

## АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *ADCY8* И *RYR3* ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ К ДИКИМ ИЛИ ДОМАШНИМ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМ ВИДА *Canis lupus*<sup>1</sup>

© 2023 г. В. Н. Кипень<sup>1, \*</sup>, М. М. Патрин<sup>2</sup>, Е. В. Снытков<sup>1, 3</sup>, А. Н. Верчук<sup>1, 4</sup>, А. Н. Семак<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Республика Беларусь

<sup>2</sup>ООО “Максим Медикал”, Москва, 123423 Россия

<sup>3</sup>Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова, Белорусский государственный университет, Минск, 220070 Республика Беларусь

<sup>4</sup>Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, 220073 Республика Беларусь

<sup>5</sup>ООО “ВэлВет”, Минск, 220063 Республика Беларусь

\*e-mail: v.kipen@igc.by

Поступила в редакцию 20.04.2022 г.

После доработки 25.07.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

На биологическом материале (образцы волка и домашней собаки) подтвержден высокий дифференцирующий потенциал полиморфных вариантов g.27748425T>C (ген *ADCY8*) и g.1414373T>C (ген *RYR3*). Предложена тест-модель из двух полиморфизмов для дифференциации волка и домашней собаки, которая отличается высокими значениями точности (96.2%), специфичности (96.3%) и чувствительности (98.9%). С использованием KASP разработан быстрый и простой подход к дифференциации на основании предложенной тест-модели, который призван сократить временные и финансовые затраты на молекулярно-генетический анализ, а также снизить риск кросс-контаминации, т. к. процесс является одностадийным (исключены этапы рестрикции и электрофореза).

**Ключевые слова:** *Canis lupus*, *Canis lupus familiaris*, SNP, дифференциация, конкурентная аллель-специфическая ПЦР (KASP, Kompetitive allele specific PCR), ПЦР-ПДРФ, плавление ампликона с высоким разрешением (HRM, high-resolution melting), генотипирование *in silico*.

DOI: 10.31857/S0016675823030062, EDN: IOHKSC

Серый волк (*Canis lupus*) – крупный плотоядный хищник, который является ключевым видом в биоценозе. Однако волки долгое время являлись основным источником конфликта между человеком и хищником, что привело к долгосрочному преследованию волков и как итог – к значительному снижению их численности, генетического разнообразия и потока генов между популяциями. Для эффективной защиты и адаптивного управления популяциями волка необходим научно-обоснованный подход. В мета-обзоре M. Hindrikson с соавт. [1] суммированы результаты генетических исследований популяций волка в Европе, охватывающих основные исследования “предгеомной эры” и первые выводы об “эре геномики” [2, 3]. Именно на основании данных, полученных с

использованием чиповых технологий (англ. Microarray analysis), в научных работах последних лет появляется огромный массив генетической информации (англ. Raw data), доступный для широкого круга исследователей, решающих прикладные задачи. Так, в работе А.Е. Гребенчук обсуждалась необходимость в дифференциации с использованием молекулярно-генетических методов представителей вида *Canis lupus*, в частности – волка и собаки [4]. Также в работе Е.Э. Хейдоровой с соавт. была показана необходимость дальнейшего изучения генетического разнообразия *Canis lupus* на основе ядерного генома для объяснения нетипичных для волка морфологических особенностей, которые могут быть следствием гибридизации с домашними собаками [5].

С учетом современного состояния геномных данных для вида *Canis lupus*, представленных в открытом доступе (Sequence Read Archive, SRA – www.ncbi.nlm.nih.gov/sra), а также учитывая воз-

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675823030062 для авторизованных пользователей.

возможности ряда биоинформатических алгоритмов для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей и поиска вариаций, представляется целесообразным разработать тест-систему на основании анализа SNP (англ. Single nucleotide polymorphism) для дифференциации собаки (*Canis lupus familiaris*) и волка (*Canis lupus*).

В следующих работах была показана возможность использования данных NGS-проектов для поиска генетических маркеров, в первую очередь — SNP, обладающих высоким дифференцирующим потенциалом для различения особей в пределах биологического вида [6–8].

Мы полагаем, что использование алгоритма для дифференциации волка и домашней собаки, основанного на расчетах частоты встречаемости аллелей в STR-локусах, должно быть проверено в пределах конкретного географического региона, что при свободной миграции волка с территории сопредельных стран (например, в Российскую Федерацию из Республики Беларусь и Украины) усложняет такой подход ввиду необходимости изучения частотного разнообразия и на этих прилегающих территориях. Ввиду данного факта поиск SNP с высоким дифференцирующим потенциалом имеет важное значение и является актуальной задачей. По причине отсутствия адаптивного управления к численности волка и его массового отстрела будут наблюдаться волны значительной депопуляции, чередующиеся с быстрым увеличением численности за счет миграции представителей вида. По этой причине оценка частотного разнообразия аллелей ряда STR-локусов будет требовать постоянной актуализации, что может быть трудновыполнимо. Как итог, будет происходить изменение частотного распределения и потеря, в первую очередь, редких аллелей. Данный факт отразится на точности алгоритма дифференциации волка и домашней собаки. Однако данного недостатка лишен подход, основанный на анализе SNP, т. к. более чем в 95% случаев для них показано только две альтернативные аллельные формы.

