

РАЗРАБОТКА МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ ПАНЕЛИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ЛОСЯ (*ALCES ALCES*) В СУДЕБНО-ЭКСПЕРТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Д. Э. НЕДЗВЕЦКАЯ¹⁾, С. А. КОТОВА¹⁾, Т. В. ЗАБАВСКАЯ¹⁾,
В. И. РЫБАКОВА¹⁾, А. Е. ГРЕБЕНЧУК¹⁾, И. С. ЦЫБОВСКИЙ²⁾

¹⁾Научно-практический центр Государственного комитета
судебных экспертиз Республики Беларусь, ул. Филимонова, 25, 220114, г. Минск, Беларусь

²⁾БелЮрОбеспечение, пр. Дзержинского, 16, 220069, г. Минск, Беларусь

Для судебно-экспертного исследования биологических следов с мест незаконной охоты на лося разработана панель из 15 микросателлитных (4 тетраплексных и 11 динуклеотидных) локусов и 1 гендерного локуса (амелогенин), реализованная в виде 2 мультиплексных тест-систем. Совокупная сила дискриминирующего потенциала микросателлитной панели на основе общей базы генотипов лося составляет более 99,999 999 999 999 %. Впервые на территории Европы генетические и криминалистические показатели панели локусов оценены на популяционной выборке лосей в масштабе страны (383 образца), а судебно-экспертная методика ДНК-идентификации биологических образцов лося (*Alces alces*) внедрена в национальную правовую систему.

Ключевые слова: микросателлиты; полиморфизм; экспертная идентификация; лось.

Образец цитирования:

Недзвецкая ДЭ, Котова СА, Забавская ТВ, Рыбакова ВИ, Гребенчук АЕ, Цыбовский ИС. Разработка микросателлитной панели для идентификации биологических образцов лося (*Alces alces*) в судебно-экспертных исследованиях. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;2:27–36. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-27-36>

For citation:

Nedzvedskaya DE, Kotava SA, Zabauskaya TV, Rybakova VI, Hrebianchuk AY, Tsybovsky IS. Development of a microsatellite panel for identification of biological samples of moose (*Alces alces*) in forensic research. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;2:27–36. Russian. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-27-36>

Авторы:

Диана Эдуардовна Недзвецкая – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Светлана Александровна Котова – кандидат химических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории технических и криминалистических исследований научного отдела технических, криминалистических и специальных исследований.

Татьяна Викторовна Забавская – старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Вероника Игоревна Рыбакова – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Александра Евгеньевна Гребенчук – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Иосиф Станиславович Цыбовский – ведущий специалист сектора учебно-методической работы управления кадровой и учебно-методической работы.

Authors:

Diana E. Nedzvedskaya, researcher at the laboratory of molecular biology research.

nedzvedskayadiana@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7953-3381>

Sviatlana A. Kotava, PhD (chemistry); leading researcher at the laboratory of technical and criminalistic research, scientific department of technical, criminalistic and special research.

svetlkotova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6521-7732>

Tatsiana V. Zabauskaya, senior researcher at the laboratory of molecular biology research.

zabava_t@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0716-4035>

Veronika I. Rybakova, researcher at the laboratory of molecular biology research.

fishveronika@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-6709-2331>

Aliaksandra Ya. Hrebianchuk, researcher at the laboratory of molecular biology research.

iamsanya94@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1224-3275>

Iosif S. Tsybovsky, leading specialist at the sector of educational and methodical work, division of human resources and educational and methodical work.

tsybovsky@yahoo.com
<https://orcid.org/0000-0002-8611-8215>

DEVELOPMENT OF A MICROSATELLITE PANEL FOR IDENTIFICATION OF BIOLOGICAL SAMPLES OF MOOSE (*ALCES ALCES*) IN FORENSIC RESEARCH

D. E. NEDZVEDSKAYA^a, S. A. KOTAVA^a, T. V. ZABAUSKAYA^a,
V. I. RYBAKOVA^a, A. Ya. HREBIANCHUK^a, I. S. TSYBOVSKY^b

^aScientific and Practical Center of the State Forensic Examination Committee
of the Republic of Belarus, 25 Filimonava Street, Minsk 220114, Belarus

^bBelJurZabespjachjenne, 2b Dzierżyńska Avenue, Minsk 220069, Belarus

Corresponding author: D. E. Nedzvedskaya (nedzvedskayadiana@gmail.com)

For forensic analysis of evidence from illegal hunting sites of moose, a panel of 15 microsatellite (4 tetranucleotide and 11 dinucleotide) loci and 1 sex locus (amelogenin) was proposed. The cumulative power of discrimination of individual based on the common genetic database of moose (for a panel of 15 microsatellite loci) is more than 99.999 999 999 999 %. The genetic and forensic indicators of a microsatellite panel were evaluated on a population sample of moose on a national scale (383 samples) for the first time in Europe and forensic methodology of the DNA identification of the moose (*Alces alces*) introduced into the national legal system.

Keywords: microsatellites; polymorphism; forensic identification; moose.

