DOI 10.32900/2312-8402-2023-129-70-78
УДК 636.4.082.453.5:57.085.2:57.089.3

КОНТРОЛЬ КОНТАМІНАЦІЇ БІОЛОГІЧНИХ ЗРАЗКІВ *SUS SCROFA* З ВИКОРИСТАННЯМ ГАПЛОЇДНИХ ДНК-МАРКЕРІВ

Будаква Є. О., асп., м. н. с., https://orcid.org/0000-0001-5941-1953
Почерняєв К. Ф., д. с.-г. н., гол. н. с., https://orcid.org/0000-0001-9973-6429
Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН
м. Полтава, Україна
Почерняєв А. К., https://orcid.org/0000-0001-9520-4492
Полтавський науково-дослідний експертно-криміналістичний центр
МВС України

У цій роботі ми пропонуємо ефективний спосіб контролю контамінації(забруднення)біологічних зразків виду Sus scrofaчужорідним матеріалом на преаналітичному етапі у дослідженнях нуклеїнових кислот методом ПЛР. Оскільки ПЛР має високу чутливість, навіть мізерна кількість чужорідного біологічного матеріалу що містить ДНК може привести то хибних результатів. У випадку аналізу забруднених біологічних зразків з використанням диплоїдних ДНК-маркерів, суміш диких та мутантних гомозигот буде визначено як гетерозигота. На відміну від диплоїдних ДНК-маркерів, суміш двох різних гаплотипів визначаються однозначно. Забір біологічного матеріалу свині (вухо з биркою ідентифікаційного номера тварини). ДНК виділяли з епітеліальної тканини вушної раковини. У якості гаплоїдного маркеру були використані 5 SNPsмітохондріального геному. Дослідження проведено з залученням багатосайтового ПЛР-ПДРФ способу, особливість якого полягала у аналізі фрагмента D-петлі між позиціями 15531 і 15959 мітохондріального геному свині(GenBank: AJ002189.1).На цій ділянці розташовані один мономорфний 15558W і п'ять поліморфних сайтів рестрикції Tas I: 15580T > C, 15616T > C, 15714T > C, 15758T > C та 15916A > T. Наявність або відсутність сайту Tas I у зазначених вище позиціях визначає мітохондріальні гаплотипи, що позначені латинськими літерами від A до P (К. Почерняєв, 2017)*.ПЛР-ПДРФ аналіз зразків ДНК визначив на електрофореграмі фрагменти ДНК, які вказували на об'єднання двох та більше гаплотипів. Встановити наявність контамінації вдалося завдяки використанню багатосайтового ПЛР-ПДРФ способу, який припускає для мітохондріальної ДНК окремої тварини суворо дискретний набір рестриктних фрагментів. В сумі, розміри рестриктних фрагментів повинні складати 428 п.н., а наявність додаткових смуг ДНК вказують на об'єднання двох та більше гаплотипів. Таким чином, було продемонстровано, що використання гаплоїдних ДНК-маркерів дозволяє визначати забруднення зразків чужорідним біологічним матеріалом. Даний спосіб може бути використаний при дослідженні ядерної ДНК свиней, як лабораторний контроль якості на преаналітичному етапі, що дозволить зменшити витрати лабораторії, поліпшити організацію роботи та уникнути драматичних помилок при виконання генетичних експертиз.*

Ключові слова: **свині, епітелій, мітохондріальний геном, генотипування, гаплоїдні ДНК-маркери, ПЛР, контамінація.**

Для генотипування використовують різноманітні методи, вибір яких залежить від того, яку інформацію потрібно отримати. Значна частка методів вимагає

