



Scientific and Practical Centre of the State Committee
of Forensic Expertises
Minsk, Belarus



ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОБЪЕКТОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В СУДЕБНОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Светлана Котова, к.х.н.

Зав. НИЛ молекулярно-биологических
исследований Государственного комитета
судебных экспертиз Республики Беларусь
e-mail: nrc@ sudexpertiza.by

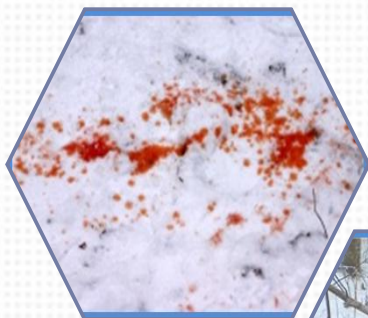
«Актуальные вопросы судебной
медицины и экспертной практики-2017»
12-14 апреля 2017, г. Москва

Цели и задачи исследования

Разработка и апробация методических подходов для генотипирования ДНК животного происхождения при решении экспертных задач различных уровней

- 1) идентификация вида животного (лось, олень, косуля, дикий кабан, зубр)
- 2) идентификация конкретной особи животного
- 3) установление половой принадлежности животного
- 4) дифференциация по принадлежности к дикому или домашнему животному (например, кабан дикий или свинья домашняя)

Актуальность



- Наиболее очевидные (фенотипические) признаки не доступны для исследования
- В Беларуси основными видами - объектами незаконной охоты являются - лось, олень, косуля, дикий кабан

