

ВЛИЯНИЕ АРТЕФАКТОВ ПЦР НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА В НАТИВНЫХ ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЯХ

Р.А. КУЛИБАБА, Ю.В. ЛЯШЕНКО

Государственная опытная станция птицеводства НААН Украины, Борки
E-mail: romankx@rambler.ru

Изучен вопрос образования различных типов артефактов в процессе амплификации при использовании разных классов молекулярно-генетических маркеров (Indel и SSR). Показано, что в процессе амплификации гетерозиготных образцов как фрагментов целевых генов, так и микросателлитов образуется гетеродуплексная ДНК. При проведении электрофореза в нативном полиакриламидном геле продуктов амплификации гомозиготных образцов по микросателлитным локусам обнаружены специфические дополнительные фрагменты, которые не относятся к классу гетеродуплексной ДНК. Очевидно, дополнительные фрагменты относятся к особому типу гомодуплексной ДНК – нелинейным гомодуплексам. Проведенный анализ выявил, что образование нелинейной гомодуплексной ДНК происходит на 20–25-м цикле ПЦР как при амплификации ДНК опытных образцов, так и вырезанных из геля отдельных фрагментов.

Ключевые слова: микросателлиты, инсерции, полимеразная цепная реакция, артефакты, гетеродуплексы, гомодуплексы.

Введение. Проблема образования артефактов при проведении амплификации достаточно широко распространена и зависит как от типа используемых молекулярно-генетических маркеров, так и от параметров проведения ПЦР [1]. В большей мере это касается микросателлитов (SSR) [2]. Высокий уровень полиморфизма SSR-локусов, основанный на изменении количества tandemных нуклеотидных повторов, существенно повышает эффективность их практического применения для решения широкого спектра задач [3–5]. Однако зачастую сложно получить достоверную информацию о нативной структуре микросателлитов изучаемого объекта в лабораторных условиях (*in vitro*). Обычная амплификация, которая на данный момент является практически безальтернативным инструментом получения необходимого

для исследования количества ДНК, все же лишена возможности в полном объеме воспроизводить процесс репликации в живой клетке. В результате возникают побочные продукты, которые могут приводить к ложным результатам [6]. Более того, особенности структуры микросателлитов во многом усугубляют данную проблему [7].

К наиболее широко распространенным артефактам ПЦР при проведении SSR-анализа относятся: нуль-аллели; недостаточная амплификация одного из аллелей в случае гетерозиготных образцов; статтеры; добавление аденина к 3'-концу цепи ДНК (особенность Taq-полимеразы) [1, 8–10].

Нуль-аллели, а также недостаточная эффективность амплификации одного из аллелей в случае с гетерозиготами может быть вызвана мутациями в участках гибридизации праймеров с ДНК-мишенью. Количество мутаций (нуклеотидных замен), их тип (SNP, Indel) и положение (несовпадения нуклеотидных последовательностей, расположенных ближе к 3'-концевой части праймера) могут приводить к изменениям эффективности амплификации и, в свою очередь, к неверному генотипированию (преобладанию количества гомозиготных особей), а также к искажению оценки генетической структуры популяции [11].

Статтеры – неспецифические продукты амплификации, возникающие в результате так называемого проскальзывания ДНК [9, 10]. Они могут содержать как инсерцию, так и делецию, и характерны, как правило, только для микросателлитов. Эти продукты приводят к образованию дополнительных фрагментов на электрофореграммах, а также к ошибкам в интерпретации данных [8]. Частота возникновения статтеров зависит от длины мотива и размера микросателлита (количества мотивов). Эффект скольжения (проскальзывания) цепи ДНК ле-

жит в основе феномена микросателлитной нестабильности.

Добавление аденина к 3'-концу цепи ДНК (обеих цепей ДНК) относится к функциональным особенностям Таq-полимеразы. В отличие от других перечисленных артефактов достаточно просто исправляется увеличением длительности этапа финальной элонгации ПЦР.

