

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036754**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.12.16**

**(21)** Номер заявки  
**201600045**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.12.07**

**(51)** Int. Cl. **C12Q 1/68** (2006.01)  
**B01D 57/02** (2006.01)  
**A01K 67/00** (2006.01)

---

**(54) СПОСОБ И ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ОЛЕНЕВЫХ И ИХ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ОТ ДРУГИХ ПАРНОКОПЫТНЫХ**

---

**(43)** **2017.06.30**

**(96)** **2015/EA/0152 (BY) 2015.12.07**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ "НАУЧНО-  
ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР  
ГОСУДАРСТВЕННОГО КОМИТЕТА  
СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ" (BY)**

**(72)** Изобретатель:  
**Котова Светлана Александровна,  
Спивак Елена Александровна,  
Рыбакова Вероника Игоревна,  
Рябцева Алина Олеговна, Заблоцкая  
Елена Андреевна, Цыбовский Иосиф  
Станиславович (BY)**

**(56)** KIM Eung Soo et al. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) and fluorescence-based capillary electrophoresis for identification of deer species from antlers. African Journal of Biotechnology, 2012, 11(13), p. 3179-3186, реферат, с. 3180-3181, 3184-3185

ЕПИШКО О.А. и др. Метод оценки достоверности происхождения крупного рогатого скота по полиморфизму нуклеотидных последовательностей ДНК// Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной образованию кафедр кормления сельскохозяйственных животных; физиологии, биотехнологии и ветеринарии и 15-летию кафедры ихтиологии и рыбоводства УО "БГСХА". - Горки: Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, 2011, с. 42-49

EP-A1-2889381  
WO-A1-2012155084

**(57)** Изобретение относится к области биодиагностики и может быть использовано для установления видового происхождения биологических образцов диких животных в криминалистике при экспертном исследовании вещественных доказательств по делам о незаконной охоте, краже домашнего скота. Предложен способ видовой ПЦР-идентификации биологических образцов диких животных семейства Оленевые (лось, олень, косуля, лань) и их дифференциации от домашних представителей отряда Парнокопытные (бык, овца, коза, свинья) и диких зубра и кабана, при котором ДНК определяемых видов генотипируют с использованием мультиплексного набора праймеров, специфичных к ДНК других генетически родственных видов семейства Оленевые и Полорогие. Предложена тест-система для осуществления способа, состоящая из набора 1 (локусы T108, T501, BM1824, CSSM036, RT24, RT9, DYS392) и набора 2 (локусы T108, BM1824, RT9, BL4, McM505, SO766).

**036754 B1**

**036754 B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области биодиагностики и может быть использовано для установления видового происхождения биологических образцов (волосы, слюна, пятно крови, фрагмент мышцы и др.) европейских видов диких животных семейства Оленевые - Лось (*Alces alces*), Олень благородный (*Cervus elaphus*), Косуля (*Capreolus capreolus*), Лань (*Dama dama*) и дифференциации указанных видов от других парнокопытных - домашних представителей семейства Полорогие (Бык - *Bos taurus*, Овца - *Ovis aries*, Коза - *Capra hircus*) и дикого Зубра (*Bos bonasus*), а также семейства Свиные - Кабан дикий (*Sus scrofa scrofa*)/Свинья домашняя (*Sus s. domestica*) - в криминалистике при экспертном исследовании вещественных доказательств по делам о незаконной охоте, краже домашнего скота и др. Изобретение может также применяться при установлении источников происхождения или состава мясopодуктов, в мониторинге стад диких животных в природоохраннх или экологических целях, а также при проведении научных исследований.

### Сведения о предшествующем уровне техники

Вопросы о видовой принадлежности исходного биологического материала изначально возникли в пищевой промышленности в отношении переработанных продуктов, таких как фарш, колбасы и т.п., в связи с проверкой соответствия качества, заявленного производителем, используемому в действительности сырью [4-10].

В экспертно-криминалистической практике установление видовой принадлежности исходного биологического материала [1-3] существенно при расследовании фактов экономического мошенничества в пищевой промышленности, а также в расследовании правонарушений экологического и природоохранного характера. Наиболее распространенным преступлением такого рода является незаконная охота (браконьерство). Доказывание фактов браконьерства осложняется тем, что наиболее распространенные объекты незаконной охоты - дикий кабан, косуля, лось, олень - не только являются родственными видами между собой, но и состоят в филогенетическом родстве с домашними животными (свинья, бык, коза, овца). В системе классификации живых организмов все они относятся к одному отряду Парнокопытные, включающему 3 семейства: семейство Оленевые (лось, олень, косуля, лань), семейство Полорогие (зубр, бык, овца, коза) и семейство Свиные (дикий кабан и домашняя свинья).

Достоверное определение видового происхождения в случае генетически родственных видов возможно путем проведения исследования на молекулярном уровне, что соответствует возможностям современного ДНК-анализа. Известны различные подходы к установлению источника происхождения биологического материала на молекулярном уровне.

1. Первые работы с использованием ДНК для выявления видового источника происхождения мяса животных основывались на гибридизации меченых зондов ДНК с образцами геномной ДНК, ковалентно связанной с нейлоновыми мембранами, в формате слот- или дот-блоттинга [4, 6, 10]. Используя такие методы, были однозначно идентифицированы образцы ДНК кур и свиней [6], выделенные из приготовленного мяса и коммерческих продуктов [4, 6], и свинина в смесях свинины с говядиной [10]. Были получены зонды на мясо козы, барана и быка, специфичность которых была не абсолютна, но достаточна для решения ряда практических задач [6, 11]. В работах [5, 7, 12] было описано использование видоспецифичных зондов на основе сателлитной ДНК и достижение четкой идентификации биологических образцов крупного рогатого скота, оленя, свиньи, курицы, индейки, кролика, овцы и козы в исходных продуктах. Продемонстрировано присутствие различных видов мяса в смесях и в широком ряду технологически переработанных, подвергшихся нагреванию и консервированию продуктов [5, 7].

Однако тестирование ДНК указанными выше подходами достаточно трудоемко, в современной судебной экспертизе вышеперечисленные подходы не используются.

#### 2. Анализ последовательностей митохондриальной ДНК.

Имеется ряд сообщений о перспективности определения животных, от которых произошел различный биологический материал, путем исследования митохондриальных генов цитохрома b, цитохромоксидазы I, 16S рРНК [13, 14]. Наиболее проработано исследование митохондриального гена цитохрома b, накоплен значительный объем данных о последовательностях этого гена у различных видов животных, что иногда позволяет по однонуклеотидным заменам распознать даже близкородственные виды. С одной стороны, моноаллельное состояние и многокопийность митохондриальной ДНК в клетке обеспечивает ей некоторое преимущество перед ядерной ДНК в криминалистических исследованиях по идентификации видовой принадлежности животных образцов. С другой стороны, митохондриальная ДНК также проявляет некоторую внутривидовую вариабельность и поэтому следует с осторожностью делать выводы при изучении различий между организмами, основанных на полиморфизме единичных нуклеотидов в ограниченном числе локусов [15].

