



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



МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СЛЕДОВ ДИКИХ ЖИВОТНЫХ ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ ДЕЛ О НЕЗАКОННОЙ ОХОТЕ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Иосиф Цыбовский, к.б.н.

Ученый секретарь НПЦ Государственного
комитета судебных экспертиз Республики
Беларусь

e-mail: npc@ sudexpertiza.by

«Совершенствование судебно-экспертной
деятельности как фактор обеспечения экологической
безопасности и сохранения биоразнообразия»

18 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)

Sus scrofa scrofa



Alces alces



Dama dama



Объекты
(дикие животные)

Capreolus capreolus



Bison bonasus



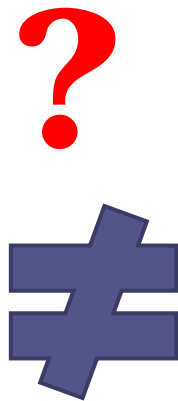
Cervus elaphus



Методы

- Общепринятые подходы и оборудование
- Полихромная мультиплексная ПЦР
 - STR локусы
- Фрагментный анализ

Актуальность



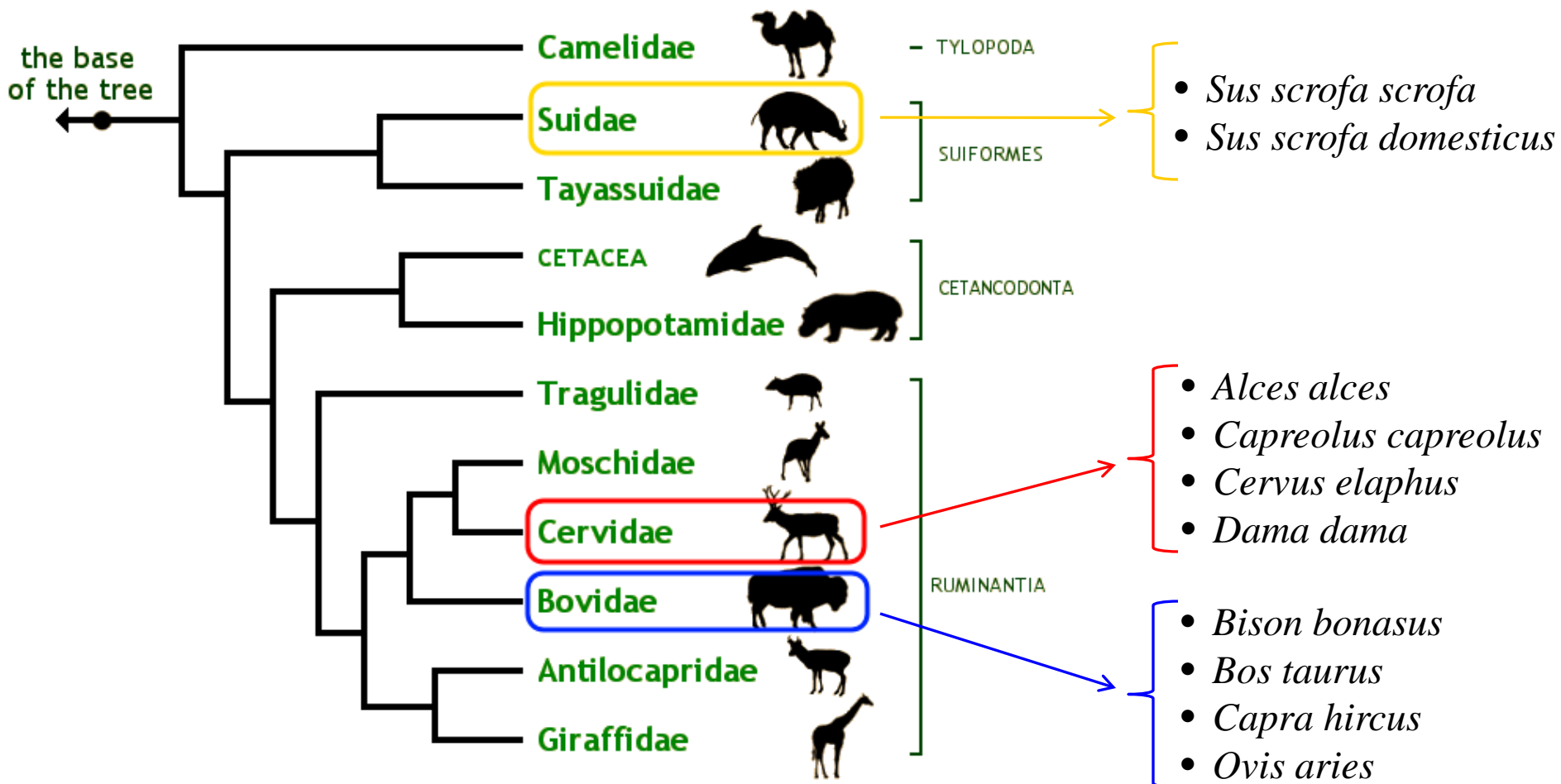
- Наиболее очевидные (фенотипические) признаки недоступны для исследования
- В Беларуси основными видами – объектами незаконной охоты являются – лось, олень, косуля, дикий кабан

