

УДК [57.08:577.133.5]+575.86

© 2004 р. О. В. ГУМОВСЬКИЙ

## ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ ДНК В СИСТЕМАТИЦІ: ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ ТА МОДЕЛЬНИЙ ПРОТОКОЛ

**Вступ.** Значення молекулярних досліджень у сучасній науці важко переоцінити. Вивчення зоологічних об'єктів є неодмінною складовою молекулярної біології ще з моменту зародження цієї галузі біології. Відтоді подібні дослідження дають потужний матеріал для таких наук, як біохімія, імунологія, ферментативна кінетика, генна інженерія тощо.

Водночас, використання молекулярно-біологічних даних у таких традиційних галузях зоологічної науки як систематика та філогенія, є порівняно недавнім напрямком, проте таким, чий розвиток є чи не найстрімкішим у сучасній зоології (Quicke, 1993; Phylogenetic systematics ..., 2000).

**Спосіб викладення.** У даній статті запропоновано таку структуру: а) короткий огляд історії вивчення, методологічних основ отримання та галузей використання даних структури ДНК в сучасній зоології; б) додаток, в якому наводиться модельний протокол отримання даних структури ДНК (сіквенсінгу), з коментарями щодо сутності та мети кожного етапу. Певні розділи тексту міститимуть базову інформацію. Однак автор вважає доцільним її наведення, оскільки даний огляд розрахований насамперед на широкий загал зоологів-систематиків, повсякденна практика яких не пов'язана з молекулярно-біологічними дослідженнями. Робота має на меті ознайомлення зоологів з головними положеннями молекулярних досліджень (вивчення структури ДНК, зокрема), що потрібно в разі необхідності проведення подібних робіт самостійно (і для самостійного опанування чого не завжди є час і можливості). Водночас, стандартні протоколи, що наводяться в більшості інструкцій та посібників, містять конкретні виміри, дози та розрахунки, без коментарів щодо сутності кожного етапу. Проте, на практиці, по-перше, для ефективного проведення дослідів потрібно розуміти сутність робіт, що виконуються, а, по-друге, почасти кожен протокол вимагає коректив залежно від об'єкту досліджень (які, відповідно, неможливо зробити, не знаючи чим зумовлений той чи інший хід).

Для базових понять в роботі наводяться англійські аналоги, що має полегшити пошук відповідних розділів у посібниках, інструкціях та у мережі Internet. З цією самою метою додаток наводиться двома мовами (українською та англійською).

**Історія, підґрунтя та сутність методу.** Відкриття Дж. Вотсоном та Ф. Кріком у 1953 році сутності носіїв генетичної інформації відкрило нову еру в біологічній науці, започаткувавши такий напрямок як молекулярна генетика. Загальновідомим став той факт, що нуклеїнові кислоти, носії первинної генетичної інформації, складаються з азотистих сполук — пуринових (*гуанін, аденін*) та піримідинових (*тимін, цитозін*) основ (нуклеотидів). Ці сполуки визначалися кількісними та якісними методами, проте встановлення послідовності цих основ на певних ділянках ДНК (тобто її первинної структури) було проблематичним. Головною причиною цього була незначна кількість нуклеїнової кислоти, що її можна було видобути з біологічного об'єкту. Ще й понині технічні засоби не дозволяють визначити структуру нуклеїнової кислоти за вихідною кількістю матеріалу.

По мірі зростання потреби у визначенні цих послідовностей вівся пошук можливостей збільшення кількості ДНК-матеріалу, насамперед шляхом штучного синтезу. Загальновідомо, що матрицею для синтезу дочірнього ланцюга ДНК є інший ланцюг ДНК. Оскільки молекули ДНК є дволанцюговими у тварин та рослин, ці ланцюги мають бути розділені, щоб кожен з них став матрицею. У природних умовах цей процес відбувається завдяки діяльності ферментів рестриктаз, нуклеаз та транскриптаз, причому синтез відбувається майже водночас з розділенням ланцюгів вихідної ДНК. При цьому також синтезується повна компліментарна копія на кожному матричному ланцюгові. Відтворення цього процесу в штучних умовах є доволі складним. Крім того, в разі лабораторного відтворення буде копіюватися уся ДНК в цілому, тоді як для конкретних досліджень потрібна тільки певна її ділянка. Отже, проблема була в експериментальному розділі дволанцюгової ДНК, штучному обмеженні певних ділянок ДНК та подальшому синтезі їх численних, достатніх для розпізнавання, копій. Вирішальним кроком у просуванні до вирішення цих проблем були відкриття *праймерів* та *ланцюгової реакції полімерази*.

Ланцюгова реакція полімерази (*the polymerase chain reaction, PCR*) — це технологія ампліфікації (багаразового збільшення кількості) *in vitro* певної ділянки ДНК, що знаходиться між двома *вже відомими* послідовностями ДНК.

Праймери (primers) — це короткі (здебільшого на декілька десятків азотистих основ), односторонні олігонуклеотиди, що є компліментарними кінцевим ділянкам згадуваних (вже відомих) ділянок ДНК.

При нагріванні до 94 °С та вище подвійний ланцюг ДНК розпадається на два окремі ланцюги. Якщо до цієї ДНК додати розчин праймерів і знизити температуру до 48–60 °С, то праймери прикріпляються до компліментарних їм ділянок, що заважає зворотному прикріпленню ланцюгів вихідної ДНК. В разі, коли потрібно вивчити структуру певного гену у певного виду, цей ген «обмежують» праймерами.

Праймери можуть бути *універсальними* (підходять для більшості організмів, що мають певний ген — тобто кінцеві ділянки цього гену однакові у цих організмів), або *специфічними* (придатні для роботи тільки з певними групами організмів). В дослідженнях з філогенії здебільшого використовуються саме універсальні праймери, оскільки вони дозволяють обмежити невідому ДНК-послідовність вже відомими, наявними у всіх, чи майже всіх організмів, нуклеотидними ділянками (Dynamics ..., 1989).

Проблемою було те, що прикріплення праймерів до ланцюга ДНК відбувається за відносно високої температури (48–60 °С), коли ферменти-полімерази денатуруються. Крім того, в експериментальних умовах досягти розділення дволанцюгової ДНК на окремі ланцюги можна завдяки нагріванню до 95 °С, а при охолодженні до кімнатної температури відбувається відновлення дволанцюгової структури.

Революційним відкриттям, що розв'язало ці проблеми, стало вивчення процесу транскрипції ДНК у бактерії *Thermus aquaticus*, що мешкає у гарячих вулканічних джерелах Йелоустоунського Національного Парку (США). Виявилось, що процес синтезу нуклеїнових кислот у цієї бактерії відбувається за температури вищої за 85 °С. Відповідно, ферменти, що відповідають за ці реакції, є надзвичайно термостійкими. Саме на використанні ферменту ДНК-полімерази *T. aquaticus* (скорочено Таq-полімераза) базувалася ланцюгова реакція полімерази (PCR, Polymerase Chain Reaction), що була розроблена Карі Малліс у 1983 році (Нобелівська премія 1993 року). Сутність цієї реакції у повторюваних циклах (70–80, в залежності від досліджуваної групи організмів) синтезу копій (до декількох мільйонів) певної ділянки ДНК (Enzymatic ..., 1985; Specific ..., 1986).

Отримання великої кількості ідентичних копій потрібної ділянки ДНК (при незначній кількості вихідного матеріалу) зробило можливим визначення структури (послідовності нуклеотидів) цієї ділянки сучасними технічними засобами. Специфіка роботи з PCR-протоколом висвітлена у багатьох посібниках та методичних рекомендаціях (зокрема, PCR protocols, 1990; The simple ..., 1991; Duffy, 2000). Нижче ми розглянемо PCR у складі модельного протоколу отримання ДНК-послідовностей.

**Використання даних первинної структури ДНК у сучасній зоології.** Як зазначалося вище, остаточним результатом обговорюваних молекулярно-біологічних досліджень є отримання первинної структури певної ділянки нуклеїнової кислоти. В сучасній біології ці дані зокрема використовуються для визначення патологій на молекулярному рівні (медична генетика), відповідності двох біологічних проб (судово-медична експертиза), генетичному картуванні тощо. З точки зору систематики сукупність азотистих сполук у нуклеотидній послідовності — це насамперед нові ознаки. Особливо значущим є те, що ці ознаки мають низку переваг порівняно до морфологічних, певних біохімічних, етологічних та ін., а саме:

- 1) чітка детермінація станів (чотири азотисті сполуки);
- 2) інший рівень організації, а відтоді незкорегованість з іншими ознаками щодо еволюційних перетворень під впливом зовнішніх умов (конвергенції, паралелизми, редукції, новоутворення тощо);
- 3) більша кількість ознак: досліджувані нині ділянки ДНК близько мають 1000 основ завдовжки, і кожна основа слугує за ознаку, тоді як морфологічних ознак, що придатні для порівняльного аналізу, зазвичай менше.

В наші дні дані первинної структури ДНК використовуються у сучасній зоології для розпізнавання видів-двійників (cryptic species, sibling species), виявлення генетичного дрейфу в популяційній генетиці, визначення видового складу жертв тварин-хижаків за вмістом їх шлунків (Agusti, DeVicente, Gabarra, 1999), визначення відповідності преімагінальних фаз розвитку дорослим особинам (у тварин з метаморфозом), зокрема, визначення видової належності личинок Hymenoptera Parasitica та їх хазяїв (Molecular ..., 2000), а зонайпоширеніше — для вивчення філогенетичних зв'язків та встановлення еволюційних сценаріїв (наприклад, Testing ..., 1998; Acoel ..., 1999; Quicke, Lopez-Vaamonde? Belshaw, 1999; Jolley, Honeycutt, Bradley, 2000; Phylogeny ..., 2000).

**Філогенетичні реконструкції.** Як зазначалося, використання даних ДНК для досліджень філогенетичних зв'язків певних таксонів є чи не найпоширенішою мотивацією для вивчення цих структур. Концепція філогенетичної систематики, основи якої закладені В. Хеннігом, та яка є визнаною в світі системою реконструкції філогенезу, оперує методологічним апаратом, що найбільш придатний для аналізу молекулярних даних (Andersen, 2001). Цей методологічний апарат має назву *кладистичного аналізу*, а алгоритм, що покладено в основу комп'ютерних програм цього аналізу, зветься кількісною кладистикою. Значення, вплив, перспективи та головні принципи філогенетичної систематики активно дискутуються в наукових виданнях та навчальних посібниках (Cladistics ..., 2000; Quicke, 1993; Phylogenetic systematics ..., 2000; Andersen, 2001), тому ми зупинимося на загальних особливостях опрацювання даних ДНК в кладистичних реконструкціях філогенезу.

Метою кладистичного аналізу є побудова філогенетичної реконструкції (кладограми), що базується на ієрархічному та водночас «щонайекономнішому» розподілі ознак між таксонами (принцип парзимонії). Внаслідок цього остаточною стає кладограма, що є найкоротшою за кількістю взаємних переходів (кроків) та є найкомпактнішою за будовою серед усіх можливих. Хоча невеликі масиви даних можуть бути проаналізовані подумки, матриці, що містять декілька сотень ознак, вимагають комп'ютеризованого аналізу. На сьогодні існують достатньо ефективні програми, що забезпечують пошук кладограм, які щонайбільше відповідають принципів парзимонії (PAUP\*, Hennig86). Вихідним матеріалом для проведення кладистичного аналізу є матриця розподілу ознак (character matrix), в якій кожному таксону відповідає певний стан ознаки. Загальною проблемою у створенні такої матриці є кодування ознак (coding of characters). При опрацюванні морфологічних, етологічних, екологічних та інших ознак кодування так чи інакше проводиться завдяки інтуїтивному вирішенню певних станів на розсуд дослідника. Нерідко перехід від одного до іншого стану є поступовим (gradual character). Тоді ця ознака або виключається з аналізу, або кодується «силоміць». Все це вносить вкрай небажані елементи суб'єктивності у дослідження філогенезу (який є процесом об'єктивним, а відтоді вимагає належної аргументації).

У випадку з молекулярними даними ситуація значно спрощується: кожна ознака може бути наявна у чотирьох станах (А, аденін; G, гуанін; С, цитозин; Т, тимін), або (в разі експериментальних недоліків) як «?». В разі потреби декілька матриць по різних генах можуть комбінуватися між собою, або навіть із морфологічними даними, продукуючи тоді філогенетичні реконструкції на засадах «загальної очевидності» (total evidence). Водночас, використання даних нуклеотидних послідовностей вимагає неабиякої уваги та знань. Так, наприклад, іноді треба брати до уваги, що транзиції (заміни пуринової основи на пуринову, а піримідинової — на піримідинову) відбуваються значно частіше, ніж трансверсії (взаємозаміна пуринової та піримідинової основи), а тому почасти заслуговують на меншу вагу порівняно до останніх. Наприклад, у приматів транзиції відбуваються у 17 разів частіше, ніж трансверсії. Крім того, кількість транзицій для пуринів може різнитися від такої для піримідинів. Відповідно, потрібно зважувати відповідність завдань дослідника з інформацією, що може бути отримана від порівняння послідовностей певних генів. Так гени, що еволюціонують дуже швидко, мають дуже мінливі ділянки (highly variable sites) і придатні для розрізнення видів, що відокремилися тільки нещодавно (recently diverged species). І навпаки — для видів, що відокремилися давніше (deep levels of divergence), такі гени вже не є достатньо інформативними через значну несхожість (і, відповідно, неможливість встановити гомологічність певних ділянок) послідовності ДНК.

