

Дальневосточный государственный технический
рыбохозяйственный университет

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ
ГИДРОБИОНТОВ С ПОМОЩЬЮ ЦПР: РАЗРАБОТКА И
АПРОБАЦИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ**

Методические указания по выполнению практических работ
для обучающихся всех форм обучения направления подготовки
35.04.07 «Водные биоресурсы и аквакультура»

Владивосток
2021

УДК 574.55 + 574.52(075.8)

ББК 28.4я73

Т86

Автор – С.В. Туранов, К.б.н., доцент кафедры «Водные биоресурсы и аквакультура» ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз», старший научный сотрудник ННЦМБ ДВО РАН.

Рецензент – Жадько Е.А., К.б.н., доцент кафедры «Водные биоресурсы и аквакультура» ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз»

Печатается в авторской редакции

Дальневосточный государственный технический
рыбохозяйственный университет, 2021 г.

Методические указания составлены¹ согласно учебному плану для обучающихся всех форм обучения направления подготовки «Водные биоресурсы и аквакультура» в рамках дисциплины «Молекулярно-генетические методы исследования в аквакультуре».

Способность разрабатывать и применять методы, основанные на ПЦР, для идентификации видовой принадлежности гидробионтов, является продвинутым, но необходимым навыком для специалистов-биологов, задействованных в области рыбного хозяйства. Такой навык является комплексным, т.к. затрагивает работу с геномными базами данных, основан на умении пользоваться различными вычислительными программами, а также способности планировать эксперимент с целью апробации метода на естественном материале.

Настоящие методические указания помогут студентам-биологам, а также другим специалистам рыбного хозяйства освоить базовые навыки разработки и апробации олигонуклеотидов для их использования при идентификации видовой принадлежности гидробионтов и других живых организмов с помощью ПЦР.

¹ При частичной финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (грант МК-305.2019.4)

Содержание

Практическая работа №1	5
Задача 1: собрать и выровнять матрицу последовательностей контрольного региона для идентификации <i>A. mikadoi</i>	6
Задача 2: провести подбор видоспецифичных олигонуклеотидов.....	9
Практическая работа №2	12
Задача 1: провести проверку разработанных олигонуклеотидов <i>in silico</i> , с помощью средств NCBI.	13
Задача 2: провести проверку разработанных олигонуклеотидов экспериментально, с помощью ПЦР.	15
Список литературы.....	18
Приложение	21

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №1

Тема: Вычислительные алгоритмы молекулярной генетики. Разработка видоспецифичных олигонуклеотидов для идентификации сахалинского осетра *Acipenser mikadoi* Hilgendorf, 1892 на основе выбранного фрагмента ДНК.

Ввиду малой численности редких и исчезающих видов рыб классические методы мониторинга видового и генетического разнообразия представляются для них губительными. Для данных мероприятий более подходящими видятся неинвазивные подходы, к которым относятся акустический [1,2], метод на основе применения нейросетей [3,4], а также использование ДНК из окружающей среды [5,6]. Последний хорошо зарекомендовал себя в данной области [7,8] и, кроме того, постепенно развивает дополнительные методические возможности для неинвазивных методов оценки генетической изменчивости гидробионтов [9-11]. К настоящему времени ДНК из водной среды успешно апробирована для мониторинга нескольких видов редких и исчезающих осетров [8, 12-14].

Использование ДНК из водной среды имеет ограничения на длину фрагментов, с помощью которых предполагается идентифицировать видовую принадлежность гидробионтов. Связано это с тем, что на свету ДНК в водной среде деградирует до весьма коротких фрагментов, непригодных для нужд идентификации. Отсюда поиск фрагментов ограничивается длиной в 400 п.о., что одновременно уменьшает благоприятный исход поиска видоспецифичных участков, если виды разделены недавней дивергенцией и не успели накопить достаточно взаимных различий.