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

Таксономическая классификация отряда *Artiodactyla*



Решение проблемы

исследование кросс-амплификации 36 STR-маркеров на образцах лося оленя косули быка кабана (n= 40-50)

12 STR-markers of *Bos taurus*:

BM1824	ETH225	TGLA122	INRA023	TGLA53	TGLA126
CSSM036	BM2113	ETH10	ETH3	TGLA227	HEL1

13 STR-markers of *Cervus elaphus*:

T156	T530	CO1	T268	C273	T172	T193
T123	T108	T501	T107	T26	T507	

5 STR-markers of *Rangifer tarandus*:

RT5	RT6	RT9	RT24	RT30
-----	-----	-----	------	------

Феномен адресной кросс-амплификации STR-локусов в ряду филогенетических родственников отряда Парнокопытные

- Изменение статуса локусов

Вид-источник маркера	Название маркера (локуса)	Целевые виды				
		Бык - <i>Bos taurus</i>	Олень благородный - <i>Cervus elaphus</i>	Косуля европейская - <i>Capreolus capreolus</i>	Лось - <i>Alces alces</i>	Кабан - <i>Sus scrofa</i>
Бык - <i>Bos taurus</i>	BM1824	P	M	M	M	N
	ETH225	P	P	P	P	N
	TGLA122	P	P	P	M	N
	BM2113	P	N	N	N	N
	ETH10	P	N	N	N	N
	ETH3	P	N	N	N	N
	TGLA227	P	N	N	N	N
	INRA023	P	M	N	P	N
	TGLA53	P	P	N	M(?)	N
	HEL1	P	N	N	N	N
	TGLA126	P	M	M	P	N
	CSSM036	P	M	P	M	N
Кабан - <i>Sus scrofa</i>	S0005	N	N	N	N	P
	S0101	N	N	N	N	P
	S0155	N	N	N	N	P
	SW240	N	N	N	N	P
	SW24	N	N	N	N	P
	SW857	N	N	N	N	P
	S0355	N	N	N	N	M
	SW951	N	N	N	N	M

P – полиморфный
 N- неамплифицируемый
 M - мономорфный

Выявлены межтаксонные различия

- в особенностях проявления (моно- или полиморфность)
- в размерных диапазонах проявления каждого маркера

Лось

6 мономорфных маркеров: 3 бычьих микросателлита (BM1824, TGLA122, CSSM036) и 3 оленьих микросателлита (T108, T501, T172)

Косуля

11 мономорфных маркеров: 3 бычьих (BM1824, TGLA126, CSSM036) и 5 оленьих (T156, T108, T501, T123, C273) и 3 микросателлита карибу (RT6, RT9 и RT24)

Олень

8 мономорфных маркеров: 4 бычьих микросателлита (BM1824, TGLA126, INRA023, CSSM036) и 4 микросателлита карибу (RT5, RT6, RT9 и RT24)

Бык

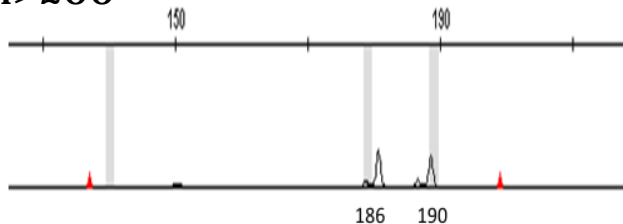
8 мономорфных маркеров:
7 оленьих (T156, T530, CO1, T268, C273, T172, T193)
1 микросателлит северного оленя (RT24)

