностями на молекулі ДНК. Це забезпечує точку початку для полімеразної реакції [43].

Температура етапу відпалу зазвичай трохи нижча за температуру денатурації. Це дозволяє праймерам зв'язуватися зі своїми комплементарними послідовностями на молекулі ДНК, утворюючи стабільні праймер-матриця комплекси.

Тривалість етапу відпалу залежить від довжини та складності праймерів і може варіюватися від секунд до декількох хвилин. Після відпалу настає етап продуктивної полімеризації, де полімераза ДНК продовжує синтезувати новий ланцюг ДНК на основі праймерів [4].

Четвертий етап – елонгація.

Етап елонгації є останнім кроком у циклі полімеразної ланцюгової реакції. Під час цього етапу новий ДНК-ланцюг синтезується на основі праймерів, які зв'язалися зі своїми комплементарними послідовностями на молекулі ДНК.

На початку етапу елонгації, температура піднімається до оптимального робочого температурного режиму для дії Taq полімерази або іншої термостабільної полімерази. Ця температура зазвичай становить приблизно 72-75 градусів Цельсія.

Під час елонгації полімераза ДНК (найчастіше, Taq полімераза) використовує вільні нуклеотиди (дезоксирибонуклеотиди - dNTPs) та матричний ДНК-ланцюг, який був розплутаний на початку реакції, для

Полімераза ДНК додає дезоксирибонуклеотиди (dNTPs) до 3'-кінця праймера, поступово продовжуючи синтез нового ланцюга ДНК. В результаті

циклів елонгації кінцевий продукт ПЛР стає збільшеним відносно початкової кількості ДНК, оскільки кожний цикл подвоює кількість дочірніх молекул ДНК.

Тривалість етапу елонгації залежить від довжини праймерів та бажаного фрагменту ДНК, а також від характеристик використовуваної полімерази. Зазвичай етап елонгації триває від 30 секунд до 2 хвилин на кожен цикл ПЛР.

Після закінчення етапу елонгації можуть бути проведені додаткові цикли денатурації, аннеалінгу та елонгації для подальшої збільшення кількості ампліфікованої ДНК. Кількість циклів ПЛР зазвичай визначається вихідною кількістю ДНК, яку потрібно ампліфікувати та додатковими вимогами протоколу ПЛР [14].

1.5 RAPD маркери

Методи мультилокусного аналізу ДНК зручні, але мають певні технічні та концептуальні обмеження.

Використання маркерів RAPD, AFLP, IS-PCR та ISSR-PCR в філогенетичному аналізі припускає, що продукти ампліфікації гомологічні, незалежні і варіабельні. Але по-перше різні фрагменти однакового розміру при електрофоретичному аналізі можуть займати однакове положення на гелі. По-друге деякі фрагменти можуть ампліфікуватись до рівня нижчого роздільної здатності, отже, не будуть виявлені. По-третє можливі артефактні смуги, що з'являються через неспецифічність праймерів, гетеродуплексів та інших помилок [3].

Єдина ознака, яка може бути визначена з цих маркерів без додаткового дослідження, - це присутність / відсутність ампліфікованого фрагмента ДНК.

Можна відрізнити доміную гомозиготу від гетерозиготи і рецесивну гомозиготу від неампліфікованої послідовності. Підрахувати частоти алелів в типовому випадку неможливо, в той час як монолокусні маркери аналізуються саме алелі з частотами.

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA – поліморфізм випадково ампліфікованих фрагментів. Проведення полімеразної ланцюгової реакції з використанням одного декануклеотидного праймера з довільною нуклеотидною послідовністю [15].

Продукти RAPD аналізу утворюються в результаті ампліфікації фрагмента геномної ДНК, що фланкується інвертованою послідовністю даного праймера. Послідовність праймерів не абсолютно будь-яка, а обмежена в межах 40-70% вмісту GC і 50-100% лінгвістичної складності нуклеотидної послідовності.

У RAPD використовують як одиночний праймер, так і декілька RAPD праймерів. Іноді праймер що виявляє високий поліморфізм для одного виду, буде також ефективний і для інших видів. Поліморфізм в ДНК-послідовностях може відрізнятись між різними видами навіть у споріднених організмів. Отже, праймери, які були спроектовані для виявлення поліморфізму в одному виді, можуть не бути специфічними для інших видів і навіть можуть не давати продукту ампліфікації або давати слабкий сигнал. При проектуванні праймерів для аналізу поліморфізму між видами важливо враховувати різницю в послідовностях між видами та забезпечувати специфічність праймерів для цільового виду.

Для роботи з RAPD-ПЛР потрібно враховувати наступні її властивості.

Вона має високу чутливість до змін умов реакцій, але повторність експерименту і середні результати декількох дослідів можуть допомогти зменшити вплив змін умов.

Досить низька температура відпалу 57°C збільшена ймовірність утворення продуктів ампліфікації з великою кількістю неспарених основ.

Оскільки праймери можуть аннелюватися до неконкретних місць у геномі. Це може призвести до складних і неоднозначних результатів.

RAPD маркери поведуться як домінантні і їх гетерозиготний стан не відрізняється від гомозиготного, тому знижується точність оцінки при аналізі популяцій і при ідентифікації генетичних ресурсів у порівнянні з кодомінантними маркерами. У випадку, коли RAPD маркери використовуються для аналізу поліморфізму, вони розглядаються як

домінантні, і їх результати допомагають встановити наявність поліморфізму, але не розкривають докладних генотипів індивідів [35].

Низька відтворюваність результатів ПЛР. Якість та джерело ДНК можуть впливати на результати RAPD. Якщо ДНК поганої якості або забруднена, це може призвести до низької відтворюваності. Присутність інгібіторів, таких як залишки реакцій або інші забруднення в ДНК-зразку, може вплинути на результати RAPD, знизити їх відтворюваність.

Для підвищення достовірності необхідна більша вибірка. Цей пункт зумовлений вище описаними факторами. Чим більша вибірка тим точніших результатів можна досягти за допомогою RAPD-ПЛР.

RAPD аналіз може служити своєрідним експрес - методом виявлення генетичного поліморфізму, що особливо актуально для маловивчених таксономічних груп, а також як джерело унікальних локус - специфічних маркерів. Діагностичні можливості RAPD-технології успішно проілюстровані на численних прикладах опису генетичної різноманітності мікроорганізмів, вищих рослин, безхребетних і хребетних тварин [30].

Популяційна генетика

Популяційна генетика досліджує характеристики популяцій, їх генетичну структуру (генофонд), тобто розподіл алелей окремих генів в різних групах і фактори, що впливають на цей розподіл в часі і просторі, а також причини нерівномірного розподілу алелей. Це дозволяє прогнозувати поширення спадкових захворювань у різних поколіннях і розробляти спрямовані медичні стратегії.

Варіабельність розповсюдження алелей в популяціях залежить від різних факторів. Розрізняють популяційні фактори, що впливають на зміну:

- частоти алелей (генних частот), які визначають відносну частоту народження певного алелю (домінантного або рецесивного) в популяції;

частоти генотипів (генотипичних частот), які відображають відносну частоту народження певного генотипу в популяції.

Частоту алелей в популяції впливають мутації, міграція, природний відбір і генетичний дрейф. Мутації вносять нові генетичні варіанти в популяцію, міграція сприяє обміну генетичною інформацією між різними групами, природний відбір сприяє збереженню адаптивних генетичних властивостей, а генетичний дрейф впливає на розподіл алелей випадковим чином від покоління до покоління.

Нижче наведені еволюційні фактори, які впливають на генетичні процеси в популяціях. Мутаційний процес сприяє створенню нових генетичних варіантів (алелей). Однак його дія не є напрямленою і не призводить до значущого переважання одних алелей над іншими. Він лише надає матеріал для подальшого відбору. В сучасному світі вплив природного відбору стає менш виразним, через антропогенний вплив. Але при цьому генетичне навантаження популяції зростає - це відомий дисгенний ефект. Наявність генетичного навантаження є безпосереднім результатом генетичного поліморфізму і є платою за екологічну і еволюційну адаптацію.

Природний відбір впливає на фенотип організмів через взаємодію багатьох факторів і може відбуватися в різних напрямках. В популяціях людей він втратив свою видоутворювальну функцію (переважає стабілізуючий відбір), але він важливий в популяціях тварин для стабілізації генетичного фонду та підтримання генетичного поліморфізму. В результаті природного відбору алелі, які підвищують шанси на виживання та репродукцію, накопичуються протягом кількох поколінь, змінюючи генетичний склад популяцій у сприятливому напрямку. Саме таким чином формуються генофонди популяцій, збалансовані за набором та частотами алелей, які забезпечують виживання популяції в конкретних умовах.

Популяція - це група осіб одного виду, які живуть на певній території та мають спільне походження. Цей термін був введений В. Йоганнсеном у 1909

році. Популяції, так само як і окремі організми, виявляють індивідуальні різниці та є динамічними системами. Кожну популяцію можна охарактеризувати за різними параметрами, такими як ареал, кількість, густота, вікова та статевая структура, рівень народжуваності, смертності, приріст, екологічні та генетичні характеристики [22].

Генетика популяцій є важливою галуззю генетики, яка вивчає генетичні процеси в популяціях. Як будь-який вид, рідну популяцію можна поділити на різні підгрупи, які називають популяціями.

Генетика популяцій досліджує генетичну структуру популяцій та процеси, які призводять до її змін. Генофонд - це сукупність усіх генів та їхніх алелей у популяції. Особини, які належать до однієї популяції, мають спільний генофонд, оскільки в популяції відбувається вільний обмін генетичною інформацією завдяки вільному схрещуванню.

Вивчення процесів успадкування та мінливості в межах популяції має свої особливості. По-перше, враховується вплив усіх генетичних наслідків від усіх вільних схрещувань в популяції. Популяції є більш генетично різноманітними, ніж окремі індивіди (або родини).

Визначення гетерогенності популяції полягає в розгляді різноманітності властивостей в цій популяції. Якщо всі особини в популяції мають однакову ознаку, то ця ознака вважається мономорфією. У разі, коли в популяції спостерігається наявність різних варіантів цієї ознаки (а відповідно, різних генів), ми говоримо про поліморфізм. Отже, поліморфізм популяції визначається як відношення кількості поліморфних генів (або ознак, які вони впливають) до загальної кількості досліджених особин.