Однако наряду с описанными существует еще один класс артефактов ПЦР, которому, как правило, не уделяют достаточного внимания. Речь идет о гетеродуплексах. Образование гетеродуплексной ДНК в процессе ПЦР достаточно распространенное явление [12–14]. Гетеродуплекс – это молекула двухцепочечной ДНК, в которой антипараллельные цепи имеют разное происхождение, т.е. являются производными разных аллелей [15, 16]. При этом цепи не полностью комплементарны друг другу (в наличии могут быть как несколько ошибочных, не канонических, пар оснований, так и более протяженные участки – инсерции).

Для изучения особенностей формирования гетеродуплексов были выбраны две модельные системы: инсерции (Indel) в локусах пролактина (*PRL*) и гипофизарного транскрипционного фактора (*PIT1*); SSR – микросателлитные локусы MCW0104 и LEI0094 соответственно.

Материалы и методы. Для проведения исследований была использована птица украинской селекции с экспериментальной птицефермы «Сохранение государственного генофонда Государственной опытной станции птицеводства Национальной академии аграрных наук Украины» – куры яично-мясные (порода полтавская глинистая) и яичные (порода борковская барвистая). Выделение ДНК из образцов крови осуществляли с помощью коммерческого набора реагентов «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс», РФ). Эффективность выделения ДНК определяли с помощью электрофореза в 0,7%-ном агарозном геле при 200 В в течение 5 мин.

Амплификацию проводили с использованием реагентов DreamTaq PCR MasterMix (ThermoScientific) при помощи программируемого термоциклера «Терцик» («ДНК-технология», РФ) по соответствующим программам: 1 цикл – денатурация 94 °С 3 мин; 35 циклов – денатурация 94 °С 1 мин, отжиг 1 мин (54 °С для *PRL*; 58 °С для *PIT1*; 67 °С для MCW0104; 65 °С для LEI0094),

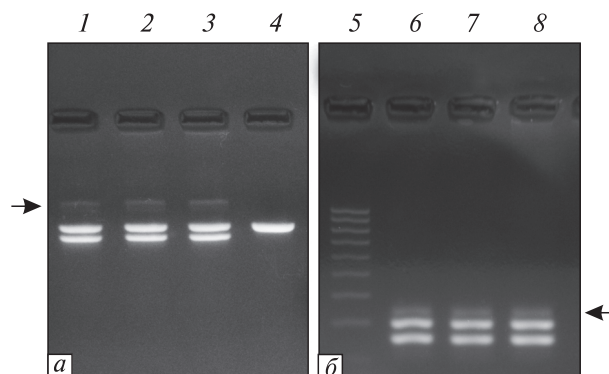


Рис. 1. Образование гетеродуплексов при амплификации образцов по локусам *PRL* и *PIT1*: *a* – инсерция размером 57 п.н. в гене *PIT1*; *б* – инсерция размером 24 п.н. в гене *PRL*; 1–3, 6–8 – генотип I/D; 4 – I/I; 5 – маркер молекулярных масс М-50; стрелка ми отмечена гетеродуплексная ДНК

элонгация 72 °С 1 мин; 1 цикл – финальная элонгация 72 °С 10 мин. Объем конечной смеси составил 10 мкл, концентрация праймеров – 0,2 мкМ в каждом случае.

Для проведения амплификации использовали следующие праймеры:

PRL – 5'-TTTAATATTGGTGGGTGAAGAGACA-3',
5'-ATGCCACTGATCCTCGAAAAC TC-3' [17];
PIT1 – 5'-GTCAAGGCAAATATTCTGTACC-3',
5'-TGCATGTTAATTTGGCTCTG-3' [18];
MCW0104 – 5'-TAGCACAAC TCAAGCTGTGA-G-3',
5'-AGACTTGCACAGCTGTGTACC-3' [19];
LEI0094 – 5'-GATCTCACCAGTATGAGCTGC-3',
5'-TCTCACACTGTAACACAGTGC-3' [19].

Продукты амплификации разделяли в 3%-ном агарозном геле при напряжении 150 В в течение 40 мин и в 5%-ном неденатурирующем полиакриламидном геле (16 × 17,5 см) при напряжении 250 В в течение 180 мин в ТВЕ-буфере. Визуализацию осуществляли с помощью бромистого этидия в ультрафиолетовом спектре. При использовании полиакриламидного геля также проводили окрашивание серебром [20].

Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли с использованием реагентов GeneJETGel-Extraction (ThermoScientific), из полиакриламидного геля – согласно протоколу [21].

Результаты исследований и их обсуждение. В результате проведенных исследований показано образование гетеродуплексных молекул ДНК,

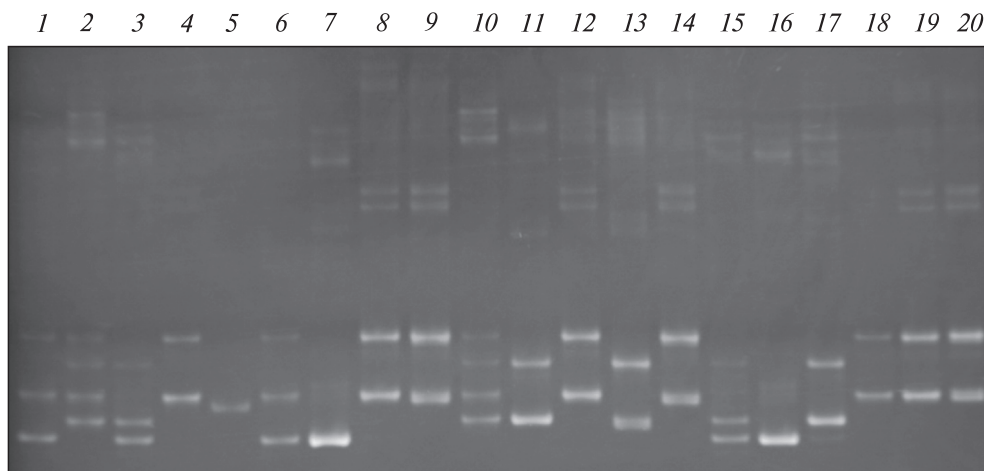


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации MCW0104: 1 – самец; 2 – самка; 3 – потомок 1; 4 – потомок 2; 5 – маркер M-200 (фрагмент 200 п.н.); 6 – самец; 7 – амплификат от вырезанного нижнего (№ 1) фрагмента самца; 8 – амплификат от вырезанного среднего (№ 2) фрагмента самца; 9 – амплификат от вырезанного верхнего (№ 3) фрагмента самца; 10 – самка; 11 – амплификат от вырезанного нижнего (№ 1) фрагмента самки; 12 – амплификат от вырезанного среднего (№ 2) фрагмента самки; 13 – амплификат от вырезанного среднего (№ 3) фрагмента самки; 14 – амплификат от вырезанного верхнего (№ 4) фрагмента самки; 15 – потомок 1; 16 – амплификат от вырезанного нижнего (№ 1) фрагмента потомка 1; 17 – амплификат от вырезанного верхнего (№ 2) фрагмента потомка 1; 18 – потомок 2; 19 – амплификат от вырезанного нижнего (№ 1) фрагмента потомка 2; 20 – амплификат от вырезанного верхнего (№ 2) фрагмента потомка 2

содержащих инсерции/делеции размером 24 и 57 п.н. (рис. 1).

Как видно из представленной электрофореграммы, в случае с инсерциями довольно большого размера для визуализации гетеродуплексов вполне достаточно использование 3%-ного агарозного геля.

Для изучения природы дополнительных фрагментов (гетеродуплексной ДНК) провели их вырезание из геля, далее экстрагировали ДНК с последующей амплификацией. Затем пробы переносили на электрофорез. Результаты исследований показали, что дополнительные фрагменты – классическая гетеродуплексная ДНК, образующаяся при амплификации гетерозиготных образцов (при наличии в реакционной смеси двух различных по нуклеотидной структуре целевых фрагментов – аллелей). При амплификации выделенной из геля ДНК образуются исходные (целевые) фрагменты, соответствующие данному генотипу, что свидетельствует о наличии двух типов гетеродуплексов. В первом случае смысловая цепь от первого (условно) целевого фрагмента, анти-

смысловая – от второго, во-втором случае смысловая цепь от второго фрагмента, в то время как антисмысловая – от первого. Каждая из цепей гетеродуплексной молекулы связана со своей комплементарной цепью уотсон-криковскими взаимодействиями за исключением некомплементарных участков. В данном участке некомплементарный фрагмент цепи формирует так называемую петлевую структуру (loop), изменяющую конформацию двухцепочечной молекулы ДНК в целом, что в свою очередь отражается на ее электрофоретической подвижности, приводящей к возникновению дополнительных фрагментов на электрофореграмме.