Введение

Микросателлитные (STR) маркеры широко распространены в геноме большинства эукариот, что делает их эффективным инструментом для оценки генетического разнообразия [1]. За последние два десятилетия наблюдается стремительное расширение опыта использования STR-маркеров в изучении генетических характеристик животных с минимальными априорными знаниями о последовательности генома организма или без них. Поскольку у генетически родственных групп животных фланкирующие области микросателлитов высококонсервативны [2], разработанные для целевого вида локусы могут быть использованы в исследованиях близкородственных таксонов или популяций. Адресная перекрестная амплификация (*cross-species amplification*) позволяет применять ранее открытые микросателлиты в исследованиях новых видов, благодаря чему отпадает необходимость в поиске дополнительных локусов. Эти факторы делают микросателлиты экономически эффективным инструментом для изучения демографических процессов и генетической динамики, а также мониторинга состояния популяций немодельных видов [3].

В настоящее время микросателлитные локусы составляют основу методического инструментария криминалистических лабораторий при идентификации биологических следов человека. Прогресс в изучении геномов животных и накопленный опыт применения микросателлитов в криминалистике делают генотипирование микросателлитных локусов одним из наиболее распространенных методов, используемых в судебной генетике для отнесения образцов животных к конкретной особи [4]. Нарботанная научная база позволяет использовать перекрестную амплификацию как подход при разработке методов расследования правонарушений в отношении объектов живой природы, наиболее распространенным из которых является незаконная охота (браконьерство).

В статье приведены результаты НИР «Изучение STR-полиморфизма лося, косули, оленя с целью разработки криминалистической методики ДНК-идентификации биологических следов отдельных особей при расследовании дел о незаконной охоте» (2017–2018) касательно распространенного в Беларуси нормируемого охотничьего вида – лося (*Alces alces*). Целью исследования была разработка технологий генотипирования охотничьих видов диких животных на основе традиционной мультиплексной ПЦР с последующей идентификацией аллелей методом капиллярного электрофореза для оценки уровня надежности полученных доказательств идентичности исследованных объектов.

Материалы и методы исследования

Коллекция ДНК была представлена образцами 383 лосей, добытых на законных основаниях во всех административных регионах Беларуси (в Брестской области было добыто 27 лосей (7,1 % от общей выборки), в Витебской области – 213 (55,6 %), в Гомельской области – 30 (7,8 %), в Гродненской области – 48 (12,5 %), в Минской области – 40 (10,5 %), в Могилёвской области – 25 (6,5 %)). Полученную выборку можно считать репрезентативной, так как в Беларуси наибольшая плотность вида приходится на северную и северо-восточную часть страны.

Эффективность отобранных STR-маркеров протестирована на образцах ДНК лося в монолокусной и мультиплексной ПЦР, что позволило разработать для генотипирования лося 2 тест-системы, содержащие в общей сложности 16 маркеров (15 микросателлитных локусов и 1 локус (амелогенин) в качестве гендерного маркера) (табл. 1). Амплификацию микросателлитов проводили в термоциклере iCycler (*Bio-Rad*, США) в конечном объеме 10 мкл, содержащем буфер К (100 ммоль/л трис-НСl, 500 ммоль/л КСl, 0,8 % Nonidet P40 (рН 8,8)), смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) (0,2 ммоль/л каждого), 1,5 ммоль/л MgCl₂, 0,75 единицы активности Taq-полимеразы, ДНК в концентрации 1–2 нг/мкл.

Таблица 1

Маркеры, использованные для генотипирования лося

Table 1

Markers which used for genotyping of moose

Локус	Тандемный повтор	Последовательность праймеров	Код в GenBank	Метка	Источник
MaF46	(GT) _n	F: AAATACCCTATAAGGCACAGTACCAC R: CACCATGGCCACCTGGAATCAGG	M77376	6-FAM	[5]
RT5	(GT) _n	F: CAGCATAATTCTGACAAGTG R: AATTCATGAACAGAGGAG	U90738	6-FAM	[6]
T530	(TAGA) _n	F: GTCCTCACAGCAGCTCTATG R: GCATTCTTTAGAACTCCAAGTG	AF442817	6-FAM	[7]
RBP3	(CA) _n	F: TGTATGATCACCTTCTATGCTTC R: GCTTTAGGTAATCATCAGATAGC	—	R6G	[8]
BM888	(CA) _n	F: AGGCCATATAGGAGGCAAGCTT R: CTCGGTGAGCTCAAAACGAG	G18484	R6G	[5]
BM1818	(CA) _n	F: AGTGCTTTCAAGGTCCATGC R: AGCTGGGAATATAACCAAAGG	G18391	R6G	[5]
T193	(TAGA) _n	F: AGTCCAAGCCTGCTAAATAA R: CTGCTGTTGTCATCATTACC	AF192398	TMR	[7]
BM6438	(CA) _n	F: TTGAGCACAGACACAGACTGG R: ACTGAATGCCTCCTTTGTGC	G18435	TMR	[5]
BL4	(CA) _n	F: AAATTTTTCATCCTTCTTTCTGAC R: TCACCCTGACTGTGAATGC	—	ROX	[5]
T268	(TAGA) _n	F: ATTCCCTTCTCCAGTGTATG R: ATGATAACAGCTCAACAGATC	AF192399	6-FAM	[7]
BM848	(CA) _n	F: TGGTTGGAAGGAAAACCTGG R: CCTCTGCTCCTCAAGACAC	G18477	6-FAM	[5]
BM1258	(CA) _n	F: GTATGTATTTTCCCACCCTGC R: GAGTCAGACATGACTGAGCCTG	G18385	R6G	[5]
RT30	(GT) _n	F: CACTTGGCTTTTGGACTTA R: CTGGTGTATGTATGCACACT	U90749	R6G	[6]
T26	(TAGA) _n	F: GTTCCAATAGACACGCTCAT R: TGCCATAGTTTTTCCTACCTT	AF442814	R6G	[7]
BM757	(CA) _n	F: TGGAAACAATGTAAACCTGGG R: TTGAGCCACCAAGGAACC	G18473	TMR	[5]
BM1225	(CA) _n	F: TTTCTCAACAGAGGTGTCCAC R: ACCCCTATCACCATGCTCTG	G18419	TMR	[5]
BM203	(CA) _n	F: GGGTGTGACATTTTGTTCCT R: CTGCTCGCCACTAGTCCTTC	G18500	ROX	[5]
T172	(TAGA) _n	F: AGCATCTCCCTTTCAACA R: CTCCCAACCCAAGTATCG	AF192397	6-FAM	[7]
Амелогенин	—	F: AGTTCCTGGCCAACACTC R: GCTGGCCAAGCTTCCAGA	FJ946989/ FJ946990	ROX	[9]

