



## Сравнительное медико-генетическое исследование мускуса кабарги сибирской (*Moschus moschiferus*)

Н.Н. Каркищенко, Н.В. Петрова, В.Н. Каркищенко, В.В. Слободенюк, М.И. Воронова, Ю.В. Фокин

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: акад., д.м.н. Каркищенко Николай Николаевич, scbmt@yandex.ru

Разработана и предложена тест-система для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с целью верификации обыкновенной, или сибирской, кабарги (*M. moschiferus*). Данная тест-система позволяет в короткие сроки и с большой эффективностью дифференцировать природное сырье мускуса кабарги от мускуса других видов животных (бобра, оленья европейского, косули европейской, лося обыкновенного). При этом отмечается высокая видовая специфичность системы, позволяющая с большой степенью точности проводить контроль качества сырья мускуса кабарги.

**Ключевые слова:** кабарга (*M. moschiferus*), мускус, ген-мишень, нуклеотидные последовательности, ПЦР-система в режиме реального времени.

### Введение

«Кабарговая струя» (или мускус) была известна с глубокой древности. О кабарожем мускусе еще в V веке писал Евсевий Иероним, церковный писарь, автор латинского перевода Библии, о нем упоминается в сочинениях древних арабских врачей в конце XIX века [9].

Мускус содержится в препуциальной железе самцов кабарги, расположенной на нижней части брюха вблизи мочеполювого отверстия. В состав мускуса входят разнообразные органические вещества. Вещество, имеющее очень стойкий приятный запах мускуса, – мускон, или мусконоподобные кетоны и альдегиды – впервые было выделено в 1906 г. из желез южных подвидов кабарги. Кро-

ме него, в состав мускуса входят воски, мужские стероидные гормоны и др. биологически активные соединения [15, 22]. Мускус обладает общестимулирующим действием, повышает сексуальную активность. Он считается эффективным лекарством от конвульсий, удушья, ушибов и нарывов [14, 17, 18].

С середины XVI века или ранее мускус из Восточной Сибири и Приморья попал в Китай. У охотников ценились не мясо и шкура, поскольку за одну «струю», т.е. один мешочек с мускусом массой 30-40 г, купцы платили от 6-ти до 15-ти рублей золотом. И это притом, что, согласно «Домострою», в XVI веке за 3 копейки серебром можно было купить крестьянскую избу, а за 1-3 рубля – хорошую

корову или лошадь с подводом. По данным, 11 копеек серебром составлял месячный прожиточный лимит москвича. В середине XVII века постройка дома в Москве обходилась в 10 рублей. Апогея это хищничество достигло в 1855 г., когда охотниками Восточной Сибири было добыто 81200 «струй». В Европе мускусу, помимо медицинского, нашли новое применение: его стали добавлять в изделия парфюмерной промышленности – главным образом, в особо дорогие духи, отчего стойкость запаха духов увеличивалась в несколько раз. Из-за спроса восточного и западного рынков промысел кабарги еще более усилился. Кабаргу называли «оленом с роковым запахом». В 1985 г. стоимость мускусного секрета на мировом рынке составляла 30-45 тыс. долларов за 1 кг [5, 21].

В восточной медицине из мускуса изготавливается более ста лекарственных препаратов. Для изготовления части подобных «лекарств» спекулянты от торговли и медицины используют не только железу самцов (струю), но и всю тушу или ее части, т.е., в современном понимании, на рынок поставляется контрафакт. В давние времена в Китае было известно не менее трех сортов мускуса разной биологической активности и ценности. Популярность и дороговизна мускуса положили начало массовому истреблению кабарги. Самый варварский, но простой способ получения этого продукта – вырезать железу из тела убитого самца. В высушенном виде кабарожья струя может храниться в течение многих лет [23, 13].

Ежегодно из России нелегально вывозится кабарожьего мускуса на сумму 25 млн долларов США, – сообщается в газете «Деловой вторник», № 25, 2000.

Сложившаяся сейчас полукриминальная ситуация на рынке животного и растительного сырья ведет к разграблению природных ресурсов. Исследования генетики животных столь разнообразны, что привести все данные, накопленные по какому-либо виду, даже такому малоизученному как кабарга, в небольшой публикации очень сложно. Данная публикация включает результаты исследования, направленного на безусловное подтверждение природного сырья и его компонентов (мускуса кабарги), осуществление входного контроля субстанций при изготовлении лекарственных средств, исключение контрафактных продуктов. Достаточно сказать, что цена, по которой струя покупается у российского охотника, отличается от цены мускуса в Гонконге в 20-25 раз [1], при этом часто поставляется на рынок в форме контрафакта.

#### **Виды кабарги, их генотипы, карิโอ-типы, фенотипы**

Родовое и видовое названия кабарги (*Moschus moschiferus*) были даны К. Линнеем в 1758 г. В дальнейшем последовал этап выделения и описания около 10-ти отдельных видов кабарги из разных частей ареала, вновь объединяемых другими исследователями в один. Однако виды кабарог продолжали выделять вплоть до 1980-х гг. (*Moschus fuscus* Li – в 1981; *M. cupreus* Grubb – в 1982 г.). В XX в. наметилась тенденция к интеграции всех этих «видов» в несколько основных или даже один вид.

