

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ И МЕТОДЫ

УДК 343.98+575.174:599.742.1

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ ОСОБЕЙ ВИДА ЕНОТОВИДНАЯ СОБАКА

© 2023 г. А. Е. Гребенчук¹, *, О. Н. Лукашкова², С. А. Котова², И. С. Цыбовский³

¹Государственный комитет судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, 220073 Республика Беларусь

²Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз
Республики Беларусь, Минск, 220114 Республика Беларусь

³Республиканское унитарное предприятие “БелЮрОбеспечение”, Минск, 220069 Республика Беларусь

*e-mail: iamsanya94@mail.ru

Поступила в редакцию 04.08.2022 г.

После доработки 23.08.2022 г.

Принята к публикации 09.09.2022 г.

По результатам исследования полиморфизма 39 микросателлитных (STR) локусов и трех локусов половой принадлежности, специфичных к различным видам семейства псовые, с целью ДНК-идентификации биологических образцов животных вида енотовидная собака (*Nyctereutes procyonoides*) предложена тест-система NPlx, включающая 14 аутомных STRs и два половых локуса. Тест-система валидирована для решения экспертных задач по установлению принадлежности биологических следов, обнаруженных на местах правонарушений (следов крови и выделений, фрагментов мышечных или костных тканей, дермы и волос и т.п.), конкретной особи животного вида енотовидная собака, а также для установления биологического родства животных данного вида. Валидационные мероприятия проведены в соответствии с протоколом Scientific Working Group on DNA Analysis Methods.

Ключевые слова: микросателлиты, идентификация, семейство псовые, криминалистика, незаконная охота.

DOI: 10.31857/S0016675823050065, **EDN:** FNOVHT

Вид енотовидная собака (*Nyctereutes procyonoides*) является самым неизученным в семействе псовые. Доступна информация о нескольких группах исследователей [1–4], которые занимаются выявлением индивидуальных генетических характеристик этого вида животных. Поскольку данный вид псовых лидирующий распространитель таких заболеваний как бешенство и чесотка, основное внимание ученых направлено именно на исследование зоонозных инфекций у вида [5–8].

Вид енотовидная собака в начале XX в. обитал только на Дальнем Востоке и включал пять подвидов: *Nyctereutes procyonoides procyonoides* (обитал в Китае и Северном Вьетнаме); *N. p. orestes* (населял горную область Китая); *N. p. ussuriensis* (был распространен в большинстве регионов Сибири и Восточного Китая); *N. p. koreensis* и *N. p. viverrinus* (обитали на территории Кореи и Японии соответственно) [9]. В Беларуси енотовидная собака была интродуцирована в 1936 г. (Гомельская, Минская и Витебская области) [10]. Но уже до этого времени на территории республики встречались единичные особи енотовидной собаки, мигрировавшие из соседних областей России, в которых

их интродукция была проведена раньше [11]. Енотовидная собака в Беларуси является ненормируемым охотничьим видом, охота на которого разрешена весь год. Однако отстрел данного животного без охотничьей путевки или в заповедниках классифицируется как факт незаконной охоты, что приводит к возбуждению уголовных дел и, как следствие, к назначению судебных экспертиз. Численность енотовидной собаки на территории страны в 2020 г. составляла около 15000 особей, из которых 5500 особей (около 40% численности) были добыты в ходе плановых охотничьих мероприятий [12].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования и выделение ДНК

Для изучения STR-полиморфизма вида енотовидная собака было исследовано 165 образцов мышечной и хрящевой ткани и образцов шерсти животных (73 биологических образца самцов и 92 самок). Коллекция образцов диких животных была законно сформирована при содействии ГУ “Полесский государственный радиационно-эко-

логический заповедник”, а также в сотрудничестве с РГОО “Белорусское общество охотников и рыболовов”.

ДНК из биологических образцов выделяли по методике, основанной на высвобождении ДНК в ходе инкубации образцов биологического материала в лизирующем буфере 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, содержащем 2% SDS, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA, с протеиназой K и 0.01 mM дитиотрейтолом, при 37–56°C и периодическом встряхивании. Лизат мышечной и хрящевой ткани подвергали общепринятой процедуре очистки на силикагеле [13]. Определение количества выделенной ДНК проводили методом спектрофотометрии с использованием прибора для измерения концентрации общей фракции ДНК для микрообъемов объектов исследования DS-11 (DeNovix, США) согласно рекомендациям производителя.

Дизайн тест-системы, амплификация микросателлитных локусов и генотипирование

С целью разработки тест-системы для криминалистической ДНК-идентификации животных биологического вида енотовидная собака проведено исследование полиморфизма 39 STR-локусов и трех локусов половой принадлежности. Подробный перечень локусов указан в табл. S1 Приложения.

В процессе оптимизации условий протекания амплификации исследовали специфичность и интенсивность выявления аллелей в зависимости от значений концентрации ионов Mg^{2+} , температуры отжига и концентрации праймеров, количества и качества ДНК, с использованием различных стабилизаторов полимеразы (Triton X-100, Tween-20, BSA, TMGNa, DMSO) в изменяющихся количествах, а также с ДНК-полимеразами различных типов и производителей. В результате конечный состав реакционной смеси общим объемом 10 мкл составил: 10 mM Tris-HCl, pH 8.6; 25 mM KCl; 2.0 mM $MgCl_2$; 0.2 mM каждого из dNTP; 0.2–1.0 мкМ каждого из пары праймеров; 0.15 ед. активности ДНК-полимеразы; 1.5 нг/мкл БСА (бычий сывороточный альбумин); 0.02% Triton X-100 и 1–20 нг анализируемой ДНК.

При разработке тест-системы NPLex амплификацию проводили на программируемых приборах термоциклического типа “C1000” (BioRad, США) в следующих условиях: 10 мин инициальной инкубации при 95°C; 30× [30 с при 95°C, 40 с при 60°C и 60 с при 72°C] с финальным этапом элонгации в течение 30 мин при 72°C.

Характерное для каждого из образцов сочетание аллелей выявляли путем электрофоретического разделения продуктов ПЦР в генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Определение размеров выявленных аллелей (в пн) и соответствующих генотипов

ДНК в исследуемых локусах проводили с использованием внутренних стандартов размера Orange 500 bp (NimaGen®, Нидерланды) и GeneScan-600 LIZ™ SizeStandard v2.0 (ThermoFisher Scientific, США), а также программного пакета GeneMapper ID-X v1.6.

Секвенирование аллелей локусов

Для выявления возможных изоаллелей и микровариантов последовательности, а также для тандемного исчисления аллелей тест-системы проводили определение первичной структуры аллелей путем секвенирования методом обрыва цепи. Нуклеотидные последовательности аллелей каждого из STR-локусов и локусов половой принадлежности особей вида енотовидная собака определяли в прямом и обратном направлении. Секвенирование проводили на приборе 3500 Genetic Analyzer с использованием набора для секвенирования BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и BrilliantDye™ Terminator kit v.3.1 (NimaGen®). Полученные результаты анализировали с помощью пакета программ Sequencing Analysis Software v.5.4 (Applied Biosystems). Сравнительный анализ последовательностей аллелей исследованных локусов у целевых видов и видов-источников проводили на основе ресурсов базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank [14] и программного продукта BioEdit v7.0.5.3 [15]. Последовательности каждого локуса тест-системы NPLex, имеющие минимальный и максимальный молекулярный размер аллелей, были внесены в базу данных GenBank с присвоением соответствующих номеров доступа, которые указаны в табл. S2 Приложения.

Статистическая обработка результатов

Основной анализ генетического разнообразия, а именно выявление уровня полиморфизма, расчет частот встречаемости аллелей, значения наблюдаемой (H_O) и ожидаемой (H_E) гетерозиготности, оценку соответствия равновесию Харди–Вайнберга (HWE) и оценку сцепления локусов проводили с использованием программных пакетов GenAlEx v6.5 [16] и Arlequin v3.5.1.3 [17]. Установление возможных ошибок в интерпретации генетических профилей локусов с интенсивными статтер-фрагментами, при выпадении аллелей, при наличии “нуль”-аллелей или других возможных артефактов ПЦР проводили с помощью программ MicroChecker v2.2.1 [18] и Cervus v3.0.7 [19].

