

УДК 575.857; 575.17

В. Н. Кипень

E-mail: slavakipen@rambler.ru

А. Н. Верчук

E-mail: aleksei-wip@mail.ru

С. А. Котова

кандидат химических наук

E-mail: kotova_spc@mail.ru

НПЦ Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь
г. Минск, Беларусь

ОСНОВНЫЕ ТАКТИЧЕСКИЕ МОМЕНТЫ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ПРОЕКТА НАБОРА ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ЖИВОТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ STR и/или SNP-локусов

В статье кратко описаны некоторые технические задачи, с которыми могут столкнуться исследователи при разработке наборов для генотипирования животных, а именно: корректная интерпретация результатов генотипирования (вычисление значений гетерозиготного баланса, пороговых уровней для интенсивности пиков, базового порогового уровня), определение дискриминирующего потенциала набора для генотипирования, тестирование видовой специфичности и чувствительности (в т. ч. для деградированных образцов), а также оценка воспроизводимости результатов генотипирования.

Ключевые слова: биологический вид, лось, косуля, олень, генотип, набор для генотипирования, гетерозиготный баланс, пороговый уровень флуоресценции, дискриминирующий потенциал, специфичность, чувствительность, воспроизводимость, перекрестная амплификация.

Объекты биологической природы являются самыми распространенными вещественными доказательствами по многим категориям уголовных и гражданских дел. Поэтому методические подходы, направленные на разрешение задач в области судебно-генетической экспертизы вещественных доказательств биологического происхождения, являются одними из наиболее востребованных в современной судебной науке. Их совершенствование и повышение эффективности представляет значительный интерес для судебных и следственных органов.

На данный момент в мире отсутствуют коммерчески доступные наборы для генотипирования (определения генетического профиля) таких животных, как, например, лось, косуля и олень. В то же время, необходимость в таких разработках для задач судебно-экспертной деятельности в Республики Беларусь назрела давно.

Для разработок подобного рода ученым-криминалистам и генетикам, помимо стандартных процедур выбора генетических локусов путем анализа научной литературы и генотипирования, придется столкнуться с решением ряда задач технического характера, такими как: корректная интерпретация результатов генотипирования (вычисление значений гетерозиготного баланса, пороговых уровней для интенсивности пиков, базового порогового уровня), определение дискриминирующего потенциала набора для генотипирования, тестирование видовой специфичности и чувствительности (в т. ч. для деградированных образцов), а также оценка воспроизводимости результатов генотипирования.

Определение популяционных частот анализируемых локусов

На сегодняшний момент технологии по дифференциации и/или идентификации, в первую очередь, животных базируются на анализе двух основных типов генетических маркеров – однонуклеотидного полиморфизма (Single nucleotide polymorphism, SNP) и/или микросателлитов (Short tandem repeat, STR). Для оценки потенциального дифференцирующего эффекта любого генетического маркера необходимо определить частоту распространенности аллелей для конкретного локуса – в случае SNP (обычно, более чем в 90% случаев, представленных двумя альтернативными вариантами) достаточно рассчитать частоту минорной аллели, в случае STR необходимо максимально охарактеризовать все возможные аллельные варианты. В этой связи, принципиальным является вопрос относительно минимального достаточного объема выборки, являющейся репрезентативной в отношении генеральной совокупности. Как правило, в контексте популяционных генетических исследований под генеральной совокупностью принято понимать численность вида на исследуемой территории, на которую и будут впоследствии распространяться сформулированные выводы. Расчет минимального объема выборки производят по формулам, представленным, например, в [1].

Интерпретация результатов генотипирования

Наиболее точным способом генотипирования (не рассматриваются полупроводниковые технологии NGS по причине иного подхода к определению уровня специфического сигнала) являются те, в которых анализ осуществляется с использованием праймеров, меченых флуоресцентными красителями, или зондов для ПЦР в реальном времени (Real-time PCR). В этом случае любой результат генотипирования носит, как минимум, полуколичественный характер и может быть подвергнут математическому анализу с расчетом вероятности (корректности) определения генотипа. Для расчета такой вероятности необходимо рассчитать несколько величин.