Идентификация вида животного отряда Парнокопытные

6 STR - идентификация 5 видов подсемейства Жвачные

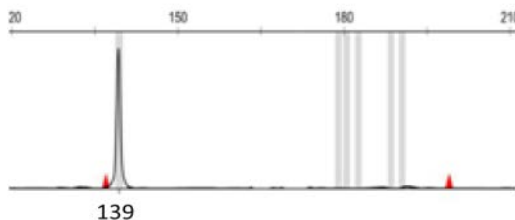
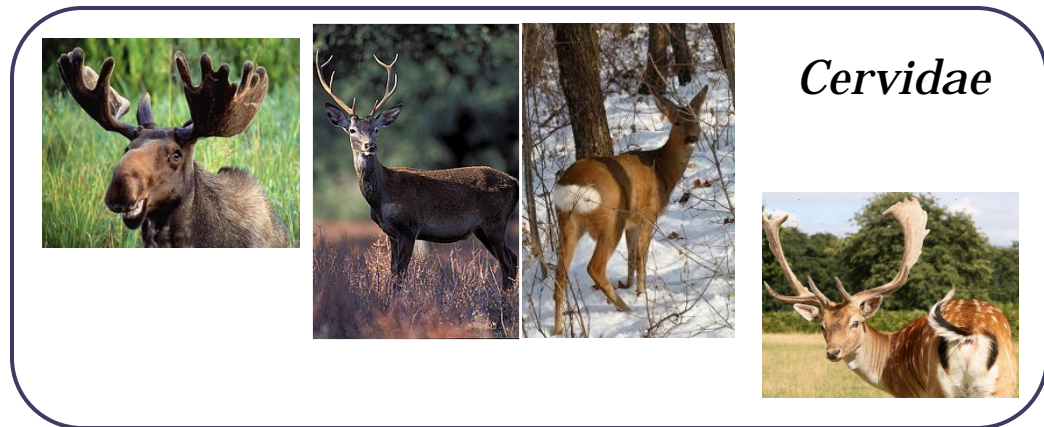


n>200



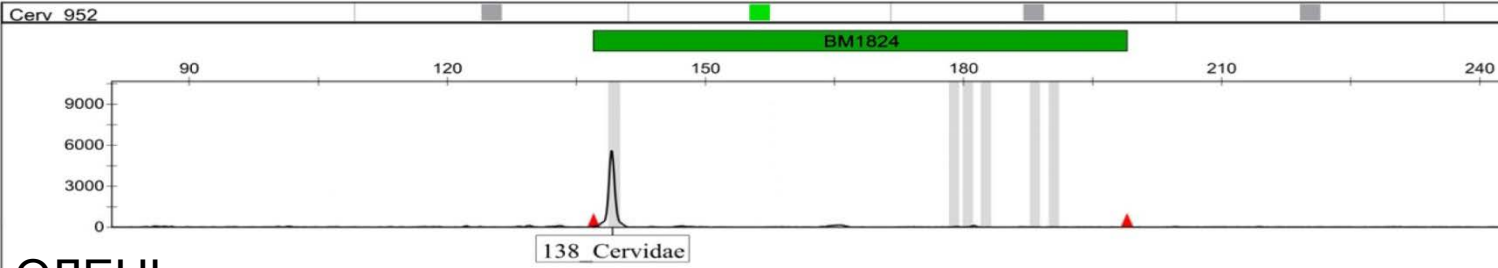
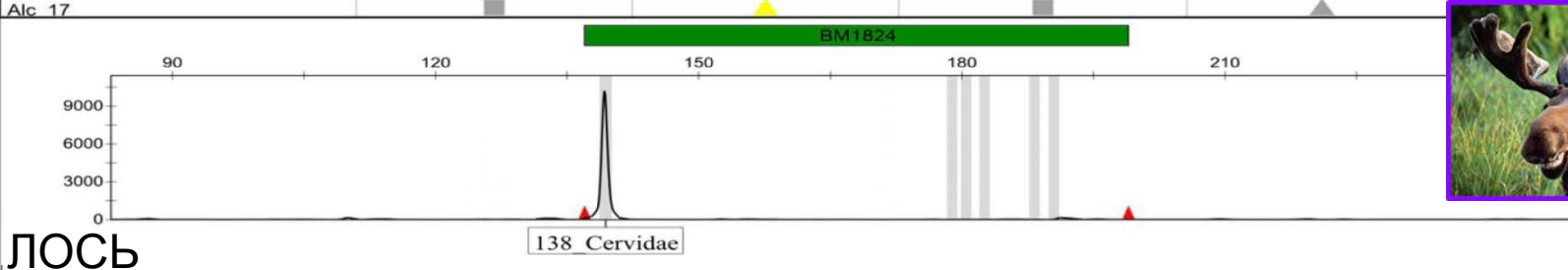
5 STR – для оленевых