попередню ампліфікацію ДНК, що зазвичай виконується за допомогою ПЛР. Оскільки метод ПЛР має високу чутливість, він дозволяє виконувати дослідження навіть на мізерних кількостях ДНК. Так, S. Furutani et al. (2012) повідомили про можливість отримання продуктів RT-PCR з використанням від 10 до 400 клітин. Необхідність аналізу експресії генів окремих клітин призвів до розроблення методів у яких достатньо для аналізу геному однієї клітини – одноклітинна або мікрокрапельна РТ-ПЛР (англ. *single-cell droplet RT-PCR* – одноклітинна крапельна RT-PCR). Безумовна цінність чутливості методу ПЛР визначає певні вимоги, які передбачають ідеальну стерильність лабораторних приміщень, обладнання, пластику та компонентів розчинів [2-5]. Як правило, на ці умови звертають основну увагу, маючи на увазі, що забір біологічного матеріалу було виконано з дотриманням комплексу заходів преаналітичний етапу. На преаналітичному етапі основну увагу звертають на спосіб відбору біологічних зразків, чітку систему маркування, реєстрації та забезпечення температурного режиму транспортування і зберігання проб. На практиці відбір проб у польових умовах (приміщення з груповим утриманням тварин, забійні цехи м'ясокомбінатів, на полюванні) відбувається з різними порушенням преаналітичного етапу, які уникнути технологічно неможливо. З тією самою проблемою стикаються і криміналісти. Повх А. С., Романчук С. М. (2018) зауважують, що молекулярно-генетичне дослідження зазвичай пов'язане з ризиком забруднення – контамінацією (англ. *Contamination*) біологічних об'єктів (зразків) чужорідною ДНК, тобто ДНК інших осіб (трупів) [6-9, 11]. Вона може виникнути на будь-якому етапі дослідження (огляд речових доказів, пошук слідів біологічного походження, виділення ДНК з об'єктів дослідження, проведення ПЛР у реальному часі, ампліфікації, фрагментного капілярного електрофорезу тощо). Контамінація сьогодні є важливою проблемою, що спонукає до розроблення заходів контролю з метою запобігти забрудненню об'єктів біологічного походження, виділеної та ампліфікованої ДНК, реактивів, лабораторного посуду, обладнання тощо, які використовують під час молекулярно-генетичного дослідження.

Проблематика контролю за контамінацією при генетичних дослідженнях у тваринництві набула особливого в значення при використанні одержаних даних в суді. Оскільки, сьогодні генетична експертиза домашніх тварин є суттєвим доказом видової та індивідуальної ідентифікації об'єктів у судових справах, коли тварина підозрюється у нападі або нанесенні збитку майну. Така експертиза доцільна під час розслідування як цивільних, так і кримінальних справ викрадення тварин, жорстокого поводження з тваринами, а також фальсифікації харчових продуктів [12]. Велика частина розбіжностей лабораторій, які знаходяться у підпорядкуванні ISAG, стосується надання судово-генетичних послуг з експертизи зразків тваринного походження. На це, можливо, випливає відсутність чіткого визначення судової генетики тварин. Для вирішення цього питання ISAG створило "Постійний комітет судової генетики тварин", одним із завдань якого було розроблення рекомендацій щодо використання генетичної інформації в криміналістичних дослідженнях тварин [13].

Зрозуміло, що проблема контролю за контамінацією набуває більшого значення завдяки впровадженню маркер-асоційованої селекції. Так, в Україні набувають поширення методи селекції свиней у яких використовують дані щодо певних ДНК-маркерів та їх асоціацій з господарсько-корисними ознаками. Вже встановлені формули ДНК-маркерів для певних порід свиней. Так, наприклад, П. А. Ващенко та співавтори (2019) пропонують відбір тварин для відтворення

здійснювати після типування молодняку і віддавати перевагу свиням із генотипами *c.1426 MC4R*^{GA}, *MC4R*^{AA}, g. 22 *CTSF*^{CC}, *g.*2845 LEP^{TT} [14].

З огляду на це, метою даної роботи було розробити спосіб визначення забруднення чужорідною ДНК з використанням гаплоїдних ДНК-маркерів. У цій роботі ми пропонуємо ефективний механізм контролю, що запобігає виникненню помилок пов'язаних з відбором проб у польових умовах. Він полягає у визначенні контамінації ДНК за допомогою гаплоїдних ДНК-маркерів, а саме ПЛР-ПДРФ варіабельної ділянки мітохондріального геному. Визначення можливої контамінації ДНК дозволить зменшити витрати лабораторії, поліпшити організацію роботи та уникнути драматичних помилок при виконання генетичних експертиз.

Мета дослідження. Визначити ефективність використання гаплоїдних ДНК-маркерів для контролю контамінації біологічних зразків чужорідним матеріалом.

Матеріали та методи дослідження. Забір біологічного матеріалу свині (вухо) виконували під час проведення забою на Глобинському м'ясокомбінаті, Глобинського району, Полтавської області на помісних свинках (175 голів) велика біла × ландрас у поєднанні з термінальними кнурами Maxgro. Після забою з туш свиней було відрізано по одному вуху з биркою ідентифікаційного номера тварини.