Как правило, наибольшей видовой специфичностью обладают наиболее изменчивые участки генома. В нашем случае наиболее изменчивым из доступных для осетров фрагментов является контрольный регион (*D-loop*) их митохондриального генома (Рисунок 1).

При разработке видоспецифичных олигонуклеотидов в матрицу последовательностей этого участка помимо *A. mikadoi* должны входить наиболее близкие ему виды, а также виды, которые делят с ним общий ареал. К ним относятся *A. medirostris* (генетически наиболее близкий), а также *A. dauricus* и *A. schrenckii* (разделяющие с ним ареал) [15].

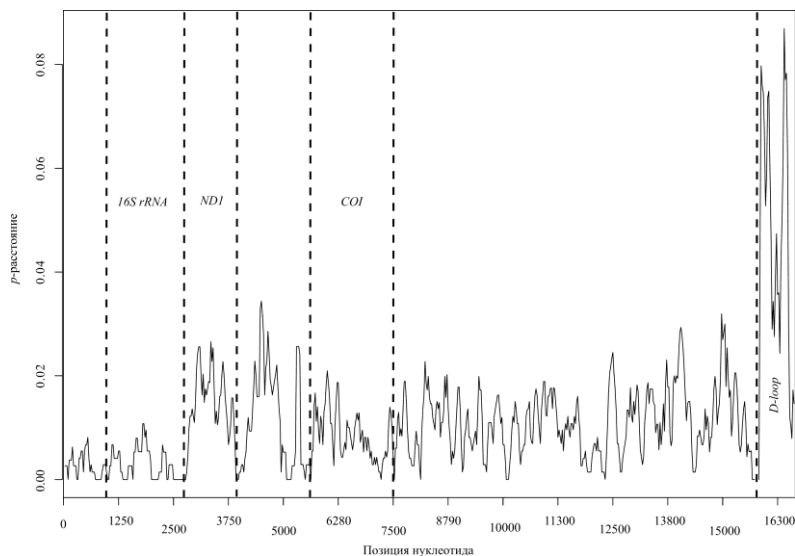


Рисунок 1. Распределение значений дивергенции (*p*-расстояние) вдоль 15 последовательностей митохондриального генома 4 видов осетров. Анализ выполнен с помощью алгоритма скользящего окна. Вертикальными прерывистыми линиями обозначены границы фрагментов, которые являлись основными кандидатами для разработки видоспецифичных праймеров.

Одним из наиболее удобных программных средств для разработки видоспецифичных олигонуклеотидов является программа DECIPHER [16]. Программа имеет ограничения – максимальная длина загружаемых последовательностей не должна превышать 10000 п.о. К счастью, обычно длина митохондриального контрольного региона не превышает 1000 п.о.

ЗАДАЧА 1: собрать и выровнять матрицу последовательностей контрольного региона для идентификации *A. mikadoi*.

Цель работы: получить навыки сбора нуклеотидных последовательностей из генного банка, их выравнивания и сохранения в нужном формате.

Оборудование:

Персональный компьютер с доступом к сети интернет.

Программы и ресурсы:

1. MEGA 7 [17].
2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (National Center for Biotechnology Information, США).

Ход работы:

1. Проходим на домашнюю страницу National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
2. Вверху слева, в разделе поиска (Search) выбираем из всплывающего списка «Nucleotide» и вносим в поле поиска один из номеров доступа, указанных в Таблице 1 и нажимаем на кнопку «Search».
3. После загрузки индивидуальной страницы последовательности сочетанием клавиш ctrl+F вызываем поиск и вводим «D-loop».
4. Нажимаем на соответствующее найденное выражение, после чего на странице будет подсвечена часть генома, которая соответствует контрольному региону.
5. Внизу справа нажимаем на Display: FASTA, после чего на отдельной странице появится нуклеотидная последовательность контрольного региона.
6. Сохраним её у себя на компьютере. Для этого в меню справа (Send to) нужно выбрать «complete record», затем «File» и из всплывающего списка выбрать формат «FASTA» (Рисунок 2).
7. После нажатия на «Create File» браузер попросит вас сохранить файл. При сохранении в названии файла необходимо прописать вид и расширение (Например, «A_mikadoi.fasta»).
8. Далее повторяем действия в пунктах со 2 по 7 для всех оставшихся номеров из таблицы 1.
9. Для дальнейшей работы понадобится программа MEGA. Открываем программу. Выделяем все сохранённые файлы с последовательностями и переносим их в окно программы MEGA. Формируется матрица не выровненных последовательностей участка контрольный регион.
10. Для выравнивания матрицы необходимо выделить все последовательности сочетанием клавиш ctrl+A, затем вы-

брать в меню «Alignment→Align by MUSCLE». В открывшемся окне можно оставить настройки по умолчанию и нажать «ОК».

11. После завершения процедуры выравнивания матрицу последовательностей необходимо сохранить. Для этого нужно выбрать в меню «Data→Export alignment→FASTA format» и сохранить матрицу под любым именем, прописав расширение (.fasta), как в пункте 7.

Таблица 1. Номера доступа в NCBI последовательностей полных митохондриальных геномов осетров

Вид	Номер доступа нуклеотидной последовательности в NCBI
<i>Acipenser mikadoi</i>	KX276658
<i>A. dauricus</i>	KJ402277
<i>A. schrenckii</i>	MN973728
	MN973729
	MN973730
	MN973731
	MN973732
	MN973733
	MN973734
	KX276660
	KX276659
<i>A. medirostris</i>	KF150287
	KC905169
	KC820796
	NC_028405

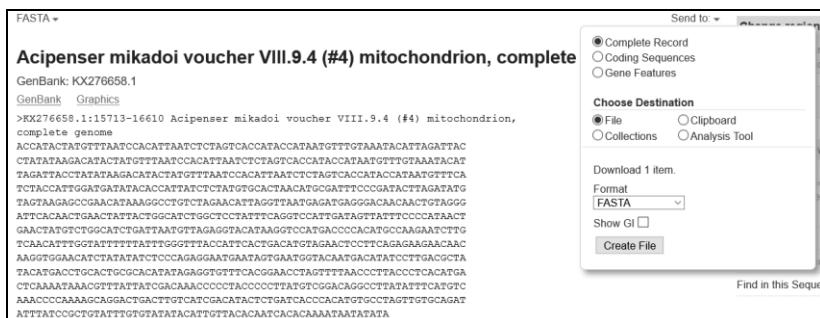


Рисунок 2. Часть web-страницы с отображением последовательности контрольного региона под номером KX276658. Последовательность подготовлена к сохранению в формате FASTA.

ЗАДАЧА 2: провести подбор видоспецифичных олигонуклеотидов.

Цель работы: получить навыки работы с программой DECIPHER для разработки видоспецифичных праймеров.

Оборудование:

Персональный компьютер с доступом к сети интернет.

Программы и ресурсы:

1. Текстовый редактор Sublime Text.
2. Web-ресурс программы DECIPHER (<http://www2.decipher.codes/DesignPrimers.html>) [16].
3. Матрица выровненных последовательностей из предыдущей задачи. Доступна по ссылке в Приложении.

Ход работы:

1. Открываем файл с матрицей выровненных последовательностей в редакторе Sublime Text. Сейчас все последовательности имеют разные имена (текст после знака « > »), однако для работы с DECIPHER нам необходимо от последовательности каждого вида оставить только видовое название. Таким образом, после этой процедуры последовательности, принадлежащие одному виду, будут иметь одинаковые имена.

2. Сохраняем файл под именем, отличным от имени оригинальной матрицы (например, Acip_DECIPHER.fasta).

3. Проходим на страницу <http://www2.decipher.codes/DesignPrimers.html> (Рисунок 3).