CSSM036, T108, T501, RT9, RT24

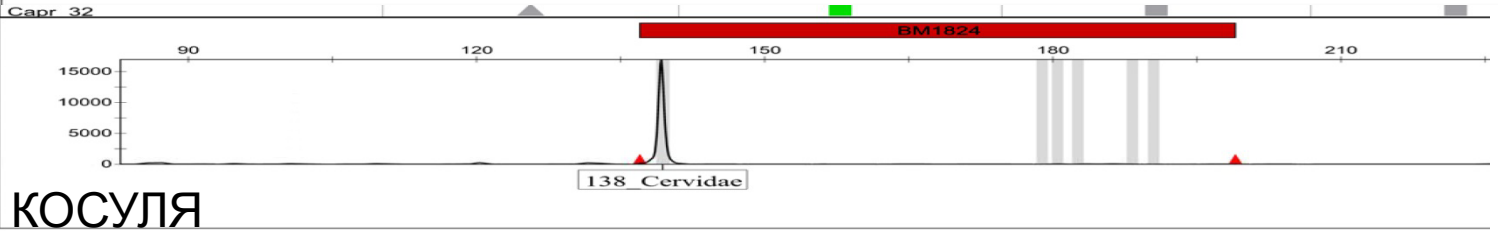


n>300

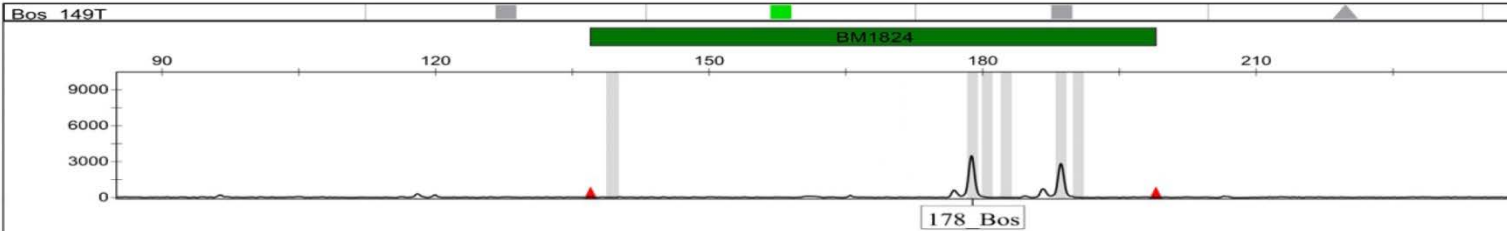
BM1824



ОЛЕНЬ



КОСУЛЯ



БЫК

Природа различий

STR BM1824

85
последовательностей
(100-272 п.н.)

6 локусов:

- BM1824
- CSSM036
- T108
- T501
- RT9
- RT24

```
B.t.: CATTCTCCAAC TGCTTCCTTGAAATGGTGC GTGAAAGGTAAACTGAGACATGAATATTAAAAATAAGTTTTTCATTCTACTCA
A.a.: .....A.....A.....A.G.....T.
C.e.: .....A.....A.....A.....C.....
C.c.: .....A.....A.....GA.....
D.d.: .....A.....A.....A.....
```

```
B.t.: CACTTTTTTGAAATTTGGCTAAGT GACATGACTAAGCAACTAACACACACACACACACACACACACACACACGCACAGAA
A.a.: ...G...A.....-----T...
C.e.: .....TA.....-----T...
C.c.: .....A.....-----
D.d.: .....A...G.....-----T...
```

```
B.t.: AGTTAGATTGGAAAAACACCTTGCTC
A.a.: .AC.....
C.e.: .C.....
C.c.: .C.....
D.d.: .C.....
```