Флеров (1930, 1952) [10, 11, 12] выделял всего 3 вида кабарог: обыкновенную кабаргу (*M. moschiferus*), китайско-гималайскую кабаргу (*M. chrysogaster*) и кабаргу Березовского (*M. berezowski*) из провинций Китая Сычуань и Гань-

су. Еще раньше Р. Лидеккер и Цалкин (1947) [2] объединили все «виды» в один прежний. В пределах этого вида последний автор выделил 7 подвидов, предложил схему их эволюции и расселения. На разных этапах кабарог объединяли в одно семейство с оленьками (*Tragulidae*), но А. Milne-Edwards (1864) [19] выявил значительные различия между оленьками и кабаргами; с оленями (*Cervidae*), от которых у кабарог также имеются существенные отличия.

В настоящее время многие зоологи придают кабаргам статус отдельного семейства *Moschidae* в отряде парнокопытных (*Artiodactyla*). Различия во мнениях относительно количества видов в роде *Moschus*, единственного в семействе кабарог, присутствуют и в настоящее время. Существуют мнения о трех или даже семи видах кабарог [16]. Др. зоологи придерживаются позиции монотипии рода.

В систематике до сих пор не выработано четких критериев для разграничения не только видов мелких животных, но и таких крупных зверей, как кабарга и лось. Данные о систематическом разграничении семейства, рода и вида кабарог, даже без учета разногласий в отношении разных форм к разным подвидам или видам, необходимы для планирования использования и охраны кабарги в разных частях ареала.

Разделение кабарог на подвиды, сделанное В.И. Цалкиным (1947) [2], почти совпадает с их более поздними классификациями для территории России. Цалкин описал различия между северными и южными группами ее подвидов (два основных – мосхиферный, сифаноидный – и смешанный типы черепа), постепенную (клинальную) изменчивость

некоторых морфологических признаков у современных кабарог с юга к северу.

Соколов, Приходько (1997, 1998), Приходько (2003) [4, 7, 8], проведя краниологический анализ, выделили группу подвидов, которую они назвали «*sibirica nov.*» и для которой характерна относительно более короткая и высокая роstralная часть головы [2]. К ней они отнесли:

- сибирскую, или обыкновенную, кабаргу (*M. m. moschiferus*), распространенную на Алтае, в Восточной Сибири на запад до Енисея и на восток до реки Лены, в Забайкалье, Северной Монголии, в Большом и Малом Хингане и на западе Станового хребта;

- арктическую, или верхоянскую, кабаргу (*M. m. arcticus* Флеров, 1935) [3], заселяющую Верхоянский хребет и хребет Черского на запад до реки Лены и на восток до Колымы, Алдана и Станового хребта;

- дальневосточную кабаргу (*M. m. turowi*, *syn. M. m. turowi*, Цалкин, 1945) [3], обитающую в Сихотэ-Алине и на запад до реки Зеи;

- сахалинскую кабаргу (*M. m. Sachalinensis*, Флеров, 1935) [3], населяющую Сахалин.

К группе подвидов «*hymalaica nov.*», для которой характерна удлинённая форма роstralной части головы (морды) и нижней челюсти, ювенильные признаки в строении черепа некоторых подвидов в сравнении с северными [2], отнесены:

- корейский подвид (*M. m. parvipes* Hollister, 1911) [3], заселяющий п-ов Корея и прилежащие территории;

- китайская кабарга (*M. m. chryso-gaster* Hodgson, 1839) [3], распространенная в Центральном и Южном Китае, Тибете, Гималаях;

• гималайская кабарга (*M. m. leucogaster* Hodgson, 1839) [3], населяющая Тибет и Гималаи. Др. авторы выделяют в пределах южной группы форм многочисленные подвиды или виды. Некоторые из синонимов, которыми называют разные авторы ее южные и северные подвиды, приведены в книгах [2, 4]. Очевидно, что систематика «зарубежных» кабарог в плане присущего российским зоологам подхода разработана недостаточно.

Тем не менее, на территории бывшего Советского Союза и РФ обитает единственный вид кабарги – кабарга сибирская (*Moschus moschiferus*), который разделен на пять подвидов:

- 1) *M. m. moschiferus* – Алтай, Саяны, Монголия;
- 2) *M. m. sibiricus* – Забайкалье, Якутия;
- 3) *M. m. arcticus* – северо-восточная Сибирь к востоку от р. Лены;
- 4) *M. m. turovi* – Амурская область, Приморский край;
- 5) *M. m. sachalinensis* – Сахалин.

Все ныне живущие кабарги не столь сильно отличаются по морфологическим признакам друг от друга, как, например, разнообразные виды антилоп семейства Настоящих оленей (*Cervidae*) или быков семейства Бычьих (*Bovidae*). Незрелая морфологическая дифференциация сказывается, в частности, на существовании основных и промежуточных типов черепа разных форм кабарги, на клинальной их изменчивости [8, 2]. Лучше дифференцированы друг от друга более древние подвиды из южной части ареала, в становлении которых большое значение имела длительная географическая изоляция.

Столь же неопределенны и небольшие известные различия в наборе хромосом. Хромосомный набор кабарги содержит  $2n=58$  хромосом, иногда – В-хромосомы [6, 8]. Эти исследования выявили значительное сходство набора хромосом кабарог из Республики Алтай, Бурятии, Западных Саян и Иркутской области и небольшие отличия от них у одного самца дальневосточной кабарги (добавочные хромосомы, расположение мелких точечных хромосом-спутников в верхней части 4-й пары аутосом).