Разница в структуре гетеродуплексов маркеров Indel и SSR заключается в размере петли (loop). Так, например, если в случае с Indel она приблизительно соответствует размеру инсерции, то в случае с микросателлитами размеры петлевого участка варьируют в зависимости от разницы в длине аллелей.

Следует отметить, что при изучении микросателлитных локусов использование агарозы не

оправдано вследствие недостаточной разрешающей способности, что приводит к необходимости использования полиакриламидного геля.

Как правило, при амплификации микросателлитных локусов наблюдается достаточно большое количество дополнительных фрагментов (артефактов) на электрофореграммах. При этом в случае, если дополнительные фрагменты локализованы рядом с целевыми, возникают трудности в точном генотипировании, так как зачастую невозможно отличить целевой фрагмент от артефакта. На электрофореграмме присутствуют более двух фрагментов практически в каждом из образцов, при этом стоит обратить внимание на наличие трех и четырех аллелей у одной особи, существенно не отличающихся по интенсивности свечения (каждый из которых соответствует определенному фрагменту на электрофореграмме). В некоторых случаях у диплоидных организмов количество аллелей на locus может быть более двух, как, например, при дупликации генов и т.д. Однако такое явление (наличие дополнительных фрагментов на электрофореграммах) настолько широко распространено, что объяснить его дупликацией фрагментов геномной ДНК не представляется возможным.

Причиной возникновения дополнительных фрагментов могут служить гетеродуплексы различных типов (в случае гетерозиготных образцов), которые в силу различий в электрофоретической подвижности детектируются как отдельные аллели. Для проверки этого предположения были проведены исследования по вырезанию из геля и последующей амплификации фрагментов ДНК (как целевых, так и артефактов). Параллельно проанализированы по локусам MCW0104 и LEI0094 родители и их потомки (F1).

На рис. 2 приведена электрофореграмма продуктов амплификации локуса MCW0104 родителей (самец и самка), их потомков (F1), а также вырезанных фрагментов (как целевых, так и дополнительных).

Как видно из представленной электрофореграммы, имеются определенные сложности в генотипировании каждой из особей. Так, например, потомок № 2 (проба 4) однозначно определяется как гетерозигота, пробы 1 и 2 указывают на наличие более двух аллелей в

диплоидном организме, что по меньшей мере требует особого внимания. Однако результаты амплификации каждого из вырезанных фрагментов коренным образом изменяют ситуацию в целом. Так, при амплификации вырезанного нижнего фрагмента самца образуется только целевой фрагмент (проба 7), однако при амплификации среднего и верхнего фрагментов образуются оба в каждом случае (пробы 8 и 9). Аналогичным образом и в случае с самкой (в наличии четыре фрагмента) – амплификация нижнего фрагмента (№ 1) дает в результате фрагмент № 1 и 3 (проба 11), амплификация второго фрагмента – № 2 и 4 (проба 12); третьего – № 3 и 1 (проба 13); четвертого – № 4 и 2 (проба 14). Таким образом, количество фрагментов в образцах определяется суммой целевых фрагментов и образуемых ими артефактов.

Полученные на электрофореграмме результаты свидетельствуют о необходимости изучения природы дополнительных фрагментов (артефактов), возникающих на этапе амплификации.

Проведенные исследования показали, что образование дополнительных фрагментов (артефактов) происходит после 20–25 циклов ПЦР. Первые 15 циклов недостаточно для появления дополнительных фрагментов. Они начинают образовываться, когда количество амплифицированного продукта достигает критической концентрации в реакционной смеси. В условиях повышения концентрации одноцепочечных фрагментов ДНК на этапе денатурации вероятность образования артефактов резко увеличивается, и к 25-му циклу их количество становится достаточным для определения в качестве отдельных фрагментов на электрофореграмме.