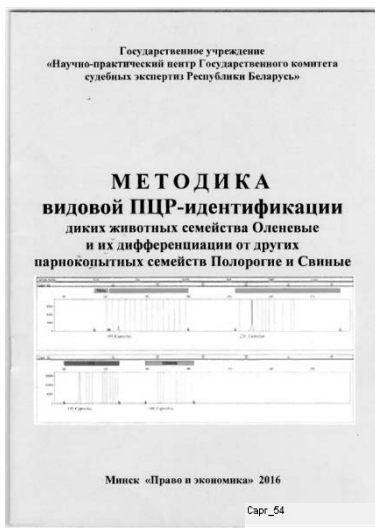
STR T108

```
C.e.: CATGTGGAGATAGGTAGACAGATGGAGAGAGGATAGAGATATATGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGAT
A.a.: .....A.....-----T.....
C.c.: .....A.....-----T.....
D.d.: .....-----
```

```
C.e.: AGATAGATAGATAGAGATAAATCAGGCAGAGAGAGCAAATACCATCTTTGGCAACCTCTGAATCAGCTACTCAGAATGG
A.a.: .A.....A.....---.....C.....A.....
C.c.: .A...G.....A.....G..C.....
D.d.: -.....A.....
```

B.t. – *Bos taurus*; A.a. – *Alces alces*, C.e. – *Cervus elaphus*,
C.c. – *Capreolus capreolus*, D.d. – *Dama dama*

Разработана методика видовой идентификации



ЕВРАЗИЙСКАЯ ПАТЕНТНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ (ЕАПО)
Eurasian Patent Organization

ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО (ЕАПВ)
Eurasian Patent Office

М. Черкасский пер. 2, Москва, 105012, Россия
М. Снежковку рет. 2, Мазсов, 109012, Russia

Факс (fax): +7(495) 621-2423. E-mail: info@eapo.org

На № от 13/01/2016 г.
Номер заявки: 201600045/26

Дата отправки 28 ЯНВ 2016

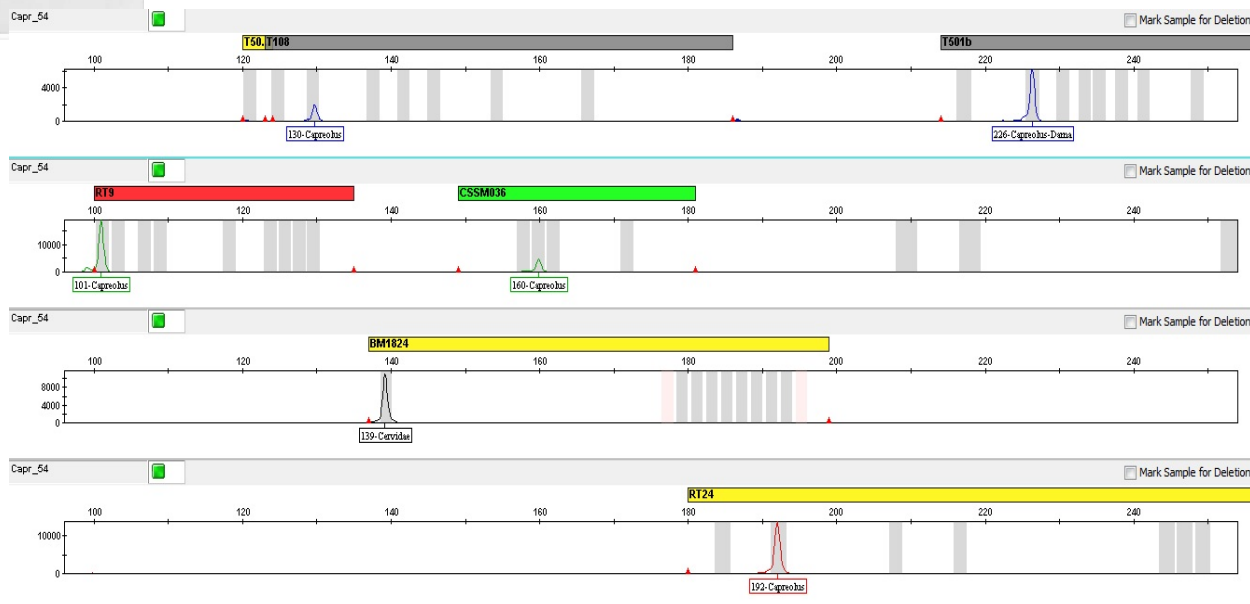
ГУ "НПЦ Государственного комитета
судебных экспертиз Республики
Беларусь" ул. Кальварийская, д. 43, г.
Минск, 220073 Республика Беларусь

г-же С.В. Крицкой

УВЕДОМЛЕНИЕ

о получении материалов евразийской заявки
из национального патентного ведомства Договаривающегося государства