Гетерозиготный баланс (Heterozygous balance, Hb) – отношение площади пика для одного аллеля к площади пика другого аллеля или, в более простом случае – отношение уровней флуоресценции (высот пиков) RFU allele A / RFU allele B, – в рамках одного локуса для гетерозиготного генотипа, выраженное в процентах (%). Высчитывается по формуле:

$$\mathbf{Hb\ (\%)\ =\ (fS\ /\ fL)\ \times\ 100\%,\quad (1)}$$

где fS – площадь (высота) малого пика (RFU); fL – площадь (высота) большого пика (RFU), и является характеристикой выявляемости (амплифицируемости) аллелей в гетерозиготном генотипе.

Относительные флуоресцентные единицы (Relative fluorescence units, RFU) – единицы измерения, используемые в анализе флуоресцентно меченных проб (ампликонов), характеризующие интенсивность флуоресценции, которая коррелирует с количеством анализируемой пробы (ампликона).

Чем больше значение Hb, тем меньший дисбаланс интенсивности аллелей по RFU имеет место – как итог: корректнее вывод о наличии гетерозиготного профиля. При Hb = 100% говорят об отсутствии гетерозиготного дисбаланса. Отдельно необходимо отметить, что Hb = 100% – относительно редкое явление по ряду причин. Так, например, при анализе импринтированных генов (менее 1% всех генов млекопитающих [2]) может наблюдаться существенное снижение параметра Hb.

Пороговый уровень для интенсивности пика (высоты или площади) для одного из аллелей гетерозиготы (Homozygous thresholds, Ht) – параметр, определяющий минимальное значение RFU для одного из аллелей в сравнении с RFU другого аллеля, при котором явление одного из аллелей не вызывает сомнения. Если в гетерозиготном генотипе на электрофореграмме наблюдается выпадение одного из аллелей (drop-out allele) – A или B, – то значение Ht для альтернативного аллеля определяется как:

$$Ht^{\phi A=0} = \phi V_{max} + 0,2 (\phi V_{max}) \quad (2)$$

$$Ht^{\phi B=0} = \phi A_{max} + 0,2 (\phi A_{max}) \quad (3)$$

Базовый пороговый уровень (Baseline thresholds, Bt) – значение RFU, характеризующее уровень флуоресцентного сигнала, детектируемого прибором (генетическим анализатором) в процессе анализа результатов ПЦР с негативным контролем (Negative control), т. е. при отсутствии специфического флуоресцентного сигнала. Вычисляется по формуле:

$$Bt = Bt_{max}^{locus1...n} + 0,25 (Bt_{max}^{locus1...n}) \quad (4)$$

Для мультилокусного набора для генотипирования, состоящего из n локусов, общий базовый пороговый уровень ($Bt_{general}$) может быть рассчитан как среднее арифметическое значений Bt для каждого локуса. Однако использование общего значения $Bt_{general}$ для тест-системы, в которой не используется подход с использованием общих для всех локусов универсальных праймеров (universal reporter primers, URP) [3], имеет ряд ограничений, связанных с неодинаковыми для анализируемых STR-локусов термодинамическими характеристиками специфических для каждого локуса пар праймеров. Как итог – в эксперимент по разработке набора для генотипирования включают дополнительную стадию оптимизации мультиплекса, направленную на подбор наиболее подходящих концентраций праймеров с тем условием, чтобы максимально равномерно происходило накопление каждого специфического ампликона в процессе ПЦР. Как правило, это длительный и дорогостоящий этап – ведь изменения в концентрации праймеров для одного локуса неизбежно влияют на амплифицируемость других локусов. В системе с более чем четырьмя STR-локусами статистически значимо предсказать и впоследствии корректно интерпретировать векторы изменений в наблюдаемых уровнях RFU всех локусов, входящих в тест-систему, становится практически невозможно (по аналогии с результатами ANOVA – ANalysis Of VAriance (дисперсионный анализ), – с четырьмя и более факторами). Поэтому наиболее корректной представляется схема с оценкой значения $Bt_{general}$ в совокупности и оценкой Bt_n для каждого локуса в каждом конкретном случае, в котором исследователь сомневается в корректности сделанного им вывода.

