



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007102654/13, 25.01.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.01.2007

(45) Опубликовано: 27.08.2008 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: DOUKAKIS P., BIRSTEIN V.J., RUBAN G.I., DESALLE R. Molecular genetic analysis among subspecies of two Eurasian sturgeon species, *Acipenser baerii* and *A. stellatus*. Mol Ecol. 1999 Dec; 8(12 Suppl 1):S117-27. BIRSTEIN V.J., DESALLE R. Molecular phylogeny of *Acipenserinae*. Mol Phylogenet Evol. 1998 Feb; 9(1):141-55. WO 9743618, 20.11.1997.

Адрес для переписки:

107140, Москва, ул. В. Красносельская, 17,
ВНИРО, патентный отдел, Т.В. Шульгиной

(72) Автор(ы):

Мюге Николай Сергеевич (RU),
Барминцева Анна Евгеньевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное унитарное
предприятие "Всероссийский научно-
исследовательский институт рыбного хозяйства
и океанографии" (ФГУП "ВНИРО") (RU)

(54) НАБОР ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ОСЕТРОВЫХ РЫБ И ПРОДУКЦИИ ИЗ НИХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области молекулярной биологии. Предложен набор олигонуклеотидных праймеров для определения видовой принадлежности осетровых рыб со следующими нуклеотидными последовательностями:

обратный праймер АНР
(TATACACCATTATCTCTATGT) для определения видовой принадлежности к осетровым рыбам и прямые праймеры:

AGF (GCACAGACTATGTGGTATCCAGAA) для определения видовой принадлежности к русскому осетру,

ABF (CAGATGCCAGTAACAGGCTGA) для определения видовой принадлежности к русскому и сибирскому осетрам,

ABRM (TGTCTGTCTAGAACATAtG) для определения видовой принадлежности к

сибирскому осетру, HusF
(TATCTATTACCTGCGAGCAGGCTG) для определения видовой принадлежности к белуге,
DauF (CCTCTTATGTACGCGGTGT) для определения видовой принадлежности к калуге,
SchF (TGTGGGGTCACGGACTTTACAG) для определения видовой принадлежности к амурскому осетру

NudF (TGTCTTTTCTGAAGGAGCTTTGC) для определения видовой принадлежности к шипу,
RutF (GGGAATAACCGTTAATTTGG) для определения видовой принадлежности к стерляди,
и SteF (GGGGTTCTTGGCATGTTGTGAGCG) для определения видовой принадлежности к севрюге.

Изобретение может быть использовано для детекции наличия митохондриальной ДНК одного из восьми видов осетровых рыб. 1 ил., 1 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2007102654/13, 25.01.2007**

(24) Effective date for property rights: **25.01.2007**

(45) Date of publication: **27.08.2008 Bull. 24**

Mail address:
**107140, Moskva, ul. V. Krasnosel'skaja, 17,
VNIRO, patentnyj otdel, T.V. Shul'ginov**

(72) Inventor(s):
**Mjuge Nikolaj Sergeevich (RU),
Barmintseva Anna Evgen'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):
**Federal'noe gosudarstvennoe unitarnoe
predprijatje "Vserossijskij nauchno-
issledovatel'skij institut rybnogo
khozjajstva i okeanografii" (FGUP "VNIRO") (RU)**

(54) **OLIGONUCLEOTIDE PRIMER SET FOR DEFINING SPECIES OF STURGEONS AND PRODUCTS THEREOF**

(57) Abstract:
FIELD: biology.
SUBSTANCE: invention concerns molecular biology. It claims an oligonucleotide primer set for defining sturgeon species with the following nucleotide sequences: reverse primer AHR (TATACACCATTATCTCTATGT) for sturgeon species identification, and direct primers: AGF (GCACAGACTATGTGGTATCCAGAA) for identification of Russian sturgeon species, ABF (CAGATGCCAGTAACAGGCTGA) - for Russian and Siberian sturgeon, ABRM (TGTCTGTCTAGAACATAtG) - for Siberian sturgeon,

HusF (TATCTATTACCTGCGAGCAGGCTG) - for hausen (white sturgeon), DauF (CCTCTTATGTACGCGGTGT) - for kaluga (great Siberian sturgeon), SchF (TGTGGGGTCACGGACTTTACAG) - for Amur sturgeon, NudF (TGTCTTTTCTGAAGGAGCTTTGC) - for barbell sturgeon, RutF (GGGAATAACCGTTAATTTGG) - for sterlet, and SteF (GGGGTTCTTGGCATGTTGTGAGCG) - for stellate sturgeon.