4. Оставляем все параметры по умолчанию, кроме «PCR Product Amplicon». Продукт не должен превышать 400 п.о.

5. В поле «Target group» вводим название последовательностей вида, для которого нужно подобрать видоспецифичные праймеры. В данном случае это «Acipenser_mikadoi».

6. С помощью кнопки «Обзор» подгружаем отформатированную матрицу последовательностей (см. пункты 1 и 2).

7. Далее нажимаем кнопку «Submit» и ждём завершения работы программы.

8. По завершению работы появится окно, в котором приводятся «Design Primers - Results». По ссылке после «Detailed results can be downloaded» скачиваем результаты (таблица в текстовом формате) на компьютер.

Design PCR Primers

Use DECIPHER's Design Primers web tool to design the optimal set of PCR primers for targeting one group of DNA sequences in the presence of many non-target groups.

F.A.Q.

Inputs

Outputs

Use *Taq* 3'-end Model to improve specificity?: [?]
☐ No ☒ Yes ☐ Yes and induce a mismatch

Primers: [?] Length - nucleotides with up to permutation(s)

PCR Product Amplicon: [?] Length - base pairs

Reaction Conditions: [?]
[Na⁺] = mM, [Mg⁺⁺] = mM, [dNTPs] = mM
Annealing Temperature = °C, [Primers] = nM

Target group: [?] with at least % coverage

Choose aligned FASTA file (limit 50 MB): [?]

Обзор...

Dloop_Acip_deciph.fasta

Submit

Рисунок 3. Часть web-страницы DECIPHER с формой ввода параметров для подбора праймеров.

Контрольные вопросы к практической работе:

1. Какие из участков митохондриального генома являются предпочтительными при идентификации видов? Обоснуйте ответ.
2. Для чего необходимо выравнивание последовательностей перед дальнейшим анализом?
3. Для чего важно использовать последовательности близкородственных видов при разработке видоспецифичных праймеров?
4. Для чего при запуске DECIPHER было выбрано ограничение по длине фрагмента в 400 пар оснований?

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №2

Тема: Работа с данными маркеров различных типов. Интерпретация результатов гель-электрофореза белков и нуклеиновых кислот. Считывание и первичный расчёт данных. Проверка специфичности разработанных олигонуклеотидов.

На данном этапе в нашем распоряжении имеется 10 пар олигонуклеотидов, предложенных алгоритмом DECIPHER, которые нацелены на амплификацию фрагментов участка *D-loop* длиной не более 400 пар оснований. В идеальном варианте все эти праймеры при проведении ПЦР должны амплифицировать участок *D-loop* только у вида *A. mikadoi*, в то время как для всех остальных живых организмов они должны быть неспецифичными. Однако, как правило, лишь небольшая доля разработанных таким образом праймеров отвечает данному условию. Нам необходимо выяснить, какие из пар праймеров идеально подходят для поставленной задачи – безошибочной идентификации сахалинского осетра. Проверка специфичности олигонуклеотидов обычно проходит в два этапа. На первом предполагается использование вычислительных методов, в основе которых сравнение с базой данных нуклеотидных последовательностей в NCBI. Это позволяет «отбраковать» пары праймеров, которые могут гибридизоваться с ДНК других организмов. Второй этап предполагает экспериментальную проверку на основе предварительно отобранных и синтезированных последовательностей праймеров. В ходе эксперимента обычно оценивают чувствительность олигонуклеотидов при обнаружении ДНК искомого организма. Эксперимент предполагает постановку ПЦР (полимеразной цепной реакции) в присутствии в качестве матрицы ДНК раствора тотальной ДНК искомого организма совместно с праймерами, утверждёнными по результатам первичной проверки. Синтез последовательностей праймеров для эксперимента осуществляют в коммерческих компаниях (например, Евроген, Синтол, Сибэнзим и др.). Для оценки чувствительности проводят двухкратные серийные разведения раствора тотальной ДНК и используют их в качестве матрицы. Результаты ПЦР проверяют путём электрофореза ПЦР-продуктов в агарозном геле с достаточно высоким для длины продуктов разрешением и визуализацией под ультрафиолетовым

светом после экспонирования геля в растворе интеркалирующего красителя (обычно бромистый этидий). На чувствительность указывает интенсивность свечения фрагмент-специфичных полос на геле. Процедуру выделения ДНК можно выполнить согласно методам, описанным в соответствующем методическом пособии [18].