В популяційній генетиці, алель вважається поліморфним, якщо його частота в популяції становить 1% і більше. Ті алелі, чії частоти зустрічальності не досягають критерію поліморфізму, але вищі за рівень спонтанних мутацій, вважаються рідкісними. Поліморфізм свідчить про те,

що частина генів в особин цієї популяції перебуває в гетерозиготному стані

Визначення частоти зустрічальності алелів та генотипів в популяції визначається як відношення кількості конкретного алелю до загальної

кількості алелів цього гена в популяції. У разі, коли прямий розрахунок

частоти не можливий через повне домінування (гетерозиготи не відрізняються фенотипово від домінантних гомозигот), його можна визначити за допомогою

Закону Харді - Вайнберга. Закон Харді - Вайнберга стверджує, що в великій популяції, де відсутні впливи зовнішніх факторів та не відбуваються нові

мутації чи обмін генетичною інформацією з іншими популяціями, співвідношення алелів залишається сталим протягом багатьох поколінь [48]

Вимоги до ПЛР лабораторії

Лабораторія ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) — це спеціалізований заклад, призначений для проведення експериментів ПЛР і

пов'язаних з ними досліджень молекулярної біології. Лабораторія складається з різних зон та обладнання, необхідних для ПЛР-ампліфікації, підготовки проб та аналізу.

Між загальними стандартними вимогами до будь-якого типу лабораторій, слід відзначити так:

- приміщення повинні бути розташовані окремо від інших зон і мати обмежений доступ. установи, які проводять забір матеріалу, повинні розташовувати приміщення для приймання аналізів при вестибюльній групі приміщень.
- якщо в лабораторії є приміщення для мікробіологічних досліджень, вони повинні бути повністю ізольовані від інших приміщень, і вхід в них повинен бути організований ззовні через спеціальне приміщення.
- у випадку, коли лабораторія знаходиться в житловому будинку, вона може розташовуватися в прибудові, при цьому між

житловими та лабораторією обов'язково повинні бути нежитлові приміщення.

Сама лабораторія для клінічних досліджень (якщо вони проводяться в приміщенні), повинна бути розділена на дві зони: "чисту" і "брудну". Кожне робоче приміщення ПЛР-лабораторії повинно мати площу не менше 12 кв.м

на одне робоче місце, включаючи передбюкс, який повинен мати не менше 2 кв.м.

При збільшенні кількості робочих місць, площу слід розраховувати, додаючи по 6 кв.м на кожне додаткове робоче місце. Отже, навіть якщо не

враховувати мийну та приміщення для забору аналізів, при виборі площі приміщення лабораторії варто розраховувати на площу приблизно 60 кв.м.

В приміщенні лабораторії також можуть бути розташовані кімната очікування, санвузол, кімната для зберігання обладнання тощо. Саме

приміщення повинно мати доступ до водопостачання, системи опалення та електропостачання. Підлога, стіни та стеля приміщення повинні бути

стійкими до вологого прибирання та дезінфекції. Кімнати для забору клінічних аналізів повинні бути обладнані раковинами для миття рук, і мати

необхідне обладнання відповідно до виду аналізів, які проводяться.

Якщо ПЛР-лабораторія працює як самостійна структурна одиниця, то додатково потрібні приміщення, такі як кабінет для роботи з документами,

кабінет завідувача лабораторії, роздягальня для персоналу, кімната для обіду, окремі санвузли та душова для "чистої" та "брудної" зон ПЛР-лабораторії,

підсобні приміщення, автоклавна тощо.

Ось деякі загальні компоненти та зони, які можна знайти в лабораторії ПЛР (хоча точне розташування та дизайн можуть відрізнятися залежно від конкретних вимог і доступного простору):

1) Зона підготовки зразків. Ця зона призначена для підготовки зразків ДНК або РНК для ПЛР-аналізу. Зазвичай він включає верстаки,

піпетки, центрифуги та інше обладнання для обробки зразків, вилучення ДНК, очищення та кількісного визначення.

2) Область ПЛР-ампліфікації. У цій зоні відбувається фактична ПЛР-ампліфікація. Важливо підтримувати чисте та контрольоване середовище, щоб запобігти забрудненню. Зона може мати окремі кімнати або спеціальні приміщення з надлишковим тиском і системами фільтрації повітря, щоб мінімізувати ризик зараження. Основне обладнання включає термоциклери (ПЛР-машини) для виконання процесу ампліфікації.

3) Зберігання реагентів ПЛР. Лабораторія ПЛР включає відповідні приміщення для зберігання реагентів ПЛР, ферментів, праймерів, нуклеотидів та інших необхідних компонентів. Зазвичай це холодильники, морозильні камери та стелажи для зберігання з належним маркуванням і організацією.

4) Зона налаштування ПЛР. Це місце призначено для налаштування реакцій ПЛР, включаючи підготовку реакційних сумішей і додавання шаблонів, праймерів та інших компонентів. Він може мати шафи з ламінарним потоком або кожухи для ПЛР, які забезпечують стерильне середовище для мінімізації забруднення.

5) Зона обладнання. У цьому розділі міститься різне обладнання, необхідне для експериментів ПЛР, наприклад мікроцентрифуги, системи гелелектрофорезу, спектрофотометри та системи документування телю. Ці пристрої використовуються для аналізу зразків, кількісного визначення та візуалізації продуктів ПЛР.

6) Зона аналізу даних. Ця зона оснащена комп'ютерами, програмним забезпеченням та інструментами аналізу даних для обробки та аналізу даних ПЛР, включаючи аналіз послідовності, дизайн праймерів та інтерпретацію результатів.

7) Зона зберігання та витратних матеріалів. Лабораторія включає спеціальне місце для зберігання витратних матеріалів, таких як пробірки для ПЛР, наконечники для піпеток, мікроцентрифужні пробірки та інші

лабораторні матеріали. Вона також може мати шафи для зберігання хімікатів і небезпечних матеріалів згідно відповідних протоколів безпеки.

8) Зона утилізації відходів. Правильна утилізація відходів, утворених під час ПЛР-експериментів, має вирішальне значення. Лабораторія повинна мати спеціальні зони для утилізації біологічно небезпечних відходів, гострих предметів і хімічних відходів відповідно до місцевих правил і правил безпеки.

ПЛР-лабораторія повинна дотримуватись стандартів безпеки та мати належні засоби безпеки, включаючи аварійні виходи, вогнегасники, захисні дупові, станції для промивання очей та шафи біозахисту (якщо працюють із потенційно небезпечними зразками).

Для кожної методики лабораторного дослідження має бути підготовлено робоче місце, на якому зібрані потрібні реактиви, посуд, дозатори змінного об'єму з одноразовими насадками згідно з методиками, які виконуються в лабораторії. На флакони з реактивами привілюють етикетки з назвами реактивів і датами приготування, лаборант, який приготував реактив, ставить свій підпис. На робочому місці необхідно мати опис методики у вигляді алгоритму. Після закінчення аналізу посуд і реактиви прибирають, щоб звільнити робочу поверхню столу для інших робіт [53].

Медичний огляд працівників вперше проводиться під час прийняття на роботу та регулярно з метою визначення стану здоров'я працівника і реєстрації вихідних об'єктивних показників здоров'я та можливості виконання без погіршення стану здоров'я професійних обов'язків в умовах дії конкретних шкідливих та небезпечних факторів виробничого середовища і трудового процесу. Також для виявлення професійних захворювань (отруєнь), що виникли раніше під час роботи на попередніх виробництвах, та попередження виробничо зумовлених і професійних захворювань (отруєнь) [52].

Індивідуальні засоби захисту та одяг можуть служити бар'єром і зводити до мінімуму ризик впливу аерозолів, бризок і випадкової інюкуляції. Вибір

захисних засобів і одягу залежить від характеру виконуваної роботи. Захисний одяг слід надягати при роботі в лабораторії. Перш ніж залишити лабораторію, слід зняти захисний одяг і вимити руки [47].

Хімічні речовини повинні зберігатися в лабораторії тільки в кількостях, необхідних протягом дня. Основна маса хімічних речовин має зберігатися в спеціально призначених кімнатах або будівлях. Особливу увагу слід приділяти правильному зберіганню і застосуванню агресивних рідин і токсичних речовин. Хімічні реактиви зберігають у шафах з вентиляцією з нержавіючої сталі або дерева, які оснащені вентиляційною системою [45].

Більшість лабораторних травм і травм, пов'язаних з роботою, відбуваються через помилки людей, погані лабораторні методи і неправильне використання обладнання. Неправильні збір, транспортування та поводження зі зразками в лабораторії пов'язані з ризиком інфікування людини, яка цим займається [46].

Важливо зазначити, що дизайн і налаштування ПЛР-лабораторії можуть відрізнятися залежно від масштабу та обсягу дослідження, що проводиться, а також від конкретних нормативних актів і вказівок, що застосовуються в регіоні.

Обладнання ПЛР лабораторії

Термоциклер - це ключовий прилад для ПЛР. Він забезпечує точний контроль температурних змін під час реакцій. Термоциклер може мати один або більше блоків для розміщення пробірок або мікропробірок. В кожному блоку можуть бути нагрівальні та охолоджувальні елементи для швидкого теплового циклування. Термоциклери можуть програмуватися для виконання різних температурних профілів, включаючи нагрівання до високої температури для розплавлення ДНК, охолодження для зв'язування праймерів і підтримки оптимальної температури для полімеразної реакції.

Термостатична ванна Це контейнер, в якому розташовуються пробірки або мікропробірки з реакційними змішуваними сумішами. Ванна забезпечує

стабільну температуру протягом усієї реакції. Це потрібно для сталих умов дослідження та відтворюваності результатів. Зазвичай, вона має кришку для запобігання контамінації і для збереження оптимальних температурних умов для ПЛР. Вони зазвичай мають великі робочі об'єми, що дозволяє використовувати їх для іммерсійного охолодження або нагріву об'єктів, наприклад, пробірок, реакційних судин або інших зразків.

Автоклав - це пристрій, який використовується для стерилізації реакційних пробірок, мікропробірок, петель, реагентів та іншого обладнання перед початком ПЛР. Автоклав створює унікальні умови, включаючи високий тиск (зазвичай вищий за атмосферний) та підвищену температуру (зазвичай вищу за 100 градусів Цельсія), що дозволяє ефективно знищувати бактерії, віруси, спори і інші мікроорганізми. Автоклави оснащені різними системами безпеки, включаючи клапани для відведення надлишкового тиску та аварійних ситуацій, що забезпечується безпечною експлуатацію.