Недостатком данного подхода является то, что для установления структуры амплифицированных последовательностей митохондриальной ДНК требуется многостадийная и достаточно трудоемкая процедура их секвенирования. С другой стороны, современные технологии, разработанные для многолокусного генотипирования полиморфизма единичных нуклеотидов (минисеквенирование и гибридизация на олигонуклеотидных микроматрицах), дорогостоящи и требуют предварительного знания геномной последовательности, характерной для того или иного вида, так называемого референсного генома [16]. На

сегодняшний день эта информация опубликована для одомашненных видов (бык, овца, коза, свинья) и косули (*Capreolus capreolus*), но пока недоступна для остальных видов животных отряда Парнокопытные [17].

### 3. Рестрикционное расщепление продуктов ПЦР.

Этот подход (ПЦР+ПДРФ) подразумевает двухэтапное исследование: полимеразная цепная реакция на первом этапе и анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов на втором этапе. Chikuni et al. [18] предложили праймеры для ПЦР, основанные на последовательности сателлитной I-ДНК овцы [19], которые взаимодействовали с ДНК овцы и козы, но не других видов, таких как крупный рогатый скот, азиатский буйвол, олень, конь, свинья, курица или кролик. "Овечий" фрагмент размером 374 п.н. разрезался на фрагменты 236 и 138 п.н. ферментом *ApaI*. Поскольку данный сайт рестрикции отсутствовал в "козьем" фрагменте, тот оставался неразрезанным, и разницу можно было визуализировать электрофорезом в агарозном геле. Данный подход впоследствии нашел широкое применение для идентификации многих видов мясных животных [9, 20, 21].

При использовании данного подхода возможен скрининг продуктов ПЦР без секвенирования. С другой стороны, такого рода исследования проводятся в ручном режиме, что неудобно для криминалистических лабораторий. Кроме того, метод обладает некоторыми недостатками: а) довольно часто происходит неполное расщепление ампликонов, б) внутривидовая вариабельность может привести к удалению или созданию дополнительных сайтов рестрикции, что потенциально может приводить к экспертным ошибкам, в) метод не является универсальным для видовой идентификации диких парнокопытных животных.

### 4. ПЦР с видоспецифичными и группоспецифичными праймерами.

Для идентификации видов, для которых имеется детальная информация о последовательностях ДНК, на основе филогенетически информативного полиморфизма единичных нуклеотидов созданы видоспецифичные праймеры. В соответствующих строгих условиях ПЦР такие праймеры дают продукт только в присутствии ДНК данного вида, при этом можно предсказать длину продукта амплификации. Таким образом, идентификация подтверждается, если ампликон соответствующего размера идентифицируется при электрофоретическом разделении. Сочетание видоспецифичных праймеров для различных видов животных позволяет детектировать одновременное присутствие более одного вида.

При другом подходе используют неселективный праймер, который обычно основывается на последовательности, общей для всех изучаемых в данной системе видов. Вариация точного положения данной группоспецифичной последовательности в гене становится причиной изменения размеров продуктов амплификации.

Использующие подобный режим мультиплексные реакции описаны для мясных видов животных [8]. Неселективные праймеры, общие для всех изучаемых в данной системе видов, дают возможность устанавливать принадлежность животных к надвидовым таксонам.

Описан метод, основанный на вариабельности контрольного региона митохондриальной ДНК (мтДНК), известного как D-петля (D-loop). У представителей семейства Оленевые этот регион содержит как консервативные зоны (идентичные последовательности между видами семейства), так и участки, которые содержат мутации (однонуклеотидные замены), делеции или инсерции. Авторы предложенного метода сосредоточили свое внимание на одном из участков D-петли, который различается по размеру у оленя и косули (у оленя на этом участке имеются делеции общей длиной 12 пар нуклеотидов, п.н.). Для детекции различий в размере амплифицируемых фрагментов (12 п.н.) проводили анализ фрагментов мтДНК в полиакриламидном геле [22].

Как правило, видо- и группоспецифические праймеры основаны на митохондриальных генах, в связи с чем существует вероятность, что амплификация может быть нарушена вследствие внутривидовой вариабельности. Кроме того, образование видоспецифичных продуктов ПЦР происходит в достаточно строгих условиях ПЦР, что не всегда выполнимо в условиях исследования криминалистических образцов. Для разработки новых, более эффективных и надежных видо- и группоспецифических праймеров необходима детальная информация о последовательностях ДНК всех близкородственных видов в рассматриваемой системе видов.

### 5. Способ идентификации путем генотипирования полиморфных коротких tandemных повторов (STR) и сравнения множества ПЦР-продуктов некоторой совокупности STR-локусов для сравниваемых объектов [23].

В настоящее время сравнительное исследование полиморфизма STR-локусов является главенствующим подходом при идентификации личности человека и его биологических следов в судебно-экспертной практике. Для исследования полиморфизма STR-локусов домашних животных с известной геномной последовательностью разработаны коммерческие наборы реагентов. Так, корпорация Applied Biosystems (США) [24] поставляет наборы StockMarks for Cattle Genotyping Kit Bovine (11 динуклеотидных локусов, крупный рогатый скот), StockMarks for Dog Genotyping Kit Canine (10 динуклеотидных локусов, собаки), StockMarks for Horses Equine Genotyping System (17 динуклеотидных локусов, лошади). Корпорация Promega (США) [25] производит набор The MeowPlex (11 тетра- и пентануклеотидных локусов для идентификации домашних кошек). Корпорация Mentype (Германия) [26] является изготовителем набора

Mentype Animaltype Pig Kit (11 тетраплексных локусов, свиньи).

Коммерческие тест-системы для генотипирования диких животных отсутствуют. Имеется ряд научных публикаций о полиморфизме STR-локусов оленя [27, 28], косули [29, 30], дикого кабана [31] и других видов диких животных, на основе которых возможна идентификация отдельных особей, например, в рамках криминалистических исследований.