Хромосомный набор кабарги Березовского [20] практически не отличается от кариотипа сибирской кабарги. Как считают указанные авторы, эти признаки могут свидетельствовать в пользу монотипии рода *Moschus* на всем протяжении своего ареала.

Этот факт и подтверждает данные депонированных нуклеотидных последовательностей генов рода *Moschus* во всемирной базе данных NCBI GenBank, в которой на сегодняшний день отражены нуклеотидные последовательности генов обыкновенной (сибирской) кабарги (*M. moschiferus*), китайско-гималайской (*M. chrusogaster*) и кабарги Березовского (*M. berezowski*).

### Цель исследования

Целью нашего исследования являлся выбор наиболее перспективного гена, экспрессия которого стабильна на всем протяжении жизнедеятельности организма, а нуклеотидные последовательности менее всего подвержены мутациям. Данный ген, присущий всем видам рода *Moschus moschiferus*, или по отдельным ее видам, позволит создать уникальную систему ПЦР в режиме реального времени для контроля чистоты сырья мускуса кабарги.

Задачами исследования являлись:

- поиск генов-мишеней, депонированных в базе данных NCBI GenBank;
- проведение биоинформационного анализа последовательностей генов, специфичных для рода кабарги *Moschus moschiferus*;
- отбор наиболее перспективных нуклеотидных последовательностей генов-мишеней;
- синтез видоспецифичных праймеров и зондов при создании ПЦР-системы в режиме реального времени;
- подбор и исследование расчетным и эмпирическим путем оптимальных конечных концентраций компонентов ПЦР-системы в режиме реального времени: дезоксинуклеотидтрифосфатов, ионов магния ( $Mg^{2+}$ ) и олигонуклеотидных праймеров и зондов;
- подбор расчетным и эмпирическим путем оптимальной температуры отжига олигонуклеотидных праймеров согласно соотношению оснований G/C и A/T их нуклеотидной последовательности;
- оптимизация количества повторяющихся циклов, при которых происходит наработка специфических продуктов амплификации;

- определение генетической общности внутри вида *Moschus moschiferus*;
- установление различий и верификация мускуса кабарги и его дифференциация с мускусом бобра и образцами видов животных семейства Оленьковые (*Cervidae*): оленя европейского (*Dama dama*), косули европейской (*Capreolus capreolus*), лося обыкновенного (*Alces alces*).

### Материалы и методы

Материалом для проведения исследования служил мускус кабарги. Исследование проводили поэтапно: выделение тотальной ДНК из мускуса кабарги, из тканей и препуциальной железы и др. животных в количестве 100 мг на каждую пробу, амплификация ДНК с помощью ПЦР в режиме реального времени (рис. 1).

Исследование нуклеотидных последовательностей гена *16S rRNA*: при выборе нуклеотидных последовательностей для конструирования олигонуклеотидных праймеров и зондов использовались последовательности гена, депонированные в электронной базе NCBI GenBank.

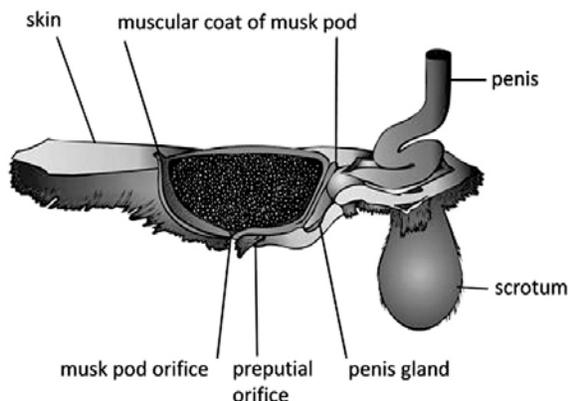


Рис. 1. Схема нативной ткани мочеполовой системы самца кабарги.

Для подбора зондов и праймеров применяли биоинформационный анализ последовательностей генов с помощью комплекса компьютерных программ Vector NTI Advance 9.0 (PC) [25], DNASTAR, BLAST [24]. Исследование будущей структуры олигонуклеотидных праймеров и зонда проводили на отсутствие внутренней вторичной структуры (отсутствие само- и взаимнокомплементарности), отсутствие комплементарности между 3'-концами (праймер-димеров, шпилек). Мечение красителями и гасителями по свойствам флуоресценции и гашения флуоресценции линейных зонда мишеней, с учетом ПЦР в реальном времени, осуществлялось в комбинации (по схеме «флуорофор – олигонуклеотид – гаситель»):

**ROX (карбоксих-Х-родамин) – зонд – BHQ2 (black hole quenchers).**

Вычисление концентрации производилось в соответствии с законом Ламберта-Бера при известной величине поглощения и молярном коэффициенте поглощения.

На значение молярного коэффициента поглощения влияет как состав олигонуклеотида, так и взаимодействия гетероциклических оснований, т.е. последовательность олигонуклеотида. Таким образом, зная значение поглощения (показатель спектрофотометра) и вычислив значение молярного коэффициента поглощения, мы рассчитываем концентрацию олигонуклеотида в растворе (мкМ) по уравнению Ламберта-Бера:

$$A = \epsilon \times C \times l,$$

где  $A$  – поглощение (ОЕ),  $\epsilon$  – молярный коэффициент поглощения ( $M^{-1}cm^{-1}$ ),  $C$  – концентрация (М),  $l$  – длина оптического пути (см).