Центрифуга - пристрій, який використовується для відокремлення компонентів зразків за допомогою обертальних сил. Частинки в рідині або суспензії, які мають різну густину або масу, рухаються під впливом центробежної сили. Важкі частинки седиментують або рухаються до дна реакційної трубки або іншого контейнера, тоді як менші та меншої густини частинки залишаються вище.

Центрифуги використовуються для видалення надлишкових реагентів, осадження клітин або нуклеїнових кислот, змивання осаду та інших процедур підготовки зразків перед ПЛР. Існують різні типи центрифуг залежно від конкретних умов, включаючи столикові центрифуги, мікроцентрифуги, ультрацентрифуги та інші. Кожен тип має свої унікальні можливості та межі швидкості.

Термостат забезпечує стабільну температуру для реакційних розчинів, реагентів та інших матеріалів, які не вимагають циклічних змін температури.

Термостати можуть бути використані для підтримки оптимальних умов зберігання реактивів або для попереднього нагрівання розчинів перед ПЛР.

Електрофорез використовується для аналізу та розділення ДНК-фрагментів за допомогою електричного струму у гелі або капілярі.

Електричне поле створюється за допомогою електродів, між якими розміщують рідинне середовище або гель. Заряджені частинки рухаються в напрямку від катода (негативно заряджений електрод) до анода (позитивно заряджений електрод) під впливом цього електричного поля.

Цей прилад може використовувати рідинне середовище або гель як матрицю для руху частинок. Гель може бути агарозним для розділення ДНК та РНК або поліакриламідним для розділення білків. Після закінчення електрофорезу розділені частинки можуть бути детектовані та проаналізовані,

зазвичай за допомогою флуоресцентних барвників або інших методів. Це дозволяє визначити розмір, кількість та інші характеристики аналізованих молекул. Електрофорез може бути використаний для визначення довжини ДНК-фрагментів або для очищення ампліфікованої ДНК від інших компонентів реакції.

Система документування гелів - це набір пристроїв, які використовуються для зафіксування та архівування результатів гелелектрофорезу в молекулярній біології. Після електрофорезу дані пристрої використовуються для розділення та визначення різних молекул ДНК, РНК

або білків за їхньою розмірністю і зарядом у гель-подібному середовищі. Дане обладнання призначене для захоплення та обробки зображень люмінесцентної ДНК у гелях, пофарбованих бромистим етидієм та аналогічними за спектральними характеристиками барвниками.

Зазвичай використовують цифрові камери для фотографування гелів. Це дозволяє отримати зображення після того, як гель був підданий електрофорезу та фарбуванню з метою виділення молекул. Програмне забезпечення дозволяє вимірювати розмірність та інтенсивність плям на гелі, визначати

концентрацію молекул та виконувати порівняльний аналіз різних гелів.

Отримані зображення зазвичай зберігаються в електронному форматі та архівуються для майбутнього використання та звітування.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріали досліджень

Буферними системами називають розчини, які здатні зберігати постійну концентрацію іонів Гідрогену, тобто значення рН середовища, при додаванні до них невеликих кількостей кислоти чи лугу або при їх розбавлянні [26].

Історія виникнення буферних розчинів в мікробіології пов'язана з розвитком самої науки та лабораторних досліджень. Перші буферні системи були розроблені для того, щоб дослідники могли контролювати та підтримувати сталий рН у різних типах досліджень. З часом було розроблено багато різних буферних розчинів з різними характеристиками та діапазонами рН, що відповідають конкретним потребам дослідників у мікробіології. Буфери використовуються для розведення реактивів та проб, щоб забезпечити оптимальні умови для проведення реакцій. Вони можуть допомогти зберегти сталі умови реакцій і запобігти змінам рН [25].

Буферна місткість та область буферування визначають можливість підтримувати стає значення рН у буферному розчині. Проте кожен буфер має свої межі, і коли до нього додають кислоту або луг, рН може різко змінитися. Буферна місткість показує, скільки іонів H_3O^+ або OH^- потрібно додати, щоб змінити рН на одиницю [17].

Буферна місткість залежить від концентрації компонентів розчину та їх відношення. Зазвичай, більша концентрація слабкої кислоти і її спряженої основи призводить до вищої буферної місткості. Важливо, щоб концентрації були значно вищими за константу дисоціації (K_a) слабкої кислоти і більшими за концентрацію іонів H_3O^+ чи OH^- , які потрібно нейтралізувати. Найефективніші буфери мають співвідношення компонентів близьке до 1. Буфери з відношенням більше 10:1 або менше 1:10 менш ефективні та менш практичні [32].

У буферних системах можна виділити декілька типів, включаючи: Системи, які складаються зі слабкої кислоти та солі цієї кислоти, яка

утворюється за участю сильної основи. Прикладами є ацетатний буфер, що складається з оцтової кислоти (CH_3COOH) та оцтового натрію (CH_3COONa), а також гідрокарбонатний буфер, де маємо вуглекислу кислоту (H_2CO_3) та бікарбонат натрію (NaHCO_3). Системи, які включають слабку основу та сіль цієї основи, утворену за участю сильної кислоти. Прикладом є амонійний буфер, який складається з амонійної гідроксиду (NH_4OH) та амонійного хлориду (NH_4Cl). Солі, що містять багатоосновні кислоти, наприклад, фосфатний буфер, що включає в себе дигідрофосфат натрію (Na_2HPO_4) та монофосфат натрію (NaH_2PO_4), або карбонатний буфер, що містить карбонат натрію (Na_2CO_3) та бікарбонат натрію (NaHCO_3). Системи, де присутній кислотний компонент та основний компонент, такі як буфер, що містить сильну або слабку кислоту разом з глицином або лугом [3939]

Потрібний для наших досліджень Tris-HCl буфер для ПЛР.

Реагенти:

121,14 мг Tris;

342,29 мг K_2HPO_4 ;

По 2 краплі реагентів для налаштування рН

1 М розчин HCl та розчин NaOH;

Дистильована вода до потрібного об'єму 900 мл;

Розчинення реагентів:

Розчинити 121,14 мг Tris у достатній кількості дистильованої води для отримання об'єму близько 900 мл. Додати 342,29 мг K_2HPO_4 до розчину Tris і ретельно перемішати, поки реагенти не розчиняться. Додати дистильовану воду до досягнення об'єму 1 л.

Налаштування рН проводити за допомогою крапельниці або піпетки.

Додаємо кілька крапель 1 М розчину HCl до буферу і перемішуємо.

Перевіряємо рН за допомогою рН-метра або рН-індикаторних смужок.

Регулюємо рН, додавши по краплям HCl або NaOH, поки не буде досягнуто бажаного рН (в діапазоні 8,0-9,0). Додатково перевіряємо рН після

змішування. Зберігаємо буфер при $+4^{\circ}\text{C}$, в стерильному контейнері, захищеному від світла.

Ферменти для Полімеразної Ланцюгової Реакції (ПЛР) грають ключову роль в ампліфікації специфічних ДНК-фрагментів та є необхідними для успішного проведення ПЛР-досліджень. Основні ферменти, які використовуються в ПЛР, включають ДНК-полімеразу, РНКазу та ДНК-лігазу.

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовуються різні ферменти, які здатні синтезувати нові нуклеотиди на основі шаблонної ДНК. Основним ферментом, який використовується в ПЛР, є ДНК-полімераза. Деякі з них володіють специфічними властивостями, що робить їх особливо корисними для конкретних додаткових задач у ПЛР.

РНК-аза використовується для розкладання РНК, яка може бути присутня в ДНК-зразках. Вона допомагає уникнути потенційних помилок в ампліфікації РНК, які можуть впливати на результати ПЛР. РНКазу додають до реакційної суміші перед ПЛР, щоб розкласти будь-яку РНК, яка може бути присутня.

ДНК-лігаза використовується для з'єднання (лігації) кінців ДНК разом.

Вона може бути використана в деяких видах ПЛР для створення об'єднаних ДНК-ланцюгів. ДНК-лігазу може бути включено в реакційну суміш разом із іншими ферментами, щоб виконати конкретні завдання, такі як клонування чи мутагенез.

Ферменти, які часто використовуються у ПЛР: Таq-полімераза: Це одна з найпоширеніших ДНК-полімераз, що використовуються у ПЛР. Вона була вперше виявлена в бактерії *Thermus aquaticus*, яка живе у гарячих джерелах. Її назва походить від імені бактерії *Thermus aquaticus*, де її було вперше знайдено. Таq-полімераза є термостабільною, що дозволяє працювати при високих температурах, які потрібні для ПЛР. Ця полімераза може витримувати температури навколо $95-98^{\circ}\text{C}$. Основні характеристики Таq-полімеразі включають її здатність копіювати ДНК, вона має екзонуклеазну активність в напрямку $5' \rightarrow 3'$ та може додавати один аденін до кінця ампліфікованого ДНК-

фрагмента. Також її властивості дозволяють видаляти та коригувати неправильно введені нуклеотиди під час ПЦР. Taq-полімераза використовується для ампліфікації конкретних ДНК-фрагментів у ПЦР для аналізу генетичних послідовностей, клонування і багатьох інших дослідницьких завдань у молекулярній біології та генетиці [11].

Pfu-полімераза: Це ще одна термостабільна ДНК-полімераза, яка виявлена в бактерії *Pycococcus furiosus*, що живе в гарячих джерелах. Pfu-полімераза має вищу точність і здатність виправляти помилки, порівняно з Taq-полімеразою, що робить її популярною для додаткових вимогливих додаткових задач у ПЦР [6]. Pfu-полімераза має 3'→5' екзонуклеазну активність. Це означає, що вона може видаляти неправильно введені нуклеотиди під час ампліфікації, що сприяє збереженню точності генетичної інформації. Вона широко використовується в біохімічних та молекулярних дослідженнях для ампліфікації ДНК фрагментів з високою точністю.