Таким образом, цель данного исследования — с использованием методов биоинформатики выявить SNP с высоким дифференцирующим потенциалом для установления принадлежности биологических образцов к диким или домашним представителям вида *Canis lupus*, и на основании проведенного анализа предложить тест-систему из нескольких SNP для дифференциации собаки (*Canis lupus familiaris*) и волка (*Canis lupus*).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Биологические образцы.** В исследование были включены следующие группы: образцы биологического материала (кровь) домашней собаки общей численностью 118 шт.; образцы биологического ма-

териала (кровь или мышечная ткань) волка — 80 шт. Образцы домашних животных были отобраны сотрудниками ветеринарных клиник и поступали для молекулярно-генетического анализа в отдельных пробирках типа Vacutainer (BD Vacutainer® Sodium Citrate Tubes), снабженных бирками с описанием животного (породная принадлежность, возраст, пол). Образцы биологического материала волка предоставлялись охотниками, добывающими волков в рамках программ регулирования численности в результате личных контактов авторов данной работы.

**Выделение ДНК.** ДНК из образцов мышечной ткани выделяли с использованием методики, основанной на высвобождении ДНК в ходе инкубирования образцов биологического материала в лизирующем буфере, содержащем 2% додецилсульфата натрия (SDS), 20 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, 20 мМ EDTA (pH 8.0) и протеиназу К. При наличии фрагментов, которые подверглись лизису не полностью, осадок отделяли центрифугированием в течение 5 мин при 3000 об./мин, а супернатант переносили в новую пробирку. К супернатанту добавили 6.3 М раствор гуанидинхлорида в объеме 1/2 от объема исходной смеси, далее помешали пробирки в холодильник при 0–5°C на 10–15 мин, осадок комплекса продуктов расщепления белков с SDS удаляли центрифугированием в течение 8 мин (5000 об./мин). Далее использовали коммерческую смесь Roti®-Phenol (www.carlroth.com) согласно рекомендациям производителя.

Для выделения ДНК из крови использовали коммерческие наборы “Blood-Animal-Plant DNA Preparation Kit” (Jena Bioscience, www.jenabioscience.com).

Концентрацию ДНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop-1000 (PepLab, Германия). Среднее значение концентрации ДНК составило  $85.4 \pm 11.8$  нг/мкл ( $260/280 = 1.92 \pm 0.13$ ).

**KASP.** Определение генотипа по SNP g.27748425T>C (*ADCY8*) и g.1414373T>C (*RYR3*) осуществляли с использованием технологии, основанной на конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP, Kompetitive allele specific PCR). Генотипирование проводили с использованием KASP Assay mix (KASP by Design, KBD) и KASP Master mix (LGC Biosearch Technologies, Великобритания; ООО “Максим Медикал”, РФ) в двукратной повторности. ПЦР проводили в объеме 10 мкл в термоциклире CFX96 (Bio-Rad, США) согласно имеющимся рекомендациям по KASP.

**ПЦР-ПДРФ.** Реакцию ПЦР для генотипирования по SNP g.27748425T>C (*ADCY8*) и g.1414373T>C (*RYR3*) проводили в объеме 20 мкл. Количество вносимой ДНК на реакцию составляло 10–20 нг. Для ПЦР использовали реакционную смесь qPCRmix-HS (Евроген, РФ), финальная концентрация прямого и обратного праймеров со-

**Таблица 1.** Последовательности олигонуклеотидов для анализируемых в рамках данного исследования полиморфных вариантов с использованием ПЦР-ПДРФ и HRM

Полиморфизм (ген)	Последовательность олигонуклеотида 5' > 3'	Генотип/размер фрагментов (пн)
*g.27748425T>C ( <i>ADCY8</i> )	F: 5'-GGG TTT GAA TAC TTC TCC CCA AC-3' R: 5'-AAT GAC ATA ACC ACA TCC CCC AAT-3'	T/T (31/45) C/T (31/45/76) C/C (76)
**g.1414373T>C ( <i>RYR3</i> )	F: 5'-TGA TGA GGT GAC ACG GAT CTC-3' R: 5'-CAG GCC TTC CCT TAG AAG TTA C-3'	T/T (71) C/T (25/46/71) C/C (25/46)

\* CanFam3.1 (GCF\_000002285.3), Chromosome 13 (NC\_006595.3).

\*\* CanFam3.1 (GCF\_000002285.3), Chromosome 30 (NC\_051834.1).

ставила 400 нМ. Протокол амплификации для двух SNP был одинаков: 95°C – 5 мин, 40 циклов (95°C – 10 с, 56°C – 30 с, 72°C – 30 с), 72°C – 5 мин. Реакцию рестрикции проводили согласно рекомендациям производителей, для g.27748425T>C использовали *TaiI*, для g.1414373T>C – *TaqI* (Thermo Fisher Scientific). Электрофорез проводили в 10.0%-ном ПААГ (акриламид/бисакриламид – 29/1, м/м) при постоянном напряжении электрического поля 320 В в течение 80 мин в термостатируемых условиях – +(6–10)°С.

Информация о последовательностях олигонуклеотидов (Евроген, РФ) для анализируемых SNP, а также о фрагментах реакции рестрикции представлены в табл. 1.