Объекты

Sus scrofa scrofa



Capreolus capreolus



ДИКИЕ ЖИВОТНЫЕ

Alces alces



Cervus elaphus



Dama dama



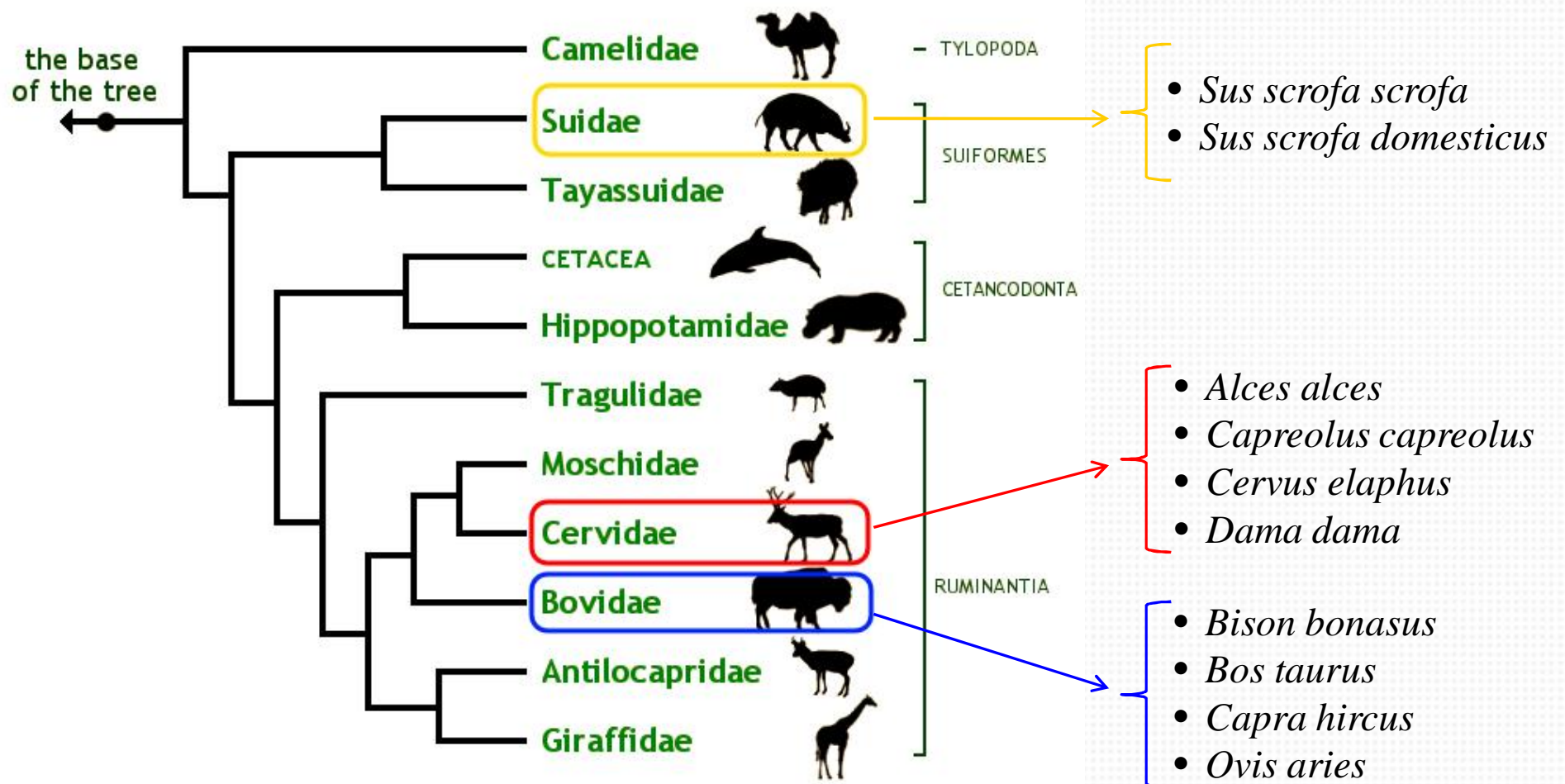
Bison bonasus



ДОМАШНИЕ ЖИВОТНЫЕ



Таксономическая классификация отряда *Artiodactyla*



Специфика проблемы



- Виды семейства Оленевые находятся в филогенетическом родстве между собой и с видами семейства Полорогие
- Детальная структура геномов для оленевых не определена
- По причине филогенетического родства отмечается высокий уровень кросс-амплификации микросателлитов