EFFECT: detection of presence of mitochondrial DNA belonging to one of eight sturgeon species.
1 dwg, 1 tbl, 10 ex

RU 2 3 3 2 4 6 3 C 1

RU 2 3 3 2 4 6 3 C 1

Изобретение относится к рыбной промышленности и молекулярной биологии, в частности к способам идентификации видовой принадлежности осетровых и получаемой из них икры и другой продукции. К настоящему времени были предложены следующие методики определения видовой принадлежности осетровых и продуктов их переработки на

5 основании анализа митохондриальной ДНК.

Сайт специфический ПЦР на основании полиморфизма по гену цитохромоксидазы субъединицы В (CytB). Метод впервые предложен ДеСале и Бирштейном (DeSalle и Birstein. 1996), US Patent No. 5766144. July 28, 1998. European Patent No. 087690. August 28, 2002. Метод основан на использовании видоспецифичных праймеров по гену

10 CytB. Достоинство предложенного метода - охватывает все виды осетровых мира (27 видов).

Недостатки. Низкая сайтоспецифичность праймеров, что вызывает высокий процент ложных срабатываний.

Небольшая выборка особей каждого из видов (для некоторых видов праймеры

15 составлялись на основании последовательности одного экземпляра) и связанная с этим высокий процент ложнопозитивного сигнала.

Не позволяет дифференцировать сибирского и русского осетров (несущего «baerii-like» гаплотип).

Сиквенирование участка гена CytB. Метод предложен Файном и коллегами (National Fish

20 and Wildlife Forensics Laboratory, Ashland), опубликован только в Интернете. Предполагает дорогостоящее сиквенирование каждого изучаемого образца. В настоящее время не актуален.

Рестрикционный анализ амплифицированного участка мтДНК (метод PCR-RFLP) предложен Людвигом и соавторами (Ludwig и др., 2002). Включает последовательное

25 применение рестрикционных ферментов для идентификации видоспецифичных участков ПЦР-продукта с гена CytB. Достоинство: высокая воспроизводимость результатов.

Недостатки: требует трудоемкой и дорогостоящей процедуры, включающей до 4-х реакций рестрикции и соответствующее количество визуализации продуктов рестрикции методом электрофореза. Не позволяет дифференцировать сибирского и русского осетров (несущего

30 «baerii-like» гаплотип).

Технической задачей заявленного изобретения является расширение спектра видоспецифических праймеров, позволяющих детекцию наличия митохондриальной ДНК видов осетровых рыб, обитающих на территории РФ.

Поставленная задача достигается набором олигонуклеотидных праймеров для

35 определения видовой принадлежности осетровых рыб и продукции из них, причем олигонуклеотидный праймер выбирают со следующими нуклеотидными последовательностями:

Набор олигонуклеотидных праймеров для определения видовой принадлежности осетровых рыб и продукции из них, причем олигонуклеотидный праймер выбирают со

40 следующими нуклеотидными последовательностями: обратный праймер ANR (TATACACCATTATCTCTATGT) для определения видовой принадлежности к осетровым рыбам, и прямые праймеры:

AGF (GCACAGACTATGTGGTATCCAGAA) для определения видовой принадлежности к русскому осетру,

45 ABF (CAGATGCCAGTAACAGGCTGA) для определения видовой принадлежности к русскому ("baerii-like" мтДНА гаплотип) и сибирскому осетрам,

ABRM (TGTCTGTCTAGAACATAtG) для определения видовой принадлежности к сибирскому осетру, HusF (TATCTATTACCTGCGAGCAGGCTG) для определения видовой принадлежности к белуге,

50 DauF (CCTCTTATGTACGCGGTGT) для принадлежности к калуге,

SchF (TGTGGGGTCACGGACTTTACAG) для принадлежности к амурскому осетру

NudF (TGTCTTTTCTGAAGGAGCTTTGC) для определения видовой принадлежности к шипу,

RutF (GGGAATAACCGTTAATTTGG) для определения видовой принадлежности к стерляди,

SteF (GGGGTTCTTGGCATGTTGTGAGCG) для определения видовой принадлежности к севрюге.