ЗАДАЧА 1: провести проверку разработанных олигонуклеотидов *in silico*, с помощью средств NCBI.

Цель работы: освоить навыки работы с web-интерфейсом программы Primer-BLAST и научиться оценивать с её помощью специфичность олигонуклеотидов.

Оборудование:

Персональный компьютер с доступом к сети интернет.

Программы и ресурсы:

1. Программа для работы с электронными таблицами (Microsoft Excel или аналог).
2. Web-ресурс программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) [19].
3. Таблица с выводными данными программы DECIPHER. Доступна по ссылке в Приложении.

Ход работы:

1. Импортируем файл с выводными данными программы DECIPHER в Microsoft Excel. Для проверки нам понадобятся нуклеотидные последовательности праймеров, представленные в колонках «forward_primer.1» (прямой) и «reverse_primer.1» (обратный). Также мы будем опираться на длину фрагмента в колонке «product_size».
2. Проходим на страницу Primer-BLAST <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Рисунок 4).

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)

AAGGCTGTCTAGAACATTAGTT

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)

CCATTCACATATTCATTCTCTGGGAG

Clear

Min

Max

PCR product size

70

400

of primers to return

10

Primer melting temperatures (T_m)

Min

Opt

Max

Max T_m difference

57.0

60.0

63.0

3

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span

No preference

Exon junction match

Min 5' match

Min 3' match

Max 3' match

7

4

8

Minimal and maximal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction

Intron inclusion

☐ Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range

Min

Max

1000

10000

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Note: Parameter values that differ from the default are

Specificity check

☒ Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode

User guided

Database

nr

Exclusion

☐ Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix)

☐ Exclude uncultured/environmental

Organism

Actinopterygii (taxid:7898)

Add organism

Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency

Primer must have at least

2

total mismatches to unintended targets, including

at least

2

mismatches within the last

5

bps at the 3' end

Ignore targets that have

6

or more mismatches to the primer

Max target amplicon size

4000

Allow splice variants

☐ Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

Get Primers

☒ Show results in a new window

☒ Use new graphic view

Рисунок 4. Часть web-страницы Primer-BLAST с формой ввода параметров для оценки праймеров.

3. Выбираем одну из пар праймеров в таблице.

4. В секции «Primer Parameters» вставляем последовательности выбранной пары прямого (Use my own forward primer) и обратного (Use my own reverse primer) праймеров.

5. Выставляем значения получаемого ПЦР-продукта (PCR product size) не более 400 пар оснований.

6. В секции «Primer Pair Specificity Checking Parameters» во всплывающем списке поля «Search mode» выбираем «User guided», в «Database» — «nr». В поле «Organism» вводим таксон Actinopterygii. В данном случае мы ограничиваем этим таксоном область поиска в NCBI. Все остальные параметры оставляем по умолчанию и нажимаем «Get primers».

14

7. Через некоторое время появится окно «Primer-BLAST Results», в котором будут отражены результаты анализа (Рисунок 5). Если в списке обнаруженных последовательностей присутствует только искомый вид, и длина обнаруженного фрагмента не превышает заданную, то данная пара праймеров удовлетворяет требованиям поиска и с ней можно продолжать работу по экспериментальной оценке.