- Это позволяет использовать микросателлиты вида-источника для изучения других (целевых) видов
- Неучтенная кросс-амплификация является источником экспертной (судебной) ошибки

Образцы

собраны в осенне-зимний охотничий сезон 2010-2011 гг.

| Вид животного | Количество |
|---------------|------------|
| Кабан | 948 |
| Косуля | 465 |
| Лось | 476 |
| Олень | 102 |
| Всего | 1993 |

Быки: (n=41)

Овцы: (n=8)

Козы: (n=10)

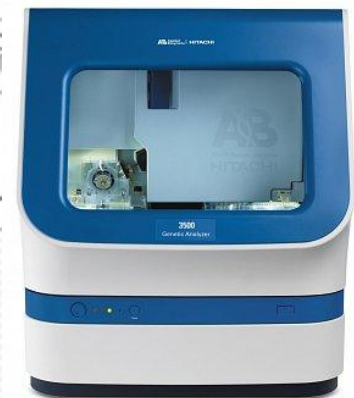
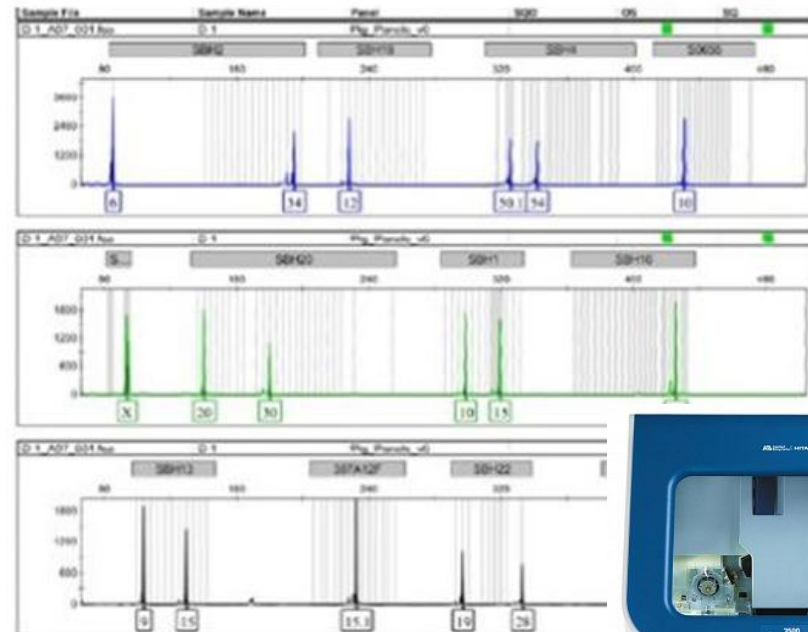
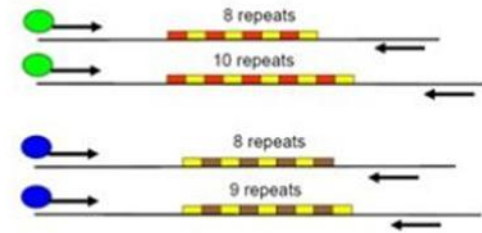
Свинья домашняя (n=304)