Определение поглощения ( $A$ ), измеренное при 260 нм в кювете с длиной

оптического пути 1 см, равно количеству олигонуклеотида в 1 мл воды. Концентрация олигонуклеотида в р-ре зависит от длины и последовательности, которые определяют значение суммарного молярного коэффициента поглощения ( $\epsilon$ ).

Отработку специфичности линейного зонда и праймеров для гена *16S rRNA* рода *Moschus* проводили в результате кратных амплификаций выделенной ДНК и с последующим анализом результатов порогового значения амплификации, при граничном значении порогового цикла  $Ct < 28$  регистрировали специфический уровень флуоресцентного сигнала по каналу ROX.

В работе применялся фермент ПЦР – HotTaq-полимераза. Для активизации фермента перед проведением ПЦР проводили прогревание реакционной смеси с ферментом при  $95^{\circ}C$  в течение 15 мин (горячий старт). Для HotTaq-полимеразы в реакционной смеси использовался  $\times 10$  ПЦР-буфер следующего состава: 700 мМ Трис-НСl, рН 8,3 /  $25^{\circ}C$ , 166 мМ  $(NH_4)_2SO_4$ . Концентрация  $\times 10$  ПЦР-буфера в рабочей реакционной смеси доводилась до однократной концентрации.

Расчет оптимальной температуры отжига олигонуклеотидных праймеров и зондов проводили по формуле (1), если суммарная длина нуклеотидной последовательности не превышала 20 оснований:

$$T_m = [(A + T) \times 2^{\circ}C] + [(G + C) \times 4^{\circ}C] \quad (1);$$

по формуле (2) – если суммарная длина олигонуклеотида составляла 20-30 оснований:

$$T_m = 22 + 1,46 ([2 \times (G + C)] + (A + T)) \quad (2),$$

где:  $T_m$  – температура отжига,  $A$  – число оснований аденина,  $T$  – число

оснований тимина, G – число оснований гуанина, C – число оснований цитозина.

Выделение ДНК проводили методом магнитной сепарации с помощью набора для выделения МАГНО-сорб («ИнтерЛабСервис», Россия) на автоматической станции выделения нуклеиновых кислот и белков Kingfisher DUO («Thermo Scientific», Финляндия).

Аmplификацию с последующим определением гена *16S rRNA* проводили в 25 мкл смеси: ПЦР-буфер ( $\times 10$ ): 700 mM Трис-HCl, pH 8,6 / 25°C, 166 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTPs, 2,5 E HotTaq-полимеразы. Для амплификации фрагментов гена *16S rRNA* применяли условия амплификации: 95°C – 5 мин, затем 45 циклов: 95°C – 30 с, 55,5°C – 30 с, 72°C – 30 с. Детекцию накопления продуктов реакции в режиме реального времени (Real-Time) проводили с помощью детектирующего амплификатора CFX-96 («Bio-Rad», США).

### Результаты и их обсуждение

На основании проведенного мониторинга генома рода *Moschus*, депонированного в базе данных NCBI GenBank, было установлено, что геном кабарги представлен ограниченным числом генов, большая часть из которых не имеет строго специфичных последовательностей, присущих только роду *Moschus*.

Одним из более перспективных генов рода *Moschus*, представленных в базе, был определен ген *16S rRNA*. Данный ген, по литературным данным, используется многими учеными мира для построения и изучения систематики, эволюционного родства различных живых систем. Ген *16S rRNA* участвует

в синтезе абсолютно всех рибосомальных белков внутри каждой клетки организма, обеспечивая тем самым жизнедеятельность на постоянном уровне, и эволюционно практически не подвержен мутациям. По своей структуре ген *16S rRNA* имеет как сходство между видами, так и индивидуальность, специфичность, присущую только конкретному роду/виду организма. Именно родовая специфичность нуклеотидных последовательностей гена *16S rRNA* кабарги позволила определить его как потенциальную мишень.

По результатам проведенного биоинформационного анализа нуклеотидных последовательностей гена *16S rRNA* рода *Moschus*, депонированных в базе NCBI GenBank, были подобраны наиболее перспективные последовательности для создания олигонуклеотидных праймеров и зонда (табл.).

Для подбора форвард-прайма использовали разработанную нами ПЦР-систему в реальном времени для быстрого и высокоточного выявления специфичной нуклеотидной последовательности гена *16S rRNA* на участке 1-188 п.н. Для подбора реверс-прайма использовали нуклеотидную последовательность гена *16S rRNA* на участке 175-334 п.н. Для подбора нуклеотидной последовательности зонда использовали последовательность гена *16S rRNA* на участке 67-200 п.н. (табл.).

В результате проведения ПЦР-исследования ДНК кабарги с применением подобранных праймеров и зонда на основе последовательности гена *16S rRNA* рода *Moschus* были получены специфические результаты в режиме реального времени по каналу детекции ROX (рис. 2).