Primer pair 1			
		Sequence (5'->3')	
Forward primer		AAGGCCTGTCTAGAACATTAGGTT	
Reverse primer		CCATTCACATTCATTCCTCTGGGAG	
Products on target templates			
> KX276658.1 Acipenser mikadoi voucher VIII.9.4 (#4) mitochondrion, complete genome			
product length = 308			
Forward primer	1	AAGGCCTGTCTAGAACATTAGGTT	24
Template	16011	16034
Reverse primer	1	CCATTCACATTCATTCCTCTGGGAG	26
Template	16318	16293

Рисунок 5. Часть web-страницы Primer-BLAST с результатами оценки одной из пар праймеров.

ЗАДАЧА 2: провести проверку разработанных олигонуклеотидов экспериментально, с помощью ПЦР.

Цель работы: освоить навыки постановки ПЦР и научиться оценивать с её помощью специфичность и чувствительность набора олигонуклеотидов для идентификации ДНК искомого организма.

Оборудование и материалы:

1. Амплификатор.
2. Вортекс.
3. Набор автоматических дозаторов объёмом от 10 до 1000

мкл.

4. Наконечники пластиковые разного объёма для автоматических дозаторов.
5. Перчатки.
6. Пробирки объемом 0,2 мл для ПЦР.
7. Штатив для пробирок объемом 0,2 мл.
8. Стерильная вода.
9. 5X Taq Red буфер для ПЦР или аналог.
10. Смесь dNTPs.
11. Растворы с прямым и обратным праймерами в рабочей концентрации 10 мкМ.
12. Taq ДНК-полимераза.
13. Раствор тотальной ДНК *A. mikadoi*.
14. Камера для электрофореза, заливочный столик, подложка для гелей, упоры для заливки и гребёнки.
15. Источник питания для электрофоретических камер.
16. Агароза.
17. Жаропрочная колба для заваривания агарозы.
18. Электродный ТВЕ-буфер.
19. Микроволновка.
20. Весы.
21. Раствор бромистого этидия.
22. Трансиллюминатор с системой гель-документирования.

Ход работы:

1. В пробирках объемом 0,2 мл делаем двухкратные серийные разведения тотальной ДНК осетра от 2 до 2048 крат.

2. Производим постановку реакции ПЦР согласно следующим расчётам. Общий объём реакционной смеси – 25 мкл, включает 5 мкл 5X Taq Red буфера, 0.2 мМ dNTPs, по 0,048 мМ прямого и обратного праймеров, 0,25 мкл Taq ДНК-полимеразы, 1 мкл раствора ДНК, а также деионизированую воду до конечного объёма. Термический алгоритм реакции: предварительный нагрев до 98°C – 2 мин., 30 циклов по схеме 98°C – 5 сек., 52°C – 10 сек. и 72°C – 10 сек., а также финальная 5-минутная элонгация при 72°C.

3. Приготавливаем 2% агарозный гель, вносим в лунки по 4 мкл ампликонов и выполняем электрофорез при напряжении 150 V в течение 35 минут (напряжение и длительность электрофореза могут отличаться при разных типах агарозы, а также разных моделях источников питания).

4. После проведения электрофореза экспонируем гель в растворе бромистого этидия в течение 20-25 минут и просматриваем результаты в гель-документирующей системе (Рисунок 6).

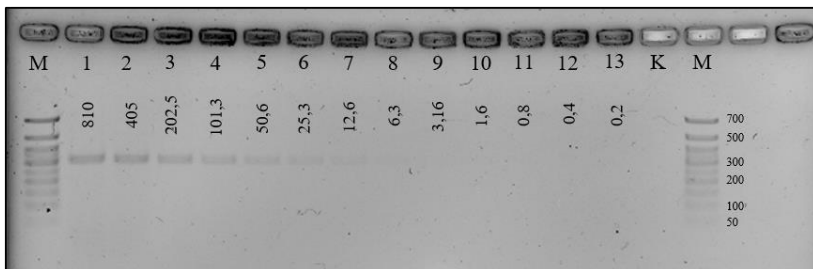


Рисунок 6. Результаты амплификации фрагмента *D-loop* с использованием серийного разведения тотальной ДНК сахалинского осетра *A. mikadoi*. Дорожки от 1 до 13 – ампликоны фрагментов, полученных на основе серийного разведения ДНК от 810 мкг/мкл до 0,2 нг/мкл. М – маркер длин ДНК 50+ bp DNA Ladder. К – отрицательный контроль. Электрофорез выполнен в 2% агарозном геле, в растворе электродного буфера TBE.