РУП «Научно-практический центр Национальной Академии наук Беларуси по животноводству»

- Министерство лесного хозяйства Республики Беларусь
- Государственная инспекция охраны животного и растительного мира при Президенте Республики Беларусь
- Республиканское государственно-общественное объединение "Белорусское общество охотников и рыболовов» (БООР)
- Национальный парк «Беловежская пуща»
- Охотхозяйство «Красный бор» и др.
- Минский зоопарк

Методы исследования

- полихромная мультиплексная ПЦР-амплификация
- STR-локусы
- флуоресцентно-меченные праймеры
- капиллярный электрофорез на автоматизированных секвенаторах



ДНК-маркеры

- STR

17 бычьих
16 оленьих
5 карибу
25 свиных

- SNP

MC1R -ген меланокортинового рецептора 1 (с.367A>G)
NR6A1 - ген ядерного рецептора (g.299084751C>T)

- мтДНК

участок
D-петли

Разработки для генотипирования



- Идентификация вида животного
- Идентификация особи животного

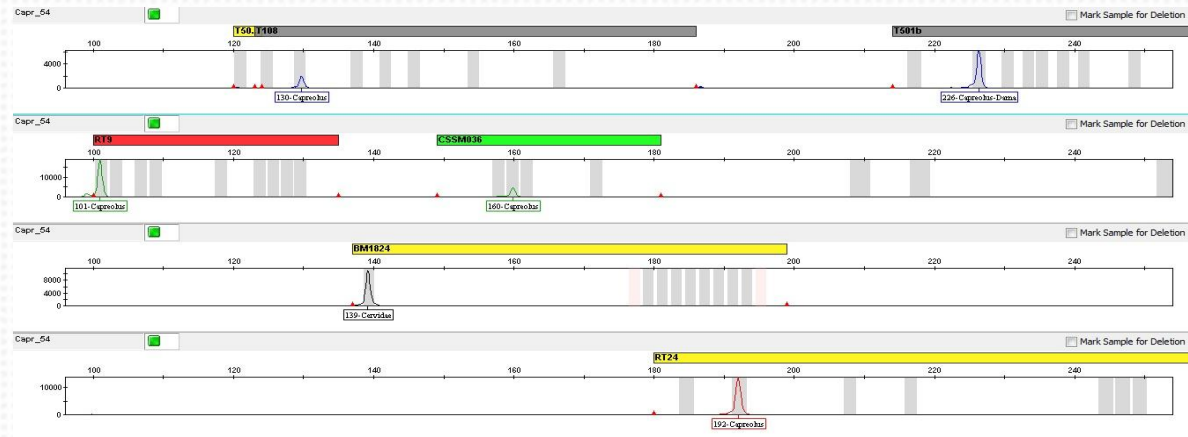
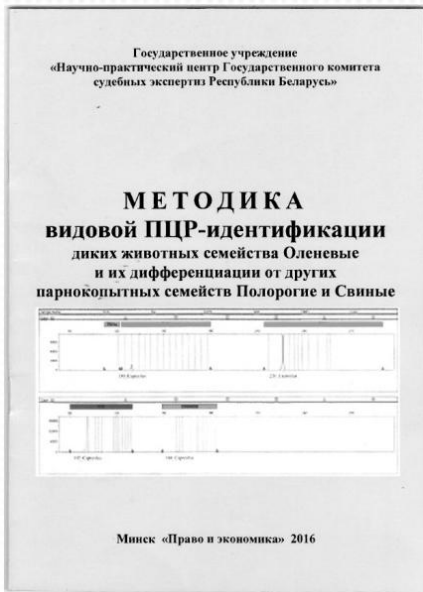