Вместе с тем, в связи с существованием феномена адресной перекрестной амплификации у родственных видов, криминалистической ДНК-идентификации отдельных особей диких животных обязательно должно предшествовать установление видовой принадлежности животного - видовая идентификация, поскольку для идентификации особи могут быть использованы только праймеры, специфичность взаимодействия которых с ДНК данного вида доказана. Наиболее распространенные промысловые дикие животные Беларуси (олень, лось, косуля, кабан) относятся к одному отряду Парнокопытные, который включает 3 семейства - Оленевые (виды - олень, лось, косуля, лань), Полорогие (дикий вид - зубр, домашние - крупный рогатый скот, овца, коза) и Свиные (дикий кабан и домашняя свинья). С точки зрения генетики ДНК-идентификацию отдельной особи в данном случае предстоит осуществлять в широкой группе диких и домашних представителей родственных видов. Проведение генотипирования с целью идентификации особи с неустановленной видовой принадлежностью может приводить к ошибочным результатам, поскольку высокоспецифичные для одного вида праймеры могут быть частично эффективными при генотипировании ДНК другого, генетически родственного вида.

Таким образом, приведенный выше анализ уровня техники показал, что в настоящее время отсутствуют эффективные способы видовой идентификации биологических образцов диких животных в кругу представителей отряда Парнокопытные. Кроме того, описанные в литературе подходы не учитывают требование технологичности процессов, задействованных в современных судебно-экспертных лабораториях, в которых основной и наиболее доступной технологией стала мультилокусная ПЦР-амплификация STR-локусов с использованием флуоресцентно-меченных праймеров и анализ продуктов ПЦР методом капиллярного электрофореза на автоматизированных секвенаторах.

С учетом изложенного выше, в данной области техники существует потребность в разработке способа и тест-системы для видовой ПЦР-идентификации диких видов животных семейства Оленевые и их дифференциации от домашних животных отряда Парнокопытные и диких зубра и кабана.

#### **Сущность изобретения**

Задачей настоящего изобретения является создание способа видовой ДНК-идентификации диких видов животных семейства Оленевые и дифференциации представителей семейства Оленевые от домашних животных отряда Парнокопытные и диких зубра и кабана (по типу "дикий - домашний") на основе STR-локусов, а также разработка тест-системы для установления видовой принадлежности диких животных семейства Оленевые и дифференциации их от других парнокопытных (домашнего скота, зубра и кабана) с помощью данного способа.

Поставленная задача решается заявляемым способом на основе феномена адресной перекрестной амплификации STR-локусов у представителей родственных видов животных.

Феномен перекрестной адресной амплификации базируется на высоком уровне консервативности фланкирующих праймер-связывающих участков, сохраняющих схожие последовательности ДНК среди близкородственных видов [32-34].

Для нейтральных ДНК-маркеров в большинстве своем наблюдается следующая закономерность: перекрестная амплификация становится менее вероятной с усилением эволюционной дивергенции между видами в силу случайного накопления мутаций во фланкирующих областях [35]. При нарастании филогенетической дистанции между видами такое ограничение перекрестной применимости микросателлитного локуса может сначала проявляться нарушением амплификации и, следовательно, невыявлением отдельных аллелей (так называемых нуль-аллелей) [36], а в конечном итоге приводит к полной невозможности амплификации на основе данной пары праймеров.

Успешно амплифицируемые маркеры по своему проявлению у целевого вида (вид, на котором апробируется указанный ДНК-маркер) разделяются на две группы: мономорфные, т.е. характеризующиеся единственным аллелем у всех представителей вида, и полиморфные, т.е. имеющие более одного аллельного варианта (качественные признаки). Одновременно при межтаксонном переносе маркеров может также наблюдаться сдвиг в большую или меньшую сторону размерных диапазонов амплифицируемых фрагментов ДНК (количественные признаки).

Технически задача решается заявляемым способом - путем использования набора праймеров полиморфных STR-локусов нескольких видов-источников (вид, для которого микросателлитный маркер был изначально разработан) для генотипирования ДНК целевых видов (вид, на котором апробируется указанный маркер) с использованием заявляемой или аналогичной мультиплексной тест-системы и оценкой совокупности качественных (невыявление, мономорфное выявление, полиморфное выявление) и количественных (молекулярный размер) параметров продуктов амплификации.

Преимуществом заявляемого способа и тест-системы является возможность проведения видовой ДНК-идентификации диких животных семейства Оленевые отряда Парнокопытные с использованием общепринятых ПЦР-технологий - путем мультиплексного генотипирования STR-локусов ДНК, выделен-

ной из идентифицируемого образца, с последующим электрофоретическим анализом флуоресцентно-меченных продуктов ПЦР с использованием традиционного для ДНК-лабораторий оборудования. Дополнительным преимуществом является возможность использования генотипов информационно значимых полиморфных локусов, полученных при видовой идентификации образца, на второй стадии идентификационного исследования, на которой осуществляется идентификация конкретной особи установленного вида животного (например, в криминалистических исследованиях).

Сущность заявляемого способа и тест-системы заключается в следующем.

1. ДНК из идентифицируемого объекта извлекают с использованием общепринятых процедур.

2. Проводят генотипирование (амплификацию) полученной ДНК с использованием тест-системы, включающей праймеры, специфичные к различным видам отряда Парнокопытные, в том числе по п.3, в условиях, описанных в п.4.

3. Состав заявляемой тест-системы для видовой ДНК-идентификации биологических образцов диких животных семейства Оленевые - Лось (*Alces alces*), Олень (*Cervus elaphus*), Косуля (*Capreolus capreolus*), Лань (*Dama dama*) и дифференциации представителей семейства Оленевые от других парнокопытных (домашний скот - бык, овца, коза, свинья; дикие - зубр и кабан).

Заявляемая тест-система предназначена для мультиплексной амплификации и флуоресцентной полихромной детекции 10 STR-локусов и включает основные локусы:

3 STR-локуса - BM1824, CSSM036, BL4, специфичные к ДНК быка (крупного рогатого скота). Амплифицируемые фрагменты содержат в своей структуре у вида-источника динуклеотидные tandemные повторы;

2 STR-локуса - T108 и T501, специфичные к ДНК оленя. Амплифицируемые фрагменты содержат в своей структуре у вида-источника тетра-нуклеотидные tandemные повторы;

2 STR-локуса - RT9 и RT24, специфичные к ДНК северного оленя Карibu. Амплифицируемые фрагменты содержат в своей структуре у вида-источника динуклеотидные tandemные повторы;

1 STR-локус - McM505, специфичный к ДНК овцы. Амплифицируемые фрагменты содержат в своей структуре у вида-источника динуклеотидные tandemные повторы;

1 STR-локус - SO766, специфичный к ДНК свиньи, с динуклеотидным tandemным повтором;

и дополнительные локусы:

STR-локус DYS392, специфичный к ДНК человека в качестве контроля на ингибирование ПЦР,

укомплектованные в 2 набора: первый набор включает комплект праймеров для локусов BM1824, CSSM036, T108, T501, RT9 и RT24, а также дополнительный локус DYS392 и фрагмент ДНК человека в качестве контроля на ингибирование ПЦР; второй набор содержит локусы BM1824, T108, RT9, BL4, McM505 и локус SO766, специфичный к ДНК свиньи.