Кластерный анализ массива генотипов выборки енотовидной собаки, полученного с разработанной тест-системой, оценивали с использованием программы Structure v2.3.4 [20, 21].

Криминалистические параметры отобранных микросателлитных локусов (расчет *PIC*, вероятностей случайного совпадения генотипов для неродственных особей и для сибсов, частоты встречаемости определенного генотипа) были рассчитаны с помощью программных продуктов GenAlEx v6.5 и Cervus v3.0.7. Конвертацию массивов генотипов енотовидной собаки в генетические файлы вышеперечисленных программ проводили с использованием вспомогательного компонента PGDSpider [22].

Валидационные мероприятия

Процесс апробации и оптимизации условий использования тест-системы был направлен на достижение высокого уровня специфичности амплификации, оптимальной интенсивности выявления флуорофоров маркера и заключался в подборе температуры отжига праймеров, концентрации праймеров и их соотношения в системе, а также количества ДНК в пробе.

Валидационные мероприятия проведены в соответствии с протоколом Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) и включали в себя: исследование работоспособности тест-системы как с коммерческими наборами реагентов различных производителей (ThermoFisher Scientific, США, ОДО “Праймтех”, РБ; ООО “Синтол”, РФ; ЗАО “Евроген”, РФ; ООО “АртБиоТех”, РБ; BioRad, США), так и с реакционными смесями лабораторного приготовления, а также тестирование разработанной системы на повторяемость, воспроизводимость, специфичность, анализ смесей, чувствительность и устойчивость. Анализ результатов валидационных мероприятий проводили с помощью программного обеспечения GeneMapper ID-X v1.4 (ThermoFisher Scientific).

Повторяемость. С целью оценки повторяемости получения результатов с использованием тест-системы NPlеx контрольные образцы ДНК были амплифицированы 16 раз с последующим анализом результатов генотипирования.

Воспроизводимость. Оценена вариабельность получения результатов с использованием тест-системы NPlеx между операторами, временными интервалами (сутки) и используемыми приборами. Каждый оператор независимо соблюдал протокол в отдельные дни и с использованием разного оборудования.

Специфичность. В рамках анализа специфичности оценена перекрестная применимость данной системы на матрицах ДНК других представителей семейства псовые. Также для валидации тест-системы NPlеx по аналитической специфичности проведена проверка возможности отжига различных комбинаций праймеров, использованных в тест-системе, на матрицах ДНК других представи-

телей класса млекопитающие. Анализ проводили с использованием базы нуклеотидных последовательностей GenBank и программного продукта Primer-BLAST.

Анализ смесей. С использованием предлагаемой тест-системы были проанализированы образцы, содержащие смесь биологического материала различных особей енотовидной собаки, а также образцы, содержащие смесь ДНК енотовидной собаки и ДНК другого представителя семейства псовые, в различных соотношениях компонентов смеси. Соотношения смесей были следующими: 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5, 1 : 15 и 1 : 30, причем мужской образец был второстепенным компонентом.

Чувствительность. Во время валидационных и контрольных исследований тест-система NPlеx была проанализирована с использованием матриц ДНК в разном количестве (0.1, 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 20 нг) и различного качества (ДНК с различным индексом деградации).

Устойчивость. В рамках валидационных мероприятий продемонстрирована устойчивость результатов, полученных с помощью тест-системы NPlеx, с использованием образца контрольной ДНК енотовидной собаки. Амплификацию контрольного образца ДНК с использованием тест-системы NPlеx проводили при 20, 25, 30, 35 и 40 циклах ПЦР в трех повторностях.

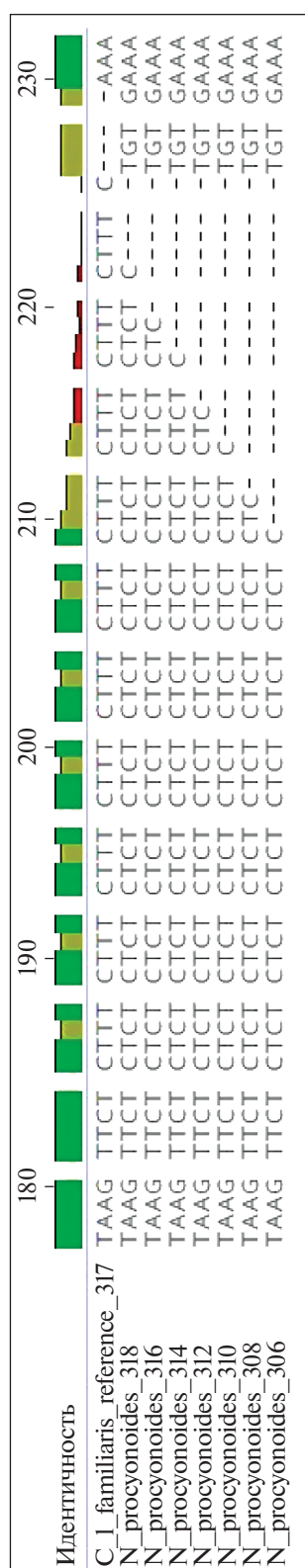
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование мультиплексной тест-системы

Уже на первоначальном этапе исследования пять микросателлитных локусов были исключены из последующего анализа по причине отсутствия специфической амплификации (табл. S1 Приложения). На втором этапе оценивался уровень полиморфизма отобранных 34 локусов и их способность к амплификации в мультиплексной системе. Локусы с мономорфным проявлением признака, высокой интенсивностью статтер-фрагментов или препятствующие мультиплексированию были удалены из последующего анализа.

Исключения составили два локуса *vWEx* и *Nuc10*, у которых были выявлены один и два аллеля соответственно. Аллели локуса *vWEx* содержат в своей структуре гексануклеотидные tandemные повторы. У енотовидной собаки, лисицы обыкновенной и песца обыкновенного locus имеет мономорфное выявление, у собак и волков — полиморфное. Locus *Nuc10* у лисицы обыкновенной проявляется мономорфно, у енотовидной собаки — полиморфно, а у волка, собаки и песца locus не амплифицируется.

Поскольку в Беларуси объектами незаконной охоты могут быть все вышеперечисленные дикие виды животных, а охоту на енотовидную собаку нередко проводят с использованием охотничьих



собак, существует высокая вероятность наличия смешанных криминалистических образцов. В таком случае локусы с выраженным межвидовым дифференцирующим потенциалом могут быть полезными компонентами тест-системы в качестве внутреннего молекулярно-генетического контроля видовой принадлежности исследуемого образца.

В результате проведенного секвенирования аллелей отобранных локусов была установлена выраженная размерная гомоплазия с типом тандема $(AG)_n(GGAA)_n$ в локусе *FN3771* и было выявлено большое количество микровариантов в динуклеотидном локусе *CPH4*. Данные локусы также были исключены из дальнейшей работы. Причины исключения остальных исследованных маркеров более подробно указаны в табл. S1 Приложения.

Неожиданный результат был получен при секвенировании аллелей локуса *FH2361*. При переносе данного маркера на ДНК енотовидной собаки аллели с исходно тетра nukлеотидным тандемом (CTTT)*n* у собаки домашней визуализируются при электрофорезе как динуклеотидные и имеют тандемное строение (CT)*n* (рис. 1).

Таким образом, в результате изучения полиморфизма 39 STR-локусов и трех локусов половой принадлежности было отобрано 14 аутосомных микросателлитных локусов (гексануклеотид *vWFx* [23]; три локуса с тетрануклеотидным повтором – *FH2096* [24], *Nyct10* [2], *PEZ17* [25]; два тринуклеотидных локуса – *Nyct9*, *Nyct11* [2]; восемь динуклеотидных – *FH2361* [25], *NPPM30*, *NPPM609*, *NPPM965* [1], *Nyct3*, *Nyct4*, *Nyct6* [2] и *V602* [26]) и два половых (*DBX6*, *DBY7* [27]). Из них девять локусов разработаны для генотипирования енотовидной собаки (*Nyct10*, *Nyct9*, *Nyct11*, *NPPM30*, *NPPM609*, *NPPM965*, *Nyct3*, *Nyct4*, *Nyct6*), шесть локусов – для собаки домашней (*vWFx*, *FH2096*, *PEZ17*, *FH2361*, *DBX6*, *DBY7*) и один локус – для лисицы обыкновенной (*V602*).