Дезоксинуклеотидилтрансфераза (dNTP-полімераза): Цей фермент використовується для виконання оберненої транскрипції з РНК-шаблонів, отримуючи комплементарну ДНК (cDNA). Вона здатна синтезувати комплементарну ДНК, використовуючи РНК-шаблон і дезоксинуклеотиди трифосфати. DNA-полімераза каталізує утворення фосфодіестерних зв'язків між дезоксинуклеотидами, що додаються до 3'-кінця ростучого ланцюга ДНК. Багато видів DNA-полімераз мають екзонуклеазну активність, яка дозволяє їм видаляти неправильно введені нуклеотиди та виправляти помилки під час синтезу ДНК. Також більшість DNA-полімераз є процесивними ферментами, що означає, що вони можуть продовжувати синтез ДНК без втрати з'єднання з матрицею. Ця полімераза не може сама ініціювати синтез нового ланцюга, бо вона потребує початковий праймер, який вже містить початковий нуклеотид [2].

Ці ферменти є лише деякими прикладами з великої кількості ферментів, що можуть використовуватися у ПЦР. Вибір конкретного ферменту залежить від потреб і вимог конкретної дослідницької чи діагностичної задачі.

Методи досліджень

Гель-електрофорез

— аналітичний метод хімії і молекулярної біології для розділення різних видів молекул. Суміш молекул пропускається через гель, який являє собою молекулярне сито, яке легше пропускає дрібніші молекули, аніж великі. Рухливну силу задає електричне поле, тому молекули мають бути заряджені.

Метод використовується в молекулярній біології для розділення фрагментів дезоксирибонуклеїнової, рибонуклеїнової кислоти або білків, використовуючи електричне поле, що створюється в гелевій матриці. Метод зазвичай застосовується для аналітичних цілей, але може також використовуватися як попередня стадія таких методів як мас-спектрометрія,

поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ), полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), молекулярне клонування, секвенування ДНК, саузери-блот, вестерн блот що застосовуються для аналізу послідовностей молекул або визначення певних білків [36].

Агароза, яка використовується в гель-електрофорезі, представляє собою чистий продукт, отриманий з агару або отриманого безпосередньо з агароутворюючих морських водоростей. Цей речовина має унікальні властивості для розділення молекул нуклеїнових кислот в біологічних дослідженнях. У 1% агарозному гелі можна відокремити нуклеїнові кислоти з різними молекулярними масами, від 600 до 20 000 пар основ. Для більших молекул ДНК, що складаються із мільйонів пар основ, або денатурованої ДНК і РНК використовуються спеціальні поліакриламідні гелі.

Агарозний гель дозволяє вченим вирішити завдання розділення різних молекул нуклеїнових кислот, враховуючи не лише їхню молекулярну масу, але й форму. Наприклад, лінійні молекули переміщуються швидше, ніж кільцеві молекули при рівній масі. Крім того, послідовність нуклеотидів може також впливати на розподіл молекул. У біологічних дослідженнях розділення ДНК

також може бути позначено взаємодією з білками. Для виявлення смуг нуклеїнових кислот в агарозному гелі використовують різні методи, такі як авторадіографія для маркованих радіоактивними атомами молекул або флуоресцентні мітки, які зв'язуються з ДНК або РНК і можуть бути виявлені ультрафіолетовим підсвічуванням.

Для електрофоретичного методу розділення ДНК на агарозному гелі потрібний завчасно підготовлений робочий розчин агарози. Потрібно додати 0,5 г агарози у 50 мл буферу TAE (триосміотиновий буфер), та змішати цю суміш на плитці нагрівального блоку до повної розчинності агарози.

Потім на підготовлену литну форму з агарозою встановити гребінець, який створює ямки для завантаження зразків ДНК. Звернути особливу увагу потрібно на те, щоб гребінець був рівномірно розташований і не перекривався агарозою.

Після того, як агароза застигне і гребінець стабільно триматиметься, потрібно підготувати зразки ДНК. Для цього змішали 2 мкл зразка ДНК з 2 мкл буферу зарядження та 1 мкл барвника, який допоможе візуалізувати ДНК під час електрофорезу.

Після підготовки зразків завантажити їх, застосовуючи 5 мкл змішаної суміші до кожної ямки гелю, обережно використовуючи мікронітку. Під час цієї процедури потрібно впевнитися, що зразки розташовані на одному кінці гелю. Після завантаження проводиться електрофорез, підключаючи електроди до блоку електрофорезу та налаштовуючи відповідні параметри (напруга, час). Використовували напругу близько 100 В протягом 30-60 хвилин. Після завершення електрофорезу вимкнути блок, гель виймається з литної форми та проводиться візуалізація, для спостереження і фотографування розділених фрагментів ДНК.

Щоб отримати якісні результати розділення ДНК на агарозному гелі важливо дотримуватися правил безпеки, працювати у чистому середовищі і дотримуватися протоколу.

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Підготовка зразків та проведення ПДР

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції було відібрано по 18 голів товстолюба з озера, що знаходиться в селі Мамекине, Чернігівської області (перша група, дані про них наведені в Таблиці 1) та озера, що знаходиться поруч з селом Дубровка (друга група, дані про них особин наведені в Таблиці 2).

Таблиця 1

Стать особини	Вага, кг	Довжина, см	Дата відбору
Самка			□ Дроби
Самець			

Таблиця 2

Стать особини	Вага, кг	Довжина, см	Дата відбору проби
Самка			
Самець			

Щоб звести до мінімуму забруднення, всі матеріали, які використовувалися в експериментах, були попередньо промиті в 15-відсотковому розчині гіпохлориду натрію і прополоскані в дистильованій воді. Для відділення м'язових тканин використовували скальпель. Для кожного зразка відбирали приблизно 20 мг м'язів. Виділення ДНК здійснювалося через консервовані в 96%-му станлі плавці товстолоба.

Для аналізу маркерів ми використовували технологію полімеразної ланцюгової реакції RAPD, що дозволяє ампліфікувати специфічні регіони ДНК та отримати достатню кількість матеріалу для подальшого аналізу.

Нуклеїнові кислоти, такі як Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) і Рибонуклеїнова кислота (РНК), є біополімерами, що містять генетичну інформацію та відіграють важливу роль у функціонуванні клітин і організмів. ДНК зберігає генетичну інформацію в клітинах і визначає будову та функції білків, тим самим контролюючи всі біологічні процеси. РНК виконує функції перенесення і трансляції інформації з ДНК для синтезу білків [7].

Для виділення нуклеїнових кислот використовують різноманітні методи. Один із найпоширеніших методів - екстракція, яка полягає в розриванні клітин та мембран, після чого нуклеїнові кислоти виділяють за допомогою різних хімічних розчинників. Інший метод - це хроматографія, яка дозволяє відокремити різні типи нуклеїнових кислот залежно від їхньої розмірної та хімічної природи. Також використовують методи електрофорезу та фракціонування для розділення нуклеїнових кислот за розміром та іншими характеристиками.

В нашому випадку ми будемо використовувати сорбентний метод виділення нуклеїнових кислот (НК). Метод сорбентний є широко використовуваним для різних дослідів. Він базується на використанні спеціальних сорбентів, які здатні взаємодіяти з НК та розділяти їх від інших компонентів зразка. Необхідно також відзначити, що процес сорбції найкраще йде при високій іонній силі розчину, показниках рН 3,5-6,5 (оптимум рН 5) та температурі вище 37 °С.

Перший етап сорбентного методу виділення нуклеїнових кислот включають підготовку сорбенту. Спочатку сорбент, який зазвичай представляє собою тверду фазу (наприклад гідрогель), підготовлюють шляхом змивання зайвих речовин та активування його поверхні для забезпечення ефективного зв'язування НК.

Проба, що містить НК, розчиняється або переміщується у спеціальний розчинник, який дозволяє ефективно зв'язувати НК на сорбенті. Зразок може бути будь-яким біологічним матеріалом, який містить НК, таким як кров, клітини, тканини або мікроорганізми.

Розчинена проба, яка містить НК, наноситься на сорбент, де НК зв'язується з його поверхнею через різноманітні механізми, такі як гідрофобні або електростатичні взаємодії. Після зв'язування НК на сорбенті проводять відмивання, щоб видалити забруднення та нев'язуючі компоненти, які можуть впливати на якість виділеної НК.

Останнім етапом є елюція (відновлення) НК з сорбенту. Це здійснюється додаванням спеціального елюційного розчину, який дозволяє звільнити зв'язані НК з поверхні сорбенту. Очищення та концентрація: Після елюції НК може бути додатково очищена від залишкових забруднень або інгібіторів за допомогою додаткових методів, таких як осциляційна екстракція або колоїдова хроматографія. Після очищення НК може бути концентрована до бажаної концентрації або об'єму для подальшого аналізу або зберігання.

Після внесення суміші у термоциклічну машину проводиться серія циклів нагрівання, охолодження та продукування, які включають різні температурні режими. Цикли ПЦР проводили так:

Для проведення денатурації пробірку з реакційною сумішшю нагріли до високої температури (94-96°C) для роз'єднання дволанцюжкової ДНК на окремі одноланцюжкові фрагменти.

При аннелінгу температуру знизили до оптимальної для зв'язування праймерів до цільових послідовностей ДНК. Це забезпечує прикріплення праймерів до комплементарних регіонів ДНК. Оптимальна температура аннелінгу залежить від послідовності та довжини праймерів.

Далі температура підвищується до оптимального для активності ДНК-полімерази, яка використовується для синтезу нового ДНК-ланцюжка, починаючи з прикріплених праймерів. Полімеразна реакція прогресує вперед,

продукуючи багато копій вибраних регіонів ДНК. Цей цикл повторювали декілька разів, що призводить до значного збільшення кількості ампліфікованої ДНК у пробірці. Після закінчення ПЛР-реакції, схема якої зображена (рис 3.1), отримані ампліфіковані продукти будуть піддані електрофорезу для визначення розмірів фрагментів ДНК та отримання RAPD-профілів.