Структура праймеров (синтетических олигонуклеотидов) и тип флуоресцентной метки приведены в табл. 1.

Таблица 1

Структура праймеров, тип флуоресцентной метки локусов заявляемой тест-системы

Локус		Структура праймера (5' → 3')	SEQ ID NO:
1. BM1824 (D1S34)	F:	TMR/- CATTCCTCCAACCTGCTTCCTTG	SEQ ID NO: 1
	R:	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC	SEQ ID NO: 2
2. CSSM036	F:	JOE/- AAGAAGTACTGGTTGCCAATCGTG	SEQ ID NO: 3
	R:	GGATAACTCAACCACACGTCTCTG	SEQ ID NO: 4
3. T108	F:	FAM/- CATGTGGAGATAGGTAGACAGA	SEQ ID NO: 5
	R:	CCATTCTGAGTAGCTGATTCA	SEQ ID NO: 6
4. T501	F:	FAM/- CTCCTCATTATTACCCTGTGAA	SEQ ID NO: 7
	R:	ACATGCTTTGACCAAGACC	SEQ ID NO: 8
5. RT9	F:	JOE/- TGA AGT TTA ATT TCC ACT CT	SEQ ID NO: 9
	R:	CAG TCA CTT TCA TCC CAC AT	SEQ ID NO: 10
6. RT24	F:	ROX/- TGT ATC CAT CTG GAA GAT TTC AG	SEQ ID NO: 11
	R:	CAG TTT AAC CAG TCC TCT GTG	SEQ ID NO: 12

7. BL4	F:	JOE/- AAATTTTTCATCCTTCTTCTGAC	SEQ ID NO: 13
	R:	TCACCCTGACTGTGAATGC	SEQ ID NO: 14
8. McM505	F:	FAM/- ATCAGCACCATCTTAGGCCTAGA	SEQ ID NO: 15
	R:	TGTAGATTCCTCAATATAAAAATGGT	SEQ ID NO: 16
9. SO766	F:	FAM/- GTGTAGATATGTGTCTGTACA	SEQ ID NO: 17
	R:	AGACCTCCTATTAGAGGTGGA	SEQ ID NO: 18
10. DYS392	F:	TMR/- TAGAGGCAGTCATCGCAGTG	SEQ ID NO: 19
	R:	GACCTACCAATCCCATTCCCTT	SEQ ID NO: 20

Концентрация (мкМ) синтетических олигонуклеотидов следующая: BM1824 - 0,013-0055, CSSM036 - 0,013-0,080; T108 - 0,015-0,045, T501 - 0,015-0,090; RT9 - 0,03-0,15; RT24 - 0,025-0,150, BL4 - 0,05-0,20; McM505 - 0,03-0,10, SO766 - 0,2-0,3; DYS392 - 0,01 - 0,10.

Состав буферного раствора следующий: 10 мМ трис pH 8,6, 50 мМ KCl, 1,7 - 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>.

Раствор дезоксинуклеотидтрифосфатов: 200 мкМ (по 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата: дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ).

4. Условия проведения амплификации.

Мультилокусную ПЦР проводят на программируемых приборах термоциклического типа (амплификаторах) "iCycler" ("BIO-RAD", США) и "GeneAmp PCR System 9700" ("Applied Biosystems", США) и аналогах в следующем режиме:

1 цикл	[95°C, 3 мин → 96°C, 30 сек],
10 циклов	[94°C, 45 сек → 60°C, 1 мин → 68°C, 1 мин]
21 цикл	[93,5°C, 45 сек → 59°C, 1 мин → 68°C, 1 мин],
1 цикл	[4°C, хранение].

Объем реакционной смеси 10-15 мкл.

Фермент Taq-полимеразу добавляют в количестве 0,75-1 ед.

Исследуемую ДНК добавляют в количестве 5-20 нг.

5. Электрофоретическая идентификация продуктов ПЦР.

Идентификацию продуктов ПЦР проводят методом капиллярного электрофореза в автоматическом ДНК-секвенаторе серии "3500", "3130" ("Applied Biosystems", США) и аналогах в режиме генотипирования. Спектральную калибровку ДНК-секвенатора проводят с использованием химического стандарта (калибратора), содержащего набор красителей, которые включены в праймеры. Протокол анализа (assay) создают на основе матрицы спектральной калибровки в соответствии со специализированным пользовательским протоколом для соответствующей модели анализатора. Пробоподготовку проводят путем добавления формамида в соотношении 1:1 с последующей термоденатурацией. Определение размеров выявленных фрагментов в исследуемых локусах проводят с использованием внутреннего стандарта размера "GeneScan LIZ" и специализированной программы "GeneMapper®ID-X".

6. Последовательность выполняемых действий при исследовании и анализе результатов.

Действие 1: из образца выделяют ДНК, проводят амплификацию исследуемой ДНК с набором № 1 и разделяют продукты ПЦР.

Стадия 1. Анализ локуса BM1824.

Вариант А.

Наблюдаемый феномен - мономорфное выявление фрагмента размером в 139 п.н.

Вывод - исследуемый образец содержит ДНК диких парнокопытных семейства Оленевые (лось, олень, косуля, лань).

Вариант Б.

Наблюдаемый феномен - полиморфное выявление фрагментов (гетерозигота либо гомозигота) размером > 179 п.н.

Вывод - исследуемый образец содержит ДНК домашнего крупного рогатого скота (семейство Полорогие) либо дикого представителя этого же семейства - зубра.

Вариант В.

Наблюдаемый феномен - полное не выявление фрагментов, в том числе в локусе DYS392 человека.

Вывод - ингибирование ПЦР.

Действие 2: принимают меры по повышению качества исследуемой ДНК.

Вариант Г.

Наблюдаемый феномен - не выявление фрагментов во всех локусах, кроме локуса DYS392 человека.

Вывод:

а) непригодность ДНК для ПЦР (при сильной деградации ДНК);

б) ДНК происходит не от представителей отряда Парнокопытные (при хорошем качестве ДНК);

в) ДНК происходит от видов Овца, Коза, Кабан дикий/свинья домашняя отряда Парнокопытные.

Действие 3: проводят амплификацию исследуемой ДНК с набором № 2.

Стадия 2. Совместный количественный и качественный анализ фрагментов (см. также схему, табл. 2-9).

Ситуация 1. При мономорфном выявлении локуса VM1824 - 139 п.н.

Вариант А.