Типичная электрофореграмма разработанной тест-системы для идентификации енотовидной собаки приведена на рис. 2.

Статистический анализ результатов использования тест-системы

При статистическом анализе результатов генотипирования установлено, что распределение частот гетерозиготных профилей в исследуемой выборке соответствует нормальному (рис. 3).

При этом распределение частот гетерозиготных профилей выборки подчиняется правилу трех сигм (σ). На расстоянии одного стандартного отклонения (1σ) от среднего значения 0.658 находятся 66.7% значений из данного распределения (диапазон значений 0.530–0.786, стандартное отклонение $\sigma = 0.127$); 95.2% значений лежат на

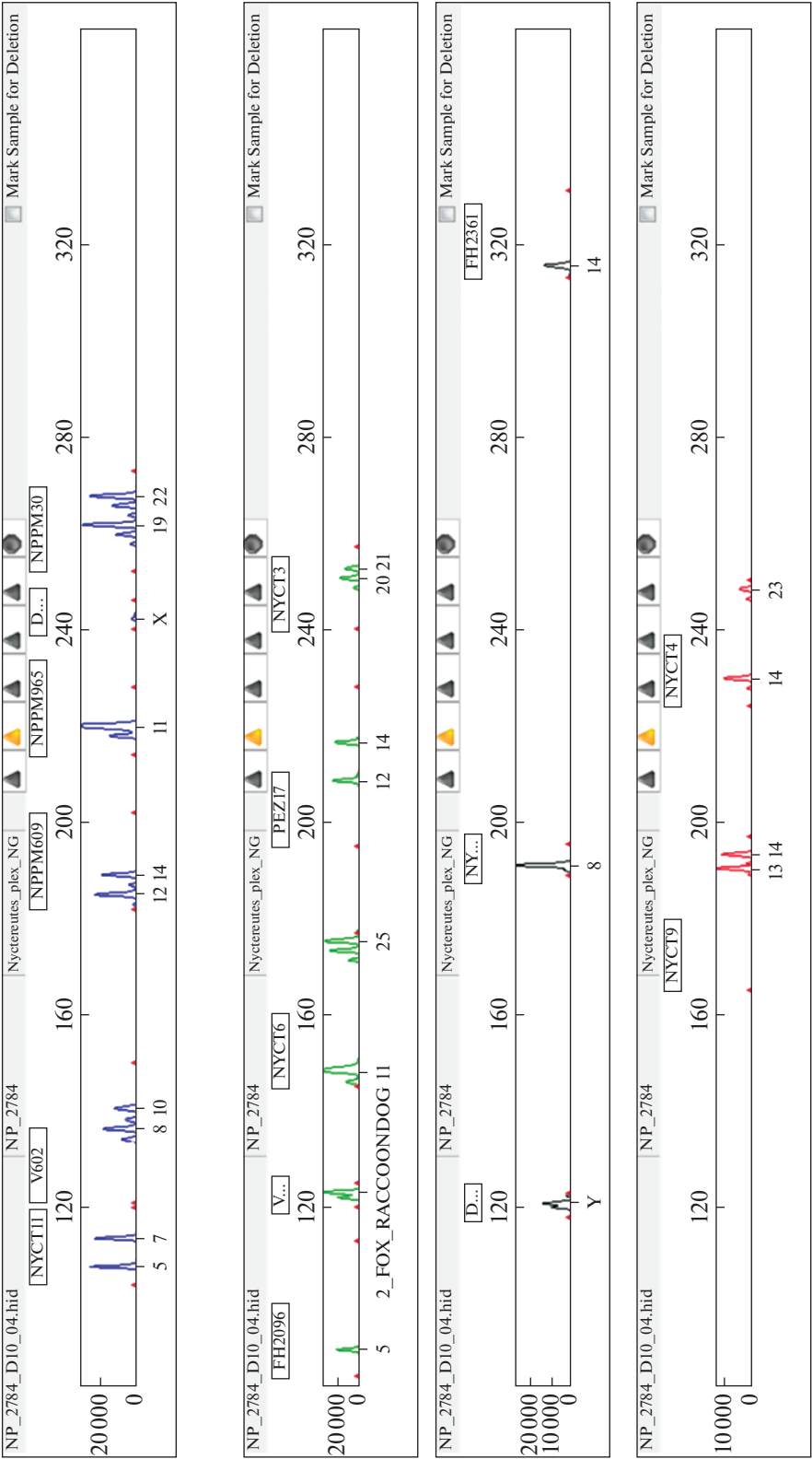


Рис. 2. Фрагмент электрофореграммы тест-системы NPlx для идентификации животного биологического вида енотовидная собака (*Nyctereutes procyonoides*).

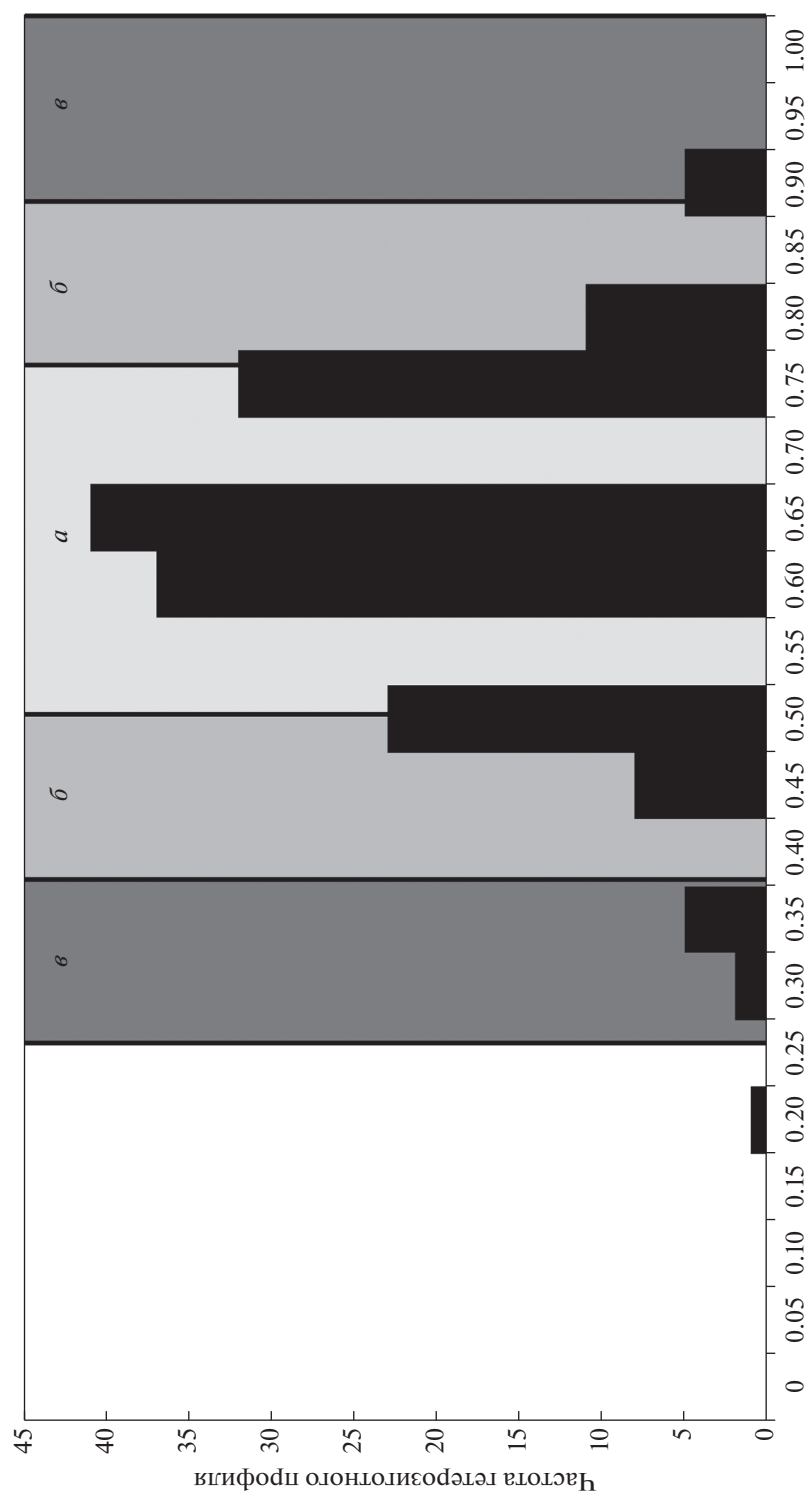


Рис. 3. Распределение частот гетерозиготных профилей в выборке еноотвидной собаки с использованием тест-системы NPIex ($n = 165$). а – диапазон значения одного стандартного отклонения (1σ); а + б – двух стандартных отклонений (2σ); а + б + в – трех стандартных отклонений (3σ).