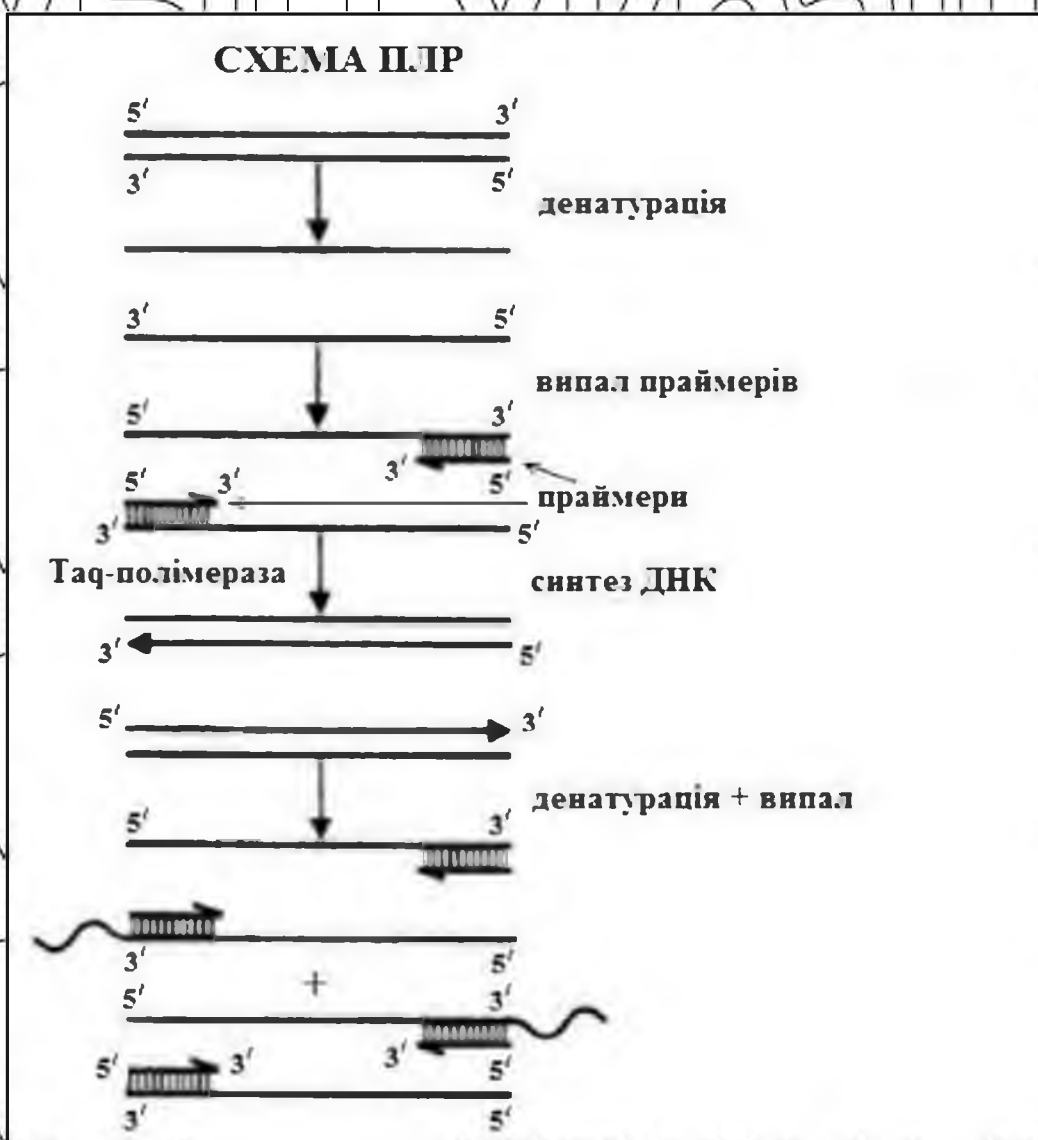


Рис 3.1 Схеми полімеразної ланцюгової реакції

Продукти ампліфікації досліджували методом горизонтального електрофорезу в 2% агарозному гелі у трис-хлор буфері з додаванням бромистого етидію. Ця речовина вбудовується в дволанцюжкову молекулу ДНК і флуоресцює в ультрафіолетовому світлі. У такому вигляді ДНК-

фрагменти були зафіксовані на цифровий фотоапарат та проаналізовано. Порівняльний аналіз отриманих спектрів здійснювали якісно та кількісно.

Зміни у концентраціях компонентів реакційної суміші та умовах проведення RAPD -PCR можуть впливати на якість та кількість отриманих ПЛР-смуг. Зазвичай, амплікони з високою молекулярною масою (понад 1,5 тисячі пар основ) виявлялися найбільш чутливими до змін умов ампліфікації, особливо при використанні підвищених концентрацій іонів Mg^{2+} (понад 2,5 мМ). Зміни в спектрах ампліфікації, такі як поява або зникнення ампліконів, відбувалися через продукти ПЛР низької інтенсивності світіння. Проте, мажорні смуги були стабільними і відтворювалися в усіх проведених експериментах.

Важливими аспектами, що впливали на якість RAPD-спектрів, виявилися такі: концентрація ДНК-матриці, температура відпалу праймерів та концентрація праймерів у реакційній суміші. Зміни інших параметрів ПЛР впливали головним чином на інтенсивність світіння ампліконів під ультрафіолетовим світлом, а не на якість спектрів.

Дослідження визначили оптимальні діапазони концентрацій реагентів у реакційній суміші та умов ПЛР. Такі зміни мінімізували вплив на точність та надійність результатів ДНК-фінгерпринту на основі ПЛР. В результаті був розроблений загальний алгоритм оптимізації методів мультилокусного ДНК-профілювання.

Конкретні діапазони оптимальних концентрацій суміші та параметри ПЛР: Іони магнію 1,8–2,2 мМ, геномна ДНК 40–60 нг/20 мкл, праймер 0,4–0,7 мкМ, дНТФ 200 мкМ, *Taq*-полімераза 0,8–1,2 од., кількість циклів 35–37, температура відпалу 45°C.

Для оцінки генетичної різноманітності у дослідній групі товстолоба використовувались різні показники. Один з таких показників - TNB (total number of bands), що вказує на загальну кількість докусів, які були виділені під час електрофорезу з певною молекулярною масою. Інший показник - NPB

(number of polymorphic bands), відображає кількість локусів, які були знайдені лише в певній частині групи, що свідчить про поліморфізм. Також враховується P % (відсоток поліморфних локусів), який обчислювався як відношення NPB до TNB.

Ці показники обчислювалися як для окремих маркерів, так і в середньому для різних типів маркерів. Ця інформація дозволяє нам краще зрозуміти генетичну різноманітність у групі товстолоба та ідентифікувати поліморфність в їхньому геномі.

Обговорення результатів

На початковому етапі наших досліджень було відібрано найбільш інформативні праймери для проведення аналізу ДНК товстолоба. Були обрані стандартні праймери YPA-04, B09, K20, A09 та A07 з унікальними нуклеотидними послідовностями наведеними в таблиці 2. Два праймери A09 та A07 виявили 100% мономорфність тому не є цікавими для результатів наших досліджень.

Таблиця 3

Нуклеотидна структура RAPD-праймерів

Назва праймеру	Нуклеотидна послідовність
K20	

Подальший аналіз варіабельності випадково ампліфікованої ДНК був проведений за допомогою методу RAPD-ПЛР із стандартним 10-нуклеотидним праймером YPA-04. RAPD-ПЛР використовується для дослідження генетичної різноманітності близьких організмів, таких як різні сорти культурних рослин, риб або мікроорганізмів. Зазвичай в цьому методи

використовується один невеликий праймер, що складається приблизно з 10 нуклеотидів. Цей праймер може бути частково комплементарним до випадкових регіонів ДНК досліджуваних організмів.

Результати моїх досліджень впливу антропогенних факторів на особливості ДНК-спектрів товстолоба, отриманих методом ПЛР-аналізу, наведено на рисунку 3.2.

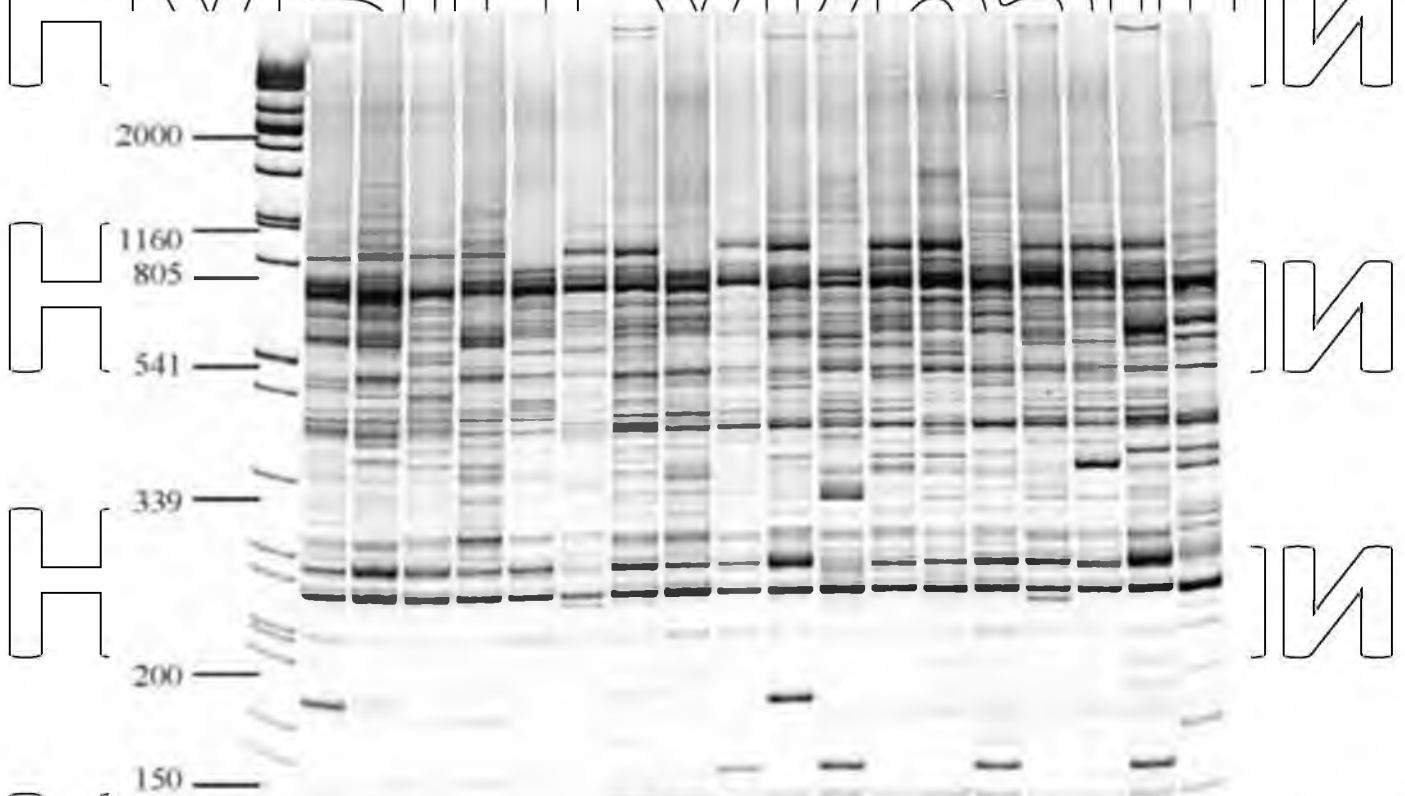


Рис 3.2 RAPD-PCR спектри товстолоба першої групи за УРА-04.