Наблюдаемый феномен: мономорфное выявление фрагментов в локусах T108 - 130 п.н.; T501 - 226 п.н.; RT24 - 192 п.н. Полиморфное выявление фрагментов в локусах RT9 - аллели 101, 103 п.н.; CSSM036 - аллели 160, 162 п.н.

Вывод - исследуемый образец содержит ДНК косули.

Вариант Б.

Наблюдаемый феномен: мономорфное выявление фрагментов в локусах T108 - 121 п.н.; T501 - 228 п.н.; RT9 - 107 п.н.; RT24 - 216 п.н.; CSSM036 - 158 п.н.

Вывод - исследуемый образец содержит ДНК лани.

Вариант В.

Наблюдаемый феномен: мономорфное выявление фрагментов в локусах CSSM036 - 172 п.н.; T108 - 125 п.н. Полиморфное выявление фрагментов в локусах T501 - аллели 121, 217 п.н.; RT9-118-129 п.н.; RT24-240-271 п.н.

Вывод - исследуемый образец содержит ДНК лося.

Вариант Г.

Наблюдаемый феномен: мономорфное выявление фрагментов в локусах CSSM036 - 158 п.н.; RT24 - 185 п.н. Полиморфное выявление фрагментов в локусах RT9 - аллели 107, 109 п.н.; T108 - 134-182 п.н.; T501 - 227-257 п.н.

Вывод - исследуемый образец содержит ДНК оленя.

Ситуация 2. При полиморфном выявлении локуса VM1824 - 179-191 п.н.

Вариант А.

Наблюдаемый феномен: невыевление фрагментов в локусах T108, T501, мономорфное выявление фрагмента в локусе RT24 - 208 п.н. (у зубра полиморфное 202-212 п.н.). Полиморфное выявление фрагментов в локусе CSSM036 - фрагменты размером > 161 п.н.: в локусе RT9 - фрагменты размером > 110 п.н.

Вывод: исследуемый образец содержит ДНК крупного рогатого скота либо зубра.

Действие 4. При необходимости дифференцировать КРС и зубра переходят к исследованию полиморфизма мтДНК.

Ситуация 3. Если реализовано действие 3 - проведена амплификация исследуемой ДНК с набором № 2.

Вариант А.

Наблюдаемый феномен: полиморфное выявление фрагментов во всех локусах: VM1824 - аллели 169, 173, 175 п.н.; T108 - 122-124 п.н.; RT9 - 116-135 п.н.; BL4 - 155-163 п.н.; McM505 - 114-118 п.н. Невыевление в локусе SO766.

Вывод: исследуемый образец содержит ДНК овцы.

Вариант Б.

Наблюдаемый феномен: мономорфное выявление фрагментов в локусах VM1824 -171 п.н.; T108 - 124 п.н.; BL4 - 145 п.н. Полиморфное выявление в локусе McM505, 92-94 п.н. Невыевление в локусах RT9 и SO766.

Вывод: исследуемый образец содержит ДНК козы.

Вариант В.

Наблюдаемый феномен: невыевление фрагментов в 5 локусах - VM1824, T108, RT9, BL4, McM505. Полиморфное выявление фрагментов в локусе SO766 свиньи (фрагменты 430-490 п.н.).

Вывод - ДНК происходит от представителя семейства Свиные (кабан дикий или домашняя свинья).

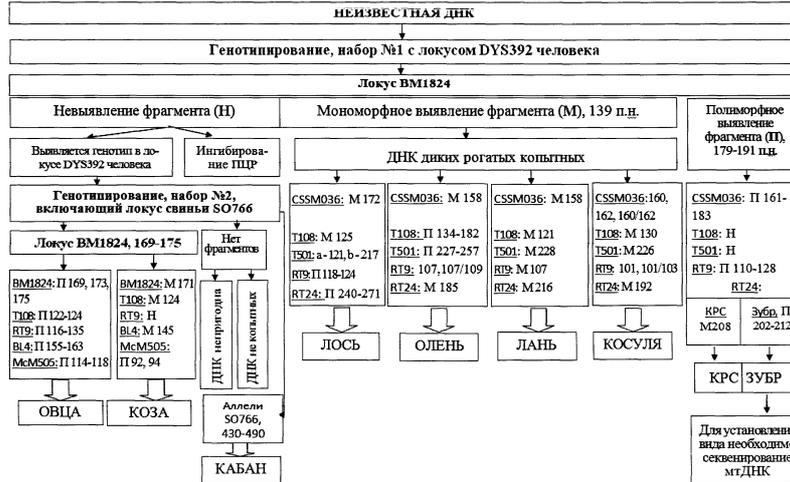
Вариант Г.

Наблюдаемый феномен: невыевление фрагментов во всех 6 локусах.

Вывод - ДНК происходит не от представителей отряда Парнокопытные.

На стр. 13 приведена схема идентификации видов животных по результатам генотипирования. Поскольку маркер VM1824 у всех диких видов отряда Парнокопытные - за исключением зубра - амплифицируется единым фрагментом с молекулярным размером 139 п.н., анализ результатов генотипирования с целью видовой идентификации биологического объекта начинают с локуса VM1824.

Схема идентификации видов животных по результатам генотипирования.



7. Примеры реализации способа с использованием заявляемой тест-системы.

Приведены электрофореграммы и в таблицах указаны молекулярные размеры фрагментов, полученные для секвенаторов Applied Biosystems серии 3500, полимера POP-4 и размерного стандарта "GeneScan-600 LIZ SizeStandard v.2.0". Использование других серий генетических анализаторов, полимера или размерного стандарта может привести к незначительному изменению размеров фрагментов.

На фиг. 1 приведен скриншот с секвенатора Applied Biosystems 3500 электрофореграммы продуктов генотипирования ДНК лося с использованием заявляемой тест-системы. Программой "GeneMapper®ID-X" на основе маркерной панели "Diffplex" продукты ПЦР идентифицированы как принадлежащие к семейству Оленевые (локус VM1824, Cervidae); виду Лось (Alces). В табл. 2 приведен комплекс признаков, выявляющийся при генотипировании ДНК вида Лось.

Таблица 2

Особенности выявления признаков у представителей вида Лось

Признаки	Локусы					
	VM1824	CSSM036	T108	T501	RT9	RT24
Размеры аллелей, п.н.	139	172	125	121,217	118-129	240-271
Характер выявления	М моно-морфный	М моно-морфный	М моно-морфный	2 фрагмента или моно-морфный	П поли-морфный	П поли-морфный
Диагностическое значение	Идентификация вида Лось				Идентификация особей лося	

На фиг. 2 приведен скриншот с секвенатора Applied Biosystems 3500 электрофореграммы продуктов генотипирования ДНК оленя с использованием заявляемой тест-системы. Программой "GeneMapper®ID-X" на основе маркерной панели "Diffplex" продукты ПЦР идентифицированы как принадлежащие к семейству Оленевые (локус VM1824, Cervidae); виду Олень (Cervus). В табл. 3 приведен комплекс признаков, выявляющийся при генотипировании ДНК вида Олень.