Таблица 1. Характеристика микросателлитных локусов тест-системы NPlех для идентификации особей енотовидной собаки

Локус	Выявленный размерный диапазон в тандамах	Выявленный истинный диапазон, пн	N_a	H_O	H_E	HWE	PIC
<i>vWEX</i>	2/2	121/121	1	Мономорфный локус			
<i>Nyct10</i>	8–9	188–191	2	0.503	0.500	ns	0.375
<i>Nyct11</i>	5–8	103–112	3	0.570	0.585	ns	0.495
<i>NPPM609</i>	12–19	183–197	5	0.612	0.581	ns	0.547
<i>NPPM965</i>	9–13	220–228	5	0.412	0.389	ns	0.357
<i>NPPM30</i>	17–23	226–238	6	0.648	0.741	ns	0.695
<i>Nyct9</i>	6–14	162–186	6	0.776	0.785	ns	0.752
<i>Nyct3</i>	16–22	237–249	7	0.636	0.691	ns	0.652
<i>FH2361</i>	14–20	306–318	7	0.463	0.436	ns	0.409
<i>Nyct4</i>	10–23	215–241	7	0.780	0.795	ns	0.765
<i>FH2096</i>	4–10	84–108	7	0.661	0.635	ns	0.595
<i>Nyct6</i>	11–25	143–171	8	0.812	0.799	ns	0.771
<i>PEZ17</i>	9–17	192–224	9	0.818	0.768	ns	0.737
<i>V602</i>	3–14	124–146	9	0.855	0.811	ns	0.785
<i>DBX6</i>	X	246	1	Мономорфный локус			
<i>DBY7</i>	Y	117	1	Мономорфный локус			

Примечание. * N_a — число выявленных аллелей в локусе; H_O — наблюдаемая гетерозиготность; H_E — ожидаемая гетерозиготность; HWE — значимость отклонения от равновесия Харди–Вайнберга; ns — статистически незначимое отклонение от равновесия HWE ; PIC — показатель информативности генетического полиморфизма.

расстоянии двух стандартных отклонений (диапазон 0.402–0.914); 99.4% — не более трех σ (диапазон значений 0.274–1.041). Результаты свидетельствуют, что выборка животных репрезентативна и панель локусов тест-системы NPlех выявляет полиморфизм образцов адекватно.

Одновременно был проведен анализ результатов генотипирования с помощью программ Micro-Checker v2.2.1 и Cervus v3.0.7 на предмет выпадения аллелей, неверной интерпретации результатов генотипирования по причине интенсивных статтерфрагментов, артефактов ПЦР, “нуль”-аллелей и т.п. Анализ показал отсутствие “нуль”-аллелей или других отклонений у всех исследованных локусов.

Оценка сцепления локусов с использованием программных пакетов GENALEX v6.5 и Arlequin v3.5.1.3 показала отсутствие сцепленного наследования признаков, что свидетельствует о независимом распределении аллелей локусов тест-системы.

Кластерный анализ выборки, проведенный с использованием программы Structure v2.3.4, показал отсутствие подразделения на популяции и признал выборку образцов генетически однородной.

Аллельное распределение в суммарной выборке енотовидных собак для всех исследованных полиморфных локусов соответствовало распределению Харди–Вайнберга ($P > 0.05$).

Средняя ожидаемая гетерозиготность (H_E) для микросателлитных локусов, входящих в тест-систему, составила 0.655. Средняя наблюдаемая гетерозиготность (H_O) составила 0.657. Детальная информация об исследованных локусах представлена в табл. 1.

Согласно D. Botstein et al. [28] PIC для высокоинформативного локуса должен превышать значение 0.5, для достаточно информативного может быть менее 0.5, но обязательно превышать значение 0.25. Показатель PIC для малоинформативного локуса имеет значение менее 0.25. Как следует из табл. 1, минимальные значения PIC выявлены у локусов *Nyct10* (0.375), *NPPM965* (0.357). Такое значение PIC для локуса *Nyct10* обусловлено существованием только двух аллелей, а для локуса *NPPM965* (пять аллелей) — сильной выраженностью мажорного аллеля. Максимальное значение PIC выявлено у локуса *V602* (0.785), что объясняется большим количеством выявленных аллелей с относительно равномерным распределением в популяции. Среднее значение PIC составило 0.629. Таким образом, полученные нами данные следует считать значимыми для интерпретации результатов и оценки уровня изменчивости.

Суммарно в выборке с использованием тест-системы NPlех были идентифицированы 82 аллеля, частоты встречаемости которых приведены в

Таблица 2. Частоты встречаемости аллелей локусов тест-системы NPlеx в популяции енотовидной собаки

Аллель	<i>NYCT11</i>	<i>V602</i>	<i>NYCT10</i>	<i>NPPM609</i>	<i>NPPM965</i>	<i>NPPM30</i>	<i>FH2096</i>	<i>NYCT6</i>	<i>NYCT3</i>	<i>PEZ17</i>	<i>FH2361</i>	<i>NYCT9</i>	<i>NYCT4</i>
3		0.130											
4		0.091					0.006						
5	0.464	0.161					0.545						
6		0.009					0.155					0.097	
7	0.436						0.073						
8	0.100	0.300	0.494		0.003		0.012					0.197	
9		0.097	0.506		0.094		0.015			0.003			
10		0.197			0.136		0.194			0.036		0.176	0.015
11		0.003			0.764			0.209		0.091			
12				0.164						0.170		0.024	
13				0.612	0.003					0.379		0.191	0.284
14		0.012		0.094						0.191	0.735	0.315	0.235
15				0.067						0.118	0.018		
16									0.012	0.009	0.024		
17						0.055		0.009	0.482	0.003	0.012		0.216
18						0.282		0.300	0.152		0.073		
19				0.064		0.321		0.152	0.079		0.134		0.116
20								0.024	0.209		0.003		
21						0.064			0.061				0.073
22						0.264		0.070	0.006				
23						0.015		0.045					0.061
25								0.191					

табл. 2. Наиболее полиморфными оказались локусы *V602* и *PEZ17*, у них было выявлено по девять аллелей. Наименьший уровень полиморфизма показали локусы *Nyct10* (два аллеля), *Nyct11* (три аллеля). Наиболее выраженные мажорные аллели были обнаружены в локусах *NPPM965* – аллель 11 (частота 0.764), *FH2361* – 14 (0.735), *NPPM609* – 13 (0.612), *FH2096* – 5 (0.545) и *Nyct3* – 17 (0.482). В локусах *Nyct11*, *NPPM30*, *Nyct6* и *Nyct4* выявлено два и более доминантных аллеля.

Криминалистическую применимость локусов тест-системы NPlеx для идентификационных целей оценивали по таким критериям как вероятность случайного совпадения генотипов двух индивидуумов (*P(ID)* – для неродственных особей и *P(ID)sib* – для родственных животных) и частота встречаемости определенного генотипа. Поскольку в исследованной выборке отсутствует подразделение на популяции, расчет показателей проводили на основе полученных данных совокупной выборки для 13 несцепленных локусов. Результаты приведены в табл. 3, при этом перечень локусов отражает убывание их значений *P(ID)*.

Значение вероятности случайного совпадения исследуемого образца по заданному генотипу было максимальным для локуса *NPPM965*, а минимальным для локуса *V602*. Высокий уровень значения *P(ID)* для локуса *NPPM965* (пять аллелей) объясняется сильно выраженным мажорным аллелем 11 (частотой встречаемости 0.764). Минимальное значение случайного совпадения для локуса *V602* обусловлено максимальным числом аллелей (9) с относительно равномерным распределением частот в популяции.