## Олигонуклеотидные праймеры и зонд ПЦР-системы

Исследуемая мишень гена 16S rRNA	Олигонуклеотидные праймеры и зонд
Mom F	ACCAAAGCTAGCCCACAATTTCACTCAACCTAACAATCAAAGCAAAATAAA ACAAAACATTTATTTAATACCTTAAAGTATAGGAGATAGAAATTTAACTTGG CGCTATAGAGAAAGTACCGTAAGGGAACGATGAAAGAAAATATACAAAGTAT AAAAAGCAAAGATTACCCCTTGTACCTTTTG
Mom R	CCTTGTACCTTTTGCATAATGAGTTAACTAGTATGAAGCTTAACAAAACG AATTCAGCTAAGCCACCCGAAACCAGACGAGCTACSTATGAACAGTT TATTAAGAACCAACTCATCTATGTAGCAAATAGTGAGAAGATTTATAGG TAGAGGTGACACGCC
Mom Z	AATACCTTAAAGTATAGGAGATAGAAATTTAACTTGGCGCTATAGAGAAAG TACCGTAAGGGAACGATGAAAGAAAATATACAAAGTATAAAAAAGCAAAGAT TACCCCTTGTACCTTTTGCATAATGAGTTA

В результате проведенной на первом этапе работы все образцы ДНК кабарги имеют специфическое накопление продукта амплификации, детектируются прибором в виде логарифмической кривой, т.е. показали себя как положительные.

Полученные данные свидетельствуют о специфичности ПЦР-системы в

режиме реального времени в отношении дифференциации рода *Moschus* и, следовательно, возможности проводить качественную ПЦР-диагностику гена, присущего всем видам рода *Moschus*, и осуществлять контроль чистоты сырья мускуса.

В качестве апробации данной ПЦР-системы нами проведен эксперимент, в

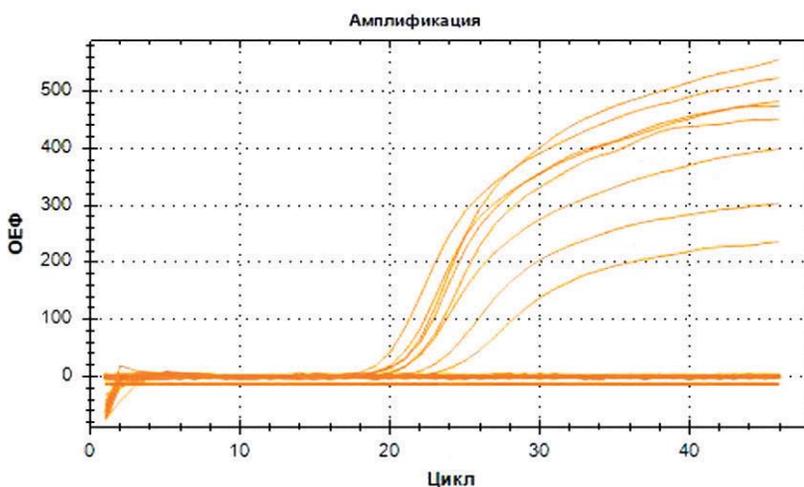


Рис. 2. Графическое изображение сигналов флуоресценции проведенной амплификации мускуса кабарги сибирской *Moschus moschiferus*.

По оси абсцисс – циклы амплификации, по оси ординат – относительные единицы флуоресценции (ОЕФ).

котором исследуемыми образцами являлись:

- ДНК мускуса кабарги Natural Qinghai Wild Deer Musk Grains Moschus Quality Assurance Muskiness (Китай);
- ДНК мускуса кабарги Natural Xizang Deer Musk Grains Moschus Quality Assurance Tibet Muskiness (Китай);
- ДНК мускуса кабарги, обитающей на территории России в республике Алтай;
- ДНК соединительнотканной части препуциальной железы кабарги, обитающей на территории России в республике Алтай;
- ДНК бобрового мускуса, или струи бобра обыкновенного (Castor fiber).

Этот животный продукт, выработанный секреторными железами, характеризуется буроватым цветом и мускусным запахом, также может использоваться как фальсификат мускуса кабарги.

По окончании проведенной пробоподготовки и амплификации с выбран-

ными праймерами и флюоресцирующим зондом по предоставленной выше программе получили следующие результаты.

На рис. 3 отображены детектируемые положительные образцы мускуса кабарги Natural Qinghai Wild Deer Musk Grains Moschus Quality Assurance Muskiness, мускуса кабарги Natural Xizang Deer Musk Grains Moschus Quality Assurance Tibet Muskiness, ДНК мускуса кабарги, обитающей на территории России в Республике Алтай, а также ДНК соединительнотканной части препуциальной железы кабарги, обитающей на территории России в Республике Алтай.

В отрицательных пробах мускуса бобра не выявляется специфичного продукта амплификации.

На третьем этапе эксперимента в качестве исследуемых образцов были выбраны ДНК разных животных, в т.ч. кабарга, относящихся к большому отряду парнокопытных и подотряду жвачных, а также:

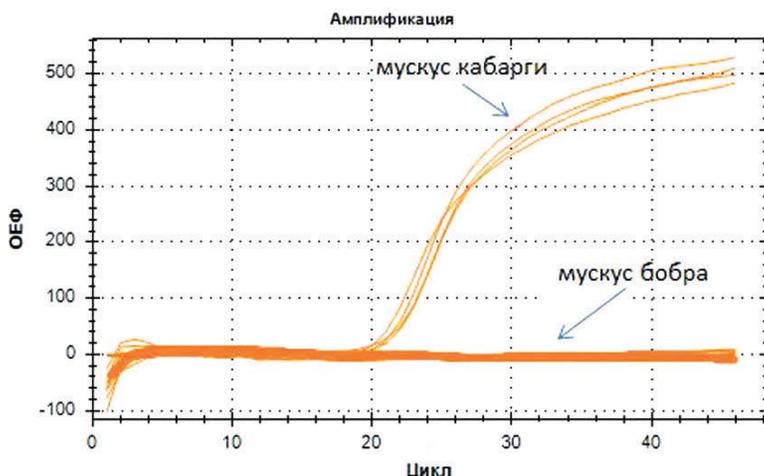


Рис. 3. Сравнительное графическое изображение сигналов флуоресценции продуктов амплификации мускуса кабарги и струи (мускуса) бобра.