**HRM-анализ.** Генотипирование по SNP g.27748425T>C (*ADCY8*) и g.1414373T>C (*RYR3*) также проводилось с использованием Precision Melt Supermix for High Resolution Melt (HRM) Analysis (Bio-Rad, США) в трехкратной повторности согласно рекомендации производителя. Результаты аллельной кластеризации были проанализированы с использованием Precision Melt Analysis™ Software v1.3 (Bio-Rad, США). Концентрация ДНК для всех образцов была стандартизирована до 10 нг/мкл. Протокол амплификации и плавления ампликона соответствовал рекомендуемым Bio-Rad.

**Определение генотипа in silico.** Генотипы *in silico* для животных, геномы которых были представлены в открытом доступе в NCBI, определяли с использованием on-line алгоритма SRA-Blast (файлы в формате \*.sam) и программы Unipro UGENE v.1.31.1 [9]. Определение генотипа с использованием алгоритма BLAST (с покрытием в интересующем полиморфизме  $\geq 5x$ ) было проведено для 694 особей домашней собаки (*Canis lupus familiaris*) и 203 особей волка (*Canis lupus*). Для автоматизации процесс поиска, скачивания файлов в формате \*.sam, а также пакетного определения генотипа для первичного анализа использовали программную библиотеку Selenium WebDriver для Google Chrome (версия 89.0.4389.90) под управлением Python (версия 3.9).

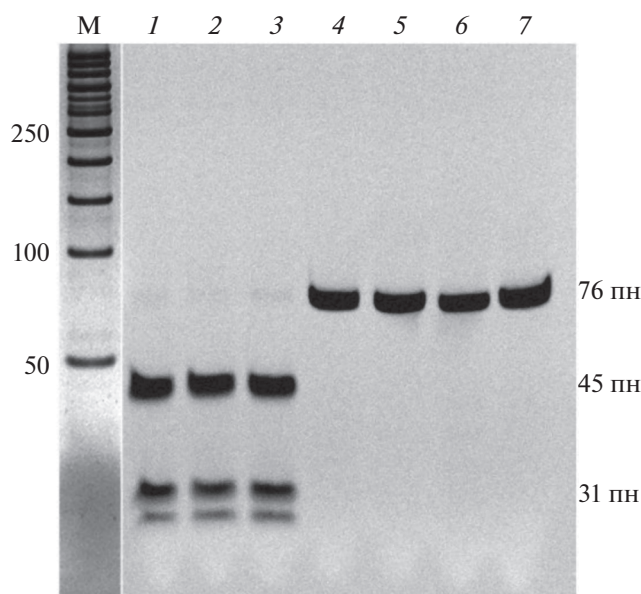
Также определены генотипы для ряда родственных биологических видов: обыкновенный шакал – *Canis aureus* ( $n = 1$ ), койот – *Canis latrans* ( $n = 5$ ), гималайский волк – *Canis lupus chanco* ( $n = 8$ ), Динго – *Canis lupus dingo* ( $n = 10$ ), иберийский волк – *Canis lupus signatus* ( $n = 1$ ), красный волк – *Cuon alpinus* ( $n = 2$ ), африканский золотой волк – *Canis lupaster* ( $n = 1$ ), эфиопский шакал – *Canis simensis* ( $n = 1$ ), гиеновидная собака – *Lycaon pictus* ( $n = 1$ ). Дополнительно определены генотипы для трех особей, являющихся гибридами между волком и собакой (*Canis lupus* × *Canis lupus familiaris* – wolfdog).

При анализе “сырых” данных (raw data) полных геномов использовали файлы из проектов PRJEB34110, PRJEB39198, PRJEB42199, PRJEB43408, PRJEB44869, PRJNA263947, PRJNA358192, PRJNA417738, PRJNA448733, PRJNA494719, PRJNA494815, PRJNA512209, PRJNA517114, PRJNA532581, PRJNA543877, PRJNA593363, PRJNA648123.

Используемые настройки поиска генотипа *in silico* отражены в работе [10].

**Статистический анализ данных.** Дифференцирующий потенциал SNP определяли с использованием ROC-анализа в SPSS v.20.0. При наличии нижней границы асимптотического 95%-го доверительного интервала более 0.8 для параметра AUC (площадь под кривой) полиморфизм позиционировался как генетический маркер с высоким дифференцирующим потенциалом.

Комплексную оценку дифференцирующего потенциала для совокупности SNP проводили с использованием программы MDR v.3.0.2 (<http://www.multifactorialdimensionalityreduction.org/>) [11]. Вклад конкретного генотипа определялся величиной энтропии  $H$  (выраженной в %). При  $H = 100\%$  генотип способен однозначно дифференцировать, к какой группе (волк или домашняя собака) относится неизвестный образец. В программе MDR в результате множественных перестановок (пермутаций) первичных данных определяется наиболее оптимальная модель дифференциации.