**Молекулярні технології.** Різні методи мають різний ступінь придатності для вирішення завдань систематики (рис., табл.). Серед молекулярних методик, що вживані у сучасній зоології, головне місце посідають: вивчення ДНК-послідовностей (*DNA-sequencing*), вивчення вставкових елементів (*insertional events*, *SINES*), вивчення повторюваних елементів та мікросателітів (*microsatellites and other repetitive DNA sequences*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* — довільна ампліфікація поліморфної ДНК), вивчення ферментів (ізозимів та алозимів) шляхом електрофорезу, RFLP (*restriction fragment length polymorphisms* — вивчення проіморфізму вирізаних фрагментів), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms* — вивчення ампліфікації фрагментів поліморфних за довжиною). Останні методи (RAPD, електрофорез білкових молекул, AFLP) можуть бути ефективними до певної міри для вивчення філогенетичних зв'язків певних груп організмів, але переважно використовуються на рівні популяцій та близько споріднених видів. Ми зосередимось на розгляді ДНК-послідовностей (ДНК-сіквенсінгу), як щонайбільш вживаного у вивченні філогенетичних зв'язків.

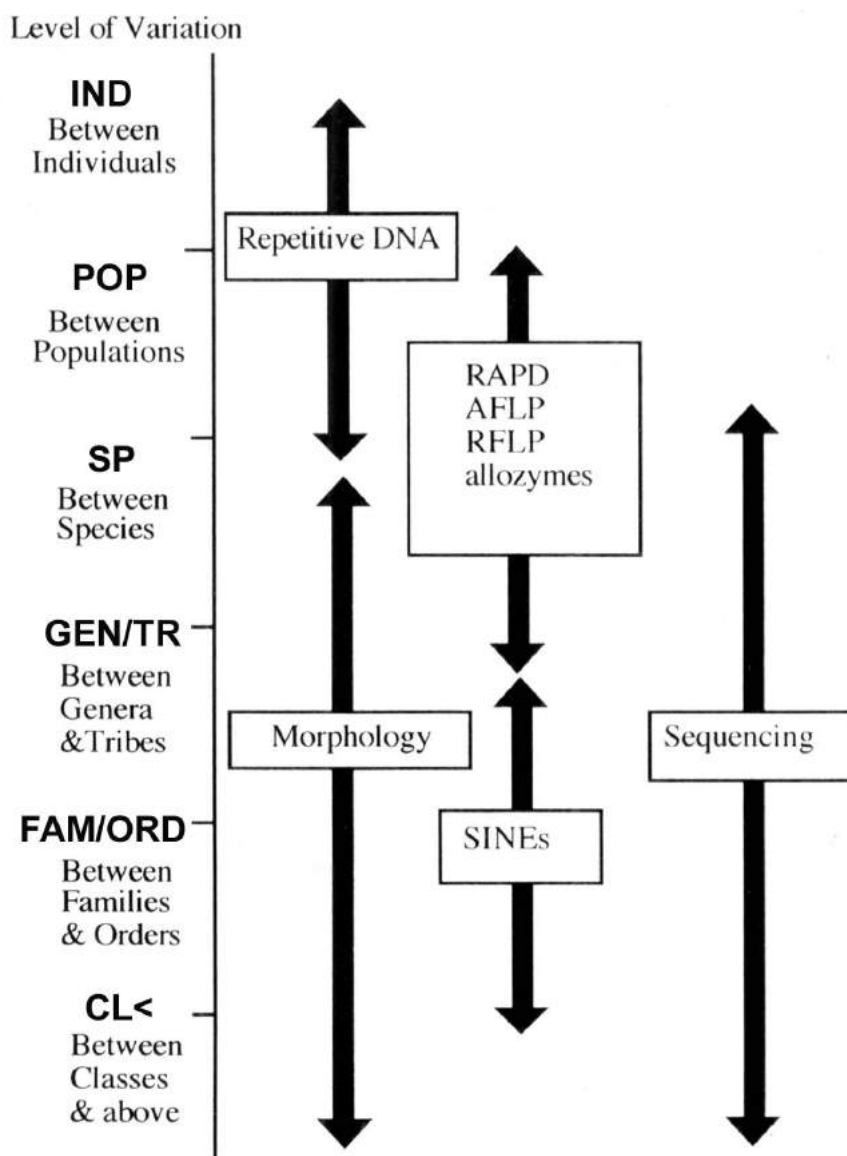


Рис. 1. Порівняльна придатність використання різних маркерів за градієнтом мінливості таксонів (за Phylogenetic systematics ..., 2000); на осі ординат вказані рівні відмінностей: IND — між особинами, POP — між популяціями, SP — між видами, GEN/TR — між родами та трибами, FAM/ORD — між родинами та рядами, CL< — між класами та вище.

Таблиця. Загальні дані щодо придатності різних молекулярно-біологічних методик для потреб сучасної систематики (за Phylogenetic systematics ..., 2000) (сутність абrevіатур — в тексті)

Методика	Порівняна вартість	Придатність для знаходження відмінностей на видовому рівні	Придатність для знаходження відмінностей на вищих рівнях
Вивчення білкових молекул (зокрема аллозимів)	низька	помірна	низька
RAPD	помірна	помірна	немає
AFLP	помірна	значна	низька
RFLP	помірна	помірна	низька
ДНК сіквенсінг	значна	низька	значна
Вивчення вставкових елементів, SINEs	значна	низька	значна
Вивчення мікросателітів	значна	значна	немає

Гени, послідовності яких щонайчастіше використовуються у ДНК-сіквенсінгу, поділяються на мітохондріальні та ядерні, а також на ті, що Кодують рибосомальні РНК чи протеїни. Інформативність ДНК-послідовностей цих генів є різною в різних групах, а також — різною для різних цілей дослідника. Ми зосередимось на придатності означених генів для вирішення питань систематики. Серед ядерних рРНК-синтезуючих (*nuclear rRNA-coding*) генів активно використовуються 28S rDNA\* (кодує велику субодиницю клітинної рибосоми) та 18S rDNA (кодує малу субодиницю клітинної рибосоми). Обидва ці гени демонструють відмінності здебільшого між таксонами рангу родин, рядів та вище, проте до певної міри можуть «працювати» і на рівні родів та видів. Для визначення спорідненості таксонов нижчого рангу (*low-level phylogenetics*) може бути продуктивним використання високо консервативного ядерного гену «фактора видовження «альфа»», *Elongation Factor-1 $\alpha$* , або скорочено *EF-1 $\alpha$*  (A highly ..., 1995). В цілому існує біля 14 ядерних генів, використання ДНК-послідовностей яких є потенційно перспективними для філогенетичних побудов (Friedlander, Regier, Mitter, 1992, 1994). Мітохондріальних генів, що використовуються в сучасній систематиці, дещо більше, їх інформативність охоплює ледь не усі таксономічні ранги, також вони активно використовуються для відокремлення видів-двійників, оскільки деякі є дуже видоспецифічними. Серед мітохондріальних генів виділяють ті, що кодують мітохондріальну рибосомальну РНК (*ribosomal RNA, rRNA*), транспортну РНК (*transfer RNA, tRNA*) та ті, що кодують білки (*protein-coding genes*). З тих генів, що найчастіше використовуються для визначення філогенетичних зв'язків, варто згадати 16S rRNA (кодує велику субодиницю мітохондріальної рибосоми), 12S rRNA (кодує синтез малої субодиниці мітохондріальної рибосоми), Cytochrome oxidase I (COI, кодує цитохромоксидазу I) та Cytochrome b (Cyt b, кодує мітохондріальний цитохром b). Ці гени активно використовуються як для вивчення філогенетичних зв'язків як на рівні родів (12S rRNA: наприклад, *Phylogenetic systematics* ..., 2000), так і на рівні родин та підродів (16S rRNA, COI: наприклад, Downton, Austin, 1997; Cyt b, наприклад, *Phylogenetic relationships* ..., 1993). Повний список мітохондріальних генів, що використовуються для визначення філогенетичних зв'язків, наведений К. Саймоном з співавтором (Evolution ..., 1994).

**Підготовка та зберігання матеріалу для подальшого ДНК-сіквенсінгу.** Наріжним каменем підготовки матеріалу для ДНК-сіквенсінгу є умертвіння об'єктів у спирті, бажано 100 % (Quicke, Belshaw, Lopez-Vaamonde, 1999). Спирт, швидко просякаючи глибоко в тканини біологічного об'єкту, викликає денатурацію білків, зокрема нуклеаз. В свою чергу, в разі повільної смерті, нуклеази починають «нищити ДНК», розриваючи молекули на коротенькі нуклеотиди. Періоду, за який тварина гине, здебільшого достатньо для повної руйнації ДНК. Саме тому спирт, як швидкий розчинник, є ідеальним середовищем для фіксації біологічних зразків, що призначені для подальшого вивчення ДНК-послідовностей. Для значно хітинізованих комах (наприклад, жуків-довгоносиків, жуків-златок тощо) простого занурення в спирт іноді недостатньо, оскільки покриви таких комах надійно ізолюють їх від середовища на певний термін, і процес їх умертвіння розтягується в часі (навіть у спирті — до декількох хвилин), що може негативно вплинути на стан ДНК. Для запобігання такому розвитку подій радять до деякої міри порушити цілісність покривів комахи (наприклад ентомологічною шпилькою), забезпечивши стрімке проникнення спирту в тіло комахи. Іншим, також доволі успішним підходом, є заморожування зразку, або фіксація у лізуючому буфері.

Ідеальними умовами для зберігання матеріалу з метою подальшого вилучення ДНК є збереження в морозильній камері при  $-20^{\circ}\text{C}$ . За таких умов зразки можуть зберігатися до декількох років. Можливе також збереження висушених екземплярів (як звичайним випаровуванням спирту, так і автоматизованим, наприклад, за допомогою апарату висушування у критичній точці, Critical Point Drier). Висушувати екземпляр можна одразу після умертвіння, проте монтувати (для подальшого визначення) його можна приклеюванням до паперової чи целулоїдної основи, але не безпосередньо на металевій шпильці, оскільки контакт біологічного матеріалу з металом руйнівний для ДНК. Однак, досвід автора вказує на те, що найліпше «працюють» свіжі, нещодавно (протягом місяця) зібрані матеріали, що зберігалися при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Матеріали з пасток Малеза та зібрані іншими способами, попри потенційну придатність для виділення ДНК, давали або надто слабкий сигнал, або не давали сигналу взагалі. Причиною цього, вірогідно, були неналежні умови зберігання, або контакт з іншими речовинами.

Якщо досліджуються порівняно великі комахи, то корисно брати частку м'яких тканин (зокрема м'язи), або одну з кінцівок, залишивши більшу частину хітинізованих структур для подальших досліджень. В такому разі цей екземпляр стає *еталонним зразком (voucher specimen)* і може знадобитися

\* У назвах ядерних генів традиційно вказується складова «DNA», тобто акцент робиться саме на ДНК-послідовність, що кодує певний ген, тоді як в мітохондріальних фігурує «RNA», тобто акцент робиться на продукт транскрипції. Оскільки і ядерна, і мітохондріальна ДНК кодують РНК, то в паспортах ГенБанку фігурує тільки РНК — тобто те, що саме кодується ДНК.

для перевірки визначення видової належності, проведення додаткових вимірів, тощо. Особливо потрібним збереження еталонного зразку є в разі неможливості точного його визначення на момент вивчення ДНК. В такому разі вказують неповне визначення (наприклад, на рівні роду), а уточнення (в разі потреби) проводять пізніше. Для дрібних комах, коли для отримання вихідної кількості ДНК потрібним є подібнення всього екземпляру, корисно працювати з вивідними серіями (сібсами), зберігаючи решту особин як еталонні екземпляри.

Водночас, А. Філіпс та К. Саймон (Phillips, Simon, 1995) запропонували методику вилучення ДНК з сухих музейних зразків членистоногих, за якої не вимагається подібнення колекційних екземплярів. Дана методика базується на методі вилучення ДНК із зразків людської крові (A fast method ..., 1991), де зазвичай міститься дуже невелика кількість ДНК. За цієї методики цілісність покривів екземпляру має бути дещо порушена (наприклад, шпилькою), а потім зразок переміщується у спеціальний буфер (в основі якого 8 % розчин броміду додецилтриметиламонія, ДТАВ) і лишається на ніч за температури 68 °С. Потім екземпляр вилучається з розчину, відмивається хлороформом від ДТАВ і може бути повернений до колекції, а розчин пропускається ще крізь низку речовин, зокрема крізь 5 % розчин броміда цетилтриметиламонія (СТАВ). ДТАВ, що є денатуруючим катіонним розчинником, у контакті з СТАВ, дозволяє вибірково осаджувати ДНК, яка надалі є вихідним матеріалом для PCR.

**Основні етапи отримання та вивчення ДНК-последовностей** (на прикладі протоколу фірми Qiagen):

1. Підготовка проби (висушування, подібнення).
2. Виділення ДНК (лізис тканин, відокремлення трердих решток та зайвої органіки).
3. Підготовка матеріалів для PCR: створення розчину, що міститиме віхідну ДНК та складові для подальшої побудови багатьох її копій.
4. PCR: багаторазове збільшення копій потрібної ділянки (що обмежена праймерами) вихідної ДНК.
5. Хроматографія у гелі: очищення продуктів PCR (копій потрібної ділянки ДНК) та визначення їх кількості під ультрафіолетовим випромінюванням.
6. Очищення продуктів PCR від гелю та зайвих реактивів.
7. Перевірка якості очищення (знов у гелі, але з використанням дуже незначної кількості тих продуктів PCR, кількість яких є задовільною для подальшого вивчення).
8. Підготовка матеріалів для сіквенсінгу I: створення розчину, що міститиме продукти PCR, мічені (флуоресцентні) основи та реагенти для побудови мічених копій продуктів PCR.
9. Сіквенсінг I (отримання коротких різнорозмірних олігонуклеотидів з флуоресцентними кінцями, що позначають місця, де синтез копії ДНК був перерваний).
10. Осадження (преципітація) продуктів сіквенсінгу завдяки послідовному відмиванню 100 % та 70 % спиртом; результат — пробірка з сухою масою ДНК-фрагментів (зберігається в морозильнику при – 40 °С).
11. Сіквенсінг II. Аналіз у автоматизованому сіквенсері через розчинення у Loading Buffer, денатурацію та запуску через гель при зчитуванні лазерним сканером сигналів від флуоресцентних міток усіх олігонуклеотидів (пункт 9) та укладці їх відповідно до довжини. Результатом є електроферограма (у вигляді комп'ютерного файлу), на якій кольорові сигнали трансформовані у відповідні азотисті основи і укладені відповідно до розміру олігонуклеотидів, внаслідок чого отримана послідовність азотистих основ відповідає первинній структурі досліджуваної ДНК-ділянки.
12. Перевірка якості трансформованого комп'ютером сигналу автоматизованого сіквенсера у ДНК-последовність та його корекція (в разі потреби) через перевірку відповідності кольорового сигналу кожної флуоресцентної мітки певній азотистій основі.