На практиці було виявлено, що ДНК-спектр товстолоба за УРА-04, містить 15 випадково ампліфікованих фрагментів ДНК різної довжини від 150 до 2000 пар нуклеотидів. Отримані амплікони, при більш детальних дослідженнях, можуть слугувати в якості молекулярно-генетичних маркерів для ідентифікації цих двох груп товстолоба. Також важливо відзначити значущі частотні відмінності між цими двома вибірками риб за ампліконами на позиціїк 179 п.о.: у першій групі амплікон 179 п.о. присутній у 10% вивчених особин, тоді як у другій у 30%. Амплікон 895 позначається у

першої з частотою 40%, у другій - 70%. Ці різниці можуть бути також використані як додаткові критерії для ідентифікації вибірок.

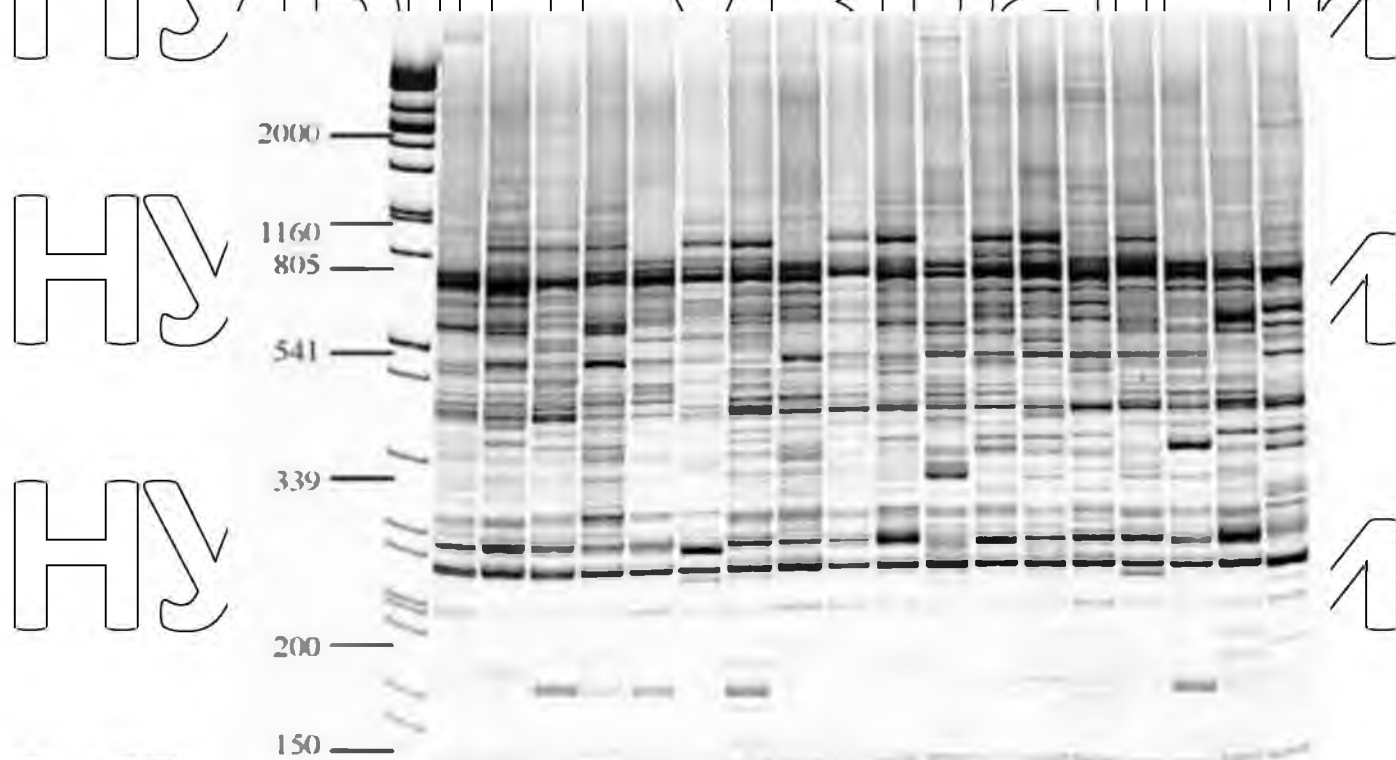


Рис. 3.3 RAPD-PCR спектри товстолоба другої групи за YPA-04.

У ДНК-спектрах товстолоба за YPA-04, також виявлено найбільш виразний ДНК-фрагмент довжиною 805 нуклеотидів. Фрагменти ДНК 200, 339, 1160 що присутні лише у окремих осіб, можуть стати важливими показниками для розрізнення різних процесів і характеристик, що відрізняють цих осіб.

Під час аналізу ДНК-спектрів було проведено порівняння за частотою зустрічання ДНК-фрагментів у особин. Чотири фрагменти присутні у всіх досліджуваних осіб – це фрагменти довжиною 150, 300, 456 та 805 пар нуклеотидів. Частота появи цих фрагментів становить 100%. Практично у всіх відзначений фрагмент 790. Найбільш цікавим фрагментом в цих ДНК-спектрах є фрагмент довжиною 1160 пар нуклеотидів.

Припускається, що RAPD-маркери в основному локалізовані в некодуючій області ДНК, оскільки вона складає переважну частину геному

еукаріотів. Швидкість мутації в некодуєчій ДНК приблизно вдвічі вища, ніж в кодуєчій. Крім того, RAPD-маркери іноді ампліфікуються з регіонів повторюваної ДНК, і, отже, вони можуть відображати високі швидкості їхньої мутації, які можуть бути спричинені радіаційним або хімічним забрудненням довкілля.

Під час аналізу ДНК-спектрів риб, були виявлені як поліморфні, так і мономорфні ДНК. Незмінні RAPD-маркери, які не виявляють індивідуальної або географічної змінності. Таку ДНК запропоновано відрізнати від поліморфної і розглядати як виявлення генетичного мономорфізму на рівні

ДНК. У ДНК-спектрах такий мономорфний маркер був виявлений. Це ДНК-фрагмент довжиною 550 пар нуклеотидів, який виявлений яскраво у всіх досліджених осіб даного виду. Поліморфними ДНК-маркерами, які можуть відповідати за різні характеристики окремих осіб, виявилися ДНК-фрагменти 541, 339 та 1160 пар нуклеотидів.

Також є цікавим ДНК-фрагмент довжиною 160 пар нуклеотидів у першій групі, який виявлений у деяких осіб першої вибірки (30%) та відсутній у другій. Слід відзначити, що водойма в селі Мамекине піддана сильному антропогенному впливу. Ймовірно, цей ДНК-фрагмент поширився серед риб популяцій саме внаслідок впливу забруднень. Подальше дослідження цього питання дозволить виявити ДНК-маркери забруднення вод. Аналіз рівня внутрішньопопуляційної мінливості дозволить оцінити ступінь згубного впливу забруднення на популяції риб та водні екосистеми в цілому.

Дослідження показало, що частина локусів, виявлених під час аналізу, мали невисоку частоту в зразках. Деякі локуси були навіть унікальними, тобто присутні лише в одній особині. Це може бути корисним для аналізу спорідненості між рибами, оскільки унікальні локуси можуть служити як генетичні підписи для ідентифікації конкретних особин.

Проте також було виявлено декілька мономорфних локусів для різних маркерів, що свідчить про те, що ці локуси були спільними для всіх особин у дослідженій групі.

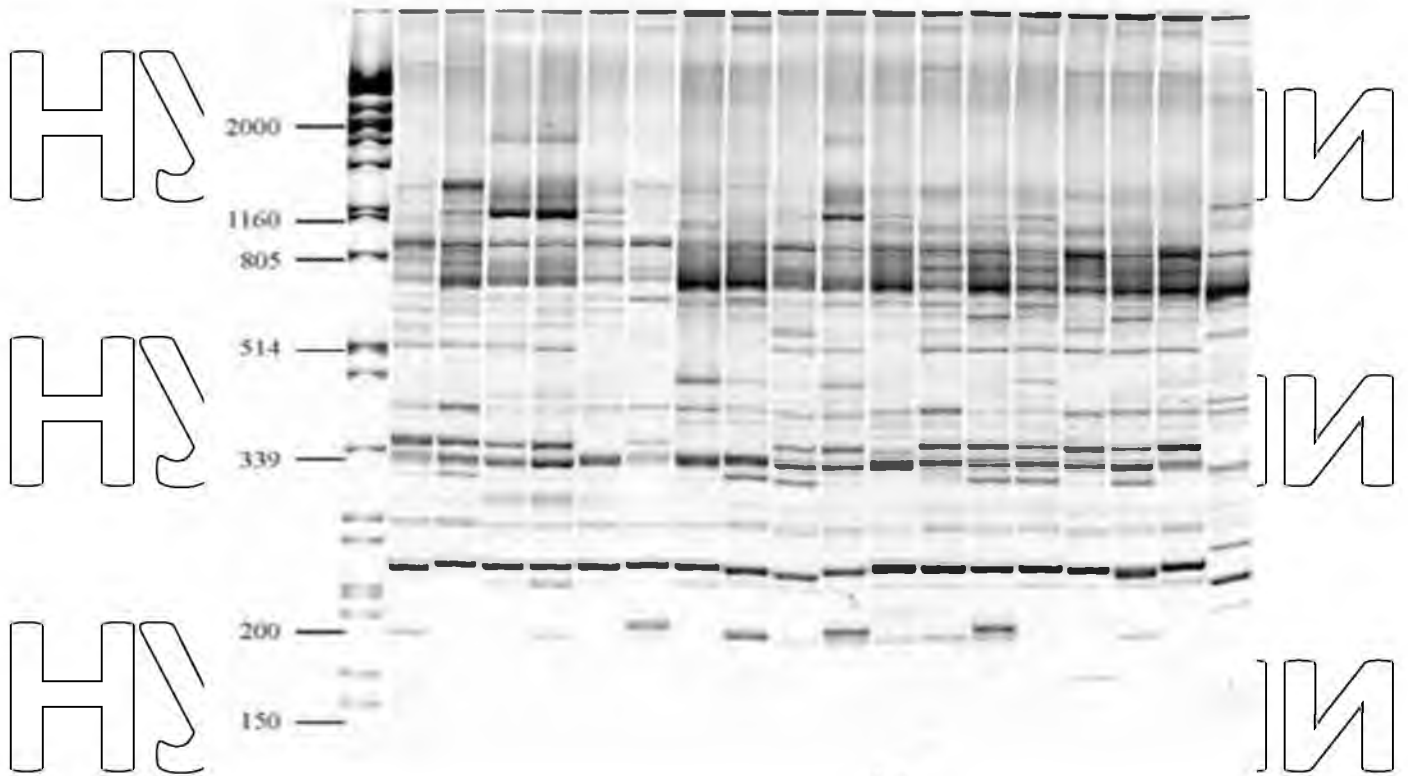


Рис. 3.4 RAPD-PCR спектри першої групи товстолоба за B09.