Контрольные вопросы к практической работе:

1. Расскажите об основных способах проверки олигонуклеотидов на видоспецифичность.
2. Можно ли использовать для идентификации вида все праймеры, полученные по завершению работы программы DECIPHER и почему?
3. Какие из пар праймеров вы бы выбрали, а от каких отказались по результатам проверки их в Primer-BLAST и почему?
4. Расскажите об основных компонентах реакции ПЦР для идентификации видов.
5. Для чего в ходе оценки чувствительности праймеров проводится раститровка (серийные разведения) тотальной ДНК?
6. На основе данных из рисунка 6 определите диапазон чувствительности разработанного нами ПЦР-теста для идентификации ДНК сахалинского осетра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузнецов, М.Ю. Гидроакустические методы и средства оценки запасов рыб и их промысла. Часть 2. Методы и средства промысловой биогидроакустики / М.Ю. Кузнецов, Ю.А. Кузнецов // Известия ТИНРО. – 2016. – Т. 184. – С. 264-294.
2. Кузнецов, М.Ю. перспективные направления научных исследований и развития гидроакустической техники / М.Ю. Кузнецов, Ю.А. Кузнецов // Технические проблемы освоения Мирового океана. – 2017. – Т. 7. – С. 58-64.
3. Jerde, C. L. “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA / C.L. Jerde, A.R. Mahon, W.L. Chad-derton, D.M. Lodge // Conservation Letters. – 2011. – Vol. 4. – №. 2. – P. 150-157.
4. Siddiqui, S. A. Automatic fish species classification in underwater videos: exploiting pre-trained deep neural network models to compensate for limited labelled data / S.A. Siddiqui, A. Salman, M.I. Malik, F. Shafait, A. Mian, M.R. Shortis, E.S. Harvey // ICES Journal of Marine Science. – 2018. – Vol. 75. – №. 1. – P. 374-389.
5. Hering, D. Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive / D. Hering, A. Borja, J.I. Jones, D. Pont, P. Boets, A. Bouchez, M. Kelly // Water Research. – 2018. – Vol. 138. – P. 192-205.
6. Кирильчик, С.В. Апробация метода количественного анализа ДНК окружающей среды для оценки запасов и мониторинга популяций байкальского омуля / С.В. Кирильчик, М.М. Макаров, П.Н. Аношко, М.С. Астахова, И.Н. Смолин, Е.В. Дзюба // Международный Журнал Прикладных и Фундаментальных Исследований. – 2018. – № 6. – С. 98-102.
7. Mizumoto, H. An Environmental DNA Survey on Distribution of an Endangered Salmonid Species, *Parahucho perryi*, in Hokkaido, Japan / H. Mizumoto, T. Mitsuzuka, H. Araki // Frontiers in Ecology and Evolution. – 2020. – Vol. 8. – P. 1-8.