ДНК виділяли з епітеліальної тканини вушної раковини з використанням набору для виділення нуклеїнових кислот ДНК-сорб-Б виробника ТОВ «ІнтерЛаб Сервіс-Україна» згідно рекомендацій виробника.

Дослідження мітохондріальної ДНК (мтДНК) свиней було здійснено з використанням полісайтового способу ПЛР-ПДРФ [1]. Для ПЛР-реакції використовували набір (Thermo Scientific™), олігонуклеотидніпраймери власного дизайну MITPROF: GCACCCAAAGCTGAAATTCTA та MITPRO2R: CATACAAATATGTGACCCCAAA було синтезовано (Metabion international AG, ФРН). Ампліфікацію проводили на програмованому термостаті (Biometra GmbH) за наступних умов. Початкова денатурація – 5 хв за 95 °С та 35 циклів: денатурація – 94 °С (40 с), випалювання праймерів – 63 °С (40 с), синтез –72 ˚С (40 с), завершальний синтез – 72 °С, 5 хв, (зберігання – 4 °С).

Якість та специфічність продуктів ПЛР перевіряли за допомогою електрофорезу у 2% агарозному гелі у буфері 1×ТВЕ, при напрузі 2В/см гелю. Як маркери молекулярної маси використовували: 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific™). Після закінчення електрофорезу гель фарбували розчином бромистого етидію (10 мг/см3) упродовж 4–7 хв. Гідроліз продуктів ПЛР виконували з використанням ендонуклеази *Tas* I (Thermo Scientific™) за умов виробника. Продукти гідролізу ПЛР були розділені за допомогою електрофорезу у 8% поліакриламідному гелі у 1×ТВЕ буфері за сили струму 50мА, як маркер молекулярної маси використовували ДНК *pUC*19/Msp I (Hpa II) та pBiueScript DNA/MspI (Thermo Scientific™). Після закінчення електрофорезу гель фарбували розчином бромистого етидію (10 мг/см3) упродовж 4–7 хв, промивали гель дистильованою водою та документували результати електрофорезу цифровою камерою на трансілюмінаторі (Micro DOC Gel Documentation Digital camera with UV Transilluminator, Cleaver Scientific).

Результати досліджень. Дослідження проведено з залученням багатосайтового ПЛР-ПДРФ способу, особливість якого полягала у аналізі фрагмента D-петлі між позиціями 15531 і 15959 мітохондріального геному свині (GenBank: AJ002189.1), де розташовані один мономорфний 15558W і п'ять поліморфних сайтів Tas I: 15580T > C, 15616T > C, 15714T > C, 15758T > C та 15916A > T. Наяв-

ність або відсутність сайту пізнавання Tas I у зазначених вище позиціях визначає мітохондріальні гаплотипи, що позначені латинськими літерами від A до P [1]. Електрофорез продуктів ПЛР ампліфікації ДНК свиней у 2% агарозному гелі визначив розмір фрагментів 428 п.н. Ампліфікована ДНК всіх зразків відповідала очікуваним розмірам фрагментів та не містила додаткових смуг на електрофореграмі, що свідчить про специфічність синтезу (Рис. 1.).

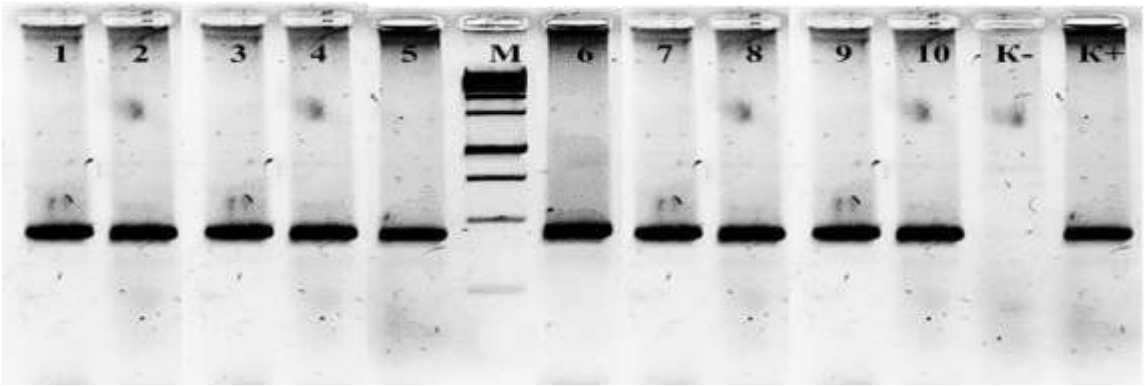

Рис. 1. Ампліфікована у ПЛР мтДНК свиней з парою олігонуклеотидних праймерів MITPROF та MITPRO2R фракціонованих у 2% агарозному гелі: М – маркер молекулярної маси 1 kb DNA Ladder, зразки 1-10 ДНК свині, К- негативний контроль (H_2O), К+ – позитивний контроль (ДНК свині).