Для каждого локуса необходимо оценить параметры Hb_{min} и Ht_{max} . Данные параметры оценивают исходя из уровней RFU для каждого аллеля для биологического образца целевого вида с заведомо известным гетерозиготным генотипом. Для этого необходимо поставить эксперимент с титром ДНК (например, 250 пг/реакцию, 500 пг, 1нг, 5 нг, 20 нг), а также на стадии пост-ПЦР с различными параметрами времени электрокинетической инъекции (injection time) амплификата при анализе на генетическом анализаторе – например 5 сек, 10 сек, 15 сек и 20 сек.

В итоге, зная расчетные значения Hb_{min} и Ht_{max} , а также частоту распространенности каждого из аллелей локусов в тест-системе, можно вычислить вероятность отнесения (match probability, P_m) неизвестного образца по конкретному локусу к одному из трех генотипов – AA, AB или BB (рисунок).

Генотип AA (рисунок, А) должен быть определен, если (ϕ – площадь пика):

• $\phi A > Ht$ и $\phi B < Bt$, тогда $P_m = f(p_A^2)$ (при условии, что высота пика для аллеля A $> Ht$);

Генотип BB (рисунок, Б), если:

• $\phi B > Ht$ и $\phi A < Bt$, тогда $P_m = f(p_B^2)$ (при условии, что высота пика для аллеля B $> Ht$);

Генотип AB (рисунок, В), если:

• $\phi A > Ht$ и $\phi B > Bt$, тогда $P_m = f(2p_A p_B)$ (при условии, что высота пика для аллеля A $> Ht$ и для аллеля B $> Bt$);

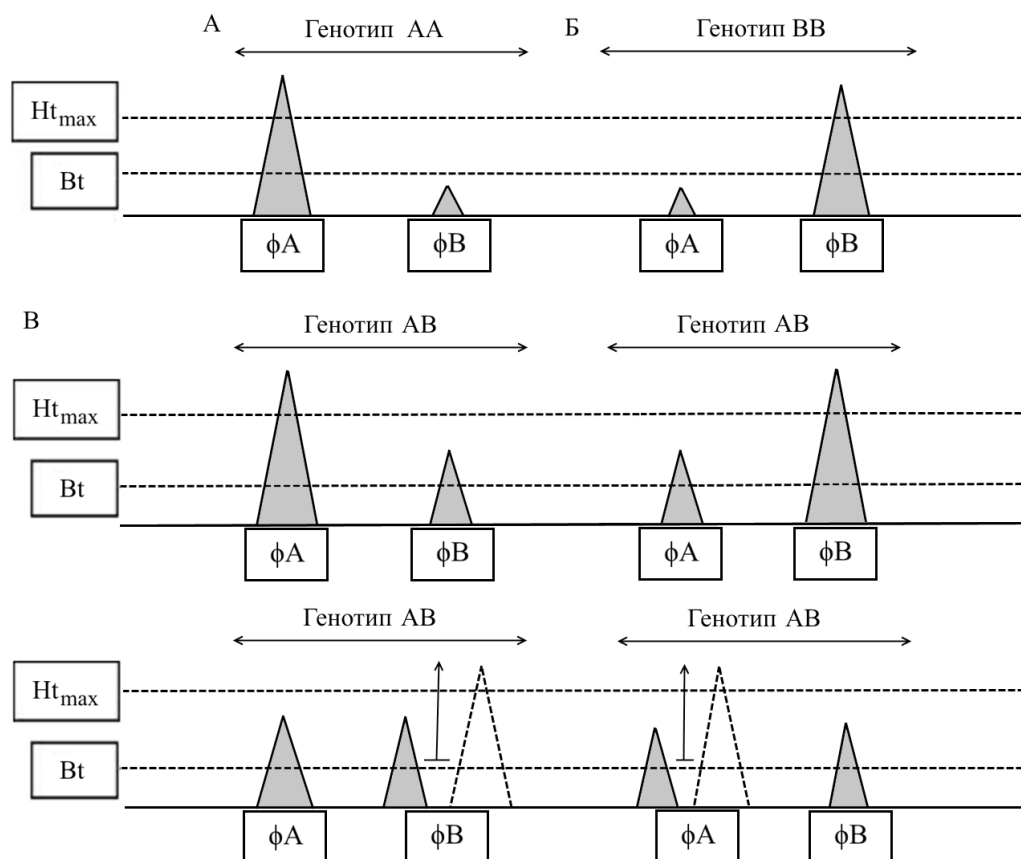
• $\phi B > Ht$ и $\phi A > Bt$, тогда $P_m = f(2p_A p_B)$ (при условии, что аллель B $> Ht$ и аллель A $> Bt$);