**Представлення щойно отриманих даних до Генетичного банку.** Для посилення на дані последовностей ДНК в наукових публікаціях ці дані мають бути зареєстровані в міжнародному генетичному банку (EMBL/GenBank/DBJ databases, або NCBI, National Center for Biotechnology Information). Представлення нових даних до EMBL та отримання інформації про наявні ДНК-последовності відбувається на Інтернет-вузлах <http://www3.ebi.ac.uk/Services/webin> або <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, відповідно.

**Модельний протокол дослідження структури ДНК** (на прикладі комах, Додаток 1). Даний протокол є узагальненням тих операцій, що проводилися автором в процесі дослідження ДНК-последовностей їздців родини Eulophidae у Молекулярній лабораторії відділу біології Королівського коледжу Університету Лондона (Department of Biology, Imperial College at Silwood Park),

переважно базуючись на протоколах фірми Qiagen. Існує багато інших протоколів, які відрізняються одне від одного наявністю чи відсутністю певних етапів, використанням тих чи інших хімічних сполук тощо. Наприклад, нерідко продукти PCR очищуються з розчину, а не з агарози (див. п. 6 Основних етапів, вище). Проте, загальна логічна послідовність операцій однакова в усіх протоколах, тому в Додатку 1 ми опишемо увесь процес, включаючи деталі, з розрахунком на те, що після ознайомлення з усім процесом на конкретному прикладі читачеві неважко буде опанувати й інші, в чомусь відмінні, протоколи.


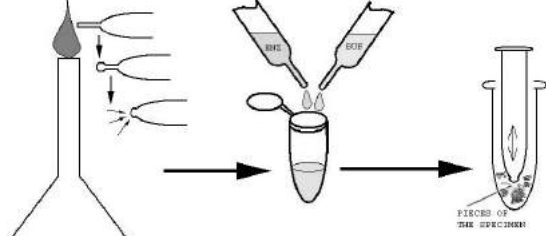
**Подяки.** Ця стаття є часткою дослідницької роботи автора, що була фінансована грантом Royal Society/NATO Postdoctoral Fellowship (NATO/99A/bll) та є частиною проекту, що підтриманий Державним Фондом Фундаментальних Досліджень України (проект 05.07/00078). Автор висловлює щирю подяку Д. Квіку (Donald L. J. Quicke, Department of Biology, Imperial College at Silwood Park, Ascot, UK), Р. Белшоу (Robert Belshaw, Department of Biology, Imperial College at Silwood Park) за допомогу в опануванні молекулярних методик та слушні рекомендації при підготовці цієї роботи, та В. В.Ткачу (Інститут зоології ім. І. І.Шмальгаузена НАН України) за редакцію рукопису та критичні зауваження.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

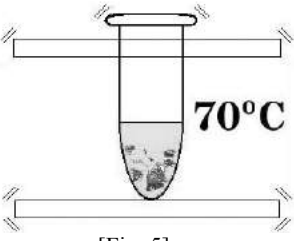
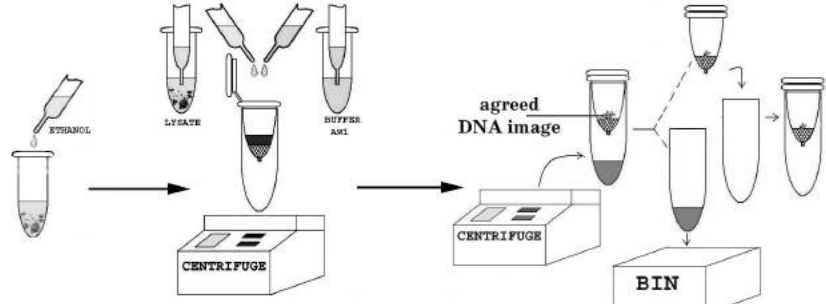
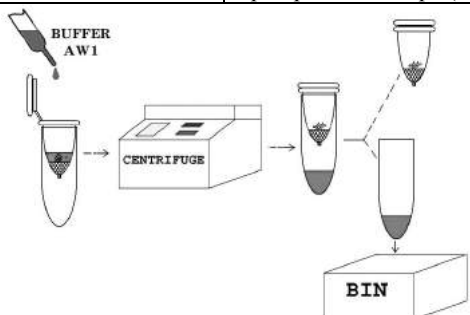
- A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood** / G. G. Gustinich, G. Manfioletti, G. Del Sal, C. Schnieder // *Bio-Techniques*. — 1991. — P. 298–301.
- A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: Elongation factor-1 $\alpha$  recovers morphology-based tree for heliothine moths** / S. Cho, A. Mitchell, J. C. Regier *et al.* // *Mol. Biol. and Evol.* — 1995. — Vol. 12, № 4. — P. 650–656.
- Acoel flatworms: earliest extant Bilaterian Metazoans, not members of Platyhelminthes** / I. Ruiz-Trillo, M. Riutort, D. T. J. *et al.* // *Science*. — 1999. — Vol. 283. — P. 1919–1923.
- Agusti N. M., DeVicente C., Gabarra R.** Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helocoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis // *Mol. Ecol.* — 1999. — Vol. 8. — P. 1467–1474.
- Andersen N. M.** The impact of W. Hennig's «phylogenetic systematics» on contemporary entomology // *Eur. J. Entomol.* — 2001. — Vol. 98, № 2. — P. 133–150.
- Cladistics. The theory and practice of parsimony analysis.** / I. J. Kitching, P. L. Forey, C. J. Humphries, D. M. Williams. — Oxford: University Press, 2000. — 228 pp.
- Duffy R.** The Polymerase Chain Reaction (PCR) // <http://usitweb.shef.ac.uk/~mba96rmd/index.htm>. — 2000.
- Dowton M., Austin A.** Evidence for AT-transversion bias in wasp (Hymenoptera: Symphyta) mitochondrial genes and its implications for the origin of parasitism // *J. Mol. Biol.* — 1997. — Vol. 44. — P. 398–405.
- Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers** / T. D. Kocher, W. K. Thomas, A. Meyer *et al.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* — 1989. — Vol. 86. — P. 6196–6200.
- Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle cell anemia** / R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona *et al.* // *Science*. — 1985. — Vol. 230. — P. 1350–1354.
- Evolution, weighting and phylogenetic utility of Mitochondrial genesequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers** / C. Simon, F. Frati, A. Beckenbach *et al.* // *Ann. Entomol. Soc. Amer.* — 1994. — Vol. 87, № 6. — P. 651–701.
- Friedlander T. P., Regier J. C., Mitter C.** Nuclear gene sequences for higher-level phylogenetic analysis: 14 promising candidates // *Syst. Biol.* — 1992. — Vol. 41. — P. 483–489.
- Friedlander T. P., Regier J. C., Mitter C.** Phylogenetic information content of five nuclear gene sequences in animals: initial assessment of character sets from concordance and divergence studies // *Syst. Biol.* — 1994. — Vol. 43. — P. 511–525.
- Jolley T. W., Honeycutt R. L., Bradley R. D.** Phylogenetic relationships of pocket gophers (genus *Geomys*) based on the mitochondrial 12S rDNA gene // *J. Mammalogy*. — 2000. — Vol. 81, № 4. — P. 1025–1034.
- Molecular confirmation of host records for ichneumonoid parasitoids of wood-boring beetle larvae** / N. M. Laurenne, R. Belshaw, G. Broad, D. L. J. Quicke // *J. Hymenoptera Res.* — 2000. — Vol. 9, № 2. — P. 241–245.
- PCR protocols** / M. A. Innes, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. — San Diego: Academic, 1990. — 213 pp.
- Phillips A. J., Simon C.** Simple, efficient, and nondestructive DNA extraction protocol for arthropods // *Ann Entomol. Soc. Amer.* — 1995. — Vol. 88, № 3. — P. 281–283.
- Phylogenetic relationships of pocket gophers (*Cratogeomys* and *Pappogeomys*) based on mitochondrial DNA cytochrome b sequences** / T. S. DeWalt, P. D. Sudman, M. S. Hafner, S. K. Davis // *Mol. Phylogenetics and Evol.* — 1993. — Vol. 2. — P. 193–204.
- Phylogenetic systematics. A practical guide to theory and practice** / H. H. Başibüyük, F. Bardakci, R. Belshaw, D. L. J. Quicke. — Sivas: Önder Matbaa, 2000. — 134 pp.
- Phylogeny of Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), with a reclassification of Eulophinae and the recognition that Elasmidae are derived eulophids** / N. Gauthier, J. LaSalle, D. L. J. Quicke, H. C. J. Godfray // *Syst. Entomol.* — 2000. — Vol. 25. — P. 521–539.
- Quicke D. L. J.** Principles and techniques of contemporary taxonomy. — London: Blackie Academic & Professional, 1993. — 311 pp.
- Quicke D. L. J., Belshaw R., Lopez-Vaamonde C.** Preservation of Hymenopteran specimens for subsequent molecular and morphological study // *Zoologica Scripta*. — 1999. — Vol. 28. — P. 261–267.
- Quicke D. L. J., Lopez-Vaamonde C., Belshaw R.** The basal Ichneumonidae (Insecta, Hymenoptera): 28S D2 rDNA considerations of the Brachycyrtinae, Labeninae, Paxylommatinae and Xoridae // *Zoologica Scripta*. — 1999. — Vol. 28. — P. 203–210.
- Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction** / K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf *et al.* // *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*. — 1986. — Vol. 51. — P. 263–273.
- Testing the Cambrian explosion hypothesis by using a molecular dating technique** / L. Bromham, A. Rambaut, R. Fortey *et al.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1998. — Vol. 95. — P. 12386–12389.
- The simple fool's guide to PCR, version 2.0** / S. Palumbi, A. Martin, S. Romano *et al.*. — Honolulu: Dep. of Zoology, Univ. of Hawaii, 1991.

Додаток 1. МОДЕЛЬНИЙ ПРОТОКОЛ ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ ДНК (НА ПРИКЛАДІ КОМАХ).

APPENDIX 1. A model protocol for obtaining DNA sequencES FROM insect samples

PREPARATION - ПІДГОТОВЧИЙ ЕТАП		
<p>Materials:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Specimens preserved in alcohol or CPD-dried.</li> <li>2) Dneasy (with matrix) and collection tubes.</li> <li>3) Pipettes.</li> <li>4) Proteinase K.</li> <li>5) Buffer ATL.</li> </ol>	<p>Матеріал:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Екземпляри, що зберігаються у 100 % спирті, або вже висушені (наприклад, колекційні зразки, що висушені за допомогою методу висушування у критичній точці (CPD));</li> <li>2) пробірки набору «DNeasy» та пробірки-колектори;</li> <li>3) піпетки;</li> <li>4) протеїназа К;</li> <li>5) буферний розчин ATL.</li> </ol>	
OPERATION	ЕТАП	FIGURE / ІЛЮСТРАЦІЯ
<p><b>Drying of alcohol-reserved specimens</b></p> <p>The alcohol-preserved specimens to be placed on filter paper and left for about 10–15 min (some hours, for sure). The alcohol is inhibiting the activity of proteinase K, which, in its turn, is breaking proteins and releasing DNA. If the specimens are alcohol-preserved, the alcohol must be evaporated.</p>	<p><b>Висушування екземплярів, що зберігалися у спирті</b></p> <p>Екземпляри, що тільки-но вилучені зі спирту, кладуться на на фільтрувальний папір на 10–15 хвилин (або і декілька годин, якщо є така можливість), щоб спирт випарувався. Спирт пригнічує (інгібує) активність ферментів (зокрема протеїнази К). В свою чергу, протеїназа має зруйнувати білки та «вивільнити» молекули ДНК.</p>	 <p>[Fig. 2]</p>
<p><b>Grinding and initial lysis</b></p> <p>It is vital to grind * tissues into small pieces to enable more efficient lysis. ATL buffer (180 µl) and enzyme (proteinase K, 20 µl) must be added to the grinded materials.</p> <p>The enzyme will provide a lysing of tissues in order to release DNA, and the buffer maintains its proper chemical condition (pH, etc.)</p> <p>*Grinding pestels may either be bought, or made handly by heating pipette's ends and squashing in collection tube's bottom</p>	<p><b>Подрібнення та початок лізису</b></p> <p>Для більш ефективного лізису (що потрібний для «вивільнення» ДНК) матеріал потрібно якомога сильніше подрібнити *. Подрібнення матеріалу може відбуватися як до додавання буферного розчину (в сухій пробірці), так і після (у рідині). Лізис тканин забезпечується ферментом (proteinase K, 20 мкл), а буферний розчин ATL (180 мкл) забезпечує належні умови для протікання реакції лізису.</p> <p>*Товкачки для подрібнення матеріалу або купуються, або виготовляються самостійно через опалвлення кінчиків наконечників для піпеток.</p>	
 <p>[Fig. 3]</p>		
<p><b>Lysis</b></p> <p>The lysis happens under 55 °C. The sample's particles must be dispersed in tube for proper enzyme work.</p> <p>Grinded material in the tube with buffer/enzyme mixture is placed on rocking platform of thermostat and to be kept overnight under 55 °C, or incubated for 1–3 hours under the same temperature.</p>	<p><b>Лізис</b></p> <p>Лізис відбувається за температури 55 °C. Частки подрібненого матеріалу мають бути рівномірно розподілені у розчині для належної роботи ферменту.</p> <p>Зразок у пробірці, що містить також буферний розчин та фермент-протеїназу, ставиться на рухому платформу в термостат, або, в разі потреби, може бути полишений на 1–3 години за цієї ж температури.</p>	 <p>[Fig. 4]</p>