ДНК-спектр товстолоба за B09 (рис 3.4 та 3.5), містить 13 ампліфікованих фрагментів. Найвищу кількість поліморфних ПЦР-продуктів було отримано за допомогою цього RAPD-праймера. Найбільш виразним виявився фрагмент довжиною 339 пар нуклеотидів, що присутній у всіх осіб товстолоба.

Для маркеру B09 характерними мономорфними виявилися три амплікона: 278, 339 і 921 пара основ. З них для подальшого розгляду як можливого додаткового маркера характеристики роду варто звернути увагу на амплікон в 339 пар основ, оскільки він присутній в вибірці з прийнятною частотою. Деякі з цих мономорфних локусів можуть бути видоспецифічними,

що вказує на можливість використання їх для розрізнення між різними породами та видами риб на генетичному рівні.

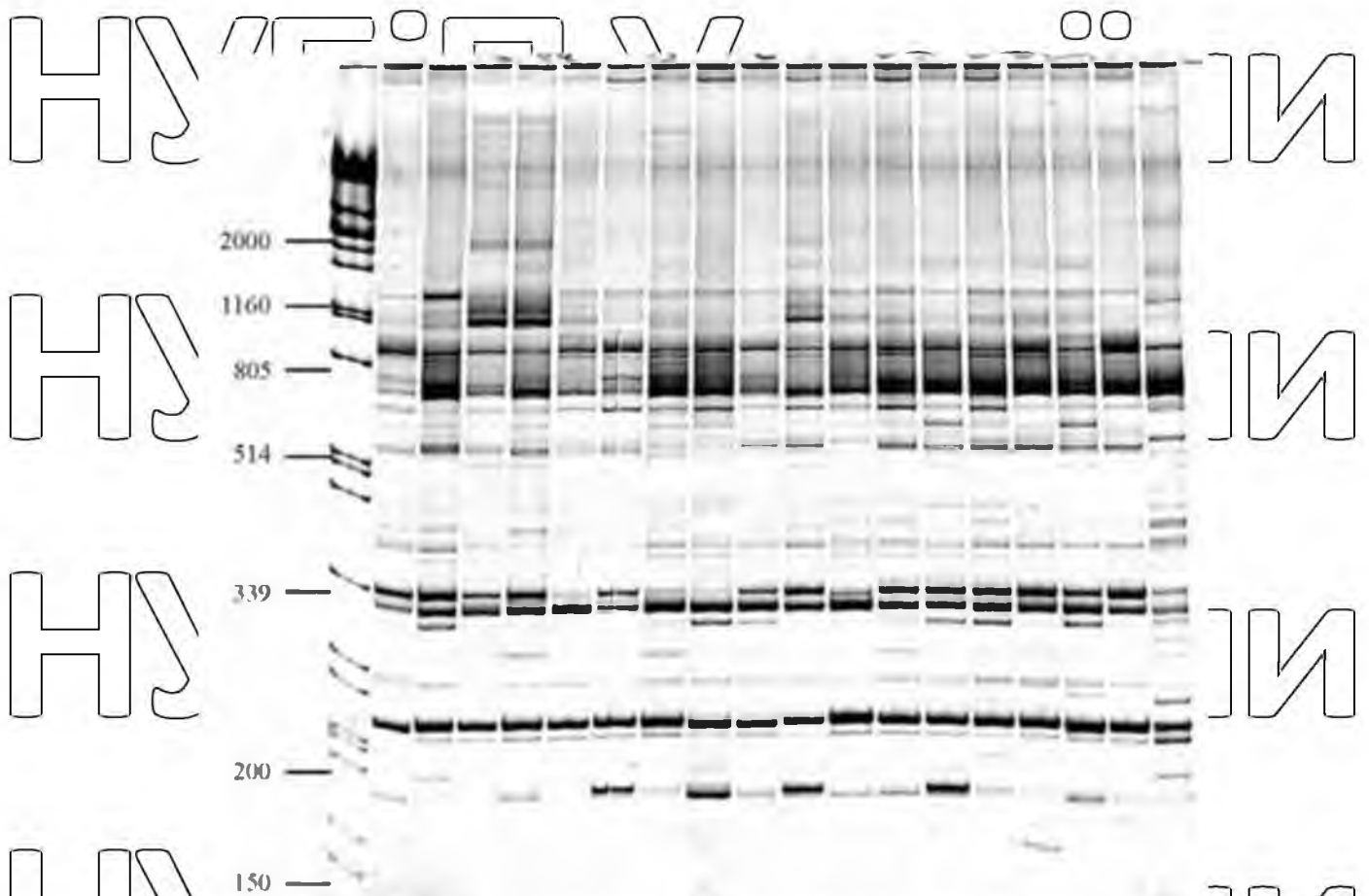


Рис. 3.5 RAPD-PCR спектри другої групи товстелоба за B09.

Загальний набір спектрів та частот ампліконів за праймером B09 дав 16 типів ампліконів. Щодо отриманих ампліконів для першої групи характерним є тільки один амплікон в позиції 260 п.о., який не виявляється у жодному іншому зразку інших груп. Проте частота поширення цього амплікона низька, тому його не слід розглядати як можливий молекулярний маркер для ідентифікації чи паспортизації породи.

Для першої групи з озера Мамекіне характерними є три амплікони: 162 (15%), 442 (20%) та 1180 п.о. (30%). З них варто виділити для подальшого розгляду як можливий допоміжний маркер характеристики вибірки амплікон в 1180 п.о., оскільки він має прийнятну частоту поширення.

Для другої групи з озера Дубровка характерні 5 ампліконів: 1065 (10%), вибірки придатні лише амплікони 755 та 172 п.о.

Особливу увагу слід приділити амплікону в 230 п.о., який зустрічається на 100% у першій групі і на 100% відсутній у другій. Амплікон, що були знайдені в першій групі (тобто вони присутні у всіх особин даної вибірки) повністю відсутні у особин другої. Цей амплікон може бути використаний для характеристики вибірки.

Для наших вибірок було виявлено 4 амплікони, які є характерними: 805 п.о., присутній у 90% першої та 100% другої, 306 п.о. у 20% першої та 30% другої, 390 п.о. у 10% першої та 10% другої та 760 п.о. у 100% першої та 90% другої. Для характеристики породи підходять лише амплікони 805, 760 та 306.

Особливу увагу слід приділити маркерам 805 та 760, оскільки вони знайдені в 100% осіб обох виділень і можуть бути потенційними молекулярними маркерами для ідентифікації говстолобів на рівні виду.

Також було виявлено амплікон, який є характерним тільки для другої вибірки: 1238 п.о. (у осіб він виявився з частотою 10%). Проте цей амплікон не підходить для характеристики через низьку частоту його виявлення або необхідність додаткових досліджень на більшій вибірці.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Проведення генетико-популяційних досліджень може допомогти в вирішенні багатьох рибогосподарських проблем. Для проведення популяційного аналізу можна використовувати різні методи молекулярної генетики, такі як аналіз ізоферментних спектрів, секвенування ДНК, рестрикційний аналіз та інші. На мою думку, RAPD-фінгерпринтінг, який дозволяє вивчати характеристики геному, повинен стати важливим елементом методичного арсеналу для цього завдання. Мої дослідження показали, що дані, отримані за допомогою RAPD-ПЛР, дозволяють вивчати та контролювати генетичні характеристики популяції.

Експериментальним методом були виявлені конкретні діапазони оптимальних концентрацій суміші та параметри проведення RAPD-ПЛР: Іони магнію 1,8–2,2 мМ, геномна ДНК 40–60 нг/20 мкл, праймер 0,4–0,7 мкМ, дНТФ 200 мкМ, *Taq*-полімераза 0,8–1,2 од., кількість циклів 35–37, температура відпалу 45°C.

Під час аналізу ДНК-спектрів риб, були виявлені як поліморфні, так і мономорфні ДНК. Результатами моїх досліджень було виявлено, що праймери K20, A09 та A07 є мономорфними і не підходять для вирішення генетико-популяційних завдань щодо товстолоба. Однак два праймери B09 та YPA-04 показали достатньо високий рівень поліморфізму і можуть допомогти у вивченні цього роду риб.

Усього за використання 5 праймерів було отримано 51 амплікон, з яких 35 були поліморфними для обох груп. Значення маркерних індексів (MI) RAPD-праймерів виявились схожими щодо різниці між дослідженими особами ($p < 0,05$). Найвище значення MI (4,12) було зафіксовано для RAPD-праймера YPA-04. Отже, загальний рівень генетичного поліморфізму, виявлений використаними ДНК-маркерами, був подібним для обох вибірок.