5 В результате большого количества последовательностей регулярного участка митохондриальной ДНК восьми основных видов осетровых рыб (русский, сибирский, амурский осетры, белуга, калуга, шип, стерлядь и севрюга) был создан набор видоспецифических праймеров, позволяющих детекцию наличия митохондриальной ДНК. Анализироваться могут как образцы ткани осетровых рыб (образцы плавника, мускулатуры, 10 печени и т.д.), так и икры и других продуктов, получаемых из осетровых рыб, например балычная продукция.

Метод ПЦР-идентификации осетровых рыб включает выделение ДНК, проведение ПЦР и визуализацию продуктов ПЦР на агарозном геле.

Выведение ДНК.

15 Выделение ДНК может проводится любым общепринятым методом. Нами в работе применялось главным образом метод солевой экстракции (Aljanabi S M & Martinez I 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research. 25 (20): 4692-4693) и выделение с помощью фенольного метода (Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: 20 Мир, 1984. 480 с.), а также на сорбентсодержащих колонках (Sigma). При выделении ДНК из икры перед лизированием необходимо удалить оболочку икринки, чтобы избежать последующее ингибирование ПЦР реакции полисахаридами яичевой оболочки.

Проведение ПЦР (полимеразной цепной реакции).

Все ПЦР-реакции проводились в объеме 25 мкл при следующих условиях:

25 1x Taq-буфер (Силекс, Москва, состав: (10x) 700 mM Трис-HCl, pH 8.6/25°C, 166 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, 2.5 mM каждого dNTP (Диалат, Москва), 2,5-5 пикоМ праймеров (праймеры согласно табл. 1 и разбираемым ниже примерам), 2,8 мкл Креазол-глицерин (3,5 mM крезоловый красный, 50% водный раствор глицерина), 2,5U Taq-полимеразы (Силекс-М) и 2 мкл экстракта ДНК, воды (milliQ) до 25 мкл).

30 ПЦР реакция проводилась при следующих параметрах:

Предварительный отжиг при 95°C - 2 мин.

Отжиг 92°C - 20 сек.

Отжиг 57°C - 30 сек.

Синтез 72°C - 30 сек.

35 Всего 35 циклов.

Окончательный синтез 72°C 10 мин.

Получаемые в ходе реакции видоспецифичные ампликоны (продукты ПЦР) имеют следующие размеры (Табл.1, чертеж).

40 Праймеры разработаны таким образом, что имеется возможность постановки мультиплекной ПЦР-реакции, т.е. с добавлением более двух праймеров в реакционную смесь. Однако подбор условий ПЦР реакции и концентрации каждого из праймеров должен проводиться нВ каждой лаборатории самостоятельно. Нами рутинно используется набор для мультиплекной реакции на определение русского и сибирского осетров (AGF, ABF, 45 ABRM, ANR) в пропорции 1:2:1:1 и тех же параметрах амплификации, что и для одиночных реакций.

Визуализация продуктов ПЦР на агарозном геле.

50 Продукт ПЦР наносится на 2% агарозный гель (0,5^x TBE) и разгоняется 30 мин при напряжении 15 В/см. Определение видового состава проводится по наличию амплификата в реакции с праймерами, специфичными для данного вида. В реакциях с другими праймерами ПЦР продукт должен отсутствовать. Допускается нанесение в одну лунку продукт всех реакций данной особи. В этом случае видовой принадлежности определяется по длине ПЦР продукта. Для удобства определения вида в процессе тестирования была составлена смесь из ПЦР-продуктов всех возможных длин, получаемых в процессе реакции

(138, 190, 215, 253, 266, 329, 374, 420 и 429 п.н.). Смесь ПЦР-продуктов наносится на агарозный гель одновременно с тестируемыми образцами и является реперным маркером молекулярной массы, позволяющим визуальным образом идентифицировать результаты тестирования (см. чертеж).