Таблица 3

Особенности выявления признаков у представителей вида Олень благородный

Признаки	Локусы					
	VM1824	CSSM036	RT9	RT24	T108	T501
Размеры аллелей, п.н.	139	158	107,109	185	134-182	227-257
Характер выявления	М, моно-морфный	М, моно-морфный	2 фрагмента или моно-морфный	М, моно-морфный	П, поли-морфный	П, поли-морфный
Диагностическое значение	Идентификация вида Олень				Идентификация особей оленя	

На фиг. 3 приведен скриншот с секвенатора Applied Biosystems 3500 электрофореграммы продуктов генотипирования ДНК косули с использованием заявляемой тест-системы. Программой "GeneMapper®ID-X" на основе маркерной панели "Diffplex" продукты ПЦР идентифицированы как принадлежащие к семейству Оленевые (локус VM1824, Cervidae); виду Косуля (Capreolus). В табл. 4 приведен комплекс признаков, выявляющийся при генотипировании ДНК вида Косуля.

Таблица 4

Особенности выявления признаков у представителей вида Косуля европейская

Признаки	Локусы					
	BM1824	CSSM036	T108	T501	RT9	RT24
Размеры аллелей, п.н.	139	160,162	130	226	101, 103	192
Характер выявления	М моно-морфный	2 фрагмента или моно-морфный	М моно-морфный	М моно-морфный	2 фрагмента или моно-морфный	М моно-морфный
Диагностическое значение	Идентификация вида Косуля					

При генотипировании ДНК вида Лань (*Dama dama*) для задействованных в тест-системе локусов выявляются следующие амплифицированные фрагменты (табл. 5).

Таблица 5

Особенности выявления признаков у представителей вида Лань

Признаки	Локусы					
	BM1824	CSSM036	T108	T501	RT9	RT24
Размеры аллелей, п.н.	139	158	121	228	107	214
Характер выявления	М моно-морфный	М моно-морфный	М моно-морфный	М моно-морфный	М моно-морфный	М моно-морфный
Диагностическое значение	Идентификация вида Лань					

На фиг. 4 приведен скриншот с секвенатора Applied Biosystems 3500 электрофореграммы продуктов генотипирования ДНК быка с использованием заявляемой тест-системы. Программой "GeneMapper®ID-X" на основе маркерной панели "Diffplex" продукты ПЦР идентифицированы как принадлежащие виду Бык домашний (*Bos*). В табл. 6 приведен комплекс признаков, выявляющийся при генотипировании ДНК вида Бык.

Таблица 6

Особенности выявления признаков у представителей вида Бык домашний

Признаки	Локусы					
	T108	T501	RT24	BM1824	CSSM036	RT9
Размеры аллелей, п.н.	-	-	208	179-191	161-183	110-128
Характер выявления	Н, не выявление	Н, не выявление	М, мономорфный	П, полиморфный	П, полиморфный	П, полиморфный
Диагностическое значение	Идентификация крупного рогатого скота			Идентификация особей крупного рогатого скота		

При генотипировании ДНК вида Коза (*Capra hircus*) для задействованных локусов выявляются следующие амплифицированные фрагменты, табл. 7.

Таблица 7

Особенности выявления признаков у представителей вида Коза домашняя

Признаки	Локусы					
	VL4	McM505	BM1824	T108	RT9	SO766
Размеры аллелей, п.н.	145	92-94	171	124	-	-
Характер выявления	М, моно-морфный	П, поли-морфный	М, моно-морфный	М, моно-морфный	Н, не выявление	Н, не выявление
Диагностическое значение	Идентификация вида Коза					

При генотипировании ДНК вида Овца (*Ovis aries*) для задействованных локусов выявляются следующие амплифицированные фрагменты (табл. 8).

Таблица 8

Особенности выявления признаков у представителей вида Овца домашняя

Признаки	Локусы					
	BL	McM505	BM1824	T108	RT9	SO766
Размеры аллелей, п.н.	155-163	114-118	169,173, 175	122-124	116-135	-
Характер выявления	П, поли-морфный	П, поли-морфный	2 фрагмента или моно-морфный	П, поли-морфный	П, поли-морфный	Н, не выявление
Диагностическое значение	Идентификация вида и особей овцы					

При генотипировании ДНК вида Кабан (*Sus scrofa*) для задействованных локусов выявляются следующие амплифицированные фрагменты (табл. 9).





## Источники информации.

- 1 Linacre, A. DNA typing in wildlife crime: recent developments in species identification / A. Linacre, S.S Tobe // *Forensic Sci Med Pathol.* – 2010. – Vol. 6. – P. 195–206.
- 2 DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife forensics / E.A. Alacs [et al.] // *Forensic Sci Med Pathol.* – 2010. – Vol. 6. – P. 180–194.
- 3 A molecular genetic approach for forensic animal species identification / C. Bellis [et al.] // *Forensic Science International* 134. – 2003. – Vol. 99. – P. 108.
- 4 Baur, C. Identification of Heat Processed Meat by DNA Analysis / C. Baur, J. Teifelgreding, E. Liebhardt // *Arch. Lebensmittelhyg.* – 1987. – Vol. 38. – P. 172-174.
- 5 Species Identification by Oligonucleotide Hybridisation: The Influence of Processing on Meat Products / J.A. Buntjer [et al.] // *J. Food Sci. Ag.* – 1999. – Vol. 79. – P. 53-57.
- 6 Species Identification of Cooked Meats by DNA Hybridization Assay / K. Chikuni [et al.] // *Meat Sci.* – 1990. – Vol. 27. – P. 119-128.
- 7 Hunt, D.J. Identification of the Species of Origin of Raw and Cooked Meat Products Using Oligonucleotide Probes / D.J. Hunt, H.C. Parkes, I.D. Lumley // *Food Chem.* – 1997. – Vol. 60. – P. 437-442.
- 8 A Quick and Simple Method for the Identification of Meat Species and Meat Products by PCR Assay / T. Matsunaga [et al.] // *Meat Sci.* – 1999. – Vol. 51. – P. 143-148.
- 9 Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis: A Simple Method for Species Identification in Food / R. Meyer [et al.] // *JAOAC Int.* – 1995. – Vol. 78. – P. 1542-1551.
- 10 Winterø, A.K. A Comparison of DNA-Hybridization, Immunodiffusion, Countercurrent Immunoelectrophoresis and Isoelectric Focusing for Detecting the Admixture of Pork to Beef / A.K. Winterø, P.D. Thomsen, W. Davis // *Meat Sci.* – 1990. – Vol. 27. – P. 75-85.
- 11 Ebbehøj, K.F. Differentiation of Closely Related Species by DNA Hybridisation / K.F. Ebbehøj, P.D. Thomsen // *Meat Sci.* – 1991. – Vol. 30. – P. 359-366.
- 12 Buntjer, J.B. Rapid Species Identification by Using Satellite DNA Probes / J.B. Buntjer, J.A. Lenstra, N.Z. Haagsma // *Lebensm. Unters. Forsch.* – 1995. – Vol. 201. – P. 577-582.
- 13 Dynamics of Mitochondrial DNA Evolution in Animals: Amplification and Sequencing with Conserved Primers / T.D. Kocher [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol. 86. – P. 6196-6200.
- 14 Species Identification Through DNA “Barcodes” / G. Ferri [et al.] // *Genetic Testing and Molecular Biomarkers.* – 2009. – Vol. 13, № 3. – P. 421–426.
- 15 Chow, S. Intra- and Interspecific Restriction Fragment Length Polymorphism in Mitochondrial Genes of Thunnus Tuna Species / S. Chow, S. Inogue // *Bull. Nat. Inst. Far Seas Fish.* – 1993. – Vol. 30. – P. 207-224.