Підраховано кількість локусів, які були виділені під час електрофорезу з певною молекулярною масою. Проаналізувавши наші вибірки за допомогою двох спектрів YPA-04, B09, маємо TNB (total number of bands) = 51, NPB розраховуємо за формулою.

$$p = \frac{NPB}{TNB} * 100\%$$

Тобто в нашому випадку відсоток поліморфних локусів дорівнює 70% для першої групи, та 72% це є достатньо високим показником. Більше того, RAPD-аналіз може послужити основою для створення інших типів молекулярних маркерів, зокрема, SCAR-маркерів. Ці нові маркери можуть бути корисними для подальших досліджень поліморфних ознак, які можуть прямо впливати на продуктивність цього та інших сімейств і видів риб.

Всередині популяції характерний високий рівень мономорфізму, що свідчить про жосткий природний відбір. Організми, які мають певні генетичні або фізичні адаптації, які підвищують їх шанси на виживання та розмноження в конкретному середовищі, мають перевагу. Тому особи, які успішно пристосовуються до змін у середовищі, передають свої корисні гени наступним поколінням.

В праймері B09 виявлено один амплікон 1180 пар основ для першої та два амплікони 755 та 172 пар основ для другої, що можуть слугувати потенційними молекулярними маркерами окремих осіб товстоюба. Щодо ідентифікації на рівні роду слід відзначити маркери 805 та 760 пар основ.

При аналізі за допомогою YPA-04 був виявлений фрагмент 160 пар основ, що присутній у 30% особин першої групи та відсутній у другої. Скоріш за все RAPD-маркери в основному локалізовані в некодуючій області ДНК, яка швидше мутує. Тому це дає змогу припустити, що водойма в селі Мамекіне

була піддана впливу негативних факторів, таких як забруднення. Такі дані можуть свідчити про високий рівень антропогенного впливу на геном риб.

Дослідження показало, що частина локусів, які були виявлені під час аналізу, мають невисоку частоту. Деякі локуси є унікальними, бо присутні лише в одній особині. Це може бути корисним для аналізу спорідненості між рибами, оскільки унікальні локуси можуть служити як генетичні підписи для ідентифікації конкретних особин.

Отже, мої дослідження виявили амплікони, які можуть бути використані для характеристики товстолоба. Можна включити таку інформацію до генетичного паспорта роду: метод генетичного типування; назва та послідовність праймера, який ефективно виділяє амплікони для ідентифікації породи; молекулярна маса ЦПР-фрагмента, який є генетичним маркером роду (у парах основ); зображення гелів продуктів ампліфікації за цим праймером з позначенням областей, що містять молекулярні маркери роду для полегшення порівняння результатів при тестуванні інших осіб.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВИСНОВКИ

товстолоб - вид риб, який потребує вивчення за допомогою різноманітних генетичних маркерів, у тому числі ДНК-маркерів, таких як RAPD.

Полімеразна ланцюгова реакція допомагає оцінити генетичне різноманіття популяцій товстолобика. Вища генетична різноманітність вказує на більшу кількість різних алелів, присутніх у популяції, що сприяє загальному здоров'ю та адаптивності виду.

APD — це техніка, яка використовується для виявлення генетичної варіації всередині та між популяціями. ДНК-спектри риб, виловлених в даній водоймі, відрізняються своєю однорідністю, що свідчить про жорсткий природний відбір. Також вони відображають високі швидкості їхньої мутації, які можуть бути спричинені радіаційним або хімічним забрудненням довкілля.

маркери (K20, YPA-04 та B09) надали уявлення про структуру популяції даного виду. Аналізуючи генетичну подібність або відмінність між індивідами, ми можемо ідентифікувати популяції, моделі міграції або потік генів, а при дослідженні особин з різних водойм, також генетичну диференціацію між різними географічними регіонами. Зібрані дані можуть керувати стратегіями збереження, включаючи ідентифікацію генетично відмінних популяцій і розробку відповідних планів щодо охорони водних ресурсів.

деякі локуси були навіть унікальними, тобто присутні лише в одній особині. Це може бути корисним для аналізу спорідненості між рибами, оскільки унікальні локуси можуть служити як генетичні підписи для ідентифікації конкретних особин і дозволяє проводити їх паспортизацію.

дані дослідження є корисними для вивчення подій гібридизації та інтрогресії (перенесення генетичного матеріалу між видами) у товстолобика. Вони допомагають визначити генетичні взаємодії та оцінити ступінь генного потоку між товстолобиком та іншими спорідненими видами.

ошибки, що можуть виникнути, дуже часто є критичними для достовірності

наукової роботи. При проведенні досліджень були виявлені конкретні діапазони оптимальних концентрацій сумішей речовин та параметри (температура, рН, час проведення та кількість циклів) полімеразної ланцюгової реакції. Ці дані допомагають мінімізувати вплив на точність та надійність кінцевих результатів.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Barman H. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. / H. Barman et al. // *Aquaculture*. 2003. Vol. 217. P. 115—123.

Genetic diversity of two carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers / R. Bartfai, S. Egedi, G. Hua Yue et al. // *Aquaculture*. 2003. Vol. 219. P. 157—167

Chen J-D, Douki T, Gasparutto T, Pouget D, Ravanat JP, Sauvaigo JL (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 424:9—21

E. Huang, T. Lo // *J. Mol. Evol.* 1994. Vol. 38. P. 138—155

Wardner, Edward; Porta, Angela R. (2012). "Determining Annealing Temperatures for Polymerase Chain Reaction". *The American Biology Teacher*. 74 (4): 256—60

Genetic diversity of subspecies of common carp (*Cyprinus carpio* L.). / R. Gross et al. // *Aquaculture*. 2002. Vol. 204. P. 507—516

Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in the Carpathian Basin. / M. Kulak M., Kaspar V., Kohlmann K., Coward K., Tešitel J., Rodina M., Gela D.,

Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in the Carpathian Basin. / M. Kulak M., Kaspar V., Kohlmann K., Coward K., Tešitel J., Rodina M., Gela D.,

Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in the Carpathian Basin. / M. Kulak M., Kaspar V., Kohlmann K., Coward K., Tešitel J., Rodina M., Gela D.,

Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in the Carpathian Basin. / M. Kulak M., Kaspar V., Kohlmann K., Coward K., Tešitel J., Rodina M., Gela D.,

Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in the Carpathian Basin. / M. Kulak M., Kaspar V., Kohlmann K., Coward K., Tešitel J., Rodina M., Gela D.,

Hydrobiologia України
Pospisek, Tomas; Vopalensky, Vaclav; Suchomelova, Petra; Pospisek, Martin
(2005). Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. Analytical
Biochemistry 336 (1): 46–50.

19. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am
1990;262(4):56-61, 64-5.

Hydrobiologia України
Nei M. Molecular evolutionary genetic / M. Nei. – N.Y.: Columbia Univ. Press,
1987. – 512 p

Hydrobiologia України
N.J.S. Fishes of the World. — New York, 2006. — 601 p.

Hydrobiologia України
Petrucci R.H., Herring G.F., Madura J.D., Bissonnette C. (2011). General
Chemistry: Principles and Modern Applications (вн. 10th) Toronto: Pearson

Hydrobiologia України
M

Hydrobiologia України
1280–1283.

Hydrobiologia України
Mullis K.B., Faloona O., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., et al.
(January 1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a
thermostable DNA polymerase". Science. 239 (4839): 487–91.

Hydrobiologia України
Mullis K.B., Faloona O., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Erlich H.,
Hoggeren M. // Biochemical Genetics. 1994. Vol. 32. P. 249 –

Hydrobiologia України
Mullis K.B., Faloona O., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Erlich H.,
Hoggeren M. // Biochemical Genetics. 1994. Vol. 32. P. 249 –

Hydrobiologia України
Mullis K.B., Faloona O., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Erlich H.,
Hoggeren M. // Biochemical Genetics. 1994. Vol. 32. P. 249 –

НУБІП України

hindrance to success. J Assist Reprod Genet. 28: 711—24.

Williams J.G.K. et al. // Nucleic Acids Research. 1990. Vol. 18. P. 6531 – 6535.

НУБІП України

ng microsatellite markers. / J. Zhou, Q. Wu, Z. Wang, Y. Ye // Russ. J. Genetics.

2004. Vol. 40, №10. P. 1144—1148.

43. Гиль М.І., Сметана О.Ю., Юлевич О.І. та ін. Молекулярна генетика та технології дослідження генома, 2015, Херсон: ОЛДІ-ПЛЮС, 318 с.

НУБІП України

риневич Н.С., Присяжнюк Н.М., Хом'як О.А., Михальський О.Р., Ткач

М.В. Загальна іктологія. Біла Церква, 2019. 46 с.

СанПіН 2.2.7.029-99 «Пітсичні вигоди щодо поводження з

промисловими відходами та визначення їх класу небезпеки для здоров'я населення».

НУБІП України

СП 9.9.5.-080-02 «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю».

загальна гігієна : посібник для практичних занять / за ред. І. І. Даценко. – Львів, 2001. – 472 с.

Н

48. Ковальчук О. М. Вивчення викопних решток коропових риб України в історичній ретроспективі // Актуальні проблеми дослідження довкілля: мат-ли V Міжнародн. наук. конф. — Суми: СумДПУ ім. А. С. Макаренка, 2013. — Т.1.

Н

49. Куцоконь Ю., Квач Ю. Українські назви міног і риб фауни України для наукового вжитку // Біологічні студії. — 2012. — Т. 6, №2. — С. 199—

лабораторні дослідження в педіатрії : навч. посібник для студ. мед. та фарм. вищ. навч. закладів / О. І. Залюбовська, Г. П. Фоміна, В. В. Зленко

НУБІП України

та ін. — Харків, 2010. — 273 с.

овчан Ю. В. Риби України. — Київ, 2011. — 444 с.

каз МОЗ України 23.07.2002 № 280 «Щодо організації проведення

обов'язкових профілактичних медичних оглядів працівників окремих професій, виробництв і організацій, діяльність яких пов'язана з обслуговуванням населення і може призвести до поширення інфекційних хвороб».

каз МОЗ України від 04.01.2001 р. № 1 «Медична облікова документація, що використовується в лабораторіях лікувально-профілактичних закладів»

оби родини корошових (Cypripinidae) водою України : довідник / [В. В. Заморов, Ю. В. Караванський, І. Л. Рижко] ; Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, Біол. ф-т. - Одеса : ОНУ, 2015. - 120 с. : рис. - Бібліогр.: с. 55. Сиволюб А. В. Молекулярна біологія, К.: «Київський університет», 2008,

384 с.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України