По оси абсцисс – циклы амплификации, по оси ординат – относительные единицы флуоресценции (ОЕФ).

- ДНК оленя европейского (*Dama dama*),
- ДНК косули европейской (*Capreolus capreolus*),
- ДНК лося обыкновенного (*Alces alces*).

В результате проведенной амплификации разработанной тест-системой получили следующие итоговые данные: отсутствие специфичного сигнала (рис. 4) у исследуемых образцов оленя, косули и лося значит, что ДНК этих животных не имеют искомого участка, проявили себя отрицательно. Пробы с ДНК кабарги из разных источников дифференцированы со специфичным продуктом амплификации, а значит, являются положительными. Зарегистрированы пробы мускуса кабарги и ткани препуциальной железы кабарги.

Полученные данные свидетельствуют о работоспособности подобранной ПЦР-системы, позволяющей проводить

верификацию рода *Moschus* в режиме реального времени, с применением флуоресцирующего зонда.

После генотипирования проведено исследование профиля химического состава мускуса кабарги в лаборатории биоаналитических исследований ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, представленное в следующей статье.

### Выводы

1. Получена ПЦР-система в режиме реального времени для верификации обыкновенной, или сибирской, кабарги (*M. moschiferus*), геном-мишенью в которой выступает ген *16S rRNA*.

2. Разработанная тест-система позволяет в короткие сроки и с большой эффективностью дифференцировать природное сырье для последующих этапов производства.

3. Осуществлен поиск генов-мишеней, депонированных в базе данных NCBI GenBank.

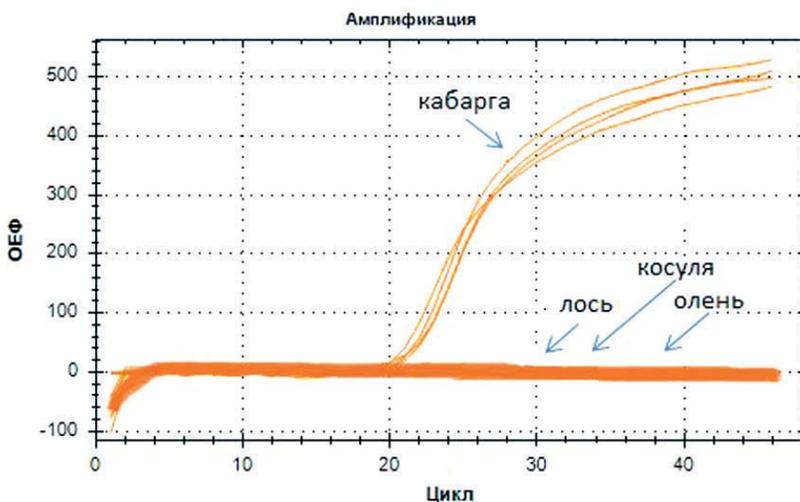


Рис. 4. Графическое изображение сигналов флуоресценции продуктов амплификации мускуса кабарги и мышечных тканей косули, лося, оленя. По оси абсцисс – циклы амплификации, по оси ординат – относительные единицы флуоресценции (ОЕФ).

4. Проведен биоинформационный анализ последовательностей генов, специфичных для рода кабарги *Moschus moschiferus*.

5. Выбраны наиболее перспективные нуклеотидные последовательности генов-мишеней.

6. Синтезированы видоспецифичные праймеры и зонд для создания ПЦР-системы в режиме реального времени.

7. Расчетным и эмпирическим путем подобраны и исследованы оптимальные конечные концентрации компонентов ПЦР-системы в режиме реального времени (дезоксинуклеотидтрифосфатов, ионов магния ( $Mg^{2+}$ ) и олигонуклеотидных праймеров и зонда), а также оптимальная температура отжига олигонуклеотидных праймеров согласно соотношению оснований G/C и A/T их нуклеотидной последовательности.

8. Оптимизировано количество повторяющихся циклов, при которых происходит наработка специфических продуктов амплификации.

9. Определено единство внутри вида *Moschus moschiferus*, обусловленное филогенетическим происхождением.

10. Осуществлена верификация мускуса кабарги и его дифференциация с мускусом бобра и образцами др. видов животных семейства Оленьковые (*Cervidae*): оленя европейского (*Dama dama*), косули европейской (*Capreolus capreolus*), лося обыкновенного (*Alces alces*).

### Список литературы

1. **Вайсман А.** Всемирный фонд дикой природы (WWF) намерен бороться с нелегальным промыслом кабарги // Честное Слово. – 2004. – № 392.
2. **Гептнер В.Г., Цалкин В.И.** Систематика кабарги (род *Moschus* L., 1758) // Олени СССР. – М., 1947. – С. 120-176.