Программа амплификации микросателлитных локусов включала первичную денатурацию (3 мин при 95 °C), 30 циклов амплификации (45 с при 95 °C, 45 с при 60 °C, 90 с при 68 °C) и конечную элонгацию (30 мин при 72 °C). Для разделения продуктов ПЦР применяли анализатор 3500 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, США). Аллели тестируемых локусов идентифицированы по молекулярному размеру в парах нуклеотидов (п. н.) с использованием программного обеспечения *GeneMapper ID-X* (версия 1.4) путем сравнения с внутренним размерным стандартом *GeneScan* – 600 LIZ (версия 2.0).

Оценку аллельного богатства (*Ar*), наблюдаемой (*Ho*) и ожидаемой (*He*) гетерозиготности, значений уровня достоверности (*p*), а также соответствия равновесию Харди – Вайнберга (HWE) проводили с помощью программных пакетов *GenAlEx* (версия 6.5) [10], *FSTAT* (версия 2.9.4) [11], *Genepop* (версия 4.7.0) [12]. Неравновесие по сцеплению (LD) между ДНК-маркерами оценивали с использованием теста отношения правдоподобия на основе программы *Arlequin* (версия 3.5.1.3) [13]. Выявление артефактов ПЦР, выпадения аллелей, нуль-аллелей и других возможных ошибок амплификации осуществляли в программе *Micro-Checker* (версия 2.2.1) [14].

Криминалистические параметры микросателлитных локусов, такие как показатель информативной ценности локуса (PIC), вероятность различения генотипов двух неродственных индивидуумов (PD), совокупная сила дискриминирующего потенциала (CPD), были рассчитаны с помощью программных продуктов *GenAlEx* (версия 6.5) [10], *Gimlet* (версия 1.3.3) [15], *Cervus* (версия 3.0.7) [16].

Результаты и их обсуждение

Тест-системы для идентификации биологических образцов лося были разработаны на основе адресного переноса микросателлитных маркеров, описанных для северного оленя (*Rangifer tarandus*), вапиту (*Cervus elaphus* spp.), овцы (*Ovis aries*) и крупного рогатого скота (*Bos taurus*).

На основе анализа литературных данных и предварительных экспериментальных исследований отобранные локусы были сгруппированы в 2 мультиплексные тест-системы:

- Plex_1 – локусы MaF46, RT5, T530, RBP3, BM888, BM1818, T193, BM6438, BL4, амелогенин;
- Plex_2 – локусы T172, T268, BM848, BM1258, RT30, T26, BM757, BM1225, BM203.

При формировании мультиплексных тест-систем учитывались диапазон молекулярных размеров аллелей локусов, отсутствие взаимодействия праймеров в смеси между собой, близкие значения температуры плавления продуктов ПЦР. При этом тип флуоресцентной метки праймеров подбирался таким образом, чтобы образующиеся в результате ПЦР продукты амплификации отдельных локусов не перекрывались по молекулярным размерам в пределах детекции каждой из четырех флуоресцентных меток.

После проведенного контрольного генотипирования образцов из тест-системы Plex_1 был исключен локус RT5 по причине выявления неспецифичных фрагментов ПЦР, а из тест-системы Plex_2 – локус BM1225 в силу нестабильной амплификации продуктов ПЦР.