PRECIPITATION 1 / ОСАДЖУВАННЯ 1		
Materials:	Матеріали:	
1) lysate 2) buffers AL, AW1 and AW2 3) VORTEX-2-GENIE	1) лізат (продукти лізису) 2) буферні розчини AL, AW1 та AW2 3) VORTEX-2-GENIE, зтрисувач (розмішувач, або шейкер)	
OPERATION		FIGURE
<b>Dissolving of the lysate</b> 1. Vortex the lysate in about 15 sec. 2. Add 200 µl of AL buffer, mix thoroughly by vortexing and incubate at 70 °C for 10 min (mostly in water heating block). It is essential to homogenize lysate after the lysis, and also to mix the lysate with buffer AL thoroughly, in order to prevent a white precipitate (to vortex once more if the precipitate was formed — it must dissolve during the incubation)	<b>Розчинення лізату</b> 1) Струшувати лізат протягом близько 15 секунд у розмішувачі; 2) Додати 200 мкл буферного розчину AL, знову розмішати та тримати при 70 °C близько 10 хвилин (переважно на водному підігріві). Дуже важливо, щоб лізат був рівномірно розмішаний з AL, щоб уникнути білого осаду (якщо він все-таки сформується, то треба його розмішати до повного розчинення)	 <p>[Fig. 5]</p>
<b>Cleaning of lysate. 1.</b> 1) Add 200 µl of ethanol (96–100 %) to the sample (for the dissolving of the organic matter out) and mix thoroughly by vortexing. 2) Replace the lysate (by pipette, drop-by-drop) into the DNeasy mini column (having matrix), sitting in a 2-ml collection tube 3) Centrifuge at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min; then discard flow-through and collection tube. The released DNA is adsorbed at the matrix.	<b>Очищення лізату. 1.</b> 1) Додати 200 мкл спирту (96–100 %) до проби та розмішати ретельно (ДНК нерозчинна у спирті, а більшість інших органічних речовин - так) 2) 2) Перенести вміст пробірки (піпеткою, краплина за краплиною) до матрикс-пробірки DNeasy, що розміщена в 2 ml пробірці-колекторі 3) Центрифугувати на $\geq 6000 \times g$ (8000 об./хв.) протягом 1 хвилини; при цьому ДНК, що вивільнилася при лізисі, осідає у товщі матриксу Dneasy-пробірки, тоді як рідка фаза розчину витікає до пробірки-колектора (остання та її вміст вже непотрібні).	
 <p>[Fig. 6]</p>		
<b>Further cleaning of the lysate by the buffer AW1.</b> Add 500 µl of buffer AW1 into the DNeasy mini-column used before (but sitting in a new collection tube), and centrifuge at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min; then discard flow-through and the collection tube	<b>Очищення лізату від органіки, що не розчинилася в спирті, за допомогою буферного розчину AW1.</b> Додати 500 мкл буферного розчину AW1 до тієї ж матрикс-пробірки (яка зараз міститься у новій пробірці-колекторі), та центрифугувати при $\geq 6000 \times g$ (8000 об./хв.) протягом 1 хвилини; рідка фаза розчину витікає до пробірки-колектора (остання та її вміст вже непотрібні).	
 <p>[Fig. 7]</p>		

**PRECIPITATION 1 / ВИСАДЖЕННЯ 1**  
**(continuation / продовження)**

**Washing out of the residual ethanol by the buffer AW2.**

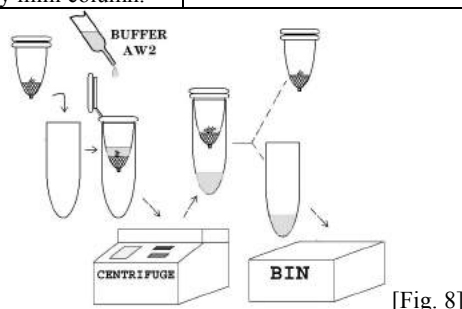
Place the same DNeasy mini column in a new 2-ml collection tube and add 500  $\mu$ l of the buffer AW2 and centrifuge at full speed for 3 min; then discard flow-through and collection tube, and the DNeasy membrane (matrix) must be dried, and then the whole DNeasy mini column to be placed into a new collection tube.

**Note:** presence of the ethanol precipitates DNA, so, when the organic ‘pollutants’ are washed off, ethanol should be removed: it goes to flow-throw while centrifuging, and the remaining amount evaporates when kept in open air). DNA remains adsorbed by the matrix of the DNeasy mini column.

**Відмивання залишків спирту буферним розчином AW2.**

Розмістити ту саму DNeasy матрикс-пробірку у нову 2-мл пробірку-колектор та додати 500 мкл буферного розчину AW2 і центрифугувати на повній швидкості 3 хвилини. При цьому рідка фаза розчину витікає до пробірки-колектора (остання та її вміст вже непотрібні), а DNeasy матрикс-пробірку треба висушити (лишити відкритою на деякий час) та перемістити до нової пробірки-колектора.

**Примітка:** За наявності спирту ДНК осаджується. Таким чином, коли органічні «забруднювачі» вимиті, треба позбутися спирту (він вимивається з буферним розчином у пробірку-колектор, а якщо щось ще лишається у матриксі, то випаровується при висушуванні); в такий спосіб уся ДНК лишається всередині матриксу.



[Fig. 8]

**Dissolving of DNA**

The adding of water is needed for the dissolving of DNA from the matrix, where it is fleshed. Wait for a while before centrifuging, so that the water is sinking through the matrix and dissolving DNA. Generally, it is advised to use 100–200  $\mu$ l of water, but for tiny insect specimens, it is better to use less water for the increasing of the DNA concentration.

- 1) Place DNeasy mini-column in the Eppendorf tube.
- 2) Drop 30–50  $\mu$ l of distillate water directly onto the DNeasy membrane (matrix).
- 3) Incubate at room temperature for 1 min.
- 4) Centrifuge for 1 min.

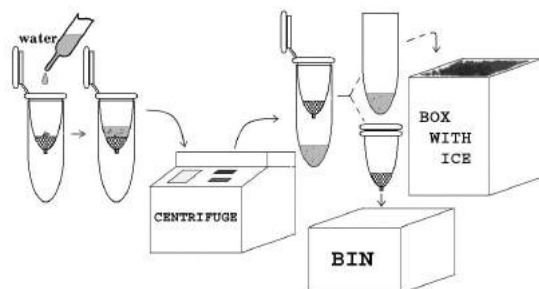
DNA is dissolved by the water and flows through the matrix into the Eppendorf tube (the DNeasy mini column to be discarded). This DNA extract (30–50  $\mu$ l) stored in Eppendorf tube, will be used in the following PCR-reaction and should be kept in ice, if PCR will be done soon, otherwise, in freeze.

**Розчинення ДНК**

Додавання води є необхідним для розчинення ДНК з матриксу, куди вона просякла при центрифугуванні. При проходженні крізь матрикс вода вимиває ДНК. Загалом радять використовувати 100–200 мкл води, але, оскільки ми працюємо з дрібними екземплярами, ліпше використовувати менше води, щоб збільшити концентрацію ДНК у екстракті.

1. Розмістити DNeasy матрикс-пробірку у пробірці Еппендорфа
2. Додати 30–50 мкл дистильованої води безпосередньо на мембрану матрикс-пробірки
3. Витримати протягом 1 хвилини за кімнатної температури
4. Центрифугувати 1 хвилину

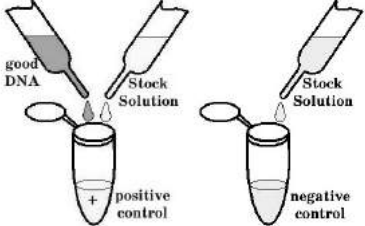

ДНК, що розчинена у воді, просякає крізь матрикс у пробірку Еппендорфа (матрикс-пробірка після центрифугування вже не потрібна). Цей екстракт ДНК (30–50 мкл) зберігатиметься в пробірці Еппендорфа та використовуватиметься в подальшій PCR-реакції. Екстракт має зберігатися в корзині з льодом (для швидкого використання), або у морозильнику.



[Fig. 9]

<b>PCR (The Polymerase Chain Reaction) / PCR, ланцюгова реакція полімерази</b>																																																																																																																																																							
<p><b>Materials:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. PCR micro tubes.</li> <li>2. DNA dissolved in water.</li> <li>3. Oligonucleotide primers (supplied) indicating start sites for the DNA-polymerase; for example D<sub>2</sub>F<sub>3</sub> (forward) and D<sub>3</sub>R (reverse) for D2 region of rDNA; all of concentration 10–20 pM/μl).</li> <li>4. Desoxynucleotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), that provide material for DNA amplification (synthesis of DNA): 10 μl of each (10 μl × 4 + 60 μl of water = 100 μl); shortly, dNTPs.</li> <li>5. Taq buffer (supplied).</li> <li>6. Taq polymerase (thermostable DNA-polymerase).</li> </ol>	<p><b>Матеріал:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. PCR мікропробірки</li> <li>2. Екстракт ДНК (водний розчин)</li> <li>3. Олігонуклеотидні праймери 10–20 pM/мкл-концентрації, що визначають місця прикріплення ДНК-полімерази, зокрема D<sub>2</sub>F<sub>3</sub> (вперед) and D<sub>3</sub>R (назад) для D2 ділянки рДНК. Праймери розробляються та синтезуються біохімічними компаніями, недорого коштують і завжди є в арсеналі сучасних молекулярно-біологічних лабораторій.</li> <li>4. Дезоксинуклеотиди (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), що є «будівним матеріалом» для створення «дочірньої» ДНК: по 10 μl кожного (10 мкл × 4 + 60 мкл води = 100 мкл); скорочено – dNTP</li> <li>5. Буферний розчин для Таq полімерази (скорочено - Таq-буфер; постачається біолабораторіями)</li> <li>6. Таq полімераза (термостійка ДНК-полімераза)</li> </ol>																																																																																																																																																						
<b>S T E P</b>	<b>К Р О К</b>																																																																																																																																																						
<p><b>Preparation of the Stock Solution:</b></p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">H<sub>2</sub>O:</td> <td style="width: 10%; text-align: right;">40,7</td> <td style="width: 10%; border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="width: 10%; border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> <tr> <td>Taq-buffer</td> <td style="text-align: right;">5,0</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>dNTPs</td> <td style="text-align: right;">1,0</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>D<sub>2</sub>F<sub>3</sub></td> <td style="text-align: right;">1,0</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>D<sub>3</sub>R</td> <td style="text-align: right;">1,0</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Taq-polymerase</td> <td style="text-align: right;">0,3</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>DNA extract</td> <td style="text-align: right;">1,0</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="text-align: center;">49 = 50</td> </tr> </table> <p>We have to multiply each item into Z, and Z = N + 1 + 1, where N is the number of studied samples, and 1+1 is positive and negative controls (see below).</p> <p><b>Example:</b> For 8 samples (but indeed 8 + 1 + 1 = 10) it will be:</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">H<sub>2</sub>O:</td> <td style="width: 10%; text-align: right;">407</td> <td style="width: 10%; border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="width: 10%; border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> <tr> <td>Taq buffer</td> <td style="text-align: right;">50</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>dNTPs</td> <td style="text-align: right;">10</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>D<sub>2</sub>F<sub>3</sub></td> <td style="text-align: right;">10</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>D<sub>3</sub>R</td> <td style="text-align: right;">10</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Taq-polymerase</td> <td style="text-align: right;">3</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="text-align: center;">490 = 49</td> </tr> </table> <p>So, 10 tubes will be filled with 49 μl of Stock Solution and 1 μl to be added to each tube (total 50 μl)</p> <p><b>Notes:</b> The whole contents of the PCR microtube must be 50 μl: 49 μl of the stock solution and 1 μl of the DNA sample. It is easier to multiply each component of the sample to the number of samples rather than to measure the precise quantity several times. Stock solution is generally prepared in the separate Eppendorf tube.</p>	H <sub>2</sub> O:	40,7				Taq-buffer	5,0				dNTPs	1,0				D <sub>2</sub> F <sub>3</sub>	1,0				D <sub>3</sub> R	1,0				Taq-polymerase	0,3				DNA extract	1,0								49 = 50	H <sub>2</sub> O:	407				Taq buffer	50				dNTPs	10				D <sub>2</sub> F <sub>3</sub>	10				D <sub>3</sub> R	10				Taq-polymerase	3								490 = 49	<p><b>Підготовка вихідного розчину:</b></p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">H<sub>2</sub>O:</td> <td style="width: 10%; text-align: right;">40,7</td> <td style="width: 10%; border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="width: 10%; border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> <tr> <td>Taq-буфер</td> <td style="text-align: right;">5,0</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>dNTP-суміш</td> <td style="text-align: right;">1,0</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>D<sub>2</sub>F<sub>3</sub>-праймер</td> <td style="text-align: right;">1,0</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>D<sub>3</sub>R-праймер</td> <td style="text-align: right;">1,0</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Taq-полімераза</td> <td style="text-align: right;">0,3</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>екстракт ДНК</td> <td style="text-align: right;">1,0</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="text-align: center;">49 = 50</td> </tr> </table> <p>Кожен компонент потрібно помножити на Z, де Z = N + 1 + 1, де N — кількість екземплярів, що планується опрацювати, а 1 + 1 — це позитивний контроль + негативний контроль (див. нижче).</p> <p><b>Приклад:</b> Для 8 зразків це буде так (проте розрахунок іде на 8 + 1 + 1 = 10):</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">H<sub>2</sub>O:</td> <td style="width: 10%; text-align: right;">407</td> <td style="width: 10%; border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="width: 10%; border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> <tr> <td>Taq-буфер</td> <td style="text-align: right;">50</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>dNTP-суміш</td> <td style="text-align: right;">10</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>D<sub>2</sub>F<sub>3</sub></td> <td style="text-align: right;">10</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>D<sub>3</sub>R</td> <td style="text-align: right;">10</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Taq-полімераза</td> <td style="text-align: right;">3</td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black;"></td> <td style="text-align: center;">490 = 49</td> </tr> </table> <p>В цілому, заповнення 10 пробірок потребує 49 мкл вихідного розчину та 1 мкл треба додати до кожної пробірки (в цілому 50 мкл)</p> <p><b>Нотатки:</b> Повний вміст PCR-мікропробірки має бути 50 мкл: 49 мкл вихідного розчину та 1 мкл ДНК-екстракту. Потреба у вихідному розчині пояснюється тим, що набагато легше помножити кожен складову суміші на кількість зразків, ніж міряти точну (і при тому дуже малу) кількість кожної речовини декілька разів. Вихідний розчин здебільшого готується у окремій пробірці Еппендорфа.</p>	H <sub>2</sub> O:	40,7				Taq-буфер	5,0				dNTP-суміш	1,0				D <sub>2</sub> F <sub>3</sub> -праймер	1,0				D <sub>3</sub> R-праймер	1,0				Taq-полімераза	0,3				екстракт ДНК	1,0								49 = 50	H <sub>2</sub> O:	407				Taq-буфер	50				dNTP-суміш	10				D <sub>2</sub> F <sub>3</sub>	10				D <sub>3</sub> R	10				Taq-полімераза	3								490 = 49
H <sub>2</sub> O:	40,7																																																																																																																																																						
Taq-buffer	5,0																																																																																																																																																						
dNTPs	1,0																																																																																																																																																						
D <sub>2</sub> F <sub>3</sub>	1,0																																																																																																																																																						
D <sub>3</sub> R	1,0																																																																																																																																																						
Taq-polymerase	0,3																																																																																																																																																						
DNA extract	1,0																																																																																																																																																						
				49 = 50																																																																																																																																																			
H <sub>2</sub> O:	407																																																																																																																																																						
Taq buffer	50																																																																																																																																																						
dNTPs	10																																																																																																																																																						
D <sub>2</sub> F <sub>3</sub>	10																																																																																																																																																						
D <sub>3</sub> R	10																																																																																																																																																						
Taq-polymerase	3																																																																																																																																																						
				490 = 49																																																																																																																																																			
H <sub>2</sub> O:	40,7																																																																																																																																																						
Taq-буфер	5,0																																																																																																																																																						
dNTP-суміш	1,0																																																																																																																																																						
D <sub>2</sub> F <sub>3</sub> -праймер	1,0																																																																																																																																																						
D <sub>3</sub> R-праймер	1,0																																																																																																																																																						
Taq-полімераза	0,3																																																																																																																																																						
екстракт ДНК	1,0																																																																																																																																																						
				49 = 50																																																																																																																																																			
H <sub>2</sub> O:	407																																																																																																																																																						
Taq-буфер	50																																																																																																																																																						
dNTP-суміш	10																																																																																																																																																						
D <sub>2</sub> F <sub>3</sub>	10																																																																																																																																																						
D <sub>3</sub> R	10																																																																																																																																																						
Taq-полімераза	3																																																																																																																																																						
				490 = 49																																																																																																																																																			