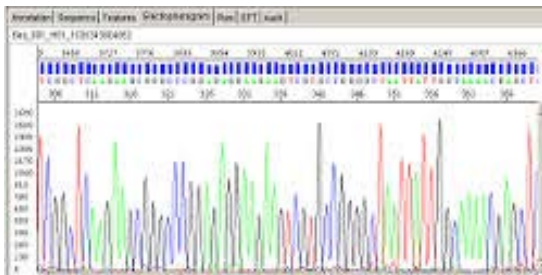
1. Евразийская заявка на изобретение: СПОСОБ И ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ОЛЕНЕВЫХ И ИХ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ОТ ДРУГИХ ПАРНОКОПЫТНЫХ поданная в Национальный центр интеллектуальной собственности Государственного комитета по науке и технологиям Республики Беларусь и зарегистрированная под № 2015/EA/0152 от 07/12/2015 г. поступила в ЕАПВ 26/01/2016 г. Евразийской заявке присвоен в ЕАПВ регистрационный № 201600045. При дальнейшей переписке просим ссылаться на этот номер.



Определение видовой принадлежности Зубра

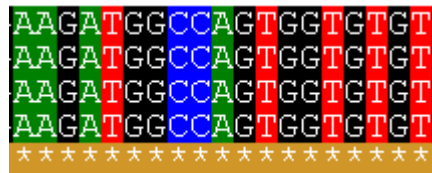
- анализ нуклеотидной последовательности участка D-петли мтДНК
- филогенетический анализ полученных последовательностей с привлечением референсных образцов;
- поиск гомологии в GeneBank (NCBI) для образцов, не кластеризующихся с референсными образцами.

“Sequencing Analysis Software v5.4”

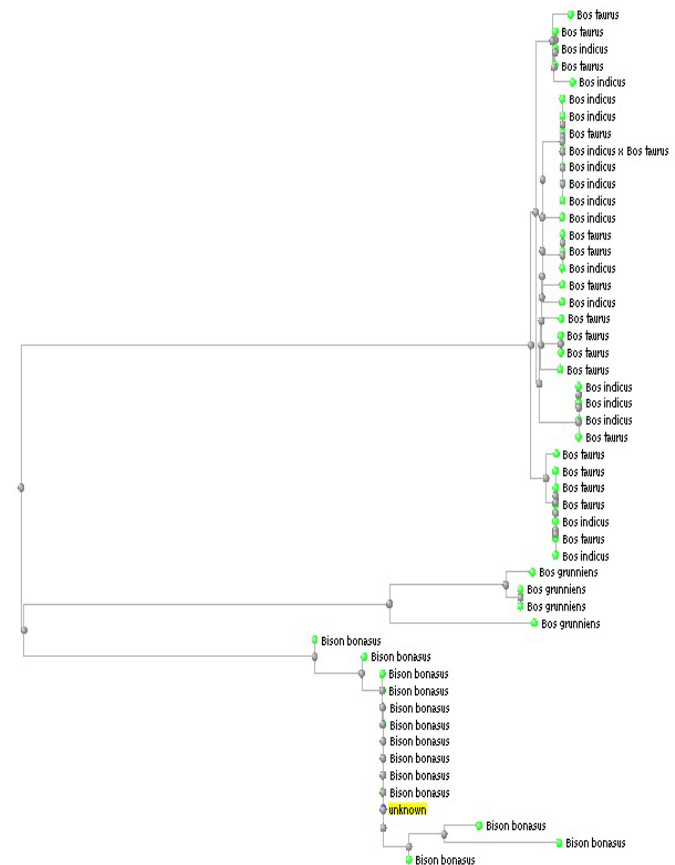


Секвенирование
последовательности
участков D-петли мтДНК

“BioEdit v7.0.5.3”