3. **Зайцев В.А.** Кабарга: экология, динамика численности, перспективы сохранения. – М.: Изд-во Центра охраны дикой природы, 2006. – 120 с. ISBN 5-93699-052.
4. **Приходько В.И.** Кабарга. Происхождение, систематика, экология, поведение и коммуникация. – М., 2003. – 443 с.
5. **Приходько В.И.** Ресурсы, разведение и охрана кабарги // Состояние популяций, охрана и использование ресурсов кабарги Восточной Сибири. – Иркутск: ИрГСХА, 2003а. – Вып. 1. – С. 149-168.
6. **Соколов В.Е., Орлов В.Н., Чудиновская Г.А., Приходько В.И.** Кариологический анализ кабарги // Докл. 2-го Всесоюз. совещ. по копытным СССР. Копытные фауны СССР. – М. – 1980. – С. 46-47.
7. **Соколов В.Е., Приходько В.И.** Систематика кабарги (*Artiodactyla*, *Mammalia*). Сообщ. I // Известия АН. Сер. биол. – 1997. – № 6. – С. 677-687.
8. **Соколов В.Е., Приходько В.И.** Систематика кабарги (*Artiodactyla*, *Mammalia*). Сообщ. II // Известия АН. Сер. биол. – 1998. – № 1. – С. 37-46.
9. **Устинов С.К.** Загадочные тропы кабарги. – Иркутск: Вост.-Сиб. кн. изд-во, 1989. – 108 с.
10. **Флеров К.К.** К систематике и географическому распространению кабарги (*Moschus moschiferus* L.) // Ежегодник Зоол. Музея Акад. наук СССР. – Т. XXXI. – 1930. – Вып. 1. – С. 1-20.
11. **Флеров К.К.** Кабарги и олени // Фауна СССР. Млекопитающие. – М.-Л. – 1952. – № 55. – Т. 1. – Вып. 1. – 256 с.
12. **Флеров К.К.** Копытные (*Ungulata*) арктических стран // Звери Арктики. – Л., 1935. – С. 105-264.
13. **Хомес Ф.** Сибирская кабарга нуждается в защите // Радиожурнал “Человек и природа”. – 2002.
14. **Чечушков М.А., Канападзе Г.Д., Петрова Н.В., Ревякин А.О.** Таксономическая характеристика кабарги (*M. moschiferus*), разработка и совершенствование методов ее отлова в дикой природе // Биомедицина. – 2017. – № 4. – С. 4-17.
15. **Do J.C., Kitatsuji E., Yoshii E.** Study on the Components of Musk. I. Ether Soluble Components // Chem. Phann. Bull. – 1975. – V. 23. – No. 3. – Pp. 629-635.
16. **Green M.J.B.** The distribution, status and conservation of the Himalayan musk deer (*Moschus*

- chrysogaster) // Biological conservation. – 1986. – No. 35. – Pp. 47-375.
17. **Lee T.H.** Measure and current usage status in Korea of medicine made with endangered species // Proceedings of the Seminar on International Trade in Endangered Wild Fauna and Flora. – Seoul, Republic of Korea, 1995.
  18. **Lydekker R.** Notes on the Mammalian Fauna of the Ward and Upper China alleus // J. Asiat. Soc. Bengal. – 1877. – V. XLVI.
  19. **Milne-Edwards A.** Recherches sur la fatile des Chevrotains // Ann. Sc. Nat. Zool. – 1864. – Ser. V. II.
  20. **Shi L., Ma K.** The mitotic and synaptenemal karyotypes of the musk deer *Moschus berezovskii* F. // Mamm. Chromosome Newslett. – 1986. – V. 27. – No. 1-4. – Pp. 103-108.
  21. **Singh C.B.** Success in captive breeding of musk deer in Uttar Pradesh // Tiger Paper, 1985. – Pp. 31-32.
  22. **Yu D., Das B.C.** Structure of hydroxymuscopiridine A and hydroxymuscopiridine B, two new constituents of musk // Planta Med. – 1983. – V. 49. – No. 3. – Pp. 183-184.
  23. <http://bio.1september.ru/2002/14/1.htm>.
  24. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
  25. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>.
- ### References
1. **Vajsman A.** Vsemirnyj fond dikoj prirody (WWF) nameren borot'sja s nelegal'nym promyslom kabargi [The World Wildlife Fund (WWF) intends to combat the illegal fishing of musk deer]. Chestnoe Slovo [Honor Bright]. 2004. No. 392. (In Russian).
  2. **Geptner V.G., Calkin V.I.** Sistematika kabargi (rod *Moschus* L., 1758) [Systematics of musk deer (genus *Moschus* L., 1758)]. Oleni SSSR [Deer of the USSR]. Moscow, 1947. Pp. 120-176. (In Russian).
  3. **Zajcev V.A.** Kabarga: jekologija, dinamika chislennosti, perspektivy sohraneniya [Kabarga: ecology, population dynamics, perspectives of conservation]. Moscow: Izd-vo Centra ohrany dikoj prirody, 2006. 120 p. ISBN 5-93699-052. (In Russian).
  4. **Prihod'ko V.I.** Kabarga. Proishozhdenie, sistematika, jekologija, povedenie i kommunikacija [The musk deer. Origin, systematics, ecology, behavior and communication]. Moscow, 2003. 443 p. (In Russian).
  5. **Prihod'ko V.I.** Resursy, razvedenie i ohrana kabargi [Resources, breeding and protection of musk deer]. Sostojanie populjacij, ohrana i ispol'zovanie resursov kabargi Vostochnoj Sibiri [The state of populations, the protection and use of the resources of musk deer of Eastern Siberia]. Irkutsk: IrGSKhA, 2003a. Issue 1. Pp. 149-168. (In Russian).
  6. **Sokolov V.E., Orlov V.N., Chudinovskaja G.A., Prihod'ko V.I.** Kariologicheskij analiz kabargi [Karyological analysis of musk deer]. Dokl. 2-go Vsesojuz. soveshh. po kopytnym SSSR. Kopytnye fauny SSSR [Reports of the 2 nd All-Union Conference on Ungulates of the USSR. Hoofed fauna of the USSR]. Moscow. 1980. Pp. 46-47. (In Russian).
  7. **Sokolov V.E., Prihod'ko V.I.** Sistematika kabargi (Artiodactyla, Mammalia). Soobshh. I [Taxonomy of the musk deer (Artiodactyla, Mammalia). Msg. I]. Izvestija AN. Ser. biol. [Proceedings of the Academy of Sciences. Biology series]. 1998. No. 6. Pp. 677-687. (In Russian).
  8. **Sokolov V.E., Prihod'ko V.I.** Sistematika kabargi (Artiodactyla, Mammalia). Soobshh. II [Taxonomy of the musk deer (Artiodactyla, Mammalia). Msg. II]. Izvestija AN. Ser. biol. [Proceedings of the Academy of Sciences. Biology series]. 1998. No. 1. Pp. 37-46. (In Russian).
  9. **Ustinov S.K.** Zagadochnye tropy kabargi [Mysterious trails of musk deer]. Irkutsk: Vost.-Sib. kn. izd-vo, 1989. 108 p. (In Russian).
  10. **Flerov K.K.** K sistematike i geograficheskomu rasprostraneniju kabargi (*Moschus moschiferus* L.) [The taxonomy and geographical distribution of musk deer (*Moschus moschiferus* L.)]. Ezhegodnik Zool. Muzeja Akad. nauk SSSR [Yearbook of Zool. Museum of the Academy of Sciences of the USSR]. V. XXXI. 1930. Issue 1. Pp. 1-20. (In Russian).
  11. **Flerov K.K.** Kabargi i oleni [Musk deer and deer]. Fauna SSSR. Mlekopitajushhie [Fauna of the USSR. Mammals]. Moscow-Leningrad. 1952. No. 55. V. 1. Issue 1. 256 p. (In Russian).
  12. **Flerov K.K.** Kopytnye (Ungulata) arkticheskikh stran [Ungulata of Arctic countries]. Zveri Arktiki [Arctic beasts]. Leningrad. 1935. Pp. 105-264. (In Russian).
  13. **Homes F.** Sibirskaja kabarga nuzhdaetsja v zashite [Siberian musk deer needs protection]. Radiozhurnal "Chelovek i priroda" [Radio journal "Man and Nature"]. 2002. (In Russian).