**PCR (The Polymerase Chain Reaction) / ланцюгова реакція полімерази  
 (continuation / продовження)**

<p><b>Positive control</b> of the Stock Solution quality</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Prepare tube with known, 'good' DNA (amplified well earlier)</li> <li>2) Add 1 µl of this sample to 49 µl of Stock Solution.</li> </ol> <p>The amplification of this sample must be successful, if the Stock Solution prepared properly. If amplification of this known sample of DNA is successful, but all other samples failed, then something is bad either with this DNA, or with the lysis or with the Precipitation I (and PCR is OK). If amplification of this known sample of DNA is not successful, and all other samples failed, then something is bad with PCR.</p> <p><b>Negative control:</b> or check of a contamination by any occasional DNA. For the preparation of the negative control only 49 µl of Stock Solution is needed, without any special adding of DNA samples. There <i>must be no amplification</i> (if any, that means that the Stock Solution was polluted by an alien organics containing DNA).</p>	<p><b>Позитивний контроль</b> призначений для перевірки якості вихідного розчину</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Підготувати зразок ДНК, що успішно ампліфікувався раніше</li> <li>2. Додати 1 мкл цього зразка до 49 мкл вихідного розчину.</li> </ol> <p>Якщо при проведенні PCR-реакції цей зразок ампліфікується, а якісь з інших (чи й усі інші) — ні, то це означає, що дані ДНК-екстракти — неякісні. Якщо ж ампліфікація не відбулася ані для досліджуваних зразків, ані для позитивного контролю, то уся PCR-реакція проведена з помилками.</p> <p><b>Негативний контроль</b> призначений для перевірки вихідного розчину на наявність забруднення (контамінації) сторонньою ДНК. Для його приготування достатньо додати в пробірку тільки 49 мкл вихідного розчину. Ніякої ампліфікації не має відбуватися у негативному контролі. Якщо вона є, то це — показник забруднення, і отримані результати є непридатними для подальшого опрацювання.</p>	
 <p>[Fig. 10]</p>		
<p><b>Preparation of the tubes</b> for the respective DNA samples. You must label the PCR microtubes similarly as the tubes with frozen DNA samples</p>	<p><b>Підготовка та підписування</b> PCR-мікропробірок для проведення власне PCR-реакції: необхідну кількість PCR-мікропробірок потрібно проетикетувати так само як пробірки з відповідними ДНК-екстрактами</p>	 <p>[Fig. 11]</p>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Take Eppendorf tubes with DNA-extract from freeze (just when the Stock Solution is prepared).</li> <li>2) Add 1 µl of each sample to 49µl of the Stock Solution being previously placed in each labelled PCR micro tube.</li> <li>3) Tubes are placed in PCR machine for about 1.5 hours. This is a cyclic process representing a cyclic alteration of denature, primers' annealing and extension. One of possible combination is:                  35 cycles of:                  Denature: 94 °C for 30 secs                  Annealing: 50 °C for 30 secs                  Extension: 72 °C for 1 min</li> </ol> <p>A thermostable enzyme Taq polymerase amplifying DNA sequences based on the sites of the template DNA, delimited by the primers. The process includes series of several separations of the template DNA into two strands (under 95 °C) and the syntheses of the complementary strands. All the cyclings take place in the PCR-block that is altering the temperature automatically.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Взяти пробірки Еппендорфа з ДНК-екстрактами з морозильної камери (тільки тоді, коли вихідний розчин готовий)</li> <li>2) 1 мкл кожного зразка додати до 49 мкл вихідного розчину, що міститься у кожній підписаній PCR-мікропробірці</li> <li>3) PCR-мікропробірки ставляться в гніздо PCR-машини приблизно на 1,5 години. Це циклічний процес, що являє собою періодичну зміну денатурації, прикріплення праймерів (анілінгу) та добудови компліментарного ланцюга ДНК. Одна з можливих комбінацій:                  35 циклів:                  Денатурація: 94 °C — 30 секунд                  Анілінг: 50 °C — 30 секунд                  Добудова: 72 °C — 1 хвилина</li> </ol> <p>Термостабільний фермент Таq полімераза ампліфікує ДНК послідовності, базуючись на ділянці материнської ДНК, що обмежена праймерами. Цей процес включає серію декількох розділень материнської ДНК на два ланцюги (за температури 95 °C) та синтез двох компліментарних цим ділянкам ланцюгів. Усі цикли відбуваються у PCR-машині, де температура змінюється автоматично.</p>	



[Fig. 12]

**Different types of the PCR blocks (Різні типи PCR машин):**

**a) PCR block: GeneAmp PCR System 9700;**

**b) GeneAmp PCR System 9700 in the molecular laboratory of the Centre of Population Biology, Ascot, UK;**

**c) Elmer DNA Thermal Cycler 480;**

**d) Perkin Elmer Quagen PCR Cycler 2400.**



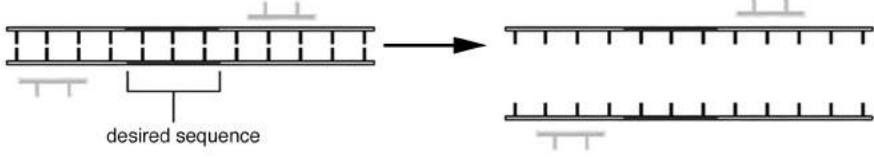
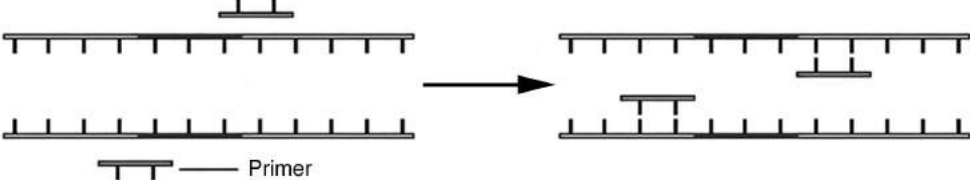
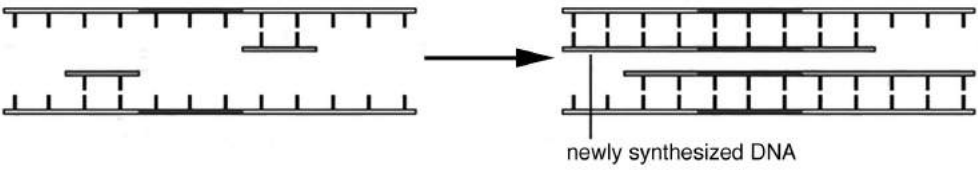
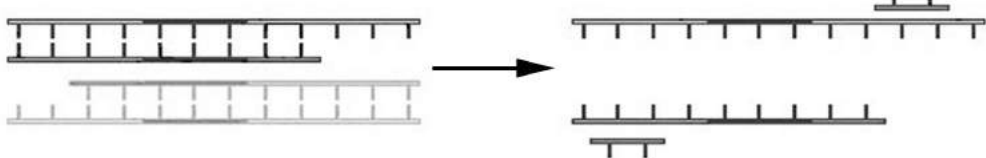
[Fig. 13a]

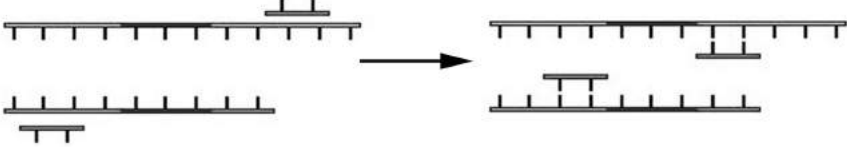

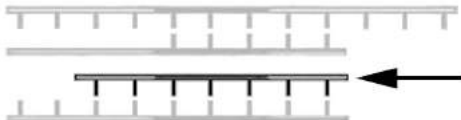
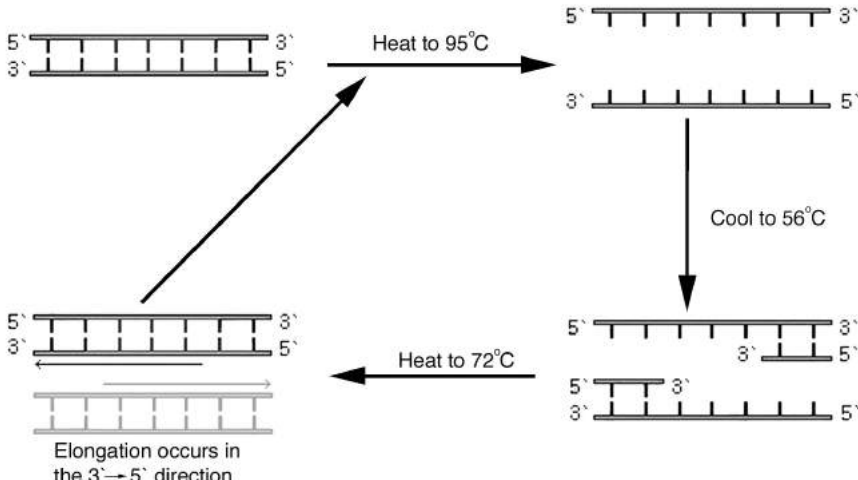


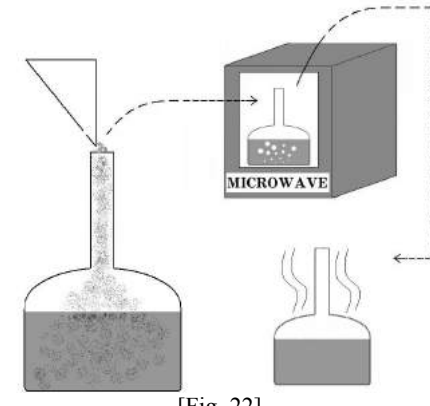
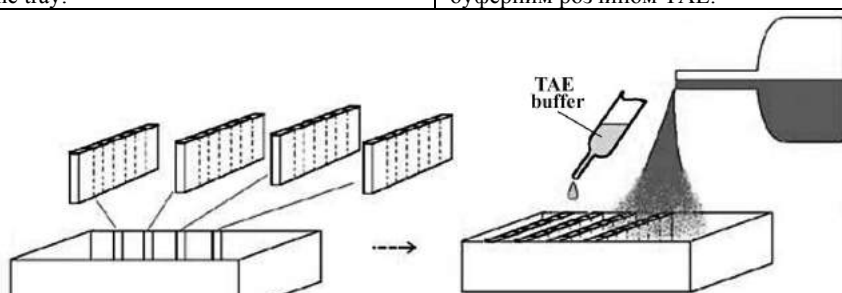
[Fig. 13b]

**UV-laboratory: a) UV transilluminator, a table for the work with gel plates, gel trays; b) the computer reading signals from UV-camera.**