Частота встречаемости генотипа в выборке варьировала от 6.3×10^{-17} до 2.5×10^{-10} со средним значением 1.1×10^{-11} . Значения *P(ID)* и *P(ID)sib* для тест-системы NPlеx составляли 1.6×10^{-11} и 3.9×10^{-5} соответственно. Значения LR для неродственных особей и сибсов составили 6.4×10^{10} и 2.5×10^4 соответственно. Учитывая, что численность популяции енотовидной собаки в Республике Беларусь по состоянию на 2020 г. оценивалась в 15000 особей, сила исключения, обеспечиваемая STR-локусами тест-системы NPlеx, позволяет

Таблица 3. Значения вероятности случайного совпадения генотипов двух неродственных особей и сибсов для отдельных локусов и их комбинаций

Локус	$P(ID)$ для одного локуса	$P(ID)sib$ для одного локуса	$P(ID)$ с включением последующего локуса	$P(ID)sib$ с включением последующего локуса
<i>NPPM965</i>	4.1×10^{-1}	6.6×10^{-1}	4.1×10^{-1}	6.6×10^{-1}
<i>NYCT10</i>	3.8×10^{-1}	5.9×10^{-1}	$1.5 \times 10^{-1*}$	$3.9 \times 10^{-1**}$
<i>FH2361</i>	3.5×10^{-1}	6.2×10^{-1}	5.2×10^{-2}	2.4×10^{-1}
<i>NYCT11</i>	2.6×10^{-1}	5.2×10^{-1}	1.4×10^{-2}	1.3×10^{-1}
<i>NPPM609</i>	2.1×10^{-1}	5.1×10^{-1}	2.9×10^{-3}	6.5×10^{-2}
<i>FH2096</i>	1.8×10^{-1}	4.8×10^{-1}	5.1×10^{-4}	3.1×10^{-2}
<i>NYCT3</i>	1.3×10^{-1}	4.4×10^{-1}	6.8×10^{-5}	1.3×10^{-2}
<i>NPPM30</i>	1.1×10^{-1}	4.1×10^{-1}	7.7×10^{-6}	5.5×10^{-3}
<i>PEZ17</i>	8.5×10^{-2}	3.9×10^{-1}	6.5×10^{-7}	2.1×10^{-3}
<i>NYCT9</i>	7.9×10^{-2}	3.8×10^{-1}	5.2×10^{-8}	8.0×10^{-4}
<i>NYCT4</i>	7.2×10^{-2}	3.7×10^{-1}	3.7×10^{-9}	3.0×10^{-4}
<i>NYCT6</i>	6.9×10^{-2}	3.7×10^{-1}	2.6×10^{-10}	1.1×10^{-4}
<i>V602</i>	6.1×10^{-2}	3.6×10^{-1}	1.6×10^{-11}	3.9×10^{-5}
LR			6.4×10^{10}	2.5×10^4

Примечание. $P(ID)$ — вероятность случайного совпадения генотипов двух индивидуумов для неродственных особей; $P(ID)sib$ — вероятность случайного совпадения генотипов двух индивидуумов для родственных животных; * — здесь и далее произведение $P(ID)$ предыдущих и данного локусов; ** — здесь и далее произведение $P(ID)sib$ предыдущих и данного локусов.

достигать надежного уровня доказательств в криминалистическом ДНК-анализе.

При этом необходимо учитывать, что исследованная выборка была однородной и, как следствие, при расчете вероятности случайного совпадения не были учтены значения F_{ST} (коэффициента инбридинга) для данной конкретной популяции енотовидной собаки. В случае использования NPlex для других регионов и мест обитаний енотовидной собаки следует создать соответствующий массив генотипов и оценить уровень субструктурирования популяции. При наличии субструктурирования значения $P(ID)$ и $P(ID)sib$ будут различны для каждой субпопуляции.

Валидация тест-системы NPlex

При разработке тест-системы NPlex синтез праймеров, входящих в тест-систему, проводился в АО “Гентерра” (Российская Федерация).

В результате валидационных мероприятий по исследованию работоспособности тест-системы с коммерческими наборами реагентов различных производителей (ThermoFisher Scientific, США; ОДО “Праймтех”, РБ; ООО “Синтол”, РФ; ЗАО

“Евроген”, РФ; ООО “АртБиоТех”, РБ; BioRad, США) установлено, что использование различных реагентов данных производителей на выявляемые параметры системы не влияет.

Повторяемость. При проведении исследований в одинаковых условиях продемонстрирована повторяемость результатов, полученных с помощью тест-системы NPlex.

В каждом параллельном анализе для каждого образца ДНК при использовании тест-системы NPlex выявлены все ожидаемые аллели во всех локусах. Полученные данные указывают на то, что тест-система NPlex стабильно дает результат с высокой повторяемостью.

Воспроизводимость. Для оценки вариабельности исследования тест-системы NPlex было получено 88 результатов. Прецизионность каждого образца, генотипированного тест-системой NPlex, составила 100%.

Специфичность. Тест-система NPlex предназначена для ДНК-идентификации и установления родства животных вида енотовидная собака, обитающих на территории Беларуси. Перекрестная активность тест-системы NPlex при генотипировании ДНК других видов семейства псовые

Таблица 4. Результаты перекрестной амплификации микросателлитных локусов тест-системы NPlex на матрицах ДНК других видов семейства псовые

Локус	<i>Vulpes vulpes</i> (лисица обыкновенная)	<i>Vulpes lagopus</i> (песец обыкновенный)	<i>Canis lupus lupus</i> (волк обыкновенный) и <i>Canis lupus familiaris</i> (собака домашняя)
<i>vWFX</i>	В аллельном диапазоне		Вне аллельного диапазона
<i>DBX</i>	Вне аллельного диапазона		В аллельном диапазоне
<i>NPPM609</i>	n/a		»
<i>Nyct6</i>	n/a		»
<i>NPPM965</i>	Вне аллельного диапазона	n/a	
<i>Nyct10</i>	»	n/a	
<i>Nyct4</i>	n/a	В аллельном диапазоне	
<i>Nyct11</i>	Общий аллельный диапазон для всех видов		
<i>V602</i>	»		
<i>NPPM30</i>	»		
<i>FH2096</i>	»		
<i>PEZ17</i>	»		
<i>FH2361</i>	»		
<i>Nyct9</i>	»		
<i>DBY</i>	»		
<i>Nyct3</i>	n/a		

Примечание. n/a – отсутствие специфического продукта амплификации.

(в части совпадения диапазона выявляемых аллелей других видов семейства псовые с диапазоном енотовидной собаки) представлена в табл. 4.

Из приведенных результатов следует, что локусы тест-системы NPlex проявляют значительную перекрестную активность с матрицами ДНК других видов из семейства псовых. Последнее не кажется удивительным, поскольку семейство объединяет виды, связанные общим происхождением в силу филогенетического родства. С учетом перекрестной активности локусов включение в тест-систему NPlex локусов с низкой полиморфностью (*vWEx*, *Nyct10*), но с выраженным межвидовым дифференцирующим потенциалом является оправданным.

При использовании данной тест-системы на матрицах ДНК представителей семейства кошачьи (кошка домашняя, рысь европейская), семейства куньи (хорь лесной, выдра речная, куница лесная, ласка, норка американская, барсук), семейства бобровые (бобр речной), семейства заячьи (заяц-русак, заяц-беляк), отряда парнокопытные (косуля европейская, олень благородный, олень пятнистый, лось, лань европейская, бык домашний, зубр европейский, кабан европейский), отряда не-

парнокопытные (лошадь домашняя), класса птицы (курица домашняя, гусь серый, индейка) и отряда приматы (человек) продукты ПЦР в используемых локусах не выявляются.

Также с использованием базы нуклеотидных последовательностей GenBank и программного продукта Primer-BLAST было проанализировано суммарно 289 возможных комбинаций праймеров тест-системы NPlex. Установлено, что только одна комбинация потенциально может приводить к неспецифической амплификации: праймер “DBY7 F” дает неспецифическую амплификацию (фрагмент в 173 пн) с праймером “Nyct10 R” на матрице ДНК кабана европейского (*Sus scrofa*). Полученный результат свидетельствует о высокой аналитической специфичности тест-системы.