14. *Chechushkov M.A., Kapanadze G.D., Petrova N.V., Revjakin A.O.* Taksonomicheskaja harakteristika kabargi (*M. moschiferus*), razrabotka i sovershenstvovanie metodov ee otlova v dikoj prirode [Taxonomic characteristics of musk deer (*M. moschiferus*), development and improvement of methods for its capture in the wild]. Biomedicine. 2017. No. 4. Pp. 4-17. (In Russian).
15. *Do J.C., Kitatsuji E., Yoshii E.* Study on the Components of Musk. I. Ether Soluble Components. Chem. Phann. Bull. 1975. V. 23. No. 3. Pp. 629-635.
16. *Green M.J.B.* The distribution, status and conservation of the Himalayan musk deer (*Moschus chrysogaster*). Biological conservation. 1986. No. 35. Pp. 47-375.
17. *Lee T.H.* Measure and current usage status in Korea of medicine made with endangered species. Proceedings of the Seminar on International Trade in Endangered Wild Fauna and Flora. Seoul, Republic of Korea, 1995.
18. *Lydekker R.* Notes on the Mammalian Fauna of the Ward and Upper China alleus. J. Asiat. Soc. Bengal. 1877. V. XLVI.
19. *Milne-Edwards A.* Recherches sur la fatile des Chevrotains. Ann. Sc. Nat. Zool. 1864. Ser. V. II.
20. *Shi L., Ma K.* The mitotic and synaptenemal karyotypes of the musk deer *Moschus berezovskii* F. Mamm. Chromosome Newslett. 1986. V. 27. No. 1-4. Pp. 103-108.
21. *Singh C.B.* Success in captive breeding of musk deer in Uttar Pradesh. Tiger Paper, 1985. Pp. 31-32.
22. *Yu D., Das B.C.* Structure of hydroxymuscopiridine A and hydroxymuscopiridine B, two new constituents of musk. Planta Med. 1983. V. 49. No. 3. Pp. 183-184.
23. <http://bio.1september.ru/2002/14/1.htm>.
24. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
25. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>.

## Comparative medical and genetic study of musk of Siberian musk deer (*Moschus moschiferus*)

N.N. Karkischenko, N.V. Petrova, V.N. Karkischenko V.V. Slobodenyuk, M.I. Voronova, Yu.V. Fokin

A test system for carrying out polymerase chain reaction (PCR) in real time for the purpose of verification of common or Siberian musk deer (*M. moschiferus*) was developed and proposed. This test system makes it possible to differentiate the natural musk deer's musk from musk of other species of animals (beaver, European deer, European roe deer, moose) in a short time and with great efficiency. At the same time, the high specificity of the system is noted, which allows to control the quality of raw musk deer's musk with a high degree of accuracy.

**Key words:** musk deer (*M. moschiferus*), musk, target gene, nucleotide sequences, real-time PCR system.