Дифференциация диких и домашних свиней



Дифференциация КРС и Зубра

Разработана методика видовой идентификации (2015 г.)



BM1824 – базовый маркер

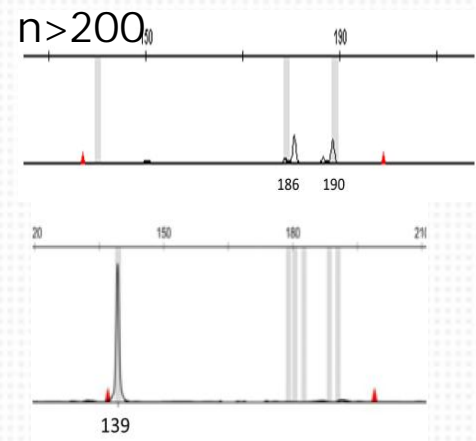


5 STR – для оленевых

CSSM036, T108, T501, RT9, RT24



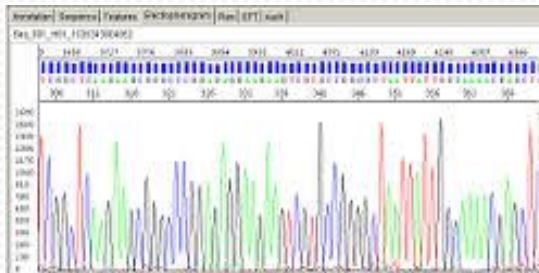
n>300



Дифференциация КРС и Зубра

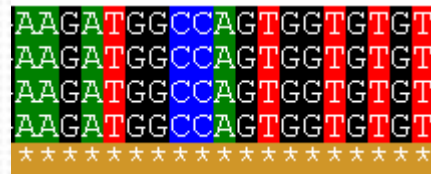
- анализ нуклеотидной последовательности участка D-петли мтДНК
- филогенетический анализ полученных последовательностей с привлечением референсных образцов
- поиск гомологии в GeneBank (NCBI) для образцов, не кластеризующихся с референсными образцами

“Sequencing Analysis Software v5.4”