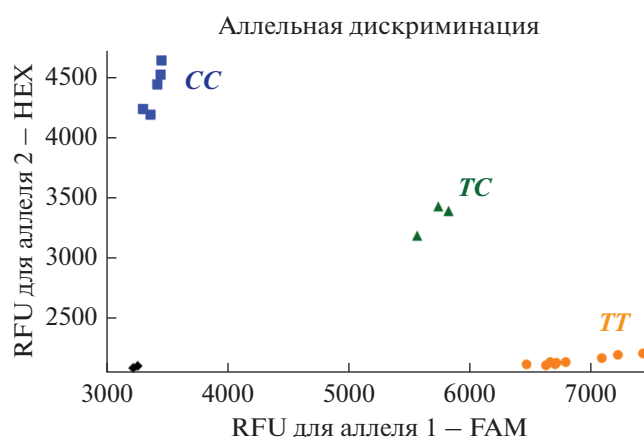
**Рис. 1.** Результаты электрофоретического разделения рестриктов для полиморфизма  $g.27748425T>C$  гена *ADCY8* в 10.0%-ном ПААГ. М – маркер молекулярного веса (Jena Bioscience M-213S). 1 – *T/T Canis lupus f.*, 2 – *T/T Canis lupus f.*, 3 – *T/T Canis lupus f.*, 4 – *C/C Canis lupus*, 5 – *C/C Canis lupus*, 6 – *C/C Canis lupus*, 7 – *C/C Canis lupus*.

В процессе моделирования были использованы высоко консервативные настройки поиска конфигурации модели, которые позволили однозначно дифференцировать наличие/отсутствие статистически значимых эффектов, а именно: количество атрибутов (attribute count range) – от 1 до  $n$  (где  $n$  – число переменных в модели); воспроизводимость модели (cross-validation count) – 100; анализ топ-моделей (track top models) – 1000; поиск конфигурации модели (search method configuration) – всесторонний (exhaustive); метод сравнения (ambiguous cell analysis) – точный тест Фишера (Fisher's exact test); классификация ячеек (ambiguous cell assignment) – неклассифицированные (unclassified). Корректность модели оценивали по значению сбалансированной точности (Balanced Accuracy), которая зависит от чувствительности и специфичности модели.

Вероятность отнесения образца к одной из двух групп: *Canis lupus familiaris* или *Canis lupus*, – рассчитывали в SPSS v.20.0 с использованием логистической регрессии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием алгоритма глобального выравнивания, реализованного в ПО Unipro UGENE v.1.31.1 [9], были проанализированы на наличие SNP с высоким дифференцирующим потенциалом (т. е. с максимально различающимися частота-

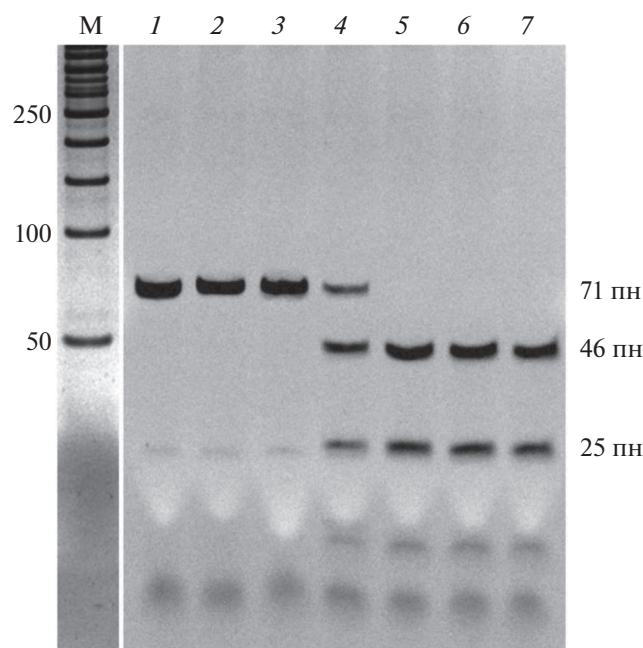


**Рис. 2.** График аллельной дискриминации результатов KASP для полиморфизма  $g.27748425T>C$  гена *ADCY8*.

ми распространения аллелей для двух групп) следующие регионы: на 13 хромосоме –  $g.27000000$ – $g.29000000$  и на 30 хромосоме –  $g.800000$ – $g.1600000$ . Выбор данных регионов был обусловлен тем фактом, что в исследовании В.М. Vonholdt с соавт. [3] с применением полногеномного анализа SNP были выявлены кластеры нуклеотидных последовательностей (для 13 хромосомы – длиной 543841 пн, для 30 хромосомы – 1239195 пн), содержащие SNP, частота аллелей для которых существенно отличалась для представителей *Canis lupus familiaris* и *Canis lupus* по причине эволюционной дивергенции. В результате биоинформатического анализа были выявлены 13 SNP с потенциально высоким дифференцирующим потенциалом.

С использованием биоинформатического и молекулярно-генетического анализа определены генотипы по SNP  $g.27748425T>C$  (*ADCY8*) и  $g.1414373T>C$  (*RYR3*) для 1095 животных, из них 283 – *Canis lupus*, 812 – *Canis lupus familiaris* (см. Приложение). Наибольший дифференцирующий потенциал был определен для SNP  $g.27748425T>C$  (ген *ADCY8*) – AUC = 0.947, 95%ДИ 0.934–0.960,  $p = 3.45E-112$ . Для SNP  $g.1414373T>C$  (ген *RYR3*) – AUC = 0.893, 95%ДИ 0.871–0.915,  $p = 4.31E-87$ .