Анализ ассоциации аллелей локусов выявил неравновесное сцепление ($p < 0,05$) между 13 парами тестируемых STR-маркеров у лося. Однако только по 1 паре маркеров (локусы T268 и T530) величина LD оставалась статистически значимой после применения поправки Бонферрони ($p < 0,00001$) (табл. 2). Для дальнейшего анализа был выбран локус T530, который имел немного более высокую способность дискриминации лосей, чем локус T268 (0,884 и 0,880 соответственно). С учетом вышеизложенного панель локусов, разработанная для генотипирования образцов лося, имеет следующий вид:

- Plex_1 – локусы MaF46, T530, RBP3, BM888, BM1818, T193, BM6438, BL4, амелогенин (9 локусов);
- Plex_2 – локусы T172, BM848, BM1258, RT30, T26, BM757, BM203 (7 локусов).

Электрофореграммы продуктов ПЦР для мультиплексных тест-систем Plex_1 и Plex_2 приведены на рис. 1 и 2 соответственно.

В ходе проведенного анализа генотипов полной выборки лосей суммарно было идентифицировано 132 аллели. Наиболее полиморфными оказались локусы BL4 (15 аллелей), BM757 (12), BM203 (11), T26 (11). У остальных локусов количество аллелей варьировалось в пределах 7–9 на локус (см. табл. 2), и лишь у локуса T172 была выявлена 1 аллель.

Локус T172, который описан как полиморфный у подвидов оленя *C. elaphus canadensis*, *C. elaphus elaphus* [17; 18], у всех исследованных животных вида *A. alces* амплифицируется одинаковым фрагментом размером 144 п. н. Однако мономорфный у лося локус T172 сохраняет полиморфный статус у близкородственных видов оленя и косули. Это позволяет в предложенной панели локусов, оптимизированной для генотипирования образцов лося, использовать локус T172 в качестве внутреннего контроля. При анализе биологических следов с мест незаконной охоты велика вероятность обнаружения смешанных генетических профилей, происходящих от разных видов оленевых. Выявление мономорфного фрагмента размером 144 п. н. является дополнительным подтверждением происхождения образца от животного целевого вида (лось). И наоборот, выявление дополнительных аллелей в этом локусе будет указывать на наличие в следах примеси других оленевых (олень и косули).

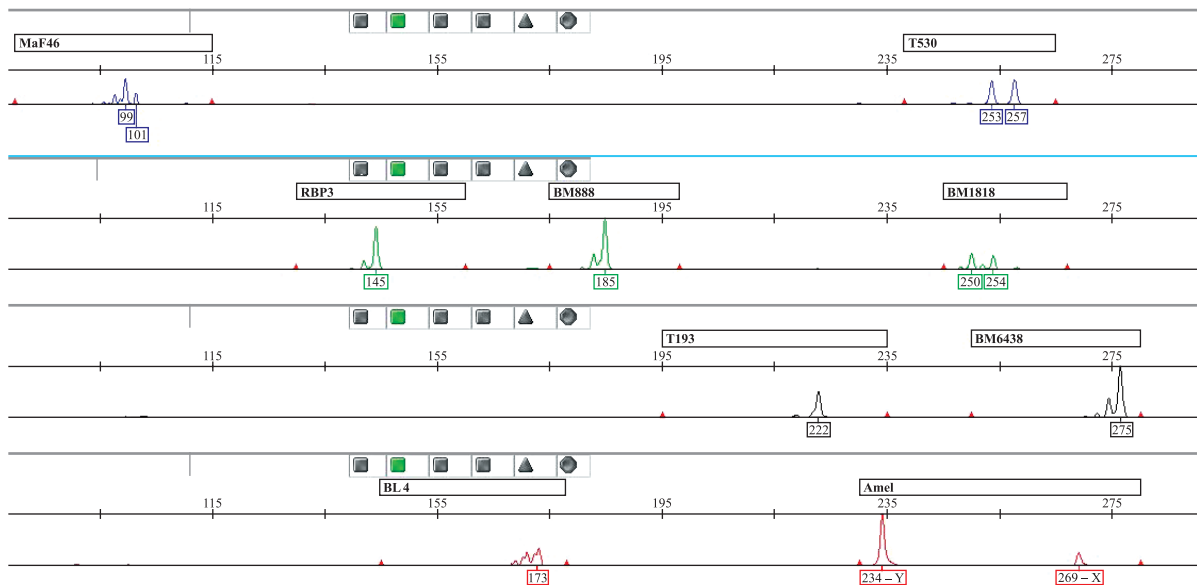


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР для мультилокусной системы Plex_1 у лося
Fig. 1. Electrophoregramm of multilocus system Plex_1 for PCR products of DNA of moose