Анализ смесей. Образцы, содержащие смесь биологического материала различных особей енотовидной собаки, а также енотовидной собаки и различных представителей семейства псовые могут быть проанализированы с использованием тест-системы. В данном случае интерпретация результатов генотипирования будет в значительной мере зависеть от качественных и количественных

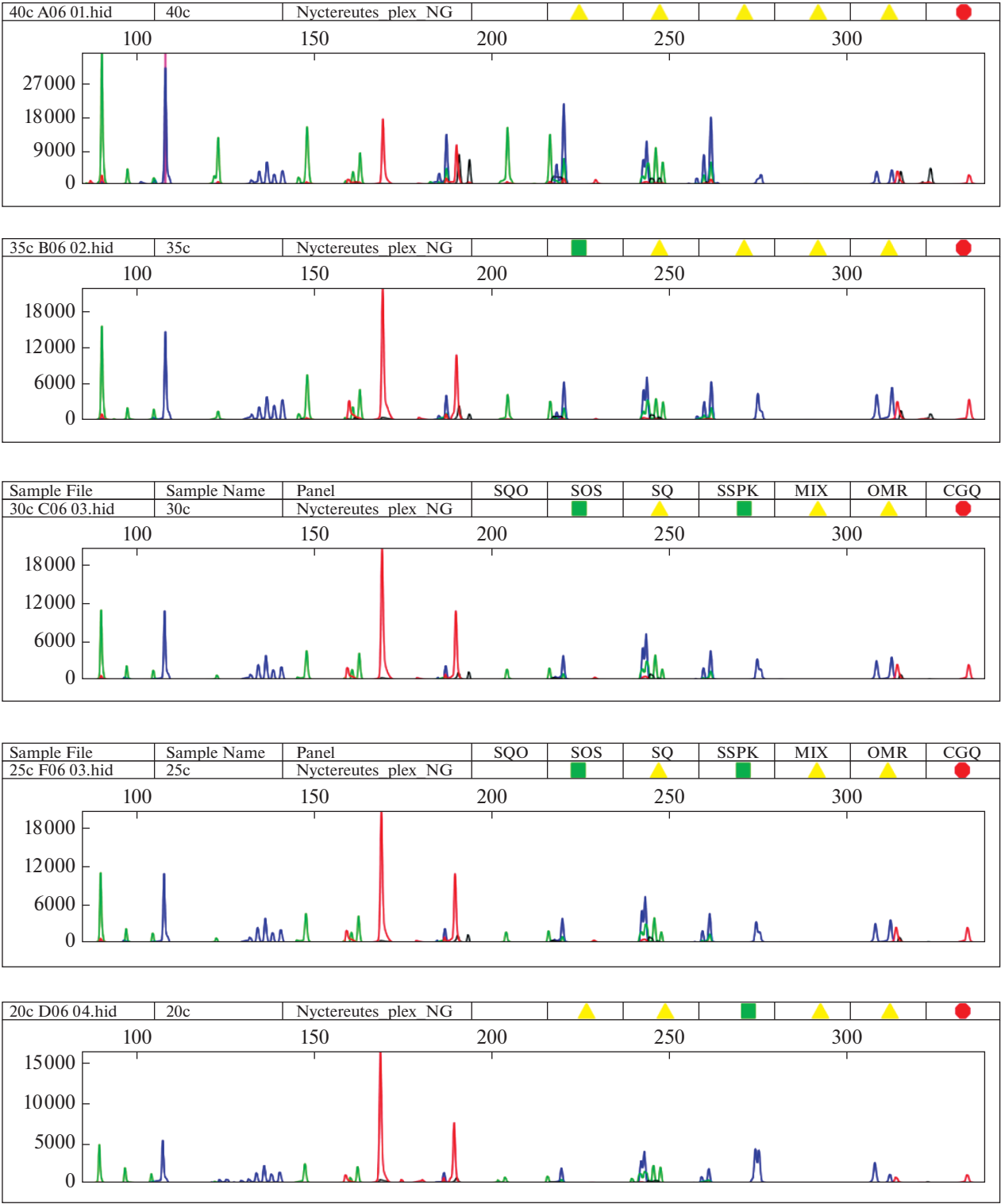


Рис. 4. Электрофореграмма результатов амплификации контрольного образца ДНК енотовидной собаки при различных количествах циклов амплификации. 40с, 35с, 30с, 25с, 20с – число циклов амплификации. По вертикали – интенсивность флуоресценции.

характеристик смеси. Тем не менее необходимо отметить, что наличие в ПЦР-смеси примеси ДНК другого псового легко диагностируется ввиду различий в аллельном диапазоне локусов, обладающих дифференцирующим потенциалом.

Чувствительность. Для тест-системы NPlex оптимальное количество ДНК, вносимой в ПЦР, составляет 2 нг. Во время валидационных и контрольных исследований тест-система показала полное выявление генотипа животного в диапазоне от 0.5 до 15 нг ДНК.

Минимальное вносимое количество ДНК, позволяющее получить полный генетический профиль животного, составляет 0.5 нг и является пределом определения тест-системы.

Устойчивость. Тест-система NPlex оптимизирована при использовании 30 циклов амплификации. В рамках валидационных мероприятий продемонстрирована устойчивость результатов, полученных с помощью тест-системы NPlex на образце контрольной ДНК енотовидной собаки. Для тест-системы NPlex получено 15 результатов, демонстрирующих устойчивость исследования. Электрофореграмма результатов амплификации контрольного образца ДНК енотовидной собаки при различном количестве циклов амплификации представлена на рис. 4.

Минимальное количество циклов амплификации, при которых возможно полное выявление генотипа животного с использованием тест-системы NPlex, составляет 20. Оптимальное количество циклов амплификации с использованием тест-системы NPlex составляет 30. При этом увеличение циклов амплификации до 40 не приводит к появлению неспецифических продуктов амплификации, а уменьшение количества циклов до 20 может приводить к выпадению аллелей только в локусах *DBX* и *Nuc9*. Остальные локусы NPlex амплифицируются эффективно.

В ходе настоящего исследования был определен спектр STR-локусов, которые обладают достаточным полиморфизмом при работе с ДНК енотовидной собаки, и была разработана мультиплексная тест-система NPlex для идентификации особей енотовидной собаки в криминалистических исследованиях. В ходе экспериментов была проведена оценка полиморфизма, криминалистических параметров локусов, включенных в тест-систему, а также подтверждена тандемная структура аллелей локусов. Разработанная тест-система NPlex обладает высокой повторяемостью и прецизионностью в 100%, имеет высокую аналитическую специфичность и низкий предел обнаружения генетического материала. По результатам генетико-статистического анализа массива генотипов образцов енотовидной собаки все локусы наследуются независимо и соответствуют равновесию Харди–Вайнберга. Разработанная тест-система NPlex может применяться при исследовании вещественных доказательств по делам о незаконной охоте, о нападении диких жи-

вотных и по иным делам, связанным с участием енотовидных собак.

Итогом разработки тест-системы явилась методика ДНК-идентификации биологических образцов животных вида енотовидная собака (*Nyctereutes procyonoides*), предназначенная для практикующих судебных экспертов Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь и научных сотрудников по профилю исследования. Методика включена в Реестр судебно-экспертных методик и иных методических материалов Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, что соответствует имплементации разработки в национальную правовую систему.

Авторы выражают благодарность Республиканскому государственному общественному объединению “Белорусское общество охотников и рыболовов” и персонально И.С. Юрченко, заведующему отдела экологии фауны Государственного природоохранного научно-исследовательского учреждения “Полесский государственный радиационно-экологический заповедник” за помощь в формировании коллекции биологических образцов.

Подробная информация об используемых последовательностях праймеров и особенностях исследованных локусов, а также номера доступа к последовательностям аллелей в GenBank приведены в табл. S1 и S2 Приложения.

Все авторы участвовали в исследовании и анализе результатов.

Данная работа выполнялась на базе государственного учреждения “Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь” и финансировалась Национальной Академией наук Республики Беларусь (номер государственной регистрации НИОК(ТР): 20190195).