• $\phi A < Ht$ и $\phi A > Bt$ и $\phi B > Bt$, тогда $P_m = f(2p_A p_B)$ (при условии, что аллель A $> Bt$ и аллель B $> Bt$);

• $\phi B < Ht$ и $\phi B > Bt$ и $\phi A > Bt$, тогда $P_m = f(2p_A p_B)$ (при условии, что аллель A $> Bt$ и аллель B $> Bt$).

Другие варианты (корректно определить генотип не представляется возможным):

- $\phi_A < Ht$ и $\phi_A > Bt$ и $\phi_B < Bt$ – аллель В «выпал»;
- $\phi_A < Bt$ и $\phi_B < Ht$ и $\phi_B > Bt$ – аллель А «выпал»;
- $\phi_A < Bt$ и $\phi_B < Bt$ – «выпадение» обоих локусов.



**Рисунок – Пример определения значений показателей Bt и Ht_{\max} ,
 ϕ_A – площадь пика для аллеля А;
 ϕ_B – площадь пика для аллеля В (адаптировано из [4])**

Определение дискриминирующего потенциала набора для генотипирования

Процесс формирования мультилокусной тест-системы, помимо аналитической стадии отбора локусов и массового генетического скрининга, включает ряд необходимых этапов по математическому анализу полученной информации с использованием законов популяционной статистики: определяют количество потенциальных аллелей в популяциях целевого вида (видов) для каждого локуса; проводят расчет частоты встречаемости каждого аллеля.

Кроме подобных элементарных критериев отбора STR-локусов для определения уровня их информативности, как правило, используют следующие наиболее часто встречающиеся статистические параметры [5; 6]:

- 1) соотношение аллелей в пределах одной популяции (F_{IS});
- 2) соотношение наиболее часто встречающихся аллелей в пределах всех исследуемых популяций (F_{IT});
- 3) индекс фиксации, который является мерой аллельного разнообразия случайно выбранных аллелей в одной популяции по отношению к другой популяции (F_{ST});
- 4) определение вероятности сцепленного наследования для анализируемых локусов (при расположении на одной хромосоме вычисляют расстояние между локусами, выраженное в млн. п.н. (Мб), как правило, расстояние в 1 Мб оценивается как вероятность реком-

бинации генов в 1% (или 1 сантиморган, сМ); для вывода об отсутствии гаплотипического наследования локусов расстояние между двумя локусами, расположенными на одном плече хромосомы должно быть не менее 30 Мб (или 30 сМ));

- 5) значение равновесия Харди-Вайнберга (Hardy-Weinberg equilibrium);
- 6) наблюдаемое число генотипов (Genotypes observed, G_o);
- 7) наблюдаемая гетерозиготность (Heterozygosity observed, H_o);
- 8) ожидаемая гетерозиготность (Heterozygosity expected, H_e);
- 9) дисперсия числа повторов (Variance, V);
- 10) разброс числа повторов (Range, R);
- 11) вероятность исключения исследуемого образца по заданному генотипу (Power of Exclusion, PE);
- 12) вероятность случайного совпадения генотипов (pM);
- 13) индекс отцовства (Paternity Index, PI);
- 14) вероятность различения генотипов двух неродственных индивидуумов (Power of Discrimination, PD);
- 15) информационное содержание полиморфизма (Polymorphism Information Content, PIC) и др.