Рестриктний аналіз продукту ПЛР розміром 428 п.н., з використанням ендонуклеази Tas I, визначив на електрофореграмі неспецифічні фрагмент ДНК (Рис. 2).

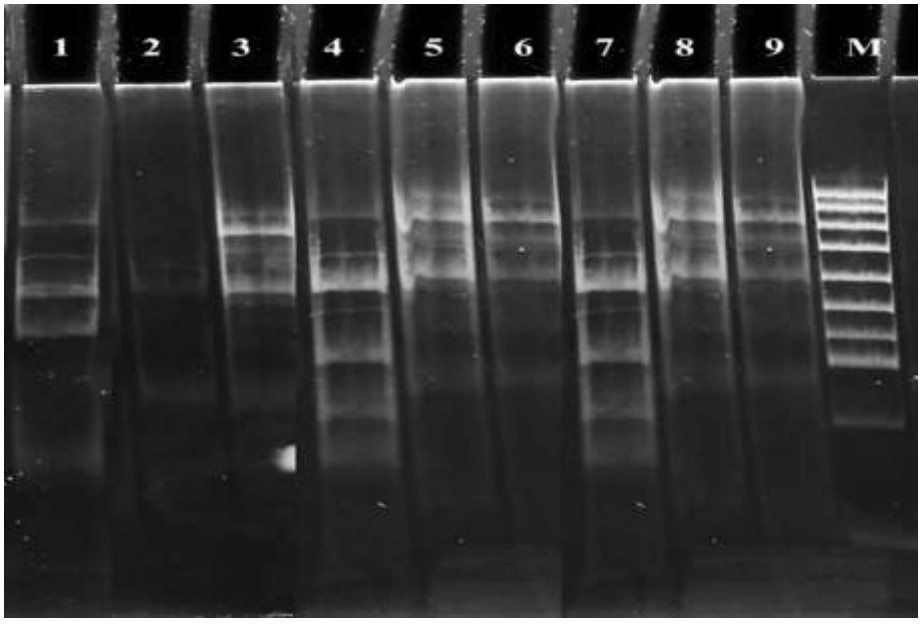

Рис. 2. Ампліфікована у ПЛР та гідролізована з використанням ендонуклеазиTas I мітохондріальна ДНК свині, фракціонована у 8 % ПААГ: 1–9 ДНК свиней,М – маркер pUC19/MspI (HpaII).

Оскільки, при використанні багатосайтового ПЛР-ПДРФ способуаналізу мітохондріального геному свині для гаплотипу кожної тварини повинний спосте-

рігатися суворо дискретний набір рестриктних фрагментів.В сумі розміри рестриктних фрагментів мають скласти 428 п.н. Так, наприклад, після гідролізу ділянки фрагменту D-петлі мітохондріального геному повинні були утворюватися наступні можливі комбінації рестриктних фрагментів ДНК:406 + 22 = 428 п.н., 383 + 23 + 22 = 428 п.н., і так далі, всього можливих 18 варіантів. Гаплотипи, що мають найбільшу концентрацію серед транскордонних порід свиней приведено на ілюстративному фото (Рис. 3).

На підставі цього, було зроблено висновок, про наявність змішаних зразків ДНК. Аналізуючи можливі шляхи контамінації на преаналітичному та аналітичному етапах дослідження, ми прийшли висновку, що під час забору зразків при забої на Глобинському м'ясокомбінаті, відбулося перехресне забруднення біологічним матеріалом свиней.

Оскільки ці зразки планувалося використати для генотипування за ядерними SNP ДНК-маркерами, одержані результати дозволили уникнути хибних результатів при використанні забрудненої ДНК. Зрозуміло, що при дослідженні змішаних зразків ДНК, з високою імовірністю міг спостерігатися надлишок гетерозигот.