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. Yan S.Q., Li Y.M., Bai C.Y. et al. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for Chinese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides procyonoides*) // Genet. Mol. Res. 2013. V. 12. P. 6351–6355. <https://doi.org/10.4238/2013.December.6.2>
2. Hong Y., Kim K.S., Lee H., Min M.S. Population genetic study of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in South Korea using newly developed 12 microsatellite markers // Genes & Genet. Systems. 2013. V. 88. № 1. P. 69–76. <https://doi.org/10.1266/ggs.88.69>
3. Paulauskas A., Gričiuvienė L., Juknelytė S. et al. Genetic diversity and population structure of raccoon dog

- (*Nyctereutes procyonoides*) in invaded areas // XMAT. 2014. P. 78. Antalya, Turkey. <https://www.neobiota.eu/wp-content/uploads/NEOBIOTA-2014-Abstract-Book.pdf>
4. Nørgaard L.S., Mikkelsen D.M.G., Elmeros M. et al. Population genomics of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in Denmark: Insights into invasion history and population development // Biol. Invasions. 2017. V. 19. № 5. P. 1637–1652. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1385-5>
 5. Oh S.Y., Kim S.A., Kim J.Y. et al. Detection of antibodies against the rabies virus in Korean raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides koreensis*) // J. Zoo and Wildlife Med. 2012. V. 43. № 1. P. 174–176. <https://doi.org/10.1638/2011-0063.1>
 6. Kido N., Itabashi M., Takahashi M., Futami M. Epidemiology of sarcoptic mange in free-ranging raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in Yokohama // Jap. Veter. Parasitology. 2013. V. 191. № 1–2. P. 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.026>
 7. Bagrade G., Deksne G., Ozoliņa Z. et al. *Echinococcus multilocularis* in foxes and raccoon dogs: an increasing concern for Baltic countries // Parasites & Vectors. 2016. V. 9. № 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1891-9>
 8. Griciuvienė L., Paulauskas A., Radzijeuskaja J. et al. Impact of anthropogenic pressure on the formation of population structure and genetic diversity of raccoon dog *Nyctereutes procyonoides* // Curr. Zool. 2016. V. 62. № 5. P. 413–420. <https://doi.org/10.1093/cz/zow038>
 9. Kauhala K., Kowalczyk R. Invasion of the raccoon dog *Nyctereutes procyonoides* in Europe: history of colonization, features behind its success, and threats to native fauna // Curr. Zool. 2011. V. 57. № 5. P. 584–598. <https://doi.org/10.1093/czoolo/57.5.584>
 10. Lever C. Naturalized Mammals of the World. London: Longman, 1985. Available from: <https://www.cabi.org/isc/abstract/19860537058>
 11. Deinet S., Ieronymidou C., McRae L. et al. Wildlife comeback in Europe: The recovery of selected mammal and bird species // Final Rep. to Rewilding Europe by ZSL, BirdLife International and the European Bird Census Council. London, UK, 2013. Available from: <https://rewilding-europe.com/wp-content/uploads/2013/11/Wildlife-Comeback-in-Europe-the-recovery-of-selected-mammal-and-bird-species.pdf>
 12. Sillero-Zubiri C., Hoffmann M., Macdonald D.W. Canids: Foxes, wolves, jackals, and dogs // Status Survey and Conservation Action Plan. 2004. V. 95. Gland, Switzerland: IUCN, available from: <https://www.carnivoreconservation.org/files/actionplans/canids.pdf>
 13. Boom R.C.J.A., Sol C.J., Salimans M.M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. 1990. V. 28. № 3. P. 495–503. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
 14. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J. et al. GenBank // Nucl. Acids Res. 2005. V. 34. P. D16–D20. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj157>
 15. Hall T., Biosciences I., Carlsbad C. BioEdit: An important software for molecular biology // GERF Bull. Biosci. 2011. V. 2. № 1. P. 60–61. https://www.researchgate.net/profile/Ahmed-Alzohairy/publication/2585-65830_BioEdit_An_important_software_for_molecular_biology/links/0deec528a87d3f2ee0000000/BioEdit-An-important-software-for-molecular-biology.pdf
 16. Peakall R.O.D., Smouse P.E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. 2006. V. 6. № 1. P. 288–295. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
 17. Excoffier L., Lischer H. An integrated software package for population genetics data analysis // Comput. and Mol. Popul. Genet. Lab (CMPG). 2006. Berne, Switzerland: Institute Zool., Univ. Berne, PMID 19325852.
 18. Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P., Shipley P. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // Mol. Ecol. Notes. 2004. V. 4. № 3. P. 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
 19. Marshall T.C., Slate J.B.K.E., Kruuk L.E.B., Pemberton J.M. Statistical confidence for likelihood – based paternity inference in natural populations // Mol. Ecol. 1998. V. 7. № 5. P. 639–655. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x>
 20. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. № 2. P. 945–959. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.195164>
 21. Earl D.A., VonHoldt B.M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conservation Genet. Res. 2012. V. 4. № 2. P. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
 22. Lischer H.E., Excoffier L. PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs // Bioinformatics. 2012. V. 28. № 2. P. 298–299. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr642>
 23. DeNise S., Johnston E., Halverson J. et al. Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers // Animal Genet. 2004. V. 35. № 1. P. 14–17. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2003.01074.x>
 24. Caniglia R., Fabbri E., Greco C. et al. Forensic DNA against wildlife poaching: Identification of a serial wolf killing in Italy // Forensic Sci. Int. Genet. 2010. V. 4. № 5. P. 334–338. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.10.012>
 25. Dayton M., Koskinen M.T., Tom B.K. et al. Developmental validation of short tandem repeat reagent kit for forensic DNA profiling of canine biological material // Croatian Med. J. 2009. V. 50. № 3. P. 268–285. <https://doi.org/10.3325/cmj.2009.50.268>
 26. Whiteside H.M., Dawson D.A., Soulsbury C.D., Harris S. Mother knows best: Dominant females determine offspring dispersal in red foxes (*Vulpes vulpes*) // PLoS One. 2011. V. 6. № 7. P. e22145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022145>
 27. Seddon J.M. Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples // Conservation Genet. 2005. V. 6. № 1. P. 147–149. <https://doi.org/10.1007/s10592-004-7734-9>
 28. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // Am. J. Hum. Genet. 1980. V. 32. № 3. P. 314. PMID 6247908.

Таблица S1. Микросателлитные и половые локусы, задействованные в исследовании

№ п/п	Маркер	Вид-источник	Тандем	Результат исследования	Ссылка на источник литературы
1	<i>NPPM30</i>	<i>N. procyonoides</i>	(TG) _n	Включен в тест-систему	Yan S.Q. et al., 2013
2	<i>NPPM609</i>	<i>N. procyonoides</i>	(GT) _n	Включен в тест-систему	Yan S.Q. et al., 2013
3	<i>NPPM905</i>	<i>N. procyonoides</i>	(TG) _n	Высокое содержание нуль-аллелей	Yan S.Q. et al., 2013
4	<i>NPPM941</i>	<i>N. procyonoides</i>	(TG) _n	Нестабильная амплификация в мультиплексной системе	Yan S.Q. et al., 2013
5	<i>NPPM965</i>	<i>N. procyonoides</i>	(GT) _n	Включен в тест-систему	Yan S.Q. et al., 2013
6	<i>Nyct1</i>	<i>N. procyonoides</i>	(GT) _n	Высокая интенсивность статтеров	Hong Y. et al., 2013
7	<i>Nyct3</i>	<i>N. procyonoides</i>	(TG) _n	Включен в тест-систему	Hong Y. et al., 2013
8	<i>Nyct4</i>	<i>N. procyonoides</i>	(TG) _n	Включен в тест-систему	Hong Y. et al., 2013
9	<i>Nyct6</i>	<i>N. procyonoides</i>	(GA) _n	Включен в тест-систему	Hong Y. et al., 2013
10	<i>Nyct7</i>	<i>N. procyonoides</i>	(CT) _n	Нестабильная амплификация в мультиплексной системе	Hong Y. et al., 2013
11	<i>Nyct8</i>	<i>N. procyonoides</i>	(TG) _n	Несоответствие распределению Харди–Вайнберга	Hong Y. et al., 2013
12	<i>Nyct9</i>	<i>N. procyonoides</i>	(CTG) _n	Включен в тест-систему	Hong Y. et al., 2013
13	<i>Nyct10</i>	<i>N. procyonoides</i>	(GCT) _n	Включен в тест-систему	Hong Y. et al., 2013
14	<i>Nyct11</i>	<i>N. procyonoides</i>	(TGC) _n	Включен в тест-систему	Hong Y. et al., 2013
15	<i>Nyct12</i>	<i>N. procyonoides</i>	(GCA) _n	Нестабильная амплификация в мультиплексной системе	Hong Y. et al., 2013
16	<i>CPH4</i>	<i>C. lupus familiaris</i>	(CA) _n	Динуклеотидный повтор с микровариантами	Caniglia R. et al., 2010
17	<i>CPH12</i>	<i>C. lupus familiaris</i>	(CA) _n	Мономорфное проявление признака	Caniglia R. et al., 2010
18	<i>Ren 112I02</i>	<i>C. lupus familiaris</i>	(TG) _n	Нестабильная амплификация в мультиплексной системе	Breen M. et al., 2001
19	<i>vWf.x</i>	<i>C. lupus familiaris</i>	(AGGAAT) _n	Включен в тест-систему	DeNise S. et al., 2004
20	<i>VGL3438</i>	<i>C. lupus familiaris</i>	(AAAG) _n	Сцепленное наследование признака с локусом FH2010	Magory Cohen T. et al., 2013
21	<i>V602</i>	<i>V. vulpes</i>	(CT) _n (CA) ₁₆	Включен в тест-систему	Whiteside H.M. et al., 2011
22	<i>PEZ08</i>	<i>C. lupus familiaris</i>	(GA) _n	Нестабильная амплификация в мультиплексной системе	Halverson J. et al., 2005
23	<i>PEZ10</i>	<i>C. lupus familiaris</i>	(GAAA) _n	Отсутствие специфической амплификации	Halverson J. et al., 2005