8. Schenekar, T. Development of a TaqMan qPCR protocol for detecting *Acipenser ruthenus* in the Volga headwaters from eDNA samples / T. Schenekar, M. Schletterer, S.J. Weiss // Conservation Genetics Resources. – 2020. – Vol. 12. – P. 395–397.
9. Tsuji, S. Environmental DNA analysis shows high potential as a tool for estimating intraspecific genetic diversity in a wild fish population / S. Tsuji, A. Maruyama, M. Miya, M. Ushio, H. Sato, T. Minamoto, H. Yamanaka // Molecular Ecology Resources. – 2020. – Vol. 20. – №. 5. – P. 1248-1258.
10. Tsuji, S. Quantitative evaluation of intraspecific genetic diversity in a natural fish population using environmental DNA analysis / S. Tsuji, N. Shibata, H. Sawada, M. Ushio // Molecular Ecology Resources. – 2020. – Vol. 20. – №. 5. – P. 1323-1332.
11. Andres, K. J., Sethi, S. A., Lodge, D. M., & Andrés, J. Nuclear eDNA estimates population allele frequencies and abundance in experimental mesocosms and field samples / K.J. Andres, S.A. Sethi, D.M. Lodge, J. Andrés // Molecular ecology. – 2021. – Vol. 30. – №. 3. – P. 685-697.
12. Pflieger, M.O. Saving the doomed: Using eDNA to aid in detection of rare sturgeon for conservation (Acipenseridae) / M.O. Pflieger, S.J. Rider, C.E. Johnston, A.M. Janosik // Global ecology and conservation. – 2016. – Vol. 8. – P. 99-107.
13. Anderson, J.T. Confirmed Observation: A North American Green Sturgeon *Acipenser medirostris* Recorded in the Stanislaus River, California / J.T. Anderson, G. Schumer, P.J. Anders, K. Horvath, J.E. Merz // Journal of Fish and Wildlife Management. – 2018. – Vol. 9. – №. 2. – P. 624-630.
14. Yusishen, M.E. Development of quantitative PCR assays for the detection and quantification of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) environmental DNA / M.E. Yusishen, F.C. Eichorn, W.G. Anderson, M.F. Docker // Conservation Genetics Resources. – 2020. Vol. 12. – №. 1. – P. 17-19.
15. Рыбы морей России: аннотированный каталог / Н.В. Парин, С.А. Евсеенко, Е.Д. Васильева; – М.: Товарищество научных изданий КМК., 2014. – 733 с.
16. Wright, E.S. Exploiting extension bias in polymerase chain reaction to improve primer specificity in ensembles of nearly

- identical DNA templates / E.S. Wright, L.S. Yilmaz, S. Ram, J.M. Gasser, G.W. Harrington, D.R. Noguera // *Environmental microbiology*. – 2014. – Vol. 16. – №. 5. – P. 1354-1365.
17. Kumar, S. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // *Molecular biology and evolution*. – 2016. – Vol. 33. – №. 7. – P. 1870–1874.
18. Туранов, С.В. Методы фиксации образцов и выделения геномной ДНК из тканей гидробионтов [Текст]: Методические указания / С.В. Туранов. – Владивосток: Дальрыбвтуз, 2017. – 20 с.
19. Ye, J. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, T.L. Madden // *BMC bioinformatics*. – 2012. – Vol. 13. – №. 1. – P. 1-11.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Ссылки на готовые наборы данных от промежуточных этапов работы с нуклеотидными последовательностями.

Обозначение набора данных	Ссылка на репозиторий ресурса GitHub
Матрица не выровненных последовательностей контрольного региона осетров	https://github.com/Sturcoal/MolGenAqua/blob/master/Acipenser_D-loop_unaligned.fas
Матрица выровненных последовательностей контрольного региона осетров	https://github.com/Sturcoal/MolGenAqua/blob/master/Acipenser_D-loop_aligned.fas
Отформатированная матрица последовательностей, подготовленная для работы с DECIPHER	https://github.com/Sturcoal/MolGenAqua/blob/master/Dloop_Acip_deciph.fasta
Выводные данные программы DECIPHER после завершения расчётов	https://github.com/Sturcoal/MolGenAqua/blob/master/Dloop_DECIPHER_results.txt
Пара наилучших праймеров	https://github.com/Sturcoal/MolGenAqua/blob/master/D-loop_best_primers.txt