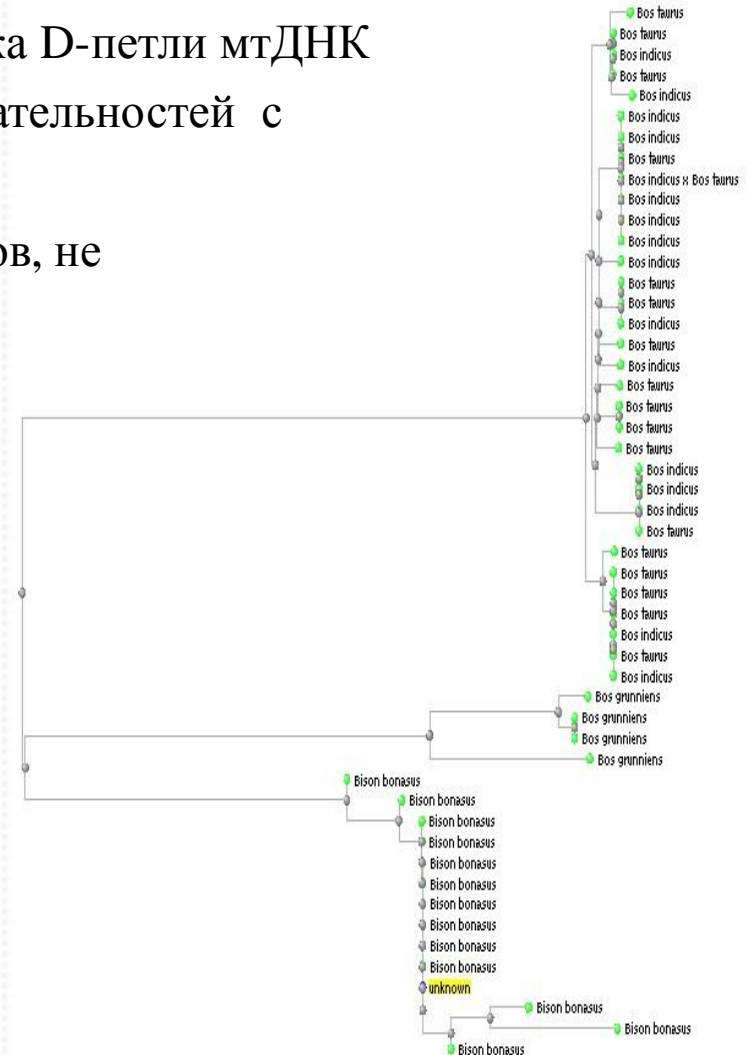


Секвенирование
последовательности
участков D-петли мтДНК

“BioEdit v7.0.5.3”

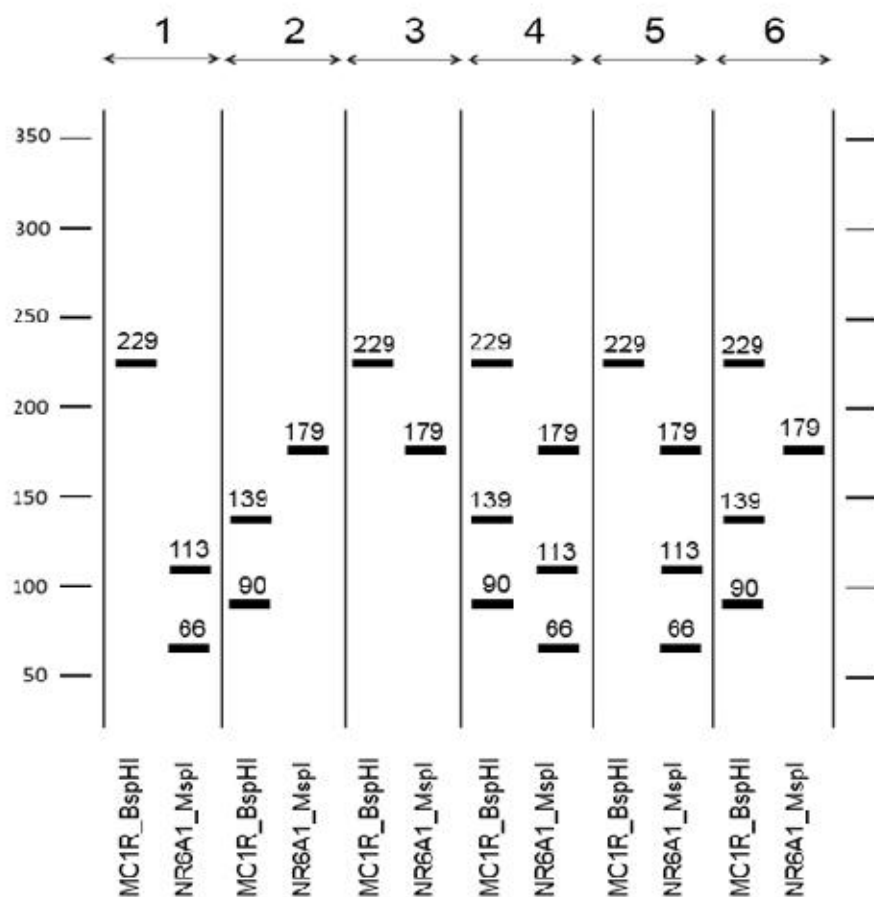


Выравнивание



Дифференциация дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) и Свињи домашней (*Sus scrofa domesticus*)