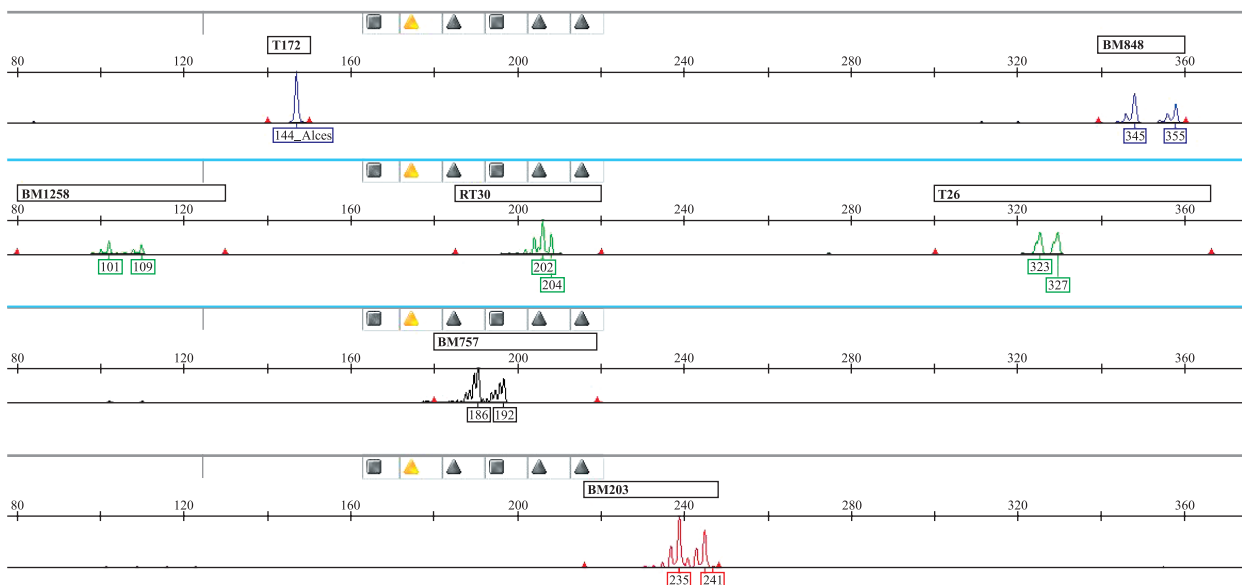


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР для мультилокусной системы Plex_2 у лося
Fig. 2. Electrophoregramm of multilocus system Plex_2 for PCR products of DNA of moose

Анализ с использованием программы *Micro-Checker* показал отсутствие нуль-аллелей у исследованных локусов, о чем свидетельствуют полученные значения частот встречаемости, приведенные в табл. 2.

В популяциях лося из Беларуси всего для 2 локусов было выявлено отклонение от равновесия Харди – Вайнберга ($p < 0,05$), однако после применения поправки Бонферрони ($p < 0,0036$) все отклонения от равновесия Харди – Вайнберга становились статистически незначимыми (см. табл. 2). Для дальнейших расчетов использовались все отобранные локусы.

Средняя ожидаемая гетерозиготность микросателлитных локусов, входящих в тест-систему, составила 0,734, а средняя наблюдаемая гетерозиготность – 0,727.

При оценке криминалистической применимости локусов для идентификационных целей были получены показатели, представленные в табл. 3.

Таблица 2

**Параметры полиморфизма локусов
тест-системы для идентификации особей лоса**

Table 2

**Parameters of polymorphism of loci
from test systems for moose identification**

Локус	<i>Ar</i>	LD	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>p</i>	NAF
MaF46	9	ns	0,741	0,750	0,132	0,006 2
T530	7	T268 (<i>p</i> = 0,000 00)	0,736	0,735	0,474	0,000 5
RBP3	8	ns	0,625	0,609	0,081	–0,011 4
BM888	7	ns	0,554	0,555	0,222	0,004 1
BM1818	8	ns	0,777	0,791	0,007	0,008 6
T193	10	ns	0,770	0,765	0,162	–0,003 3
BM6438	8	ns	0,680	0,715	0,303	0,026 1
BL4	15	ns	0,799	0,821	0,047	0,012 7
BM848	8	ns	0,688	0,659	0,091	–0,028 1
BM1258	8	ns	0,714	0,732	0,120	0,011 9
RT30	9	ns	0,731	0,722	0,295	–0,010 6
T26	11	ns	0,780	0,804	0,069	0,016 5
BM757	12	ns	0,768	0,781	0,097	0,006 4
BM203	11	ns	0,814	0,840	0,351	0,015 8

Примечание. NAF (*null allele frequency*) – частота встречаемости нуль-аллелей; ns (*none significant*) – статистически незначимое отклонение.

Таблица 3

**Криминалистические параметры локусов
тест-системы для идентификации особей лоса**

Table 3

**Criminalistic parameters of loci
from test systems for moose identification**

Локус	PIC	PD	CPD*, %
MaF46	0,710	0,897	91,73
T530	0,689	0,884	98,606
RBP3	0,530	0,768	99,857 7
BM888	0,506	0,753	99,976 00
BM1818	0,758	0,924	99,997 549
T193	0,728	0,908	99,999 749 6
BM6438	0,684	0,888	99,999 967 63
BL4	0,797	0,944	99,999 997 791
T172	Мономорфный		99,999 997 791 2
BM848	0,630	0,855	99,999 999 774 39
BM1258	0,685	0,881	99,999 999 976 956
RT30	0,691	0,892	99,999 999 998 427 7
T26	0,778	0,935	99,999 999 999 892 70
BM757	0,749	0,920	99,999 999 999 994 800
BM203	0,822	0,956	99,999 999 999 999 700 0

*Расчет нарастающим итогом.