5 Примеры использования набора олигонуклеотидных праймеров для определения видовой принадлежности осетровых рыб и продукции из них.

Пример 1. Подтверждение видовой принадлежности образца ткани, заявленной как русский осетр.

1. Выделяем ДНК из образца ткани солевым методом (Aljanabi and Martinez 1997) и ставим ПЦР 25 мкл при следующих условиях:

10 265 мкл 10^{\times} Таq-буфер (состав: 10^{\times} : 700 мМ Трис-НСl, рН 8.6 / 25°C, 166 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 мМ MgCl_2 Силекс, Москва), 2.5 мМ каждого dNTP (Диалат, Москва), 2,5 пМ праймеров АНР, АGF, и АВРМ каждого, 10 пМ праймера АВF, 2,8 мкл Креазол-глицерин (3,5 мМ крезоловый красный, 50% водный раствор глицерина), 2,5U Таq-полимеразы (Силекс-М) и
15 2 мкл экстракта ДНК, воды (milliQ) до 25 мкл).

ПЦР реакция проводилась при следующих параметрах:

Предварительный отжиг при 95°C - 2 мин.

Отжиг 92°C - 20 сек.

Отжиг 57°C - 30 сек.

20 Синтез 72°C - 30 сек.

Всего 35 циклов.

Окончательный синтез 72°C - 10 мин.

По окончании синтеза наносим на 2% агарозный гель 10 мкл реакционной смеси (0.5 \times ТВЕ), а также маркер молекулярной массы и проводим электрофорез при напряжении 15 В/см в течение 30 минут.

Присутствие на электрофореграмме одного ПЦР-продукта длиной 420 п.н. (как на дорожке 2 чертежа) свидетельствует, что изучаемый образец взят от особи русского осетра (*A. gueldenstaedtii*) с типичным гаплотипом. Присутствие продукта длиной только
30 215 п.н. (как на дорожке 3 чертежа) свидетельствует, что изучаемый образец взят от особи русского осетра (*A. gueldenstaedtii*) с гаплотипом "baeri-like". Присутствие на геле двух ПЦР-продуктов (215 и 138 п.н., дорожка 4 чертежа) говорит о том, что взятый образец принадлежит не русскому (*A. gueldenstaedtii*), а сибирскому осетру (*A. baerii*). Отсутствие ПЦР продукта может указывать как на то, что ДНК в образце
35 деградирована (требуется проведение контроля чистоты, концентрации и фрагментной составляющей ДНК экстракта), так и на то, что образец принадлежит другим видам осетровых (проверка с другими праймерами из предлагаемого набора) или не принадлежит к осетровым.

40 Пример 2. Подтверждение видовой принадлежности образца ткани, заявленной как сибирский осетр (*A. baerii*).

Выделение ДНК, постановка ПЦР и визуализация продуктов ПЦР на агарозном геле проводится как в предыдущем примере. Два ПЦР-продукта длиной 138 и 213 п.н. (как на дорожке 4 чертежа) указывает на видовую принадлежность изученного образца к сибирскому осетру (*A. baerii*)

45 Пример 3. Подтверждение видовой принадлежности образца ткани, заявленной как шип (*A. nudiventris*).

Выделение ДНК, постановка ПЦР и визуализация продуктов ПЦР на агарозном геле проводится как в предыдущем примере, однако вместо указанных выше праймеров в реакционную смесь добавляется по 5 пМ праймеров АНР и NudF. Продукт длиной 331 п.н.
50 (как на дорожке 8 чертежа) указывает на видовую принадлежность изученного образца к шипу (*A. nudiventris*).

Пример 4. Подтверждение видовой принадлежности образца ткани, заявленной как стерлядь (*A. rutenus*).

Выделение ДНК, постановка ПЦР и визуализация продуктов ПЦР на агарозном геле

проводится как в предыдущем примере, однако вместо указанных выше праймеров в реакционную смесь добавляется по 5 пМ праймеров AHR и RutF. Продукт длиной 190 п.н. (как на дорожке 5 чертежа) указывает на видовую принадлежность изученного образца к стерляди (*A. rutenus*).