методом ПЦР-ПДРФ -
исследованием полиморфизма длины рестриционных продуктов
целевого ампликона



- 1 - Дикий кабан;
- 2 - Домашняя свињья, тип А;
- 3 - Домашняя свињья, тип В;
- 4 - Гибрид «Дикий кабан / Домашняя свињья, тип А»;
- 5 - Гибрид «Дикий кабан / Домашняя свињья, тип В»;
- 6 - Гибрид «Домашняя свињья, тип А / Домашняя свињья, тип В»

НИР 2015-2016 г.г.

МЕТОДИКА УСТАНОВЛЕНИЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ
ОБРАЗЦОВ К ДИКИМ ИЛИ ДОМАШНИМ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМ ВИДА
КАБАН ЕВРОПЕЙСКИЙ МЕТОДОМ ПЦР-ПДРФ

Идентификация особей вида Кабан европейский

тест-система на основе
16 STR-локусов

Калькулятор на основе MS Excel

Дифференциация «дикий-домашний»

| В3 | f3 | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|---|---------|---------|---------|---------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q |
| Образец N | FH3637 | FH2148 | SO766 | SW240 | FH1727 | NLRIP0001 | FH1589 | FH1733 | SO005 | FH1701 | FH1900 | FH2709 | FH2478 | FH1696 | SW857 | SO101 |
| Генотип | 197/201 | 236/268 | 434/464 | 115/125 | 246/246 | 345/349 | 172/172 | 294/298 | 239/239 | 195/205 | 243/255 | 130/130 | 284/296 | 365/377 | 148/150 | 205/211 |
| Алель 1 | 197 | 236 | 434 | 115 | 246 | 345 | 172 | 294 | 239 | 195 | 243 | 130 | 284 | 365 | 148 | 205 |
| Алель 2 | 201 | 268 | 464 | 125 | 246 | 349 | 172 | 298 | 239 | 205 | 255 | 130 | 296 | 377 | 150 | 211 |
| | 0.52966 | 1.00000 | 0.39044 | 0.58377 | 0.98384 | 0.40701 | 0.56487 | 0.71470 | 0.66764 | 0.91675 | 1.00000 | 0.62873 | 0.34882 | 0.50344 | 0.63925 | 1.00000 |
| | 0.51878 | 0.23894 | 0.45613 | 1.00000 | 0.98384 | 0.84384 | 0.56487 | 0.67512 | 0.66764 | 0.55582 | 0.48417 | 0.62873 | 0.43606 | 0.73923 | 0.34848 | 0.398 |
| | 1.21 | ∞ | 0.54 | ∞ | 4845.20 | 3.71 | 1.69 | 5.21 | 4.04 | 13.78 | ∞ | 2.87 | 0.41 | 3.20 | 1.03 | |
| | 0.47034 | 0.00000 | 0.60956 | 0.41423 | 0.01416 | 0.59239 | 0.43513 | 0.28330 | 0.33236 | 0.08325 | 0.00000 | 0.37127 | 0.65118 | 0.49656 | 0.34075 | 0.000 |
| | 0.48122 | 0.76106 | 0.54387 | 0.00000 | 0.01416 | 0.15616 | 0.43513 | 0.32488 | 0.33236 | 0.44418 | 0.51583 | 0.37127 | 0.56394 | 0.24077 | 0.65152 | 0.600 |
| | 0.82 | 0 | 1.86 | 0 | 0.00 | 0.27 | 0.59 | 0.19 | 0.25 | 0.07 | 0 | 0.35 | 2.41 | 0.31 | 0.97 | |
| Полка | ДИКИЙ | | | | | | | | | | | | | | | |
| Отношение правдоподобия | 2.25E+07 (дикий) | | | | | | | | | | | | | | | |
| Достоверность вывода | 99.99999555% (дикий) | | | | | | | | | | | | | | | |
| Все локусы | 16: FH3637, FH2148, SO766, SW240, NLRIP0001, FH1589, FH1733, SO005, FH1701, FH1727, FH1900, FH2709, FH2478, FH1696, SW857, SO101, | | | | | | | | | | | | | | | |
| Алели, найденные только у диких | 4: 236 в локусе FH2148, 125 в локусе SW240, 243 в локусе FH1900, 205 в локусе SO101, | | | | | | | | | | | | | | | |
| Алели, найденные только у домашних | 0: | | | | | | | | | | | | | | | |
| Сравнения | FH3637 | FH2148 | SO766 | SW240 | FH1727 | NLRIP0001 | FH1589 | FH1733 | SO005 | FH1701 | FH1900 | FH2709 | FH2478 | FH1696 | SW857 | SO101 |
| Исследуемый | 197/201 | 236/268 | 434/464 | 115/125 | 246/246 | 345/349 | 172/172 | 294/298 | 239/239 | 195/205 | 243/255 | 130/130 | 284/296 | 365/377 | 148/150 | 205/211 |
| Совпавшие алели | 197 | 236 | 434 | 115 | 246 | 345 | 172 | 294 | 239 | 195 | 243 | 130 | 284 | 365 | 148 | 205 |
| | 201 | 268 | 464 | 125 | 246 | 349 | 172 | 298 | 239 | 205 | 255 | 130 | 296 | 377 | 150 | 211 |
| | 0.32893 | 0.05076 | 0.18081 | 0.08693 | 0.11961 | 0.27608 | 0.24200 | 0.33727 | 0.06537 | 0.13491 | 0.05146 | 0.37413 | 0.13908 | 1.00000 | 0.37204 | 0.108 |
| | 0.40264 | 0.10848 | 0.18567 | 0.11892 | 0.00000 | 0.30529 | 0.00000 | 0.21419 | 0.00000 | 0.26078 | 0.41168 | 1.00000 | 0.10987 | 1.00000 | 0.12656 | 0.284 |
| | 3.78 | 90.79 | 14.89 | 48.37 | 69.90 | 5.93 | 17.07 | 6.92 | 234.02 | 14.21 | 23.60 | 7.14 | 32.72 | | 10.62 | 15 |
| Отношение правдоподобия | 2.36E+18 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Достоверность вывода | 100.00000000% | | | | | | | | | | | | | | | |
| Все локусы | 14: FH3637, FH2148, SO766, SW240, NLRIP0001, FH1589, FH1733, SO005, FH1701, FH1727, FH1900, FH2709, FH2478, SW857, SO101, | | | | | | | | | | | | | | | |
| Подтвержденные | 14: FH3637, FH2148, SO766, SW240, NLRIP0001, FH1589, FH1733, SO005, FH1701, FH1727, FH1900, FH2709, FH2478, SW857, SO101, | | | | | | | | | | | | | | | |
| Исключенные | 0: | | | | | | | | | | | | | | | |