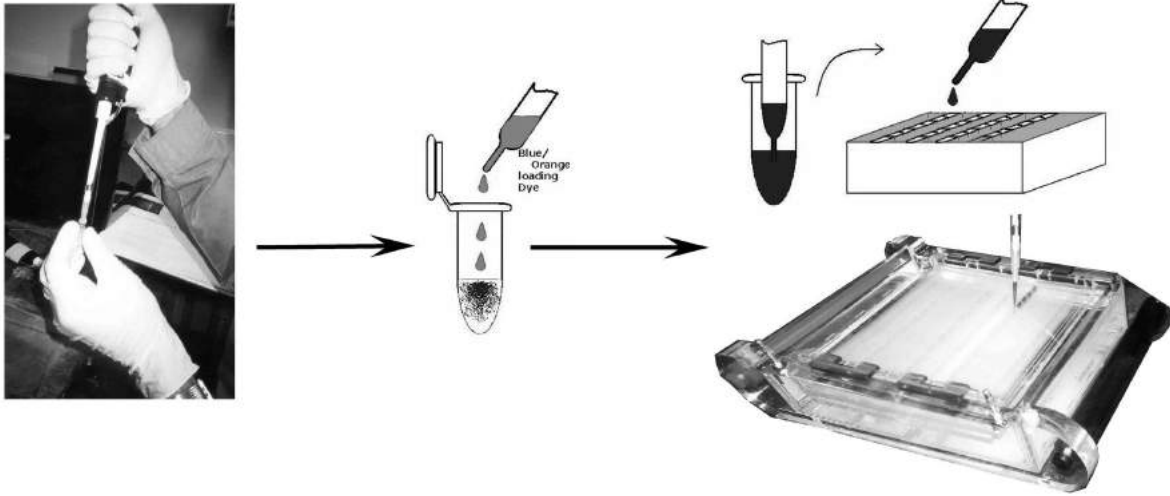
**Лабораторія для роботи з ультрафіолетом: а) столик для роботи з гелевими платівками, гелеві таці; б) комп'ютер, що читає сигнали з UV-камери.**

PCR steps (by Duffy, 2000) / PCR кроки (за Duffy, 2000)	
STEP	КРОК
<p>1) First of all, the reaction mixture is heated to about 95 °C. This causes separating of the DNA template strands. The desired sequence, shown in red, lies within the length of DNA, flanked by known sequences.</p>	<p>Спершу суміш підігрівається приблизно до 95 °C. Це призводить до того, що вихідна ДНК розділяється на два окремі ланцюги. Припустимо, що послідовність, яка нас цікавить, знаходиться між двома вже відомими послідовностями (ці послідовності компліментарні обраним праймерам)</p>
 <p style="text-align: right;">[Fig. 14]</p>	
<p>2) Once the strands have separated, the mixture is cooled to about 56 °C. The primers in the mixture anneal to the single-stranded DNA, blocking the reattachment of the template strands by their sheer numbers.</p>	<p>Тільки-но ланцюги відокремилися, суміш охолоджується до 56 °C. Праймери, що знаходяться у суміші, прикріплюються до відповідних компліментарних ділянок кожного ланцюга, що запобігає зворотному скріпленню ланцюгів</p>
 <p style="text-align: right;">[Fig. 15]</p>	
<p>3) The new complexes are ready to undergo the final step in the first cycle. Now that the primers have annealed to the strands, the DNA polymerase has an initiation site for synthesis of a new strand. Using deoxynucleotides in the mixture, the polymerase synthesises a complementary strand for each template, thereby replicating the desired gene(s). The new strands are slightly shorter than the template strands, because the sequences prior to the primer binding sequences are not copied.</p>	<p>Тепер ці нові комплекси готові для останнього кроку першого циклу. Оскільки праймери вже прикріпилися до ланцюгів, ДНК-полімераза має точку для синтезу нового ланцюга. Використовуючи дезоксирибонуклеотиди з суміші, полімераза синтезує компліментарну послідовність для кожного ланцюга (ДНК-матриці), відповідно відтворюючи потрібний ген (гени). Новий ланцюг дещо коротший за материнський, оскільки ділянка ДНК, що міститься перед послідовністю праймера, не синтезується</p>
 <p style="text-align: right;">[Fig. 17]</p>	
<p>4) These newly synthesised strands of DNA now enter the cycle as template DNA. In effect, the amount of DNA has been doubled. We will concentrate on an original strand and its new partner strand as they are subjected to the same cycle as before. The increase of temperature to 95 °C causes the strands to separate. The new shorter strand is now ready to undergo the rest of the reactions.</p>	<p>Щойно синтезовані ланцюги ДНК тепер вступають до нового циклу, так само як раніше материнські ланцюги. В результаті кількість ДНК збільшується. Ми сконцентруємо увагу на вихідному ланцюгові та його новій копії, оскільки вони проходять той самий шлях, що й попередньо. Підвищення температури до 95 °C викликає розділ ланцюгів, і вони готові для проходження наступної низки реакцій.</p>
 <p style="text-align: right;">[Fig. 18]</p>	

<b>PCR steps (continuation) / PCR кроки (продовження)</b>	
S T E P	К Р О К
5) As before, the mixture is cooled to 56 °C, and the primers anneal to the strands.	Як і раніше, суміш охолоджується до 56 °C і праймери прикріплюються до ланцюгів.
	
[Fig. 19]	
6) The temperature is raised and the Taq polymerase does its work on new and old alike. The polymerase once again replicates most of the strand it's attached to.	Температура підвищується і Taq полімераза «робить свою справу» на нових та старих ланцюгах, знову відтворюючи більшу частину ланцюга, до якого прикріплюється.
	
[Fig. 20]	
7) The short strand created from the first complementary strand, indicated below, is identical to the original top strand, but with shorter flanking regions. This means that all copies subsequently made from it will be identical. Thus the required gene is replicated as many times as desired without too much unnecessary DNA being produced.	Короткий ланцюг, що позначений нижче на малюнку, є створеним на базі одного з ланцюгів, що отримані у першому циклі, і є ідентичним до материнського, але має коротші кінці (що обмежені праймерними послідовностями). Це означає, що подальший синтез на його основі спричинить відтворення суто ідентичних копій. Тобто ген, що нас цікавить (і який міститься між відомих, «праймерних послідовностей»), копіюватиметься стільки разів, скільки потрібно, і не відбуватиметься синтезу великої кількості «зайвої» ДНК.
	
[Fig. 20]	
<b>PCR: A CYCLIC REPRESENTATION</b>	<b>PCR: ЦИКЛІЧНИЙ ПРОЦЕС</b>
Here is the cycle that the sample undergoes in order to amplify the DNA. It is assumed for simplicity that all the lengths of DNA are identical (i.e. consisting of the desired sequence and the primer sites).	Нижче зображено цикл, який кожна молекула ДНК проходить у PCR-блоці. Для зручності прийнято, що довжини усіх ДНК-фрагментів однакові (складаються з потрібного гену, що обмежений «праймерними послідовностями»)
	
[Fig. 21]	

<b>Chromatography in gel \ Хроматографія у гелі</b>		
<p><b>Remark.</b> There are several models of gel trays and paths to the gel preparation. Below we describe just the approach tried by the author.</p>		<p><b>Зауваження.</b> Існує декілька моделей блоків для електрофорезу, проте нижче описується той варіант, що саме використовувався автором.</p>
<p><b>Materials:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) PCR-products.</li> <li>2) Agarose.</li> <li>3) Blue/Orange loading Dye.</li> <li>4) Ethidium Bromide (EtBr), powerful mutagen.</li> <li>5) TAE buffer (containing acetic acid, etc.)</li> <li>6) Ladder (marker), the supplied mixture of the DNA fragments of known size (used as a scale for the comparison and the length estimation of any products amplified by the PCR).</li> </ol> <p><b>Equipment:</b>                      UV-chromatographer, gel tray, microwave block, thermostable bottle.</p>	<p><b>Матеріали:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) PCR-продукти</li> <li>2) Агароза</li> <li>3) Барвник «Blue/Orange»</li> <li>4) Бромід етідія (EtBr), сильний мутаген</li> <li>5) Буферний розчин TAE (який зокрема містить оцтову кислоту, та ін.)</li> <li>6) Маркер (ладер) — суміш ДНК-фрагментів відомої довжини (постачається біолабораторіями): при пропусканні крізь агарозний гель дає шкалу у вигляді смуг різної товщини, порівняння з якими дозволяють визначити довжину ампліфікованих фрагментів</li> </ol> <p><b>Обладнання:</b>                      UV-хроматограф, «гелева тача», піч СВЧ, лабораторний термостійкий посуд</p>	
<p><b>Note:</b> placement of the PCR products in gel is necessary not only for the quantity control of the DNA fragments amplified, but also for the cleaning of the PCR-products from the rest of chemicals.</p>		<p><b>Примітка:</b> проходження PCR-продуктів у гелі потрібно не тільки для контролю кількості отриманих ДНК-фрагментів (себто успішності PCR-реакції), але і для додаткового очищення цих фрагментів</p>
S T E P	K P O K	F I G U R E
<p><b>Gel preparation</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 3 gr of agarose dissolve in 200 ml of TAE buffer.</li> <li>2) Microwave the mixture till boiling.</li> <li>3) Cool the gel-liquid under the tap water.</li> <li>4) Add 10 µl EtBr.</li> <li>5) Leave it for ~ 10 min.</li> </ol> <p><b>Note:</b> EtBr is dangerous powerful mutagen in higher concentrations; we use lower concentration, but attention must be paid anyway!</p>	<p><b>Підготовка гелю</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 3 г агарози розчинити в 200 мл буферного розчину TAE</li> <li>2) Цю суміш, у термостійкому посуді підігрівають у СВЧ-печі</li> <li>3) Охолодити цю «гелеву рідину» під краном (але не до загусання)</li> <li>4) Додати 10 мкл EtBr</li> <li>5) Лишити «гелеву рідину» приблизно хвилин на 10</li> </ol> <p><b>Зауваження:</b> EtBr є небезпечним сильним мутагеном у високій концентрації; ми використовуємо нижчу концентрацію, проте все одно треба бути пильним!</p>	 <p style="text-align: center;">[Fig. 22]</p>
<p><b>Gel 'arrangement'</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Prepare the casting modul by the arrangement of its borders and separators.</li> <li>2) Pour the 'gel liquid' into the tray.</li> <li>3) Allow the gel to harden.</li> <li>4) When the gel is hardened, remove the loading combs and the end spacers off (the holes remained are to be filled further).</li> </ol> <p>Put the gel plate into the gel tray and pour the TAE buffer into the tray.</p>	<p><b>Оформлення гелю</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Підготувати форму для гелю: укласти обмежувачі та «розділові гребінці».</li> <li>2) Заповнити «гелевою рідиною» форму.</li> <li>3) Дати гелю затвердіти.</li> <li>4) Тільки-но гель затвердіє, витягнути розділові гребінці (від них лишаються отвори, які потім будуть заповнюватися реагентами) та обмежувачі.</li> </ol> <p>Покласти гелеву платівку до «гелевої тачі» і залити буферним розчином TAE.</p>	 <p style="text-align: center;">[Fig. 23]</p>



<b>Chromatography in gel (continuation) \ Хроматографія у гелі (продовження)</b>	
<p><b>Dyeing of the PCR products</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Add 5 <math>\mu</math>l of the Blue/Orange loading Dye to the PCR tube containing the PCR-products (the contents of the tubes is gaining dark colour).</li> <li>2) Leave the pipette tip inside the tube.</li> <li>3) Attach the pipette tip to another pipette, setting the volume exceeding 55 <math>\mu</math>l (volume of the contents of the PCR tube now).</li> <li>4) ‘Swallow’ the whole contents of the PCR tube, mixing the Blue/Orange loading Dye and PCR-products thoroughly, and pour it back to its tube.</li> </ol> <p><b>Note:</b> The Dye’s molecules are attached to the DNA molecules and then also attach EtBr molecules.</p>	<p><b>Забарвлення PCR-продуктів</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Додати 5 мкл барвника Blue/Orange до PCR-мікропробірки, що містить PCR-продукти (вміст пробірок стає темним).</li> <li>2) Лишити накінецьник всередині пробірки.</li> <li>3) Прикріпити накінецьник до іншої піпетки, з об’ємом більшим як 55 мкл (для того щоб потім «втягнути» увесь об’єм PCR-мікропробірки)</li> <li>4) Декілька разів «всмоктати» піпеткою та випустити назад увесь вміст PCR-мікропробірки для того, щоб добре перемішати барвник та PCR-продукти</li> </ol> <p><b>Примітка:</b> Молекули барвника прикріплюються до молекул ДНК, а потім до них прикріплюються молекули EtBr.</p>
<p><b>Placing of the dyed PCR-samples in the gel plate</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Drop the whole ‘swallowed’ contents of the PCR tube into the compartments formed by the “loading combs”. The entire gel plate is covered by the TAE buffer, so that the filling of each gel compartment to be conducted in a liquid environment. However, the Blue/Orange loading Dye molecules have much higher weight than the weight of the components of TAE buffer, so that slow ejection of the pipette’s contents provides nearly entire filling of the compartment with only a little portion of the dyed stuff dissolving in TAE.</li> <li>2) Loading of the ladder: mix 3 <math>\mu</math>l of the Blue/Orange loading Dye with 5 <math>\mu</math>l of the ladder in a PCR tube. Load the mixture into gel as it was described above.</li> </ol>	<p><b>Переміщення PCR-зразків у гель</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Перемістити увесь «втягнутий» вміст PCR-мікропробірки до комірок гелевої платівки, що лишилися після видалення «розділових гребінців». Уся гелева платівка вкрита буферним розчином TAE, тому перенесення забарвленого вмісту PCR-пробірки у комірку проводиться у рідкому середовищі. Проте забарвлений лозчин набагато важчий за буферний розчин, тому пр поступовому випорожненні піпетки більша частка її вмісту занурюється в пробірку і дуже незна чна частка розчиняється у буферному розчині TAE.</li> <li>2) Завантаження маркеру: змішати 3 мкл барвника Blue/Orange з 5 мкл маркера у окремій PCR-мікропробірці. Завантажити цю суміш у комірку гелевої платівки як описано вище.</li> </ol>
	
S T E P	K P O K
<p><b>Running the gel</b></p> <p>Gel is running for about 1 hour (40–45 min) under 65 V–75 V (60 V for 30 min is generally OK for 2D 28S).</p>	<p><b>Електрофорез</b></p> <p>Електрофорез триває близько 1 години (40–45 хвилин) під 65 V–75 V (для 2D 28S здебільшого 60 V протягом 30 хвилин).</p>

[Fig. 24]

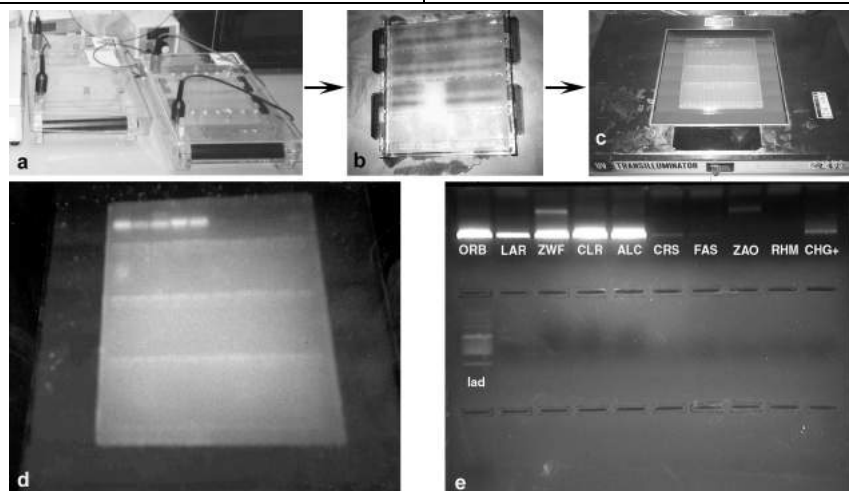
**Chromatography in gel (continuation) \ Хроматографія у гелі (продовження)**

**UV analysis**

UV light activates fluorescence of the EtBr molecules attached to DNA fragments (= PCR products), demonstrating quantity of DNA amplified per sample during the PCR process.