Для каждого из этих параметров имеется оптимальный диапазон значений, однако лишь совокупный результат по всем параметрам для всех тестируемых локусов будет способствовать принятию наиболее сбалансированного решения по созданию финальной версии мультиплексной тест-системы.

Таким образом, после включения в набор для генотипирования определенных локусов и имея рассчитанные значения частот распространенности аллелей по всем локусам, представляется возможным оценить истинное значение дискриминирующего потенциала (Potential of Discrimination, PD) набора, т. е. вычислить вероятность различения одной особи в популяции в рамках всей территории, для которой проводились исследования, от другой особи этого же вида. Чем больше значение PD (%), тем большим дискриминирующим потенциалом обладает набор для генотипирования.

Тестирование видовой специфичности набора для генотипирования

Под определением «видовая специфичность» (англ. *Species specificity*) в контексте апробации наборов для генотипирования понимают полное или частичное отсутствие неспецифических ПЦР-продуктов (ампликонов) при анализе биологических образцов нецелевых видов. Однако при анализе ПЦР-продукта может иметь наличие иной (не заявленный производителем) молекулярный размер ампликона (находящийся вне зоны аллельного диапазона для исследуемого локуса).

Определение показателей видовой специфичности набора для генотипирования конкретного вида (или рода) с целью идентификации конкретных особей данного вида или дифференциации особей различных видов (подвидов) в пределах более высоких таксономических единиц предполагает анализ результатов амплифицируемости исследуемых генетических маркеров (локусов), специфичных для целевого вида (видов), но не являющихся таковыми для иных видов. Логика отбора нецелевых видов для тестирования набора на видовую специфичность должна базироваться на ответах на несколько основных вопросов:

1. Для какого (каких) вида (видов) предполагается проводить генотипирование?
2. Какие ближайшие, эволюционно родственные, виды могут встречаться на территории, на которой обитает целевой вид (виды)?
3. Какие виды, не являющиеся эволюционно родственными для целевого вида, теоретически могут соприкоснуться в процессе своей жизнедеятельности с целевым видом?
4. Каким образом амплифицируются исследуемые генетические маркеры (локусы) в геноме человека (при их наличии в геноме – полной или частичной комплементарности используемых праймеров)?

5. Предполагается ли в перспективе использование разработанных наборов на территории других стран (территорий с иной фауной)?

Лишь ответив на ряд этих основных вопросов, исследователи, поставившие себе задачу разработки наборов для генотипирования с целью дифференциации и/или идентификации, будут в состоянии корректно выбрать нецелевые виды для оценки видовой специфичности разрабатываемого набора.

Например, E. A. Cotton et al. [7], проводя валидационные исследования набора для генотипирования человека – AMPFISTR® SGM Plus (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, cat.№ 4307133), – в рамках криминалистической задачи по идентификации неизвестной личности, в рамках оценки видовой специфичности набора использовали ДНК более 45 нецелевых видов (подвидов).

Тестирование чувствительности набора для генотипирования (в т. ч. деградированных образцов)

Анализ чувствительности набора для генотипирования предполагает определение минимального достаточного количества ДНК целевого вида для получения полного генетического профиля, под которым подразумевается однозначное определение генотипа по каждому локусу в рамках принятых для каждого локуса значений уровней V_t и H_t_{max} .

Как правило, для биологического образца целевого вида (видов) с известным генотипом, в лучшем случае – с известной нуклеотидной последовательностью (секвенированный), а также с известной концентрацией ДНК (определенной, например, с использованием Real-time PCR) делают серию разведений. При использовании коммерческих мастер-миксов (англ. *master mix*), в состав которых входят полимеразы с «горячим стартом» (англ. *Hot Start DNA Polymerase*), верхней границей тестируемого количества ДНК на реакцию является 1 нг [4; 7]. При использовании же Taq-полимеразы это количество может быть увеличено вплоть до 50–100 нг/реакцию. В результате использования в ПЦР серии разведений – например 20 нг, 5 нг, 1 нг, 500 пг, 250 пг, 125 пг, – определяют ту концентрацию ДНК, при которой выявляется полный генетический профиль. Эксперимент повторяют трижды – усредненное значение концентрации ДНК целевого вида и будет характеризовать чувствительность набора.