Анализ полученных результатов показывает, что минимальные значения PIC были выявлены у локусов BM888 (0,506) и RBP3 (0,530), максимальные – у локуса BM203 (0,822), среднее значение PIC составило 0,697. Согласно работе [19] в зависимости от значения PIC локусы для целей криминалистического анализа подразделяются на три группы: высокоинформативные (PIC более 0,50), достаточно информативные (PIC от 0,25 до 0,50) и неинформативные (PIC менее 0,25).

Значения PD у всех локусов были на достаточно высоком уровне: минимальное значение выявлено у локуса BM888 (0,753), максимальное – у локуса BM203 (0,956), а среднее значение составило 0,886. Параметр PD отражает вероятность того, что два случайно выбранных индивидуума будут иметь различные генотипы. Соответственно, чем выше данное значение, тем более информативным является исследуемый locus. Совокупный дискриминирующий потенциал тест-системы составил 99,999 999 999 999 %.

Установление половой принадлежности у животных вида *A. alces* с использованием праймеров, описанных в работе [9], показало наличие 1 аллели размером 234 п. н. для локуса амелогенина, локализованного на Y-хромосоме, и 1 аллели размером 269 п. н. для локуса амелогенина, расположенного на X-хромосоме.

Таким образом, локусы в предложенной панели, вероятнее всего, не сцеплены друг с другом и имеют низкий уровень ошибок генотипирования, таких как выпадение аллелей, а аллельное распределение всех задействованных локусов соответствует равновесию Харди – Вайнберга. Сводная генетическая статистика позволяет утверждать, что предложенная панель микросателлитных локусов обеспечивает необходимую надежность при генотипировании и может быть использована для получения высокодоказательной информации при судебно-экспертном исследовании биологических следов по фактам незаконной охоты на лося.

Вместе с тем необходимо учитывать, что применение адресного переноса праймеров при формировании описанной панели локусов обуславливает значительный уровень кросс-реактивности в отношении ДНК-матриц других видов оленевых и полорогих. По этой причине генотипирование с использованием разработанной панели локусов рекомендуется проводить для образцов, видовое происхождение которых от особей вида *A. alces* уже известно или доказано.

Эпизоотия африканской чумы свиней 2012–2013 гг. обусловила резкое сокращение популяции дикого кабана, вследствие чего именно лось занял первое место среди предпочитаемых трофеев браконьеров. В 2019 г. в Научно-практическом центре Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь было проведено 179 экспертных исследований по фактам браконьерства на оленевых, 106 из которых относились к незаконному отстрелу лосей. Успешное судебное преследование браконьерства требует идентификации биологических следов, чтобы связать доказательства, собранные на месте преступления (например, на месте отстрела), с биологическим материалом (рога, мясо, следы крови и т. п.), найденным у потенциального подозреваемого, который мог совершить данное преступление [20]. Вместе с тем в научной литературе описано лишь несколько таких тестов для судебно-экспертного генотипирования оленевых. Более того, хотя оленевые являются очень популярными промысловыми млекопитающими в Европе [21], большинство судебно-экспертных анализов микросателлитных локусов и соответствующие базы данных частот аллелей отработаны для оленевых из Северной Америки. На данный момент судебно-экспертное сообщество опубликовало один тест для STR-типирования лосей, который позже был использован для отнесения особей вида *A. alces* к их исходным популяциям из провинций Новая Шотландия и Нью-Брансуик в Канаде [22], но полезность анализа для тестирования генетической идентичности образцов европейских лосей не оценивалась. В 2021 г. канадскими исследователями [23] для криминалистического генотипирования лосей провинции Альберта и территории Юкон предложена валидированная на 515 образцах панель, включающая 12 микросателлитных динуклеотидных локусов (6 из них (RT5, RT30, BM203, BM848, BM888 и BM1225) задействованы в данном исследовании лосей, обитающих в Беларуси) и половой маркер Sika amelogenin, которые объединены в 2 мультиплекса с различными условиями амплификации. Как и в настоящей работе, ДНК-маркеры достаточно полиморфны, находятся в равновесии по сцеплению и соответствуют равновесию Харди – Вайнберга. Авторами проведен анализ популяционной структуры лосей Альберты и Юкона, однако частоты распределения аллелей локусов не опубликованы, что не позволяет провести сравнительный анализ европейских и канадских лосей.

Компанией «Гордиз» (Россия) в 2021 г. предложена тест-система COrDIS Alces¹ для молекулярно-генетической индивидуализации лосей, включающая 10 микросателлитных локусов (RT1, RT6, RT9, RT24, RT30, BMS745, FSB193, OheQ, C32, T40) и 1 полспецифичный маркер (SRY). Однако никакого информационно-справочного обеспечения данной тест-системы (частоты аллелей, генетические параметры полиморфизма, популяционный анализ и т. п.) в доступном информационном сегменте не имеется.

¹COrDIS Alces [Electronic resource]. URL: <https://gordiz.ru/products/animal-kits/cordis-alces/> (date of access: 10.09.2021).

Заключение

Настоящее исследование ставило целью разработку системы мультиплексной ПЦР для генотипирования микросателлитных локусов у лося, которая предоставила бы неоспоримые ДНК-доказательства идентичности образцов в судебной экспертизе.