**Аналіз під ультрафіолетовим випромінюванням**

Під ультрафіолетовим випромінюванням молекули EtBr, що прикріплені до молекул ДНК (PCR-продуктів), починають світитися; за інтенсивністю цього освітлення оцінюється кількість отриманих фрагментів ДНК у кожному зразку.



[Fig. 25]

**Evaluation of the PCR-reaction:** a) running the gel; b) the gel plate in the gel tray after electrophoresis; c) gel plate on the UV-transilluminator; d) the gel plate in UVB-light (the successfully amplified DNA samples fluoresce); e) picture of the same gel plate, made by the computer connected to the UV-block (original): ORB, LAR, ZWF, et al. — species names' abbreviations; CHG+ — positive control (successfully amplified DNA sample of the chalcid wasp *Chrysocharis gemma*); lad-ladder.

**Оцінка результатів PCR-реакції:** а) електрофорез в агарозному гелі; б) гелева тарця з гелевою платівкою після проходження електрофорезу; в) гелева платівка на ультрафіолетовому трансілюмінаторі; д) гелева платівка в ультрафіолетовому світлі (успішно ампліфікована ДНК світиться); е) Зразок фотографії в ультрафіолетовій камері (оригінал): ORB, LAR, ZWF, та ін. — аббревіатури назв видів; CHG+ — позитивний контроль (успішно сіквенсований зразок ДНК їдця *Chrysocharis gemma*); lad-маркер.

**PCR products' quantity control under UV**

1. To take the gel plate from the gel tray and look at it briefly at the 'UV table'.
2. If there is no need in further electrophoresis, then put the gel into the UV block and adjust the brightness and magnification settings.
3. To switch polarized light on.
4. If the UV block is connected to a computer, then run 'UV control' software program.
5. Quantity of the PCR products is visible on the display (as bright bands), quality of the image may be modified by the changing of the 'Contrast/Brightness' settings.
6. Print the image.
7. Evaluate the quantity of the DNA amplified for each sample (according to the printed picture), also check positive and negative control in order to evaluate quality of the PCR process and DNA template samples; decide which samples contain enough DNA for future process.

**Перевірка PCR-зразків у ультрафіолетовому випромінюванні**

- 1) Взяти гелеву платівку з «гелевої тарці» та подивитися на «UV столику»; це можна робити і під час електрофорезу (перериваючи його), відслідковуючи як далеко «просунулися» PCR-продукти.
- 2) Якщо подальший електрофорез вже непотрібний (PCR-продукти «просунулися» достатньо далеко від свого вихідного положення), то перемістити гелеву платівку до ультрафіолетової камери та відрегулювати яскравість і збільшення цього приладу.
- 3) Включити поляризоване світло.
- 4) Якщо ультрафіолетова камера підключена до комп'ютера, то потрібно запустити відповідну програму контролю ультрафіолетового випромінювання.
- 5) Кількість PCR-продуктів з'являється на дисплеї монітора, якість зображення регулюється зміною параметрів «Контрастність/Яскравість».
- 6) Надрукувати зображення.
- 7) Ще раз визначити кількість ДНК у кожному зразку, а також перевірити зразки позитивного та негативного контролю.
- 8) Визначити (порівнявши з записами про завантаження гелю), які зразки мають кількість ДНК, що придатна для подальшої роботи (такими є зразки, що яскраво світаються в ультрафіолетовому випромінюванні).

<b>Purification of the PCR products / Очищення PCR-продуктів</b>	
<p><b>Remark.</b> Below we will describe the purification approach which was used by the author. Occasionally, the PCR-products are cleaned directly from the solution using spin columns (e.g. QIAQuick of Qiagen). If so, then just 5 µl of PCR-products to be run in gel (likewise in the <b>Control running the gel</b>, see below), and if the PCR was successful for particular samples, the cleaning in spin columns to be conducted following the manufacturer’s instructions.</p>	<p><b>Зауваження.</b> Крім зазначеного нижче способу очищення ДНК з гелю, існує інший, також часто вживаний підхід - очищення прямо з розчину, наприклад, за допомогою обертальних пробірок (spin columns) QIAQuick фірми Qiagen. В такому разі на форез запускають тільки 5 µl PCR-продукту (як у <b>Перевірці процесу очищення</b>, див. нижче), і в разі позитивного результату використовують очищення у обертальних пробірках, відповідно до інструкцій поставника.</p>
<p><b>Materials:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) PCR-products in gel.</li> <li>2) Capture buffer (melting the agarose gel and providing proper conditions for DNA binding to the column).</li> <li>3) Wash buffer (80 % dissolved by ethanol, used for removing of impurities from the bound DNA).</li> </ol> <p><b>Equipment:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Centrifuge.</li> <li>2) GFX mini columns (having matrix for DNA precipitation) and collection tubes.</li> <li>3) VORTEX-2-GENIE.</li> </ol>	<p><b>Матеріали:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) PCR-продукти у гелі.</li> <li>2) Буферний розчин «Capture» (для розчинення агарозного гелю та забезпечення належних умов для осадження ДНК)</li> <li>3) Буферний розчин для відмивання, (Wash Buffer, 80%-спиртовий розчин, використовується для відмивання забруднювачів з розчину ДНК, гелю та буферного розчину «Capture»).</li> </ol> <p><b>Обладнання:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Центрифуга.</li> <li>2) GFX мікропробірки (з матриксом для висадження ДНК) та пробірки-колектори.</li> <li>3) Струшувач VORTEX-2-GENIE.</li> </ol>
S T E P	К Р О К
<p><b>DNA purification from agarose gel</b></p> <p><b>To cut the gel slice:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Cut out the necessary particles (according to the photo) with razor.</li> <li>2) Put each slice into separate Eppendorf tube.</li> <li>3) Discard the rest of the gel plate.</li> </ol>	<p><b>Вилучення ДНК з агарозного гелю</b></p> <p><b>Вирізати шматки гелю:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Вирізати необхідні шматки гелю (відповідно до зображення) лезом.</li> <li>2) Перемістити шматок у пробірку Еппендорфа, що підписана відповідно до того, як попередньо були позначені зразки.</li> <li>3) Рештки гелевої платівки вже не потрібні.</li> </ol>
<p><b>Purification by the Capture Buffer:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Pour 300 µl of the Capture Buffer to the Eppendorf tube with the gel slice and vortex vigorously.</li> <li>2) Incubate the tubes at 60 °C for 5–15 minutes (until the agarose is completely dissolved), shaking them by VORTEX-2-GENIE (in order ‘to help buffer to dissolve the gel parts’) from time to time.</li> <li>3) When the agarose is completely dissolved, centrifuge briefly to collect the sample at the bottom of the Eppendorf tube.</li> </ol>	<p><b>Очищення від гелю буфером Capture:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Додати 300 мкл буферного розчину «Capture» до пробірки Еппендорфа, що містить шматок гелю, та ретельно розмішати струшувачем.</li> <li>2) Тримати при 60 °C 5–15 хвилин (до того моменту поки гель повністю розчиниться), струшуючи пробірки за допомогою струшувача (це сприяє розчиненню шматків гелю) час від часу.</li> <li>3) Коли агароза повністю розчинена, центрифугувати швидко, щоб увесь зразок сконцентрувався на дні пробірки Еппендорфа.</li> </ol>

[Fig. 26]

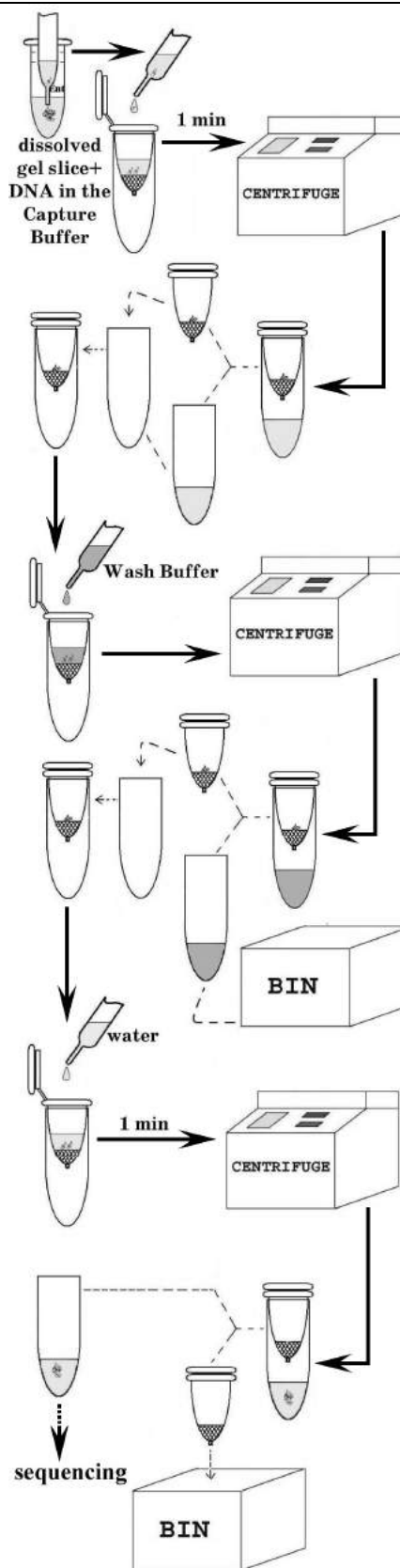
**Purification of the PCR products (continuation) / очищення PCR-продуктів (продовження)**

**Further purification**

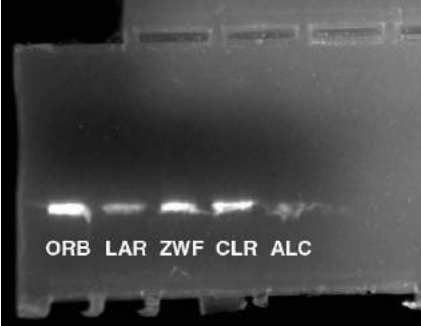
- 4) Put the whole sample (the contents of the Eppendorf tube) into the GFX Column (having matrix) sitting in a Collection Tube.
- 5) Incubate at room temperature for 1 minute.
- 6) Centrifuge at full speed for 1 min.
- 7) Take from the centrifuge, discard flow-through, and return GFX Column back into the Collection Tube.
- 8) Add 500 µl of the Wash Buffer to the GFX.
- 9) Centrifuge at full speed for 1 min; the liquid concentrates in the Collection tube.
- 10) Take from the centrifuge, discard the Collection Tube with its contents (flow-through), and sit the GFX Column in a new Eppendorf tube.
- 11) Apply 30 µl of water directly to the surface of the glass fiber matrix of GFX Column.
- 12) Incubate the sample at room temperature for a minute.
- 13) Centrifuge at full speed for 1 min to recover the purified DNA (*attention: covers of the Eppendorf tubes must be oriented to the center of the centrifuge*).
- 14) Contents of the collection tubes (purified PCR products dissolved in water) are ready for the sequencing 1.

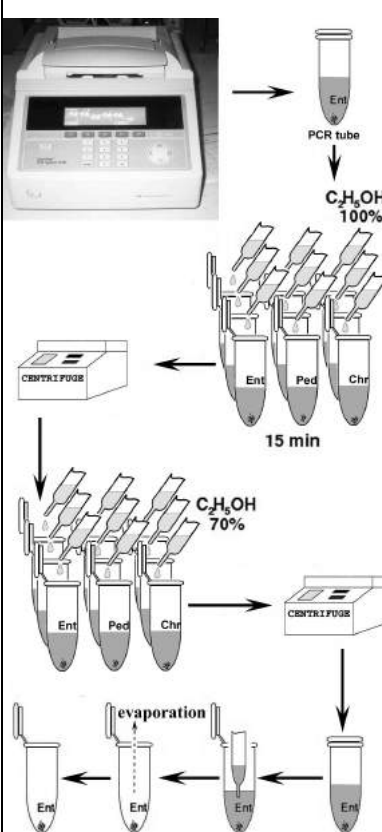
**Подальше очищення:**

- 4) Перемістити увесь вміст пробірки Еппендорфа до GFX пробірки (з матриксом), що розміщена у пробірці-колекторі.
- 5) Витримати при кімнатній температурі 1 хвилину.
- 6) Центрифугувати на повну швидкість 1 хвилину.
- 7) Взяти з центрифуги, видалити рідку фракцію з пробірки-колектора, та повернути GFX-пробірку назад, у випорожнену пробірку-колектор.
- 8) Додати 500 мкл відмивного буферного розчину до GFX-пробірки.
- 9) Центрифугувати на повній швидкості 1 хвилину; при цьому рідка фракція розчину сконцентрується у пробірці-колекторі.
- 10) GFX-пробірку треба перемістити до нової пробірки Еппендорфа, пробірка-колектор та її вміст вже не потрібні.
- 11) Перемістити 30 мкл води безпосередньо на поверхню матрикса GFX-пробірки.
- 12) Витримати одну хвилину при кімнатній температурі.
- 13) Центрифугувати при повній швидкості 1 хвилину, щоб сконцентрувати ДНК на дінці пробірки (увага: кришечки пробірок Еппендорфа мають бути орієнтовані до середини центрифуги).
- 14) Вміст пробірок Еппендорфа (PCR продукти, що розчинені у воді) готовий до наступної фази, *сіквенсінгу* 1.