Первоначальное предположение о том, что указанные артефакты относятся к типу гетеродуплексной ДНК, не соответствует действительности. Гетеродуплексы – гибридные молекулы двухцепочечной ДНК, каждая из цепей которой имеет разное происхождение. Поэтому дополнительный фрагмент, возникающий при амплификации вырезанного из геля целевого фрагмента, не может относиться к типу гетеродуплексной ДНК, так как в пробе отсутствуют разные аллели. Однако практически в каждом

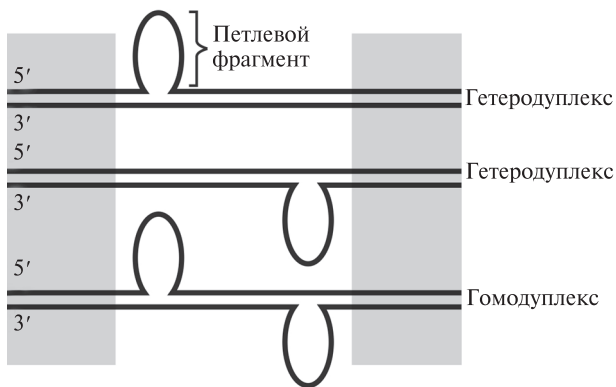


Рис. 3. Схематическое изображение различных типов гетеродуплексной и гомодуплексной ДНК в микросателлитных локусах. Серым цветом выделены фрагменты, фланкирующие микросателлитные повторы (без соблюдения масштаба)

случае мы получаем несколько (два) фрагментов после амплификации. Для объяснения наблюдаемого феномена можно допустить образование в пробах в процессе ПЦР особого типа гомодуплексной ДНК, в которой цепи комплементарны друг другу не на всем протяжении (нелинейно), при этом участки, образованные микросателлитными повторами каждой из цепей, образуют петлевою структуру, стабилизированную взаимодействием оснований в пределах каждой цепи (рис. 3).

На представленной схеме показана предполагаемая структура «нелинейных» гомодуплексов (нелинейный — так как антипараллельные цепи комплементарны друг другу не по всей длине молекулы). В данном типе гомодуплексов антипараллельные цепи комплементарны друг другу во фланкирующих микросателлитных повторах участках ампликона (включающие в себя и сайты связывания праймеров). Классические «линейные» гомодуплексы полностью соответствуют целевым фрагментам и на схеме не указаны. Следует отметить, что петлевые фрагменты могут быть различного размера и располагаться в разных участках микросателлитного повтора, что возможно связано со структурой основного мотива и общим количеством повторов. Гетеродуплексы, структура которых также представлена на рис. 3, образуются только в случае гетерозигот, однако в данном случае картина усугубляется еще и фактором наличия на электрофореграмме «не-

линейных» гомодуплексов. Гетеродуплексы достаточно легко отличить от «нелинейных» гомодуплексов по расположению на электрофореграмме, как правило, первые обладают гораздо более низкой электрофоретической подвижностью по сравнению с целевыми фрагментами.

Принимая во внимание все изложенное, можно объяснить, каким образом при амплификации одного вырезанного из геля фрагмента образуются два — целевой и дополнительный (артефакт) (рис. 2). Целевой фрагмент, в данном случае это «линейный» классический гомодуплекс, в то время как дополнительный фрагмент — «нелинейный» гомодуплекс. Следует отметить, что воспроизводимость «нелинейных» гомодуплексов равна 100 %, так как нами не зафиксировано ни одного случая их отсутствия после амплификации изучаемых целевых фрагментов.

Для подтверждения нашего предположения о природе наблюдаемых артефактов провели одиночный цикл денатурации/ренатурации вырезанных из геля отдельных фрагментов пробы 4 без проведения ПЦР, что привело к появлению на электрофореграмме как целевых (соответствующих исходным), так и дополнительных фрагментов (артефактов). Полученные результаты свидетельствуют, что возникающие артефакты относятся к типу «нелинейных» гомодуплексов и не вызваны различными вариациями в синтезе цепей в процессе ПЦР.