Отдельно стоит отметить, что определение чувствительности набора для генотипирования для целей криминалистики имеет свои нюансы. В частности, по причине возможной деградации биологических образцов, происходящей при воздействии факторов окружающей среды, и как следствие – уменьшении количества «рабочей» ДНК, следует делать поправку на выявленное значение чувствительности набора в контрольном эксперименте с ДНК, не подвергшихся таким воздействиям.

Так, в исследовании L. A. Dixon et al. [4] было показано, что в зависимости от: типа биологического объекта (кровь, слюна или сперма); времени, прошедшего от начала воздействия фактора (факторов) окружающей среды (42 дня, 62 дня, 84 дня, 147 дней, 243 дня); молекулярного размера амплифицируемого фрагмента (до 200 п. о., 200–300 п. о., более 300 п. о.), – наблюдается систематическое невыявление определенных генетических STR-локусов. Как правило, выпадение (невыявление) локусов наблюдается для образцов, подвергшихся длительному воздействию высоких температур, влажности, длительной инсоляции. Для STR-локусов также показана зависимость – чем длиннее амплифицируемый участок, тем в меньшем количестве он нарабатывается в процессе ПЦР. Если же ДНК еще и деградирована, то невыявление локусов становится обыкновенным явлением. Заключение, сделанные L. A. Dixon et al. [4] были подтверждены в исследовании K. A. Mayntz-Press [8]. Эта проблема в последнее время решается использованием вместо микросателлитов (STR) однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNP). Для их анализа достаточно амплифицировать участок ДНК в 50–70 п. о. И лишь в случае сильно деградированного биологического материала, в первую очередь подвергшемуся гнилостным изменениям, не представляется возможным провести генетипоскопические исследования ни по STR-локусам, ни по SNP.

По этой причине, определение чувствительности набора, разрабатываемого для задач криминалистики, например, для генотипирования ДНК диких животных, помимо генотипирования в серии разведений с нативной (недеградированной) ДНК должно также проводиться исследование образцов, подвергшихся воздействию факторов внешней среды, моделирующих реальную ситуацию (место преступления).

Данный факт значительно расширит границы эксперимента, однако полученные результаты будут способствовать стабильной работе мультиплексной системы и получению воспроизводимого результата.

Тестирование воспроизводимости результатов генотипирования

Под воспроизводимостью результатов генотипирования понимают систематическое получение в результате исследования известного тестируемого генетического профиля (генотипов по анализируемым локусам) без существенного отклонения от первоначальных результатов для контрольного позитивного образца.

Таким образом, входящие в набор реагенты должны иметь рабочее состояние (при заданных условиях использования и хранения) в течение всего срока эксплуатации, заявленного производителем. Результаты для одного и того же биологического образца, полученные в самом начале использования набора, должны быть конкордантны с результатами, полученными на финальной стадии использования набора.

К тому же, результаты генотипирования должны быть воспроизводимы от набора к набору с учетом допустимых флуктуаций, неизбежно возникающих при производстве новой партии реагентов.

С понятием воспроизводимости тесно связан термин стандартизованность. Стандартизованный тест – тест, имеющий спецификацию и определенные характеристики, стабильно подтвержденные на широкой выборке исследуемых образцов. Более 20 лет назад в США была разработана система норм, правил и указаний, направленных на обеспечение согласованности и достоверности результатов лабораторных исследований – стандарт GLP (англ. *Good Laboratory Practice* – Надлежащая лабораторная практика), разработанный FDA (англ. *Food and Drug Administration* – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) [9]. На территории Европейского союза используются международные стандарты ISO (англ. *International Organization for Standardization* – Международная организация по стандартизации).