5 Пример 5. Подтверждение видовой принадлежности образца ткани, заявленной как калуга (*Huso dauricus*).

Выделение ДНК, постановка ПЦР и визуализация продуктов ПЦР на агарозном геле проводится как в предыдущем примере, однако вместо указанных выше праймеров в реакционную смесь добавляется по 5 пМ праймеров AHR и DauF. Продукт длиной 438 п.н. 10 (как на дорожке 10 чертежа) указывает на видовую принадлежность изученного образца к калуге (*Huso dauricus*).

Пример 6. Подтверждение видовой принадлежности образца ткани, заявленной как амурский осетр (*A. schrenkii*).

15 Выделение ДНК, постановка ПЦР и визуализация продуктов ПЦР на агарозном геле проводится как в предыдущем примере, однако вместо указанных выше праймеров в реакционную смесь добавляется по 5 пМ праймеров AHR и SchF. Продукт длиной 246 п.н. (как на дорожке 10 чертежа) указывает на видовую принадлежность изученного образца к амурскому осетру (*A. schrenkii*).

20 Пример 7. Подтверждение видовой принадлежности образца пищевой икры, заявленной как икра севрюги (*A. stellatus*).

Выделение ДНК проводится согласно протоколу выделения солевым методом (Aljanabi and Martmez 1997) со следующей модификацией: икринка помещается в лизирующий буфер, раздавливается стерильным наконечником, и оболочка икринки извлекается из лизирующего р-ра. Постановка ПЦР и визуализация продуктов ПЦР на агарозном геле 25 проводится как в предыдущем примере, однако вместо указанных выше праймеров в реакционную смесь добавляется по 5 пМ праймеров AHR и SteF. Продукт длиной 266 п.н. (как на дорожке 7 чертежа) указывает на видовую принадлежность изученного образца к севрюге (*A. stellatus*).

30 Пример 8. Подтверждение видовой принадлежности образца продукта переработки осетровых, заявленной как балык из филе белуги (*Huso huso*)

Выделение ДНК, постановка ПЦР и визуализация продуктов ПЦР на агарозном геле проводится как в предыдущем примере, однако вместо указанных выше праймеров в реакционную смесь добавляется по 5 пМ праймеров AHR и HusF. Продукт длиной 375 п.н. 35 (как на дорожке 8 чертежа) указывает на видовую принадлежность изученного образца к белуге (*Huso huso*).

Пример 9. Определение видовой принадлежности образца ткани осетровых рыб неизвестного вида.

Выделение ДНК как в предыдущем примере. Выделенная ДНК служит матрицей для 6 ПЦР реакций: на определение русского и сибирского осетров (праймеры AHR, ABF, AGF, 40 ABRM), амурского осетра (праймеры AHR и SchF), стерляди (праймеры AHR и RutF), севрюги (праймеры AHR и SteF), шипа (праймеры AHR и NudF), Калуги (праймеры AHR и DauF), белуги (праймеры AHR и HusF). Продукты всех ПЦР наносятся на смежные дорожки агарозного геля. В зависимости от того, в какой из реакций образовался ПЦР продукт, делается заключение о видовой принадлежности изучаемого образца. При использовании 45 маркера молекулярных масс (в диапазоне 100-500 п.н.) возможно нанесение смеси всех ПЦР продуктов в одну дорожку геля. В этом случае определяется длина ПЦР продукта и в соответствии с табл.1 делается заключение о видовой принадлежности изучаемого образца.

50 Пример 10. Определение видовой принадлежности образца ткани осетровых рыб неизвестного вида, хранившегося не в оптимальных условиях и содержащего сильно деградированную ДНК (с использованием метода «гнездового ПЦР»).

Выделение ДНК как в предыдущем примере. ПЦР-диагностика проводится в два этапа методом «гнездового ПЦР» (nested PCR). На первом этапе проводится амплификация

участка митохондриальной ДНК большего размера, чем используется в тесте (с «наружных» праймеров). На втором этапе используется предлагаемый набор диагностических праймеров. Первый ПЦР проводится как в предыдущем примере, однако вместо указанных выше праймеров в реакционную смесь добавляется по 5 пМ праймеров DL651 (ATCTTAACATCTTCAGTG) и AHR3 (CATACCATAATGTTTCATCTACC).