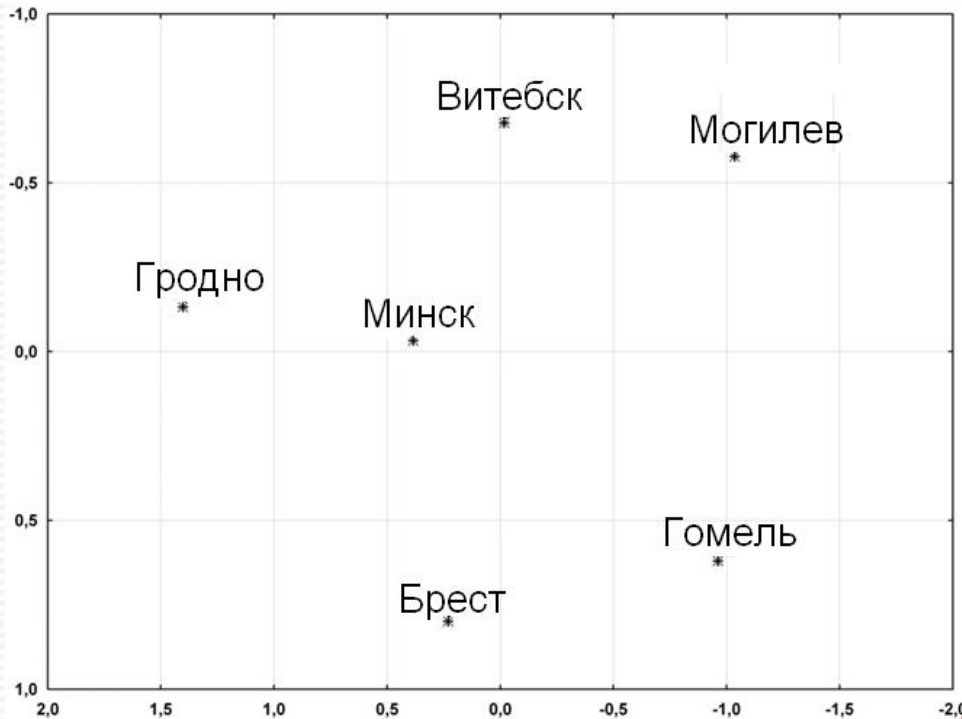
Идентификация образцов

База данных генотипов диких и
домашних животных

НИР 2015-2016 г.

МЕТОДИКА УСТАНОВЛЕНИЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ
ОБРАЗЦОВ К ДИКИМ ИЛИ ДОМАШНИМ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМ ВИДА
КАБАН ЕВРОПЕЙСКИЙ МЕТОДОМ ПЦР-ПДРФ

Генетические различия в распределении STR-аллелей между региональными европейскими популяциями кабана



Определение наиболее вероятного географического происхождения особи по STR-профилю

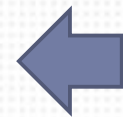


Идентификация особей семейства Оленевые

Мультиплексные
тест-системы для
генотипирования

Источники
микросателлитов

- Оленей (16 STR + Amelogenin)
- Лосей (18 STR + Amelogenin)
- Косуль (16 STR + Amelogenin)



Успешно адаптированы
маркеры, разработанные для
калифорнийских оленей



- Маркеры коровы и
- оленя



Маркеры коровы, оленя и
овцы

НИР 2017-2018

«Изучение STR- полиморфизма лося, косули , оленя с целью разработки криминалистической методики ДНК- идентификации биологических следов при расследовании дел о незаконной охоте»

Апробация научных разработок в экспертной практике



- За период 2015 г. - март 2017 г. выполнено около 200 судебных экспертиз
- Исследовались образцы диких (лось, олень, косуля, дикий кабан, зубр, медведь, бобр, лиса, волк) и домашних животных (корова, лошадь, свинья, собака)
- На первом этапе решаются задачи классификационного типа:
 - 1) установление семейства (Свиные - Оленевые)
 - 2) установление вида животного
 - 3) дифференциация по принадлежности дикому или домашнему животному
- Завершается исследование идентификацией конкретной особи животного

Выводы

- В ходе научных исследований показана возможность создания методического инструментария для судебно-экспертного генотипирования ДНК животного происхождения при решения экспертных задач различного уровня на основе STR-маркеров
- Что позволяет осуществлять производство экспертиз с использованием универсальных подходов и общепринятого для молекулярно-генетических лабораторий оборудования
- Экспертные выводы должны формироваться с учетом генетических особенностей региональных популяций диких животных

Практическое приложение

- Разработанные методики ориентированы на использование в судебно-экспертной работе по расследованию дел, связанными с правонарушениями в отношении объектов животного мира, а также могут использоваться в контроле безопасности пищевых продуктов и оценке их подлинности
- Научные сведения о полиморфизме и генетической структуре популяций могут использоваться в мониторинге стад диких животных, охотоведении, в генетике животных, научных и селекционных работах

Спасибо за внимание!

Светлана Котова, к.х.н.

Зав НИЛ МБИ НПЦ Государственного комитета судебных
экспертиз Республики Беларусь

e-mail: nrc@ sudexpertiza.by