В рассматриваемом случае в локусе MCW0104 обнаружен только один аллель, который при его выделении из геля и последующей амплификации не образовывал дополнительных фрагментов как у родителей, так и у потомков (пробы 7 и 16). При этом такой аллель содержит наименьшее количество повторов (т.е. характеризуется минимальной из изученных аллелей локуса MCW0104 длиной ампликона), что указывает на значение количества повторов для образования «нелинейных» гомодуплексов.

В случае с Indel в наличии только гетеродуплексы. Образование «нелинейных» гомодуплексов — особенность микросателлитных локусов. Наличие коротких повторяющихся фрагментов (2–6 п.н.) приводит к возможности образования достаточно стабильной, вос-

производимой вторичной структуры, в которой цепи ДНК на некоторых участках самокомплементарны.

Аналогичные исследования были проведены и на примере локуса LEI0094 (рис. 4).

Результаты исследований по локусу LEI0094 показали схожую с MCW0104 картину. Генотипирование особей сильно затруднено. Так, например, проба 1 на рис. 4 на первый взгляд соответствует гетерозиготной особи, однако, как было выяснено в результате исследований, это гомозиготный образец. Верхний фрагмент — это артефакт (проба 4 и 5). Подобным же образом и самка (проба 2) — гомозиготный образец, так как дополнительные фрагменты не что иное, как артефакты амплификации целевого фрагмента (пробы 6 и 7). Результаты исследований подтверждает также тот факт, что все особи поколения F1 оказались гетерозиготными, что может быть только при скрещивании разных гомозигот. Таким образом, генотип потомства (проба 3) представляет собой комбинацию целевых (что и следовало ожидать) и дополнительных фрагментов (артефактов) родителей.

Выводы. В результате проведенных исследований показано, что при амплификации SSR-локусов основным типом артефактов ПЦР, имеющих близкую к целевым фрагментам электрофоретическую подвижность, являются «нелинейные» гомодуплексы (НГД). Предполагается, что в процессе амплификации геномной ДНК гомозиготной особи по SSR-локусу (диплоидный генотип) может образовываться от 1 до 3 фрагментов в зависимости от длины микросателлитного аллеля («чистые» гомозиготы с одним амплифицированным фрагментом чаще всего наблюдаются для самого короткого аллеля локуса). В случае с гетерозиготным генотипом помимо гетеродуплексной ДНК на электрофореграмме появляются дополнительно 1–2 фрагмента, имеющих природу НГД. Необходимо отметить высокую вероятность образования таких нелинейных структур, сравнимую с линейными гомодуплексами. Если конформация НГД имеет стабилизированную структуру, то, как правило, они образуются всегда при денатурации–ренатурации цепей ДНК в процессе ПЦР. Интенсивность свечения (насыщенность окрас-

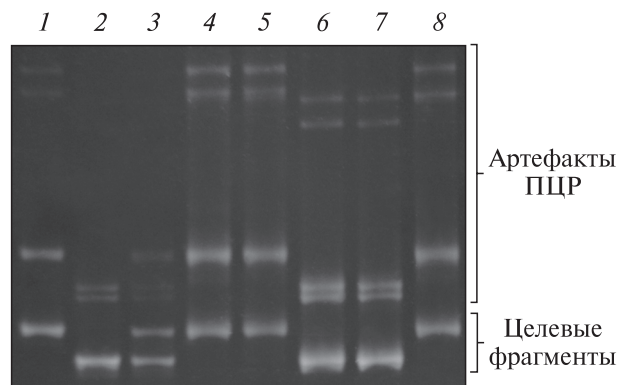


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации LEI0094: 1 — самец; 2 — самка; 3 — потомок; 4 — амплификат от вырезанного нижнего фрагмента самца; 5 — амплификат от вырезанного верхнего фрагмента самца; 6 — амплификат от вырезанного нижнего фрагмента самки; 7 — амплификат от вырезанного верхнего фрагмента самки; 8 — амплификат от вырезанного верхнего фрагмента потомка

ки) таких полос на электрофореграмме достаточна для принятия их за целевые фрагменты. В итоге мы получаем не характерную для данного типа маркеров картину — так называемый «множественный аллелизм». Аллельная лесенка одного генотипа с учетом всех артефактов может быть сопоставима с профилем RAPD. Необходимо также отметить, что все эти дополнительные фрагменты на самом деле являются производными целевых ампликонов, конформационная структура которых изменяет их электрофоретическую подвижность.