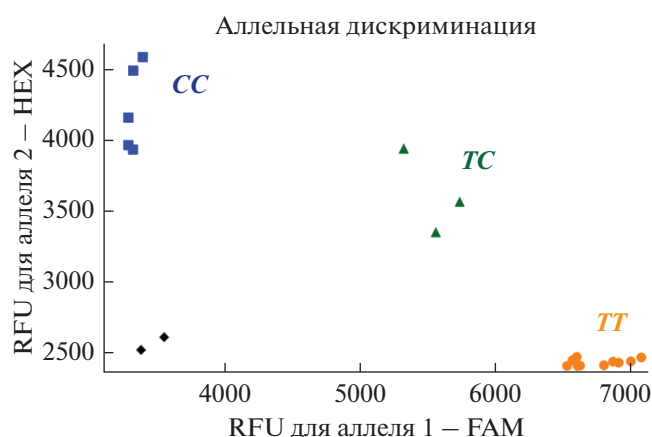
Для включенных в исследование образцов домашней собаки ( $n = 812$ ) показано наличие трех генотипов для полиморфизма  $g.27748425T>C$  (*ADCY8*), при этом аллель *T* распространен в выборке “Домашняя собака” с частотой 78.9%, т. е. является мажорным. Для образцов из выборки “Волк” ( $n = 283$ ) в рамках данного исследования аллель *C* распространен с частотой 99.3%. Электрофореграмма разделения рестриктов представлена на рис. 1, результаты аллельной дискриминации с использованием KASP – на рис. 2.



**Рис. 3.** Результаты электрофоретического разделения рестриктов для полиморфизма g.1414373T>C гена *RYR3* в 10.0%-ном ПААГ. М – маркер молекулярного веса (Jena Bioscience M-213S). 1 – *T/T Canis lupus f.*, 2 – *T/T Canis lupus f.*, 3 – *T/T Canis lupus f.*, 4 – *C/T Canis lupus*, 5 – *C/C Canis lupus*, 6 – *C/C Canis lupus*, 7 – *C/C Canis lupus*.

Для образцов из выборки “Домашняя собака” для полиморфизма g.1414373T>C (*RYR3*) также показано наличие трех генотипов. Аллель *T* распространен в данной выборке с частотой 80.9%. Для образцов из выборки “Волк” в рамках данного исследования аллель *C* распространен с частотой 83.2%. Электрофореграмма разделения рестриктов представлена на рис. 3, результаты аллельной дискриминации с использованием KASP – на рис. 4.

Для создания универсальной системы дифференциации было принято решение включить в тест-систему по одному SNP из каждой хромосомы, чтобы избежать сложностей, сопряженных с совместным наследованием генетических маркеров. Графическая интерпретация модели представлена на рис. 5. Согласно полученным результатам сбалансированная точность дифференциации (adj. Balanced accuracy) волка от домашней собаки при анализе 1095 образцов по двум SNP – g.27748425T>C (ген *ADCY8*, chr. 13) и g.1414373T>C (ген *RYR3*, chr. 30), – составила 96.2% (специфичность модели – 96.3, чувствительность – 98.9%), см. файл “Доп. материалы.xlsx”, лист “MDR\_result”. В среднем, в 5.8% случаев особь не удалось отнести ни к одному кластеру с заявленным в MDR-уровнем точности в 99.0%.