Таблица S1. Окончание

№ п/п	Маркер	Вид-источник	Тандем	Результат исследования	Ссылка на источник литературы
24	PEZ12	<i>C. lupus familiaris</i>	(AAAG) _n	Мономорфное проявление признака	Padar Z. et al., 2004
25	PEZ16	<i>C. lupus familiaris</i>	(GAAA) _n	Несоответствие распределению Харди–Вайнберга	Halverson J. et al., 2005
26	PEZ17	<i>C. lupus familiaris</i>	(TTTC) _n	Включен в тест-систему	Dayton M. et al., 2009
27	FH2001	<i>C. lupus familiaris</i>	(ATCT) _n	Выявлено 2 аллельных варианта	Francisco L.V. et al., 1996
28	FH2004	<i>C. lupus familiaris</i>	(TTCT) _n	Отсутствие специфической амплификации	Caniglia R. et al., 2010
29	FH2010	<i>C. lupus familiaris</i>	(GAAT) _n	Сцепленное наследование признака с локусом VGL3438	Halverson J. et al., 2005
30	FH2016	<i>C. lupus familiaris</i>	(CTTT) _n	Мономорфное проявление признака	Halverson J. et al., 2005
31	FH2054	<i>C. lupus familiaris</i>	(ATCT) _n	Мономорфное проявление признака	Halverson J. et al., 2005
32	FH2079	<i>C. lupus familiaris</i>	(GGAT) _n	Отсутствие специфической амплификации	Francisco L.V. et al., 1996
33	FH2096	<i>C. lupus familiaris</i>	(AATG) _n	Включен в тест-систему	Caniglia R. et al., 2010
34	FH2274	<i>C. lupus familiaris</i>	(CTTT) _n	Высокое содержание нуль-аллелей	Verardi A. et al., 2006
35	FH2309	<i>C. lupus familiaris</i>	(GAAA) _n	Высокое содержание нуль-аллелей	Dayton M. et al., 2009
36	FH2328	<i>C. lupus familiaris</i>	(AAAG) _n	Отсутствие специфической амплификации	Mellersh C.S. et al., 1997
37	FH2361	<i>C. lupus familiaris</i>	(TTTC) _n	Включен в тест-систему	Dayton M. et al., 2009
38	FH3241	<i>C. lupus familiaris</i>	(TTCT) _n	Несоответствие распределению Харди–Вайнберга	van Asch et al., 2009
39	FH3771	<i>C. lupus familiaris</i>	(AG) _n (GGAA) _n	Наличие размерной гомоплазии	Zatoń-Dobrowolska M. et al., 2014
40	DBX	<i>Hyena hyaena</i>	—	Включен в тест-систему	Seddon J.M. et al., 2005
41	DBY	<i>Hyena hyaena</i>	—	Включен в тест-систему	Seddon J.M. et al., 2005
42	SRY	<i>C. lupus familiaris</i>	—	Перекрытие размерных диапазонов с локусом тест-системы	DeCandia A. et al., 2016

Таблица S2. Номер доступа GenBank, последовательности праймеров и локусов, входящих в тест-систему NPlex

Локус	Флуорофор	Последовательности праймеров	Номер доступа GenBank
<i>vWEX</i>	VIC	CTCCCCCTTCTCTACCTCCACCTCTAA	OM371048
		CAGAGGTCAGCAAGGGTACTATTGTG	
<i>Nyct10</i>	NED	CTTGCTGCAAATCTCCCATTT	OM716956
		CAAGGAGAGGAGCTGTTTGC	OM716957
<i>Nyct11</i>	FAM	CCAGTCATCCTGCCTTTGTT	OM716958
		GTGCCCTTGTGGGTTTCTTA	OM716959
<i>NPPM609</i>	FAM	TTTGGGGTCACTCAGATAGGAAG	OM716960
		TTTTCCAGAAGGGAGAACAGGT	OM716961
<i>NPPM965</i>	FAM	AGAGCAAAGAAACAGGGCTATAG	OM716962
		GCTGATTTTGTGTTCTGCTCTGT	OM716963
<i>NPPM30</i>	FAM	AGGACTATTTACGCCTTGTTG	OM716964
		ATTCCCACCTCAGTGATTACAG	OM716965
<i>Nyct9</i>	PET	CCCTCAATGGTCTTATCCCC	OM716966
		ACGACCCCTTCATCTGACTG	OM716967
<i>Nyct3</i>	VIC	TGGACAAGGTCACACAGGAA	OM716968
		ACCCTCCAAGTGTTACAGAC	OM716969
<i>FH2361</i>	NED	GCTTGGAAGGTGAGACTGAATG	OM716970
		AGCACTTAGAATGTACCAGGCA	OM716971
<i>Nyct4</i>	PET	TGCTTCTGTCTCCCCTGTCT	OM716972
		AGTTCAGCCGGGTGTAATG	OM716973
<i>FH2096</i>	VIC	CCGTCTAAGAGCCTCCC	OM716974
		GACAAGGTTTCCTGGTTCCA	OM716975
<i>Nyct6</i>	VIC	GATCCAGCTGTCACTGCTTT	OM716976
		GTCTGCTTCTCCCTCTCCCT	OM716977
<i>PEZ17</i>	VIC	CTAAGGGACTGAAGTTCTCC	OM716978
		GTGGAACCTGCTTAAGATTC	OM716979
<i>V602</i>	FAM	CAGCCTGGACTACAATTCTCTTT	OM716980
		CCCCAAGTCTTTTGTCCAGA	OM716981
<i>DBX</i>	FAM	ATGCTGCAGTTTTTCCAGA	OM630073
		TACGCTGGGTCTTAGTT	
<i>DBY</i>	NED	GGTCCAGGAGAGGCTTTGAA	OM630074
		TGCCATTGTTTAAAAGGAAG	

A Robust Test System for DNA Identification of Raccoon Dogs

A. E. Hrebianchuk^{a, *}, O. N. Lukashkova^b, S. A. Kotava^b, and I. S. Tsybovsky^c

^a*State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, Minsk, 220073 Belarus*

^b*Scientific and Practical Center of the State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, Minsk, 220114 Belarus*

^c*RUP "BelJurZabespjachjenne", Minsk, 220069 Belarus*

^{*}*e-mail: iamsanya94@mail.ru*

To establish a system for DNA identification of biological samples of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*), we carried out a study of polymorphism of 39 microsatellite loci and three sex loci specific to various species of the Canidae family. This resulted in the development of the NPlex test system, which includes 14 autosomal STRs and two sex loci. The test system has been validated for use in forensic identification of raccoon dogs based on biological traces (such as traces of blood and secretions, fragments of muscle tissue or bones, dermis and hair, etc.) found at crime scenes, as well as for establishing biological relationship of animals of this species. Validation efforts were performed in accordance with the protocol of the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods.

Keywords: microsatellites, identification, Canidae family, forensics, illegal hunting.