На территории Республики Беларусь по состоянию на август 2017 г. имеется несколько организаций с аккредитованными Белорусским государственным центром аккредитации (<http://www.bsca.by>) лабораториями, занимающимися вопросами генотипирования животных: Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», Республиканский Центр по генетическому маркированию и паспортизации растений, животных, микроорганизмов и человека, ВУ/112 02.1.0.1599; Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет», отраслевая научно-исследовательская лаборатория ДНК-технологий, ВУ/112 2.4786; Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», лаборатория молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования, ВУ/112 1.1792.

Все коммерческие наборы для генотипирования животных, растений, микроорганизмов проходят ту или иную процедуру сертификации в зависимости от страны (стран), на территории которой (которых) предполагается использовать набор.

Заключение

Таким образом, прогресс в области фундаментальных исследований и технологий, активное внедрение их результатов в практику будет способствовать дальнейшему углублению содержания и расширению возможностей судебных генетических экспертиз вещественных доказательств по фактам незаконной охоты (браконьерства) в Республике Беларусь.

В то же время, каждый разрабатываемый проект набора для генотипирования животных с целью решения задач дифференциации и/или идентификации имеет свои специфические характеристики как в плане технической реализации, так и в контексте переноса используемых генетических маркеров с вида-источника на целевые виды, для которых и предполагается в дальнейшем использовать набор, характеристики которого должны однозначно соответствовать заявленным. Ведь к наборам для генотипирования, используемым в криминалистике, предъявляются самые строгие требования по их валидации.

Список использованных источников

1. Койчубеков, Б. К. Определение размера выборки при планировании научного исследования / Б. К. Койчубеков, М. А. Сорокина, К. Э. Мхитарян // Междунар. журн. приклад. и фундам. исслед. – 2014. – № 4. – С. 71–74.
2. Wilkinson, L. S. Genomic imprinting effects on brain development and function / L. S. Wilkinson, W. Davies, A. R. Isles // Nat. Rev. Neurosci. – 2007. – № 8(11). – P. 832–843.
3. Rapid preparation of SNP multiplexes utilizing universal reporter primers and their detection by gel electrophoresis and microfabricated arrays // J. Hussain [et al.] // International Congress Series. – 2003. – № 1239. – P. 5–8.
4. Validation of a 21-locus autosomal SNP multiplex for forensic identification purposes / L. A. Dixon [et al.] // Forensic Sci. Int. – 2005. – № 10. – P. 62–77.
5. Blood samples: probability of discrimination / D. A. Jones // J. Forensic Sci. Soc. – 1972. – №12(2). – P. 355–359.
6. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology 1st Edition / J. Butler // Academic Press. – 2014. – 704 p.
7. Validation of the AMPF1STR SGM plus system for use in forensic casework / E. A. Cotton [et al.] // Forensic Sci. Int. – 2000. – № 14;112(2-3). – P. 151–161.
8. Mayntz-Press, K. A. Performance characteristics of commercial Y-STR multiplex systems / K. A. Mayntz-Press, J. Ballantyne // J. Forensic Sci. – 2007. – № 52(5). – P. 1025–1034.
9. Handbook : good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development – 2nd ed. World / Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. – 2009. – 328 p.

Дата поступления: 01.11.2017

V. N. Kipen

A. N. Verchuk

S. A. Kotova

Candidate of Chemical Sciences

SPC of State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus
Minsk, Belarus

KEY TACTICAL MOMENTS IN THE DESIGN OF THE KIT FOR ANIMALS GENOTYPING USING THE STR AND/OR SNP LOCI

The article briefly outlines several technical objectives the researchers may face in the development of the kits intended for animals' genotyping. In particular, these are: proper interpretation of the results of genotyping (calculation of heterozygous balance values, threshold values for the intensity of peaks, threshold baseline), determination of discriminatory potential of the kit for genotyping, testing species specificity and sensitivity (including the ones for degraded samples), and the evaluation of reproducibility of the results.

Keywords: species, elk, roe, deer, genotype, kit for genotyping, heterozygous balance, threshold fluorescence level, discriminating capacity, specificity, sensitivity, reproducibility, cross-amplification.