[Fig. 27]

Control running the gel / Перевірка процесу очищення					
<p>Small quantity (5–10 µl) of the purified sample must be run in gel once more, to check whether purification was done well. This gel bands are not needed anymore (not subject for new purification).</p> <p><b>Note:</b> if the band is weak, it is possible to evaporate sample till 10 µl left (only 5 µl is needed for the further reaction).</p>		<p>Невелика кількість (5–10 мкл) отриманого екстракту запускається електрофорезом через гель, так само як і в попередньому випадку, щоб перевірити чи очищення відбулося якісно. Ця гелева платівка не буде потрібна надалі, і необхідна тільки для перевірки якості реакції.</p> <p><b>Примітка:</b> якщо сигнал (світла смуга на фотографії) був слабкий, то можна випарувати зразок допоки не лишиться 10 мкл (тільки 5 мкл потрібно для подальшої реакції).</p>		 <p>[Fig. 28] <b>Контрольний електрофорез у гелі зразків, що мали достатню кількість (яскравий сигнал, див. вище)</b></p>	
<p><b>Sequencing 1</b> Sense: this stage will be based on a fluorescent terminator based method</p>			<p><b>Сіквенсінг 1</b> Сутність: ця стадія базуватиметься на методі флуоресцентної термінації</p>		
<p><u>Materials:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) PCR-products dissolved in water.</li> <li>2) Primers (the same as for PCR reaction, but in 30 pM/µl concentration).</li> <li>3) Premix Desoxynucleotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), the same as for PCR, but having different bases (modified/fluorescent ones): an additional amplification is needed for additional fluorescent DNA-copies.</li> <li>4) PGEM and M<sub>13</sub> primer (supplied together with Premix) are the components for the positive control (the latter will be tested in the automated sequencer and not discussed here).</li> </ol> <p>General accounts are calculated for the entire reaction. Once lower concentration works well also, we use ½ or ¼ reaction for chemicals' saving.</p> <p><u>Equipment:</u> PCR block (but the regime settings differ now from those used for PCR).</p>			<p><u>Матеріал:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) PCR-продукти, що розчинені у воді</li> <li>2) Праймери (ті самі, що для PCR-реакції, але у концентрації 30 pM/мкл).</li> <li>3) Дезоксинуклеотиди «Premix» (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ті самі, що і для PCR-реакції, але з іншими модифікованими флуоресцентними основами. Даний синтез необхідний для отримання додаткових ДНК-копій що міститимуть флуоресцентні основи, які розпізнаватимуться сіквенсером.</li> <li>4) PGEM and M<sub>13</sub> праймери (постачаються разом з Premix-набором) є компонентом «позитивного контролю» цієї реакції (він проводиться в автоматичному сіквенсері).</li> </ol> <p>Загальні розрахунки виконуються для усієї реакції. Оскільки нижчі концентрації також працюють добре, ми використовуємо ½ чи ¼ концентрації для економії реактивів</p> <p><u>Обладнання:</u> PCR-машина (але режим циклів є зараз іншим, ніж той, що був запрограмований для PCR-реакції [програмується досвідченим оператором]).</p>		
Stock solution / Вихідний розчин					
for forward primer / для «вперед»-орієнтованого праймера		for reverse primer / для «назад»-орієнтованого праймера		Positive control / позитивний контроль	
half-reaction / половинна реакція	1/4	half-reaction / половинна реакція	1/4	half-reaction / половинна реакція	1/4
Premix 4 µl D <sub>2</sub> F <sub>3</sub> 1 µl PCR 5 µl <b>Total 10 µl</b>	2 µl 1 µl 7 µl <b>Total 10 µl</b>	Premix 4 µl D <sub>3</sub> R 1 µl PCR 5 µl <b>Total 10 µl</b>	2 µl 1 µl 7 µl <b>Total 10 µl</b>	PGEM 1.25 µl M <sub>13</sub> 2 µl water 2.75 µl Premix 4 µl <b>Total 10 µl</b>	1.25 µl 2 µl 4.75 µl 2 µl <b>Total 10 µl</b>
<p>The calculation of the Stock solution is similar to those done for PCR. Cyclic reactions to be done under conditions like these:</p> <p>96 °C — 30 secs 50 °C — 15 secs 60 °C — 4 mins</p>			<p>Розрахунки Вихідного розчину для певної кількості зразків мають бути виконані подібно до PCR-реакції. Циклічні реакції мають бути з подібними параметрами:</p> <p>96 °C — 30 секунд 50 °C — 15 секунд 60 °C — 4 хвилин</p>		

Precipitation / Осадження		
<b>Materials:</b> 1) Sequencing products. 2) 100 % and 70 % ethanol.		<b>Матеріал:</b> 1) Продукти сіквенсінга. 2) 100 % та 70 % спирт.
<b>Equipment:</b> Centrifuge.		<b>Обладнання:</b> Центрифуга.
STEP	КРОК	FIGURE / РИСУНОК
<b>Precipitation of the sequenced DNA for the future treatment in the automated DNA sequencer</b>  1) Transfer PCR-products to 1.5 ml Eppendorf tubes. 2) Add 17 µl of 100% ethanol. 3) Leave it for 15 min. 4) Centrifuge at full speed ~ 20 min (DNA will be concentrated and attached to a tube wall at a point being just opposite the centrifuge's center). 5) Take the ethanol off by the pipet, or pour it away and pipette off just a last drop (no risk to 'swallow' DNA, because it all is firmly attached to the tube's wall resulting from the centrifuging). 6) Add 100 µl 70 % ethanol. 7) Centrifuge at full speed ~ 5 min. 8) Take the ethanol off by the pipet (likewise it was described above). 9) Leave the tubes open to evaporate the rest of ethanol (approx. 20 mins at 37 °C, but overnight drying is the best, for sure).  Dried DNA at the bottom of the tube is the needed matter. The tube with the dried DNA stored in a deep freeze.	<b>Висадження сіквенсованої ДНК для подальшого опрацювання у автоматизованому ДНК-сіквенсері</b>  1) Перенести PCR-продукт до 1,5 мл пробірки Еппендорфа. 2) Додати 17 мкл 100 % спирту. 3) Лишити на 15 хвилин. 4) Центрифугувати на повній швидкості приблизно 20 хвилин (ДНК сконцентрується та прикріпиться до стінок пробірки у точці, що міститься безпосередньо навпроти осі центрифуги). 5) Відібрати спирт піпеткою (ніякого ризику «проковтнути» ДНК, тому, що вона уся вже прикріпилася стінок пробірки завдяки центрифугуванню), або навіть просто вилити спирт та видалити останню краплю піпеткою. 6) Додати 100 мкл 70 % спирту. 7) Центрифугувати на повній швидкості приблизно 5 хвилин. 8) Видалити спирт так, як це описано вище. 9) Лишити пробірки відкритими для випаровування решток спирту (близько 20 хвилин при 37 °C, проте найкраще лишити сушитися протягом довшого терміну, наприклад на ніч, про всяк випадок).  Висушена ДНК на дінці пробірки — це саме те, що потрібно для подальшої роботи. Пробірка з висушеною ДНК надалів зберігатиметься у глибокій заморозці.	 <p>[Fig. 29]</p>



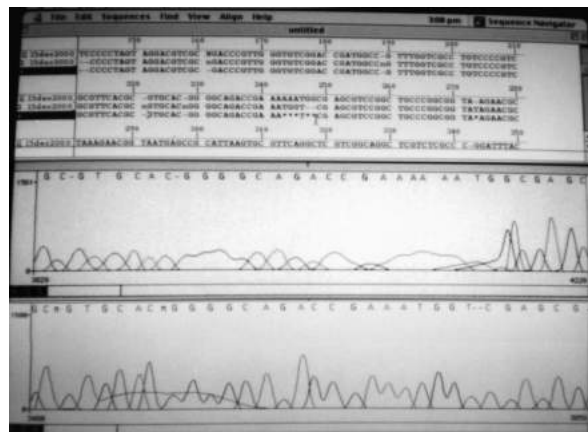
[Fig. 30]

The sequencing laboratory with the automated sequencer connected to the computer receiving a signal from the fluorescent molecules and transforming it into letters corresponding to each nucleotide.

Лабораторія сіквенсінгу з автоматизованим сіквенсером, підключеним до комп'ютера, який трансформувє сигнал від флуоресцентних молекул у відповідні зображення нуклеотидів.

ANALYSIS – SEQUENCING 1 / АНАЛІЗ – СІКВЕНСІНГ 2	
<p><u>Materials:</u> Cleaned DNA matter.</p> <p><u>Equipment:</u> Applied Biosystems automated DNA sequencer connected with a computer.</p> <p><u>Process:</u> DNA sample to be resuspended in Loading Buffer, denaturated and run in automated sequencer.</p> <p>DNA amplification interrupted in places when modified (fluorescent) bases were included into the complementary strand. Quantity of these short DNA fragments corresponds to number of the bases in the whole DNA part delimited by the chosen primers. The modified bases light differently by specific color, and computer identifies them by this color, creates 'electrophoretic' diagram and then creates epy structure of the DNA studied.</p>	<p><u>Матеріали:</u> Очищений матеріал ДНК.</p> <p><u>Обладнання:</u> Автоматичний ДНК-сіквенсер фірми Applied Biosystems, що сполучений з комп'ютером.</p> <p><u>Процес:</u> зразок ДНК розчиняється у буферному розчині (Loading Buffer), денатурується та аналізується у автоматичному сіквенсері.</p> <p>Ампліфікація ДНК переривається у місцях, де змінені (флуоресцентні) молекули включаються до компліментарного ланцюга. Оскільки усі мічені основи додаються у рівній кількості, кількість фрагментів рівної довжини пропорційна до кількості певної основи у досліджуваній послідовності ДНК. У мікротрубках сіквенсера отримані фрагменти ДНК «шикуються» за розміром. Мічені основи вирізнюються сіквенсером за кольором, і він будує електрофореграму, на якій позначена встановлена послідовність ДНК.</p>

Фінальним результатом роботи сіквенсера є комп'ютерний файл-електрофереграма. Файли електрофереграм читаються, і, в разі потреби, відкореговуються спеціальними комп'ютерними програмами (Sequence Navigator, BioEdit, MacClade 4, та ін.). На електрофереграмі флуоресцентний сигнал від кожної міченої основи має різний колір: Т (тимін) — червоний, G (гуанін) — чорний, С (цитозин) — синій, А (аденін) — зелений. Усі основи відповідають пікам хвиль на електрофереграмі. Оскільки здебільшого працюють з праймерами, що визначають прямий та зворотний напрямки, дослідник отримує два файли — для «прямой» та «зворотної» послідовності ДНК (відповідно, «зворотна» є дзеркальним відображенням «прямой»). Це полегшує точний аналіз та відтворення структури ДНК послідовності: якщо в певних місцях зчитування інформації сіквенсером було неякісним, то здебільшого ці помилки зчитування на «прямій» та «зворотній» копії різні, і структура в цілому може бути встановлена. Так, зокрема, іноді сигнал від однієї основи перекриває сигнали від наступних основ (кольорові хвилі замість одного піка на кожній утворюють декілька піків, чи плато), і тоді порівняння з іншою копією дозволяє встановити справжню структуру (на іншій копії подібна помилка також може мати місце, проте, вірогідно, в іншому місці).



[Fig. 31]

**General display view when working with the electropherograms under the Sequence Navigator program. An example of the incongruence between forward and reverse sequences obtained.** This is the same part of the sequence, but the upper sequence bearing evidence of a mistake in reading (adenine trace enlarged, and the following peaks are compressed). The lower sequence is coherent and proper sequence is recognisable and allows correcting of the upper sequence. Also the trace of the first 'T' (red wave in lower sequence) is not shown in upper sequence, and thus may be neglected

**Загальний вигляд дисплея комп'ютера під час роботи з електрофереграмами у програмі Sequence Navigator** Обидві електрофереграми демонструють один, і той самий фрагмент ДНК. В нижньому варіанті (праймер «назад») зчитування відбулося коректно (усі піки сигналів чіткі і відповідають певним основам); у верхньому варіанті перші сигнали розтягнулися, не мають чітких піків, перекриваються з іншими. Порівняння з нижнім малюнком демонструє, які помилки утворилися при зчитуванні комп'ютером верхньої електрофереграми. Також довгий хвилеподібний сигнал від першого «Т»-піка (червоний) нижньої послідовності не має аналогу на верхній послідовності, атому може бути проігнорований.

UDC [57.08:577.133.5]+575.86

**A. V. GUMOVSKY**

**STUDIES ON THE DNA SEQUENCE DATA IN SYSTEMATICS:  
GENERAL ISSUES AND A MODEL PROTOCOL**

*Schmalhausen Institute of Zoology of the National Academy of Sciences of Ukraine*

SUMMARY

This article reviews in short the history, aims, scope and main stages in the studies on the DNA sequence data. The preparation and suitability of materials for further DNA-studies are emphasised. The *Appendix* represents a model protocol scheme (largely based on the author's experience with studies on the DNA of small insects) with comments on aims and details of each step.

1 tab, 31 figs, 26 refs.