- 16 Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology / J.M. Butler // Elsevier Academic Press, San Diego. – 2012. – 704 p.
- 17 Сайтты: UCSC Genome Bioinformatics: <https://genome-euro.ucsc.edu/goldenPath/credits.html>; NCBI: [www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/10731](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/10731); [www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=capreolus](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=capreolus)
- 18 Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Sheep and Goat Meats / K. Chikuni [et al.] // Meat Sci. – 1994. – Vol. 37. – P. 337-345.
- 19 Reisner, A.H. Apparent Relatedness of the Main Component of Ovine 1.714-Satellite DNA to Bovine 1.715-Satellite DNA / A.H. Reisner, C.A. Bucholtz // EMBO J. – 1983. – Vol. 12. – P. 1145-1149.
- 20 Wolf, C. PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A Reliable Method for Species Identification / C. Wolf, J. Rentsch, P. Hübner // J. Agric. Food Chem. – 1999. – Vol. 47. – P. 1350-1355.
- 21 Evaluation of a DNA Fingerprinting Method for Determining the Species of Origin of Meats / L. Partis [et al.] // Meat Sci. – 2000. – Vol. 54. – P. 369-376.
- 22 Galan, M. Distinguishing red and roe deer using DNA extracted from hair samples and the polymerase chain reaction (PCR) method / M. Galan [et al.] // Wildlife Society Bulletin. – 2005. – Vol. 33, № 1. – P. 204-211.
- 23 Caskey C.T., Edwards A.O. / DNA typing with short tandem repeat polymorphisms and identification of polymorphic short tandem repeats // Патент US005364759A, Nov. 15, 1994;
- 24 StockMarks® for Horse, Cattle and Dog Genotyping Kits User Protocol ( <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4346135>)
- 25 J.M. Butler, V.A. David, S. J. O'Brien, M. Menotti-Raymond / The MeowPlex: A New DNA Test Using Tetranucleotide STR Markers for the Domestic Cat // Profiles in DNA – 2002 – Vol. 5(2) – P. 7-10 ([worldwide.promega.com](http://worldwide.promega.com)).
- 26 [http://www.biotype.de/fileadmin/user/MANUALS/Animaltype\\_Pig\\_eng.pdf](http://www.biotype.de/fileadmin/user/MANUALS/Animaltype_Pig_eng.pdf) Meredith E.P., Rodzen J.A., Levine K.F., Bank J.D. / Characterization of an additional 14 microsatellite loci in California Elk (*Cervus elaphus*) for use in forensic and population applications // Conservation Genetics – 2005 – Vol. 6 – P. 151-153;
- 27 Kenneth C.J., Kenneth F.L., Banks J.D. / Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California Elk (*Cervus elaphus canadensis*) // Molecular Ecology Notes – 2002 – Vol. 2 – P. 425-427.
- 28 Lorenzini, R. / The rediscovery of the Italian roe deer: genetic differentiation and management implications // Ital. J. Zool. – 2002. – Vol. 69. – P. 367-379.;
- 29 Fickel J. and Reinsch A. / Microsatellite markers for the European Roe deer (*Capreolus capreolus*) // Molecular Ecology – 2000 – Vol 9 P. 993-1011.
- 30 Rohrer, G.A., L.J. Alexander, J.W. Keele, T.P. Smith and C.W. Beattie. / A microsatellite linkage map of the porcine genome // Genetics – 1994 – Vol. 136 – P. 231-45.
- 31 Comparison of genetic diversity at microsatellite loci in near-extinct and non-endangered species of Mexican goodeine fishes and prediction of cross-amplification within the family / R.M. Hamill [et al.] // Journal of Fish Biology. – 2007. – Vol. 70. – P. 16-32.
- 32 Koskinen, M.T. Cross-species amplification of salmonid microsatellites, which reveal polymorphism in European and Arctic grayling, Salmonidae: *Thymallus* spp. / M.T. Koskinen, C.R. Primmer // Hereditas. – 1999. – Vol. 131. – P. 171-176.
- 33 Sun, H.S. Exploiting dinucleotide microsatellites conserved among mammalian species / H.S. Sun, B.W. Kirkpatrick // Mammalian Genome. – 1996. – Vol. 7. – P. 128-132.
- 34 Erler, A. Development of Y-chromosomal microsatellite markers for nonhuman primates / A. Erler, M. Stoneking, M. Kayser // Molecular Ecology. – 2004. – Vol. 13. – P. 2921-2930.
- 35 Paetkau, D. The molecular-basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears / D. Paetkau, C. Strobeck // Molecular Ecology. – 1995. – Vol. 4. – P. 519-520.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Тест-система для ДНК-идентификации биологических образцов диких животных семейства Оленевые (Лось, *Alces alces*; Олень, *Cervus elaphus*; Косуля, *Capreolus capreolus*; Лань, *Dama dama*) и дифференциации представителей семейства Оленевые от диких (Кабан, *Sus scrofa*; Зубр, *Bos bonasus*) и домашних представителей отряда Парнокопытные (Бык, *Bos taurus*; Овца, *Ovis aries*; Коза, *Capra hircus*; Свинья домашняя, *Sus scrofa domestica*), состоящая из следующих компонентов: буферный раствор для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР), раствор 4-х дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), раствор Taq-полимеразы, мультиплексный набор праймеров генетически родственных видов, имеющих последовательности SEQ ID NO: 1-20; из них 7 пар в наборе 1, специфичных для амплификации локусов оленя T108 и T501 (комплекты праймеров № 3 и 4 табл. 1 соответственно), быка BM1824 и CSSM036 (комплекты праймеров № 1 и 2 табл. 1 соответственно), северного оленя RT9 и RT24 (комплекты праймеров № 5 и 6 табл. 1 соответственно) и дополнительного локуса человека DYS392 (комплект праймеров № 10 табл. 1) в качестве контроля на ингибирование ПЦР, и 6 пар в наборе 2, специфичных для амплификации локусов оленя T108, быка BM1824 и BL4 (комплект праймеров № 7 табл. 1), северного оленя RT9, овцы McM505 (комплект праймеров № 8 табл. 1) и локуса свиньи S0766 (комплект праймеров № 9 табл. 1), при этом каждый комплект праймеров указанной мультиплексной системы представляет собой пару синтетических олигонуклеотидов, причем в химическую структуру одного из них введен флуоресцентно меченый нуклеотид, а праймеры находятся в следующей концентрации:

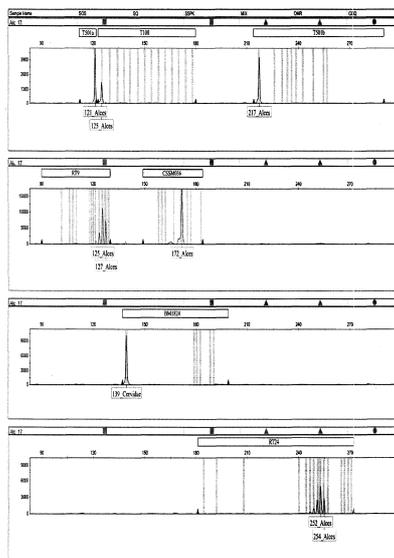
для синтетических олигонуклеотидов: SEQ ID NO: 1-2 - 0,013-0,055; SEQ ID NO: 3-4 - 0,013-0,080; SEQ ID NO: 5-6 - 0,015-0,045; SEQ ID NO: 7-8 - 0,015-0,090; SEQ ID NO: 9-10 - 0,03-0,15; SEQ ID NO: 11-12 - 0,025-0,150; SEQ ID NO: 13-14 - 0,05-0,20; SEQ ID NO: 15-16 - 0,03-0,10; SEQ ID NO: 17-18 - 0,2-0,3; SEQ ID NO: 19-20 - 0,01-0,10 (мкМ); причем

буферный раствор имеет следующий состав: 10 mM Трис pH 8,6, 50 mM KCl, 1,7-2,5 mM MgCl<sub>2</sub>;

раствор дезоксинуклеотидтрифосфатов имеет следующую концентрацию: 200 мкМ (по 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата: dATP, dCTP, dGTP, dTTP);

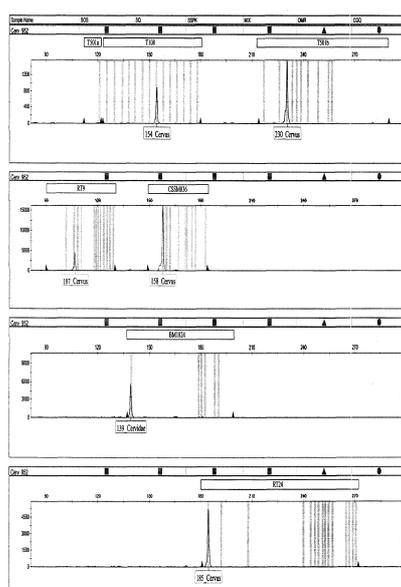
а фермент Taq-полимераза находится в количестве 0,75-1 ед. (в объеме реакционной смеси 15 мкл).

2. Способ видовой ДНК-идентификации биологических образцов диких животных семейства Оленевые (Лось, *Alces alces*; Олень, *Cervus elaphus*; Косуля, *Capreolus capreolus*; Лань, *Dama dama*) и дифференциации представителей семейства Оленевые от диких (Кабан, *Sus scrofa*; Зубр, *Bos bonasus*) и домашних (Бык, *Bos Taurus*; Овца, *Ovis aries*; Коза, *Capra hircus*; Свинья домашняя, *Sus s. domestica*) представителей отряда Парнокопытные, отличающийся тем, что ДНК определяемых видов генотипируют с использованием мультиплексного набора праймеров по п.1, специфичных к ДНК остальных генетически родственных видов семейства Оленевые и Полорогие, что позволяет проводить видовую ДНК-идентификацию биологических образцов диких животных семейства Оленевые и дифференциацию их от домашних животных отряда Парнокопытные на основе совокупности качественных (невывявление амплифицированного(ых) фрагмента(ов), мономорфное или полиморфное выявление амплифицированного(ых) фрагмента(ов)) и количественных (молекулярные размеры фрагмента(ов)) различий продуктов ПЦР.

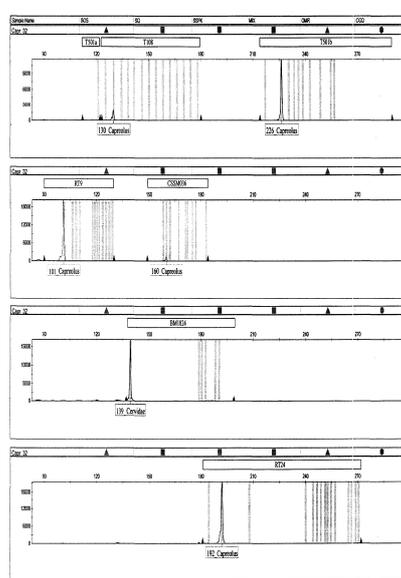


Фиг. 1

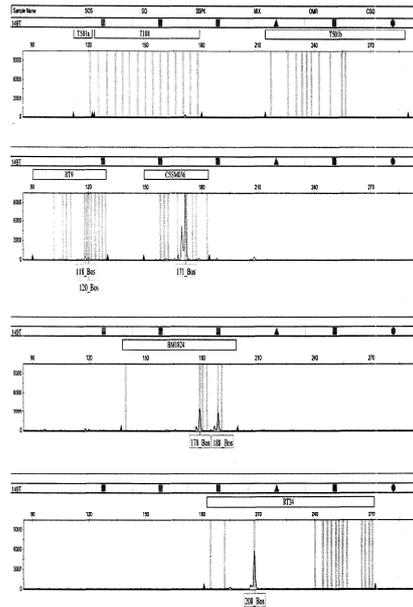
036754



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