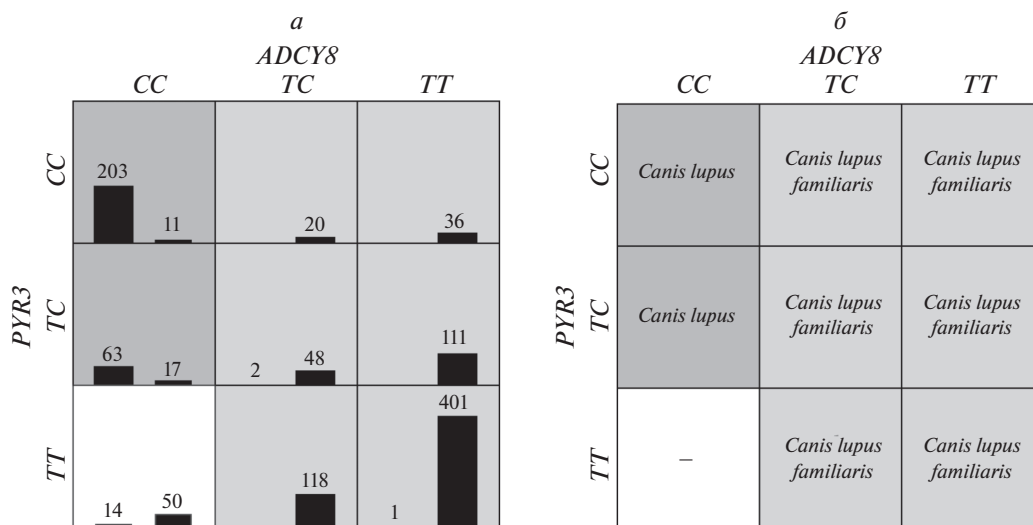


**Рис. 4.** График аллельной дискриминации результатов KASP для полиморфизма g.1414373T>C гена *RYR3*.

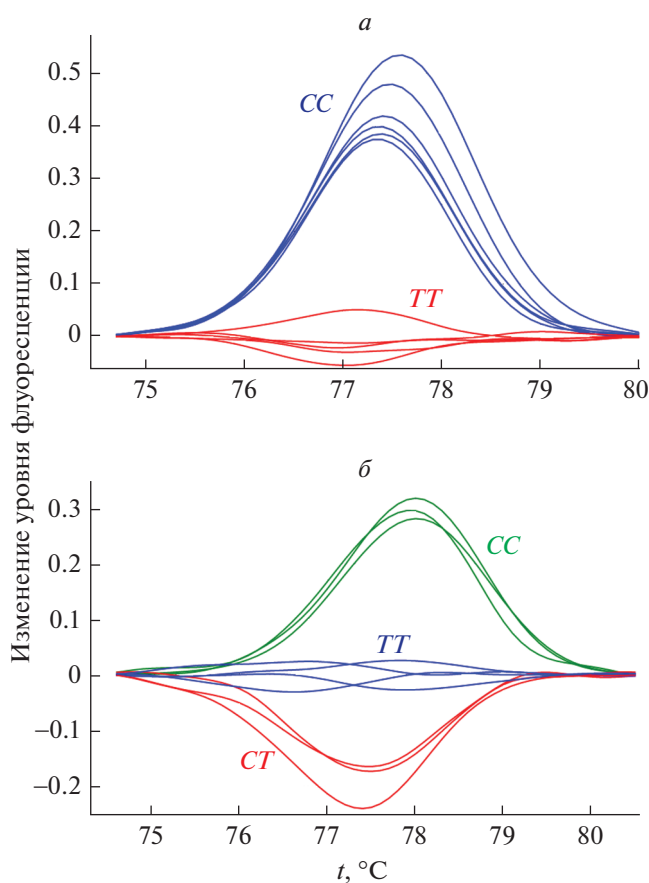
В то же время при оценке точности отнесения образца к одной из двух групп: *Canis lupus familiaris* (CLF) или *Canis lupus* (CL) с использованием логистической регрессии получены следующие данные (см. файл “Доп. материалы.xlsx”, лист “LOG”): при наличии генотипа *CC* (*ADCY8*)/*CC* (*RYR3*) вероятность отнесения образца к группе CL составляет 95.26% (распространенность особей с данным генотипом в группе – 71.73%), при наличии генотипа *CC* (*ADCY8*)/*TC* (*RYR3*) – 72.93% (распространенность – 22.26%); при наличии генотипа *TC* (*ADCY8*)/*CC* (*RYR3*) вероятность отнесения образца к группе CLF составляет 80.27%, при наличии генотипа *TC* (*ADCY8*)/*TC* (*RYR3*) – 96.81%, при наличии генотипа *TC* (*ADCY8*)/*TT* (*RYR3*) – 99.56%, при наличии генотипа *TT* (*ADCY8*)/*CC* (*RYR3*) – 99.70%, при наличии генотипа *TT* (*ADCY8*)/*TC* (*RYR3*) – 99.96%, при наличии генотипа *TT* (*ADCY8*)/*TT* (*RYR3*) – 100%.

Особого внимания заслуживают три особи волка, по фенотипическим характеристикам однозначно относящихся к *Canis lupus*, с генотипами *TC* (*ADCY8*)/*TC* (*RYR3*) и *TT* (*ADCY8*)/*TT* (*RYR3*), которые теоретически могут относиться к волкосомам (гибридам между волком и собакой). Косвенно это указывает тот факт, что для образцов SAMEA7038723, SAMEA7038724 и SAMEA7038725, являющихся гибридами между волком и собакой (*Canis lupus* × *Canis lupus familiaris* – wolfdog, BioProject – PRJEB39198), определены гетерозиготные генотипы для полиморфизма g.27748425T>C (*ADCY8*), см. файл “Доп. материалы.xlsx” (лист “dataset”) и табл. 2. Возможно, в дальнейшем анализ этих образцов с использованием STR-локусов подтвердит данное предположение.

Среди особей *Canis lupus familiaris* с генотипами *CC* (*ADCY8*)/*CC* (*RYR3*) и *CC* (*ADCY8*)/*TC* (*RYR3*) выявлены породы: русский черный терьер, шар-



**Рис. 5.** Графическое представление модели из двух полиморфизмов в генах *ADCY8* и *RYR3*. *а* – распределение генотипов исследованных локусов в выборках “Домашняя собака” и “Волк”: в каждой ячейке цифра слева – абсолютное число особей *Canis lupus*, цифра справа – абсолютное число особей *Canis lupus familiaris*. *б* – результат отнесения образца к одной из двух групп – *Canis lupus* или *Canis lupus familiaris*.



**Рис. 6.** Результат кластеризации генотипов в Precision Melt Analysis™ Software v.1.3 (Bio-Rad, США) для полиморфизма: *а* – g.27748425T>C (*ADCY8*), *б* – g.1414373T>C (*RYR3*).

пей, аляскинский маламут, пекинес, бельгийская овчарка, куньминская овчарка, такса, бернский зенненхунд, йоркширский терьер, шотландский терьер, алапахский бульдог, доберман пинчер. Таким образом, наличие аллеля С (g.1414373T>C, *RYR3*), характерного для *Canis lupus*, не является специфической характеристикой для каких-то конкретных пород собак.

Также мы апробировали метод HRM для генотипирования полиморфных вариантов g.27748425T>C (*ADCY8*) и g.1414373T>C (*RYR3*). Цель этапа – дать исследователю простой, но достаточно точный и доступный метод генотипирования в контексте описанной выше модели. Для деградированных образцов ДНК, как нам представляется, данный способ будет весьма актуален.