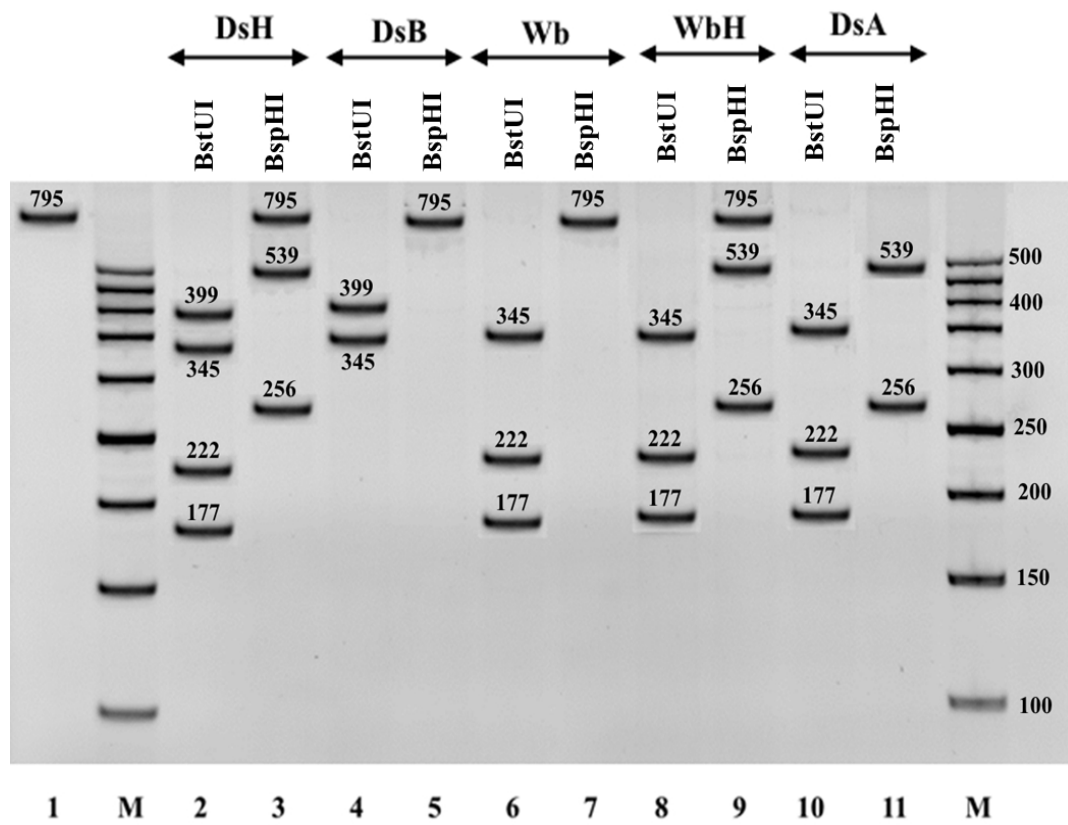


Выравнивание



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

Рестрикция генов MC1R и NR6A1



MC1R

DsH – Гибрид домашней свиньи типа «А» и типа «В»;

DsB – Домашняя свинья типа «В»;

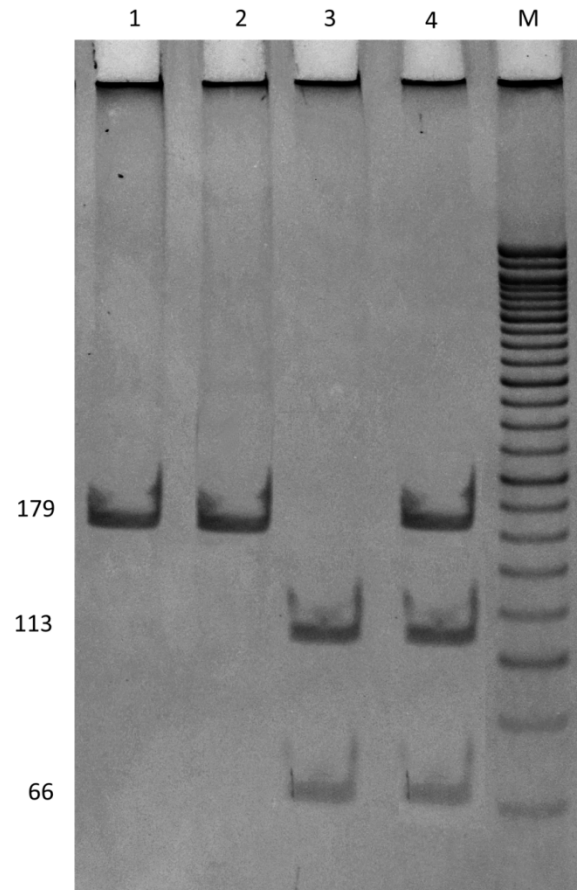
Wb – Дикая свинья;

WbH – Гибрид дикой свиньи и домашней;

DsA – Домашняя свинья типа «А».