Исходя из стандартных (неденатурирующих, нативных) условий проведения электрофореза, определять аллельный профиль образцов следует лишь на основании полной картины микросателлитной изменчивости по конкретному локусу в пределах исследуемой популяции. Как показывает практика (10 микросателлитных локусов при изучении четырех пород кур), скорость миграции дополнительных фрагментов (НГД) ниже целевых (неопубликованные данные). Поэтому за основу нужно брать лишь нижнюю пару ампликонов. При этом необходимо контролировать положение верхнего фрагмента этой пары (более тяжелого), который должен находиться в пределах миграции самого тяжелого (длинного) микросателлита для данного локуса. В качестве дополнительного

критерия для принятия правильного решения в случае гетерозигот можно использовать анализ профиля гетеродуплексов, которые обладают более низкой электрофоретической подвижностью. В спорных ситуациях, а также при анализе единичного образца можно провести повторную амплификацию вырезанных из геля фрагментов.

INFLUENCE OF THE PCR ARTIFACTS ON THE GENOTYPING EFFICIENCY BY THE MICROSATELLITE LOCI USING NATIVE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

R.A. Kulibaba, Y.V. Liashenko

State poultry research station National academy of agrarian sciences of Ukraine, Birky
E-mail: romankx@rambler.ru

The formation of different types of the artifacts in the amplification reaction with using different classes of the molecular-genetic markers (Indel and SSR) was studied. It was shown that DNA heteroduplexes formed during amplification of heterozygous samples, as fragments of target genes and microsatellite loci. During the electrophoresis in native polyacrylamide gel of the amplification products of homozygous samples for microsatellite loci it was revealed specific additional fragments that do not belong to the class of heteroduplex DNA. It was supposed, that the additional fragments belong to a special type of homoduplex DNA – non-linear homoduplexes. The analysis revealed that the formation of a non-linear homoduplex DNA takes place on the 20–25 cycle of the PCR, both at the amplification of the individual samples, and individual DNA fragments that was cut out from the gel.

ВПЛИВ АРТЕФАКТІВ ПЛР НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ГЕНОТИПУВАННЯ ЗА МІКРОСАТЕЛІТНИМИ ЛОКУСАМИ З ВИКОРИСТАННЯМ ЕЛЕКТРОФЕРЕЗУ У НАТИВНИХ ПОЛІАКРИЛАМІДНИХ ГЕЛЯХ

Р.О. Кулибаба, Ю.В. Ляшенко

Вивчено питання утворення різних типів артефактів упродовж ампліфікації при використанні різних класів молекулярно-генетичних маркерів (Indel і SSR). Встановлено, що в процесі ампліфікації гетерозиготних зразків як фрагментів цільових генів, так і мікросателітів утворюється гетеродуплексна ДНК. При проведенні електрофорезу в нативному поліакриламідному гелі продуктів ампліфікації гомозиготних зразків за мікросателітними локусами виявлено специфічні додаткові фрагменти, які не належать до класу гетеродуплексної ДНК. Зроблено