Результаты аллельной кластеризации были подтверждены с использованием ПЦР-ПДРФ и KASP. Результаты кластеризации для полиморфизма g.27748425T>C (*ADCY8*) представлены на рис. 6, *а*, для g.1414373T>C (*RYR3*) – рис. 6, *б*.

Также с использованием предложенной нами тест-системы была проведена апробация на образцах близкородственных к *Canis lupus* видов, а именно: обыкновенный шакал (*Canis aureus*), койот (*Canis latrans*), гималайский волк (*Canis lupus chanco*), динго (*Canis lupus dingo*), иберийский волк (*Canis lupus signatus*), красный волк (*Cuon alpinus*), африканский золотой волк (*Canis lupaster*), эфиопский шакал (*Canis simensis*) и гиеновидная собака (*Lycan pictus*). Результаты генотипирования in silico и классификация по кластерам представлены в табл. 2. Особи видов *Canis latrans*,

**Таблица 2.** Генотипы животных из семейства Canidae по двум SNP в генах *ADCY8* и *RYR3*

Образец	Вид	g.27748425T>C ( <i>ADCY8</i> )	g.1414373T>C ( <i>RYR3</i> )
SAMN10180427*	<i>Canis aureus</i>	TT	CC
SAMN02921301#	<i>Canis latrans</i>	CC	CC
SAMN08005340#		CC	CC
SAMN10180421#		CC	CC
SAMN10180422#		CC	CC
SAMN10180423#		CC	CC
SAMN10199001#		<i>Canis lupaster</i>	CC
SAMN03652997#	<i>Canis lupus chanco</i>	CC	CC
SAMN03652998*		TC	CC
SAMN03652999#		CC	CC
SAMN03653000#		CC	CC
SAMN03653001#		CC	TC
SAMN03653002#		CC	CC
SAMN03653003#		CC	CC
SAMN03653004#		CC	CC
SAMN08873190#	<i>Canis lupus dingo</i>	CC	TC
SAMN13476347*		TT	CC
SAMN13476607*		TC	TC
SAMN13476608#		CC	CC
SAMN13476865#		CC	CC
SAMN13476866*		TC	TC
SAMN13476879#		CC	CC
SAMN13476881*		TT	CC
SAMN13476886#		CC	CC
SAMN13476889#		CC	CC
SAMN04851099#	<i>Canis lupus signatus</i>	CC	CC
SAMN10180425#	<i>Canis simensis</i>	CC	CC
SAMN03168405#	<i>Cuon alpinus</i>	CC	CC
SAMN10180424#		CC	CC
SAMN10180432#	<i>Lycaon pictus</i>	CC	CC
SAMEA7038723*	<i>Canis lupus</i> × <i>Canis lupus familiaris</i> (wolfdog)	TC	CC
SAMEA7038724*		TC	CC
SAMEA7038725*		TC	CC

\* – согласно дифференцирующей модели образец определен как “Домашняя собака”, # – согласно дифференцирующей модели образец определен как “Волк”.

*Canis lupus signatus*, *Canis simensis*, *Cuon alpinus*, *Lycaon pictus* и *Canis lupaster* были отнесены к кластеру “Волк” (*Canis lupus*). Семь из восьми представителей вида *Canis lupus chanco* также были отнесены к кластеру “Волк” (*Canis lupus*). Среди особей вида *Canis lupus dingo* лишь шесть из десяти были отнесены к кластеру “Волк” (*Canis lupus*). Как известно, собаки динго – вторично одичавшие домашние собаки, и, таким образом, среди них высока частота аллелей, характерных для вида *Canis lupus familiaris*.

Необходимо отметить, что сбалансированная точность дифференциации *Canis lupus familiaris* и *Canis lupus* составила более 95%, данного показателя вполне достаточно для решения большинства задач биологической направленности, например, в контексте популяционных исследований. В то же время, в 2.56% случаев (согласно модели, рис. 6) образцы домашней собаки могут быть некорректно дифференцированы как образцы волка. В перспективе для увеличения точности модели (например для криминалистических приложений) необходимо увеличение выборки исследуемых образцов за счет включения новых образцов с заведомо известной видовой принадлежностью, например по результатам биологического исследования (при наличии шкуры и др. объектов биологического происхождения, позволяющих однозначно дифференцировать видовую принадлежность образца) и/или генетического исследования (например анализ STR-локусов). Также перспективно и добавление в предложенную нами модель новых SNP с высоким дифференцирующим потенциалом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего исследования предложена тест-система, основанная на анализе двух SNP в генах *ADCY8* и *RYR3*, по дифференциации волка (*Canis lupus*) и домашней собаки (*Canis lupus familiaris*). Так, с использованием методов биоинформатики определены SNP с высоким дифференцирующим потенциалом для различения волка и домашней собаки, а также на практическом материале подтвержден высокий дифференцирующий потенциал выявленных полиморфных вариантов. На основании результатов молекулярно-генетического анализа и генотипирования *in silico* 1095 образцов предложена тест-модель из двух SNP –g.27748425T>C (*ADCY8*) и g.1414373T>C (*RYR3*), сбалансированная точность которой составляет не менее 96.2% при специфичности 96.3%. Входящие в тест-систему SNP представляются возможным анализировать с использованием различных технологий – KASP, ПЦР-ПДРФ или HRM.