Рестрикция гена NR6A1

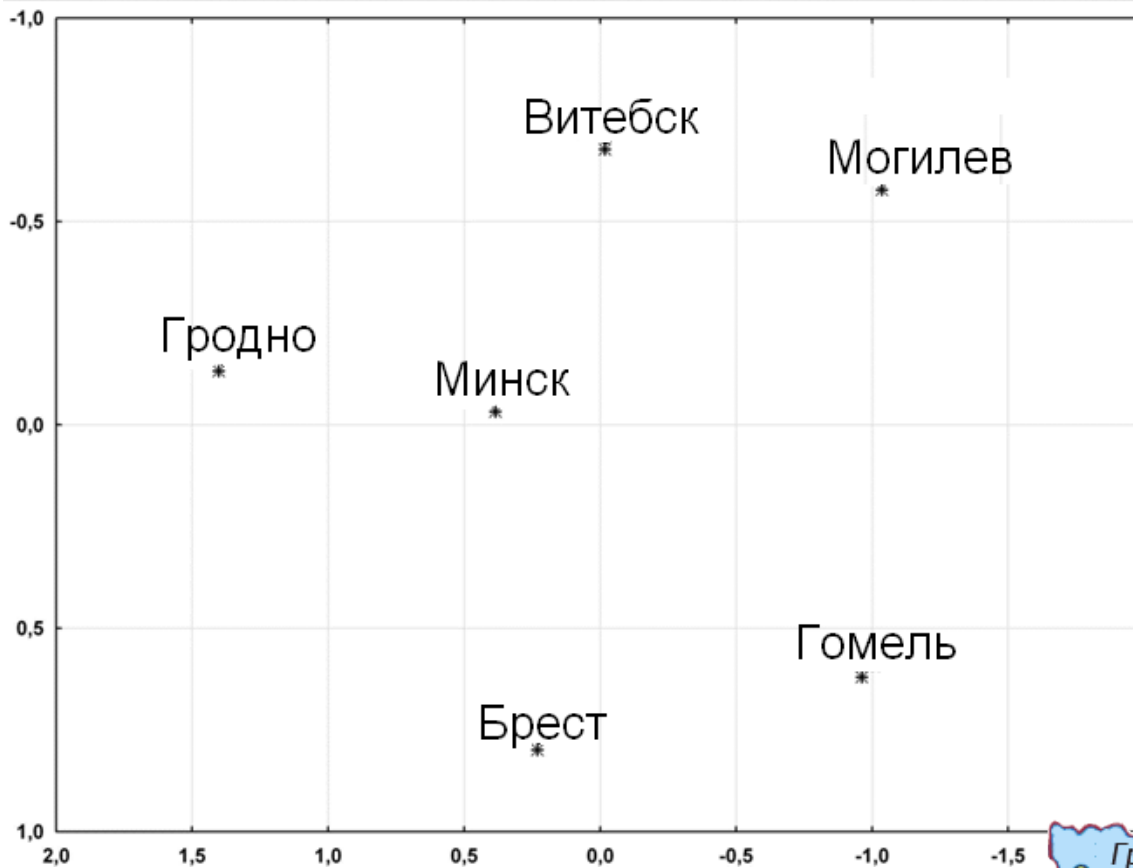
- 1 – Домашняя свинья типа «А»
- 2 – Домашняя свинья типа «В»
- 3 – Дикая свинья
- 4 – Гибрид дикой свиньи и домашней



STR-локусы для дикого кабана и свиньи домашней

	STR-locus	Chr.	No.of alleles	Allele range, b.p.
1	FH1696	1	15	345-397
2	FH1900	1	10	231-279
3	FH2148	1	21	236-376
4	SW240	2	18	93-127
5	FH2709	2	20	114-186
6	FH1589	3	21	136-204
7	FH1701	5	15	175-231
8	S0005	5	32	193-269
9	S0766	6	9	434-464
10	S0101	7	13	193-219
11	FH1733	11	10	274-314
12	FH3637	11	17	133-323
13	FH2478	12	10	272-308
14	SW857	14	11	136-160
15	FH1727	15	13	206-254
16	NLRIP0001	17	13	333-381

Дифференциация популяций дикого кабана из разных областей



Спасибо за внимание!

Иосиф Цыбовский, к.б.н.

Ученый секретарь НПЦ государственного комитета судебных
экспертиз Республики Беларусь

e-mail: npc@ sudexpertiza.by