припущення, що додаткові фрагменти належать до особливого типу гомодуплексної ДНК – нелінійних гомодуплексів. Проведений аналіз виявив, що утворення нелінійної гомодуплексної ДНК відбувається на 20–25-му циклі ПЛР як при ампліфікації ДНК дослідних зразків, так і вирізаних із гелю окремих фрагментів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Butler, J.M., *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*, 2nd ed., Acad. Press, 2005, 688 p.
- Olejniczak, M., and Krzyzosiak, W.J., Genotyping of simple sequence repeats – factors implicated in shadow band generation revisited, *Electrophoresis*, 2006, vol. 27, no. 19, pp. 3724–3734.
- Cregan, P.B., Bhagwat, A.A., Akkaya, M.S., and Rongwen, J., Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean, *Meth. Mol. Cell. Biol.*, 1994, vol. 5, pp. 49–61.
- Arif, I.A., Khan, H.A., Shobrak M., Al Homaidan, A.A., Al Sadoon, M., Al Farhan, A.H., and Bahkali, A.H., Interpretation of electrophoretograms of seven microsatellite loci to determine the genetic diversity of the Arabian Oryx, *Genet. Mol. Res.*, 2010, vol. 9, no. 1, pp. 259–265.
- Schlotterer, C., The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Rev. Genet.*, 2004, vol. 5, pp. 63–69.
- Bovo, D., Ruge, M., and Shiao, Y.-H., Origin of spurious multiple bands in the amplification of microsatellite sequences, *Mol. Pathol.*, 1999, vol. 52, no. 1, pp. 50–51.
- Erhart, M.A., Kim, T., Crews, G.M., and Pandya, A., The use of unilateral PCR to identify prominent heteroduplexes formed during PCR of the mouse microsatellite locus D17Mit23, *Mol. Biotechnol.*, 2006, vol. 33, no. 1, pp. 37–48.
- Walsh, P.S., Fildes, N.J., and Reynolds, R., Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA, *Nucl. Acids Res.*, 1996, vol. 24, no. 14, pp. 2807–2812.
- Janavicius, R., Matiukaite, D., Jakubauskas, A., and Griskevicius, L., Microsatellite instability detection by high-resolution melting analysis, *Clin. Chem.*, 2010, vol. 56, no. 11, pp. 1750–1757.
- Shinde, D., Lai, Y., Sun, F., and Arnheim, N., Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites, *Nucl. Acids Res.*, 2003, vol. 31, no. 3, pp. 974–980.
- Omasheva, M.E., Aubakirova, K.P., and Ryabushkina, N.A., Molecular markers: causes and effects of genotyping errors, *Biotechnology. Theory and practice*, 2013, no. 4, pp. 20–28. DOI: 10.11134/btp.4.2013.3

12. Nagamine, C.M., Chan, K., and Lau, F.C., A PCR artifact: generation of Heteroduplexes, *Am. J. Hum. Genet.*, 1989, vol. 45, no. 2, pp. 337–339.
13. Hashemi, S.H., Mirmohammadi-Maibody, S.A.M., Nematzadeh, G.A., and Arzani, A., Identification of rice hybrids using microsatellite and RAPD markers, *Afr. J. Biotechnol.*, 2009, vol. 8, no. 10, pp. 2094–2101.
14. Perez, J.A., Maca, N., and Larruga, J.M. Expanding informativeness of microsatellite motifs through the analysis of heteroduplexes: a case applied to *Solanum tuberosum*, *Theor. Appl. Genet.*, 1999, vol. 99, no. 3, 4, pp. 481–486.
15. Ruano, G., and Kidd, K.K. Modeling of heteroduplex formation during PCR from mixtures of DNA templates, *PCR Meth. Appl.*, 1992, vol. 2, no. 2, pp. 112–116.
16. Hatcher, S.L., Lambert, Q.T., Teplitz, R.L., and Carlson, J.R., Heteroduplex formation: a potential source of genotyping error from PCR products, *Prenat. Diagn.*, 1993, vol. 13, no. 3, pp. 171–177.
17. Cui, J.-X., Du, H.-L., Liang, Y., Deng, X.-M., Li, N., and Zhang, X.-Q., Association of polymorphisms in the promoter region of chicken prolactin with egg production, *Poult. Sci.*, 2006, vol. 85, no. 1, pp. 26–31.
18. Nie, Q., Lei, M., Ouyang, J., Zeng, H., Yang, G., and Zhang, X., Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography, *Genet. Sel. Evol.*, 2005, vol. 37, no. 3, pp. 339–360.
19. *Molecular genetic characterization of animal genetic resources*, FAO Animal Production and Health Guidelines, № 9, Rome, 2011, 87 p.
20. Irwin, N., and Janssen, K.A., *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., Cold spring harbor laboratory press, New York, 2001, 764 p.
21. Bryukhanov, A.L., Rybak, K.V., and Netrusov, A.I., *Molecular microbiology*, Moscow, 2012, 474 p. (In Russian).

Поступила 30.06.15