Предложенная нами схема по дифференциации волка и домашней собаки с использованием двух SNP выгодно отличается своей универсально-

стью (с позиций методологического подхода возможно использовать различную приборную базу), высокими точностью и специфичностью. Молекулярно-генетический анализ с использованием KASP призван сократить временные и финансовые затраты на молекулярно-генетическое тестирование, а также снизить риск кросс-контаминации, т. к. процесс является одностадийным (исключены этапы рестрикции и электрофореза).

В целом, продолжение исследований, расширение базы образцов и включение в тест-систему дополнительных SNP для идентификации, в том числе и гибридов между *Canis lupus familiaris* и *Canis lupus*, продолжает оставаться актуальной задачей.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке ООО “Максим Медикал” в рамках частной научной инициативы “Analysis of SRA Data using bioinformatics methods”.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hindrikson M., Remm J., Pilot M. et al. Wolf population genetics in Europe: A systematic review, meta-analysis and suggestions for conservation and management // Biol. Rev. 2016. V. 92(3). P. 1601–1629. <https://doi.org/10.1111/brv.12298>
2. Cronin M.A., Canovas A., Bannasch D.L. et al. Single nucleotide polymorphism (SNP) variation of wolves (*Canis lupus*) in Southeast Alaska and comparison with wolves, dogs, and coyotes in North America // J. Hered. 2015. V. 106(1). P. 26–36. <https://doi.org/10.1093/jhered/esu075>
3. Vonholdt B.M., Pollinger J.P., Lohmueller K.E. et al. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication // Nature. 2010. V. 464(7290). P. 898–902. <https://doi.org/10.1038/nature08837>
4. Гребенчук А.Е. Псовые как объект экспертного ДНК-анализа: криминалистические и генетические аспекты // Вопр. криминологии, криминалистики и судебной экспертизы. 2016. № 2 (40). С. 135–140.
5. Хейдорова Е.Э., Шпак А.В., Гомель К.В. и др. Молекулярно-генетическая идентификация инвазивного вида – шакала азиатского (*Canis aureus*) на территории Беларуси // Докл. НАН Беларуси. 2018. Т. 62. № 1. С. 86–92. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-1-86-92>
6. Купень В.Н., Иванова Е.В., Снытков Е.В., Верчук А.Н. Анализ полиморфизма гена гестина (*HEPH*) на X-хромосоме для установления принадлежности биологических образцов к диким или домашним представителям вида *Sus scrofa* // Генетика. 2020. Т. 56. № 9. С. 1054–1064. <https://doi.org/10.31857/S0016675820080068>
7. Купень В.Н., Михалова М.Е., Снытков Е.В. и др. Биоинформатический анализ геномов коммерче-



- ских пород домашних свиней для идентификации породоспецифичных SNP // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Серыя аграрных навук. 2021. Т. 59. № 4. С. 464–476.  
<https://doi.org/10.29235/1817-7204-2021-59-4-464-476>
8. Ramos A.M. Identification of high utility SNPs for population assignment and traceability purposes in the pig using high-throughput sequencing // Anim. Genet. 2011. V. 42(6). P. 613–620.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02198.x>
9. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 1166–1167.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
10. Кипень В.Н., Снытков Е.В., Кривенко А.А., Патрин М.М. *In silico* анализ полиморфизма H3GA0051811 гена *HEPN* для животных вида *Sus scrofa* // VII Междунар. конф. молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2020. Новосибирск: 2020. С. 469–472.
11. Ritchie M.D., Hahn L.W., Roodi N. et al. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer // Am. J. Hum. Genet. 2001. V. 69(1). P. 138–147.  
<https://doi.org/10.1086/321276>

## Analysis of *ADCY8* и *RYR3* Genes Polymorphism for Identification Wild and Domestic Animal of Species *Canis lupus*

V. N. Kipen<sup>a, \*</sup>, M. M. Patrin<sup>b</sup>, E. V. Snytkov<sup>a, c</sup>, A. N. Viarchuk<sup>a, d</sup>, and A. N. Semak<sup>e</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Republic of Belarus*

<sup>b</sup>*Maxim Medical LLC, Moscow, 123423 Russia*

<sup>c</sup>*International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, 220070 Republic of Belarus*

<sup>d</sup>*Scientific and Practical Center of the State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, Minsk, 220073 Republic of Belarus*

<sup>e</sup>*WellVet LLC, Minsk, 220013 Republic of Belarus*

\*e-mail: v.kipen@igc.by

As a result of the study, we confirmed the high differentiating potential of polymorphic variants g.27748425T>C (*ADCY8* gene) and g.1414373T>C (*RYR3* gene). A test model of two polymorphisms for the differentiation of a wolf and a domestic dog is proposed, which is distinguished by high values of accuracy (96.2%), specificity (96.3%) and sensitivity (98.9%). Using KASP, a quick and simple approach to differentiation based on the proposed test model has been developed, which is designed to reduce the time and cost of molecular genetic analysis, as well as reduce the risk of cross-contamination, because the process is one-stage (restriction and electrophoresis stages are excluded).

**Keywords:** *Canis lupus*, *Canis lupus familiaris*, SNP, differentiation, kompetitive allele-specific PCR (KASP), RFLP-PCR, high-resolution amplicon melting (HRM), *in silico* genotyping.