ПЦР реакция проводилась при следующих параметрах:

Предварительный отжиг при 95°C - 2 мин.

Отжиг 92°C - 20 сек.

Отжиг 52°C - 30 сек.

Синтез 72°C - 30 сек.

Всего 35 циклов.

Окончательный синтез 72°C 10 мин.

Второй цикл ПЦР реакций проводится как в примере 9, но вместо экстракта ДНК в качестве матрицы используется 1 мкл продукта первой ПЦР реакции. Визуализация и заключение о видовом составе проводиться как в примере 9.

Таблица 1.

Последовательности праймеров используемые для видовой идентификации и характеристика получаемого ПЦР-продукта				
Название	Последовательность	Используется с	Длина продукта	Видоспецифичность
AHR	TATACACCATTATCTCTATGT	AHR		Все виды
AGF	GCACAGACTATGTGGTATCCAGAA	AHR	420	русский
ABF	CAGATGCCAGTAACAGGCTGA	AHR	215	Русский (baerii-like) и сибирский
ABRM	TGTCTGTCTAGAACATATG	ABF	138	сибирский
HusF	TATCTATTACCTGCGAGCAGGCTG	AHR	374	белуга
DauF	CCTCTTATGTACGCGGTGT	AHR	439	калуга
NudF	TGTCTTTTCTGAAGGAGCTTTGC	AHR	329	шип
RutF	GGGAATAACCGTTAATTTGG	AHR	190	стерлядь
SteF	GGGGTTCTTGGCATGTTGTGAGCG	AHR	266	севрюга
SchF	TGTGGGTCACGGACTTTACAG	AHR	254	амурский осетр

<110> Mugue, Nikolai S. and Barmintzeva Anna E.

<120> "Oligonucleotide primers kit for identification of sturgeon fish species and its products."

5

<160> 1

<210> AHR

<211> 21

10

<212> DNA

<213> artificial

<400>

15

1

TATACACCAT TATCTCTATG T 21

20

<210> AGF

<211> 24

25

<212> DNA

<213> artificial

<400>

30

1

GCACAGACTA TGTGGTATCC AGAA 24

<210> ABF

<211> 21

35

<212> DNA

<213> artificial

<400>

40

1

CAGATGCCAG TAACAGGCTG A 21

45

<210> ABRM

50

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial

5

<400>

1

TGTCTGTCTA GAACATATG 19

10

<210> HusF

15

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

20

<400>

1

TATCTATTAC CTGCGAGCAG GCTG 24

25

<210> DauF

30

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial

35

<400>

1

CCTCTTATGT ACGCGGTGT 19

40

<210> SchF

45

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial

50

<400>

1

TGTGGGGTCA CGGACTTTAC AG 22

5

<210> NudF

10

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial

15

<400>

1

TGTCTTTTCT GAAGGAGCTT TGC 23

20

<210> RutF

25

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

30

<400>

1

GGGAATAACC GTTAATTTGG 20

35

<210> SteF

40

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<400>

45

1

GGGGTTCTTG GCATGTTGTG AGCG 24

50

Формула изобретения

Набор олигонуклеотидных праймеров для определения видовой принадлежности восьми видов осетровых рыб и продукции из них, причем олигонуклеотидный праймер выбирают со следующими нуклеотидными последовательностями:

обратный праймер AHR (TATACACCATTATCTCTATGT) для определения видовой

принадлежности к осетровым рыбам и прямые праймеры:

AGF (GCACAGACTATGTGGTATCCAGAA) для определения видовой принадлежности к русскому осетру,

5 ABF (CAGATGCCAGTAACAGGCTGA) для определения видовой принадлежности к русскому ("baerii-like" мтДНА гаплотип) и сибирскому осетрам,

ABRM (TGTCTGTCTAGAACATAtG) для определения видовой принадлежности к сибирскому осетру, HusF (TATCTATTACCTGCGAGCAGGCTG) для определения видовой принадлежности к белуге,

10 DauF (CCTCTTATGTACGCGGTGT) для определения видовой принадлежности к калуге,

SchF (TGTGGGGTCACGGACTTTACAG) для определения видовой принадлежности к амурскому осетру,

NudF (TGTCTTTTCTGAAGGAGCTTTGC) для определения видовой принадлежности к шипу,

15 RutF (GGGAATAACCGTTAATTTGG) для определения видовой принадлежности к стерляди и

SteF (GGGGTTCTTGGCATGTTGTGAGCG) для определения видовой принадлежности к севрюге.