В результате предложена панель из 15 микросателлитных локусов для высокодостоверной идентификации биологических образцов лося в судебной экспертизе доказательств по фактам незаконной охоты. Это первое исследование, предоставляющее возможность тестирования генетической идентичности образцов лося (*A. alces*) на основе STR-маркеров, для которого проведена оценка статистических и генетических параметров выборки лосей в масштабе страны. Результаты генотипирования образцов с использованием представленной панели позволяют достигать уровня чрезвычайно надежных доказательств в судебно-экспертном ДНК-анализе биологических следов с мест незаконной охоты на лося. Сводная генетическая статистика показала, что панель из 15 STR-маркеров демонстрирует уровень полиморфизма от умеренного до высокого (аллельное богатство варьируется от 7 до 15 аллелей на локус, наблюдаемая гетерозиготность – от 0,554 до 0,814, значения PIC – от 0,506 до 0,822). Совокупная сила дискриминирующего потенциала микросателлитной панели составляет более 99,999 999 999 999 %. Создана база данных генотипов лося. На основе проведенных исследований разработана судебно-экспертная методика ДНК-идентификации биологических образцов животных вида *A. alces* [24], которая включена в Реестр судебно-экспертных методик и иных методических материалов Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, что соответствует имплементации разработки в национальную правовую систему.

Библиографические ссылки

1. Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. 2006;255(1–4):1–29. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.11.031.
2. Engel SR, Linn RA, Taylor JF. Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls: implications for population studies. *Journal of Mammalogy*. 1996;77(2):504–518. DOI: 10.2307/1382825.
3. Miller WL, Edson J, Pietrandrea P, Miller-Butterworth C, Walter WD. Identification and evaluation of a core microsatellite panel for use in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *BMC Genetics*. 2019;20:49. DOI: 10.1186/s12863-019-0750-z.
4. Linacre AMT, Tobe SS. *Wildlife DNA analysis. Applications in forensic science*. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2013. 352 p. DOI: 10.1002/9781118496411.
5. Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden SL, Hawkins GA, et al. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*. 1994; 136(2):619–639. DOI: 10.1093/genetics/136.2.619.
6. Wilson GA, Strobeck C, Wu L, Coffin JW. Characterization of microsatellite loci in caribou *Rangifer tarandus*, and their use in other artiodactyls. *Molecular Ecology*. 1997;6:697–699. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1997.00237.x.
7. Meredith EP, Rodzen JA, Levine KF, Banks JD. Characterization of an additional 14 microsatellite loci in California Elk (*Cervus elaphus*) for use in forensic and population applications. *Conservation Genetics*. 2005;6(1):151–153. DOI: 10.1007/s10592-004-7735-8.
8. Cronin MA, Patton JC, Balmyshva N, MacNeil MD. Genetic variation in caribou and reindeer (*Rangifer tarandus*). *Animal Genetics*. 2003;34(1):33–41. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2003.00927.x.
9. Gurgul A, Radko A, Słota E. Characteristics of X- and Y-chromosome specific regions of the amelogenin gene and a PCR-based method for sex identification in red deer (*Cervus elaphus*). *Molecular Biology Reports*. 2010;37:2915–2918. DOI: 10.1007/s11033-009-9852-4.
10. Peakall R, Smouse PE. GenAEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 2006;6(1):288–295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
11. Goudet J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*. 1995;86(6):485–486. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627.
12. Raymond M, Rousset F. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 1995;86(3):248–249. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573.
13. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 2010;10(3):564–567. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
14. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004;4(3):535–538. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
15. Valière N. Gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*. 2002; 2(3):377–379. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2002.00228.x-i2.
16. Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 1998;7(5):639–655. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x.
17. Jones KC, Levine KF, Banks JD. Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California elk (*Cervus elaphus canadensis*). *Molecular Ecology Notes*. 2002;2(4):425–427. DOI: 10.1046/j.1471-8278.2002.00264.x.

18. Socratous E, Graham E, Ruttly GN. Forensic DNA profiling of *Cervus elaphus* species in the United Kingdom. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2009;2(1):281–282. DOI: 10.1016/j.fsigss.2009.08.127.
19. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):314–331.
20. Цыбовский ИС, Котова СА, Забавская ТВ, Спивак ЕА, Лукашкова ОН. Молекулярно-генетическая идентификация биологических следов диких животных при расследовании дел о незаконной охоте в Республике Беларусь. *Теория и практика судебной экспертизы*. 2018;13(4):116–123. DOI: 10.30764/10.30764/1819-2785-2018-13-4-116-12317.
21. Burbaitė L, Csányi S. Red deer population and harvest changes in Europe. *Acta Zoologica Lituanica*. 2010;20(4):179–188. DOI: 10.2478/v10043-010-0038-z.
22. Ball MC, Finnegan LA, Nette T, Broders HG, Wilson PJ. Wildlife forensics: «supervised» assignment testing can complicate the association of suspect cases to source populations. *Forensic Science International: Genetics*. 2011;5(1):50–56. DOI: 10.1016/j.fsigen.2010.02.002.
23. Sim Z, Monderman L, Hildebrand D, Packer T, Jobin RM. Development and implementation of a STR based forensic typing system for moose (*Alces alces*). *Forensic Science International: Genetics*. 2021;53:102536. DOI: 10.1016/j.fsigen.2021.102536.
24. Котова СА, Цыбовский ИС, Рыбакова ВИ, Недзвецкая ДЭ, Забавская ТВ, Спивак ЕА и др. *Методика ДНК-идентификации биологических образцов животных вида лось европейский (Alces alces)*. Цыбовский ИС, редактор. Минск: ИВЦ Минфина; 2019. 34 с.