20

25

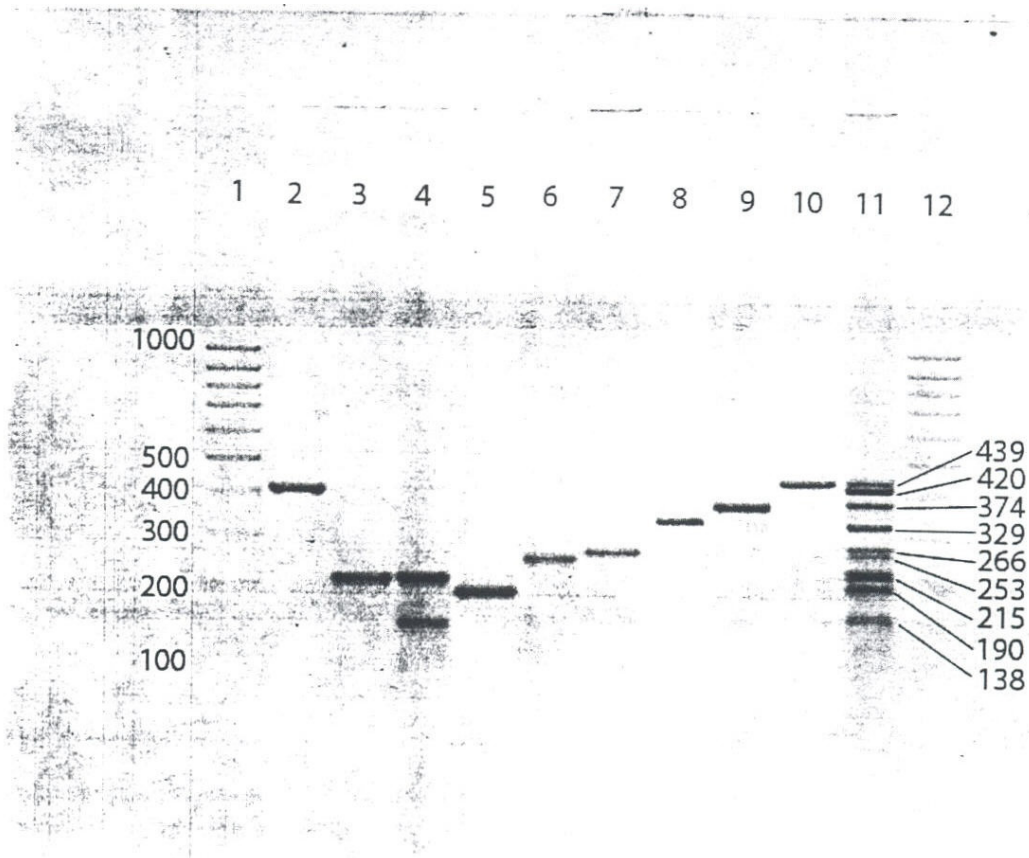
30

35

40

45

50



Дорожка 1 – маркер 100-1000п.н.; 2 – русский осетр (AGF-AHR, 420 п.н.); 3 – русский осетр с «baerii-like» мтДНК (ABF-AHR, 215 п.н.); 4-сибирский осетр (ABF-AHR, 215 п.н. и ABF – ABRM, 138 п.н.); 5-стерлядь (RutF-AHR, 190 п.н.); 6-амурский осетр (SchF-AHR, 253 п.н.); 7- севрюга (SteF-AHR, 266 п.н.); 8- шип (NudF-AHR, 329 п.н.); 9-белуга (HusF-AHR, 374 п.н.); 10-калуга (DauF-AHR, 439 п.н.); 11 –маркер масс ПЦР продуктов осетровых; 12- маркер 100-1000п.н.