References

1. Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. 2006;255(1–4):1–29. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.11.031.
2. Engel SR, Linn RA, Taylor JF. Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls: implications for population studies. *Journal of Mammalogy*. 1996;77(2):504–518. DOI: 10.2307/1382825.
3. Miller WL, Edson J, Pietrandrea P, Miller-Butterworth C, Walter WD. Identification and evaluation of a core microsatellite panel for use in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *BMC Genetics*. 2019;20:49. DOI: 10.1186/s12863-019-0750-z.
4. Linacre AMT, Tobe SS. *Wildlife DNA analysis. Applications in forensic science*. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2013. 352 p. DOI: 10.1002/9781118496411.
5. Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden SL, Hawkins GA, et al. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*. 1994;136(2):619–639. DOI: 10.1093/genetics/136.2.619.
6. Wilson GA, Strobeck C, Wu L, Coffin JW. Characterization of microsatellite loci in caribou *Rangifer tarandus*, and their use in other artiodactyls. *Molecular Ecology*. 1997;6:697–699. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1997.00237.x.
7. Meredith EP, Rodzen JA, Levine KF, Banks JD. Characterization of an additional 14 microsatellite loci in California Elk (*Cervus elaphus*) for use in forensic and population applications. *Conservation Genetics*. 2005;6(1):151–153. DOI: 10.1007/s10592-004-7735-8.
8. Cronin MA, Patton JC, Balmysheva N, MacNeil MD. Genetic variation in caribou and reindeer (*Rangifer tarandus*). *Animal Genetics*. 2003;34(1):33–41. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2003.00927.x.
9. Gurgul A, Radko A, Słota E. Characteristics of X- and Y-chromosome specific regions of the amelogenin gene and a PCR-based method for sex identification in red deer (*Cervus elaphus*). *Molecular Biology Reports*. 2010;37:2915–2918. DOI: 10.1007/s11033-009-9852-4.
10. Peakall R, Smouse PE. GenAEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 2006;6(1):288–295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
11. Goudet J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*. 1995;86(6):485–486. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627.
12. Raymond M, Rousset F. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 1995;86(3):248–249. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573.
13. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 2010;10(3):564–567. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
14. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004;4(3):535–538. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
15. Valière N. Gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*. 2002;2(3):377–379. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2002.00228.x-i2.
16. Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 1998;7(5):639–655. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x.
17. Jones KC, Levine KF, Banks JD. Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California elk (*Cervus elaphus canadensis*). *Molecular Ecology Notes*. 2002;2(4):425–427. DOI: 10.1046/j.1471-8278.2002.00264.x.
18. Socratous E, Graham E, Ruttly GN. Forensic DNA profiling of *Cervus elaphus* species in the United Kingdom. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2009;2(1):281–282. DOI: 10.1016/j.fsigss.2009.08.127.
19. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):314–331.
20. Tsybovsky IS, Kotova SA, Zabavskaya TV, Spivak EA, Lukashkova ON. DNA identification of biological traces in forensic casework for investigation of illegal hunting in Belarus. *Theory and Practice of Forensic Science*. 2018;13(4):116–123. DOI: 10.30764/10.30764/1819-2785-2018-13-4-116-12317.
21. Burbaitė L, Csányi S. Red deer population and harvest changes in Europe. *Acta Zoologica Lituanica*. 2010;20(4):179–188. DOI: 10.2478/v10043-010-0038-z.

22. Ball MC, Finnegan LA, Nette T, Broders HG, Wilson PJ. Wildlife forensics: «supervised» assignment testing can complicate the association of suspect cases to source populations. *Forensic Science International: Genetics*. 2011;5(1):50–56. DOI: 10.1016/j.fsigen.2010.02.002.

23. Sim Z, Monderman L, Hildebrand D, Packer T, Jobin RM. Development and implementation of a STR based forensic typing system for moose (*Alces alces*). *Forensic Science International: Genetics*. 2021;53:102536. DOI: 10.1016/j.fsigen.2021.102536.

24. Kotava SA, Tsybovsky IS, Rybakova VI, Nedzvedskaya DE, Zabauskaya TV, Spivak EA, et al. *Metodika DNK-identifikatsii biologicheskikh obraztsov zhivotnykh vida los' evropeiskii (Alces alces)* [Method of DNA identification of biological samples of animals of the European elk species (*Alces alces*)]. Tsybovskii IS, editor. Minsk: Informatsionno-vychislitel'nyi tsentr Ministerstva finansov Respubliki Belarus'; 2019. 34 p. Russian.

Получена 11.10.2021 / исправлена 24.01.2022 / принята 21.04.2022.
Received 11.10.2021 / revised 24.01.2022 / accepted 21.04.2022.