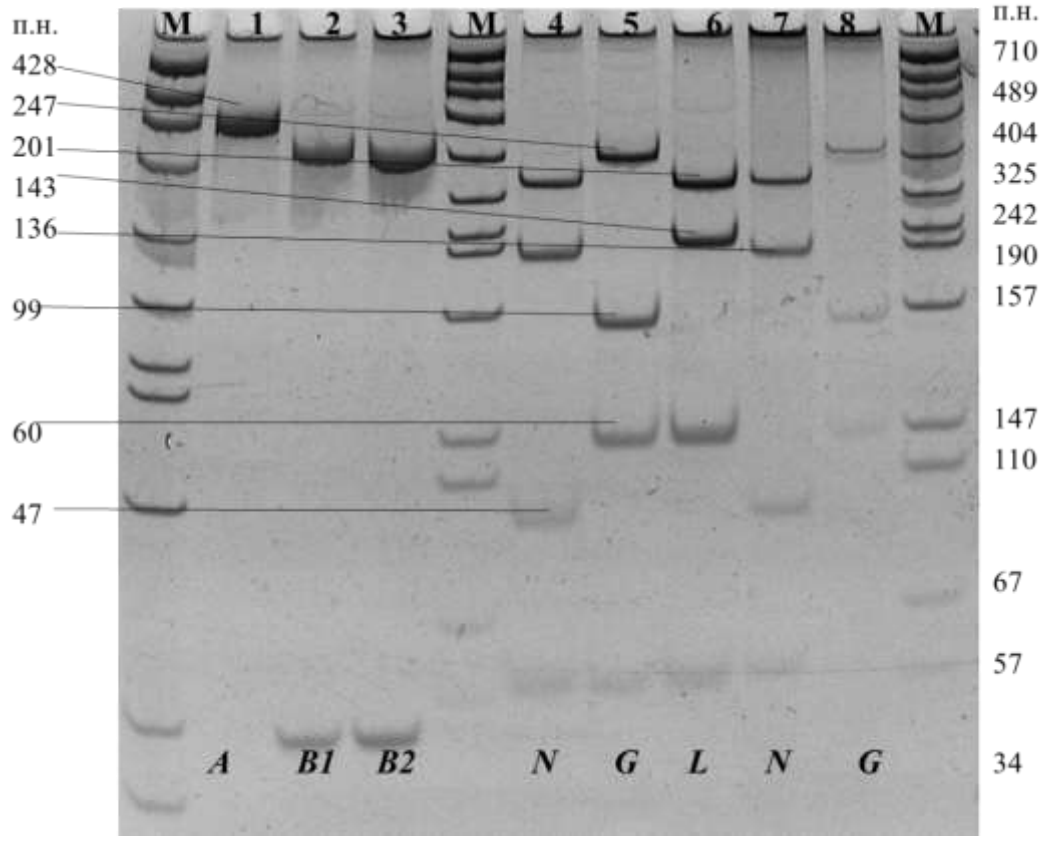

Рис. 3. Приклад різних профілів мітохондріальної ДНК (гаплотипів). Ампліфікована у ПЛР та гідролізована з використанням ендонуклеази Tas I мітохондріальна ДНК свиней, фракціонована у 8 % ПААГ: М – маркер pBiueScript DNA/Msp I. Зразки 1,2,3 разом з маркером pBiueScript DNA/Msp I фракціонували 1 годину, потім наносили зразки на лунки 4,5,6,7,8 з маркерами pBiueScript DNA/Msp I та фракціонували ще 2 години.

Залучення даного способу контролю контамінації біологічних зразків чужорідним матеріалом не доцільне при використанні аналізу STR-локусів, оскільки завдяки наявності множинних алелів притаманних мікросателітам, змішані зразки ДНК визначаються однозначно.

Таким чином, ми схиляємося до думки Van Oorschot R. A. H. et al. (2019) [10], що експертиза пов'язана з аналізом ДНК відрізняється від інших. Вона має підкріплюватися спеціальною підготовкою, перевіркою кваліфікації, авторизацією та регулярним тестуванням кваліфікації. Можливості для експертів повідомляти про проблеми, пов'язані з діяльністю, будуть збільшуватися, оскільки наші знання збільшуються завдяки подальшим дослідженням, розширюється доступ до відповідних даних, а інструменти, що допомагають інтерпретації, краще використовуватимуться. Можливості вдосконалення будуть досягнуті швидше, якщо більше лабораторій і агенцій визнають необхідність інвестувати в ці аспекти, а також у навчання практиків.

Висновок. Використання гаплоїдних ДНК-маркерів, у нашому випадку мітохондріального геному дозволяє визначати забруднення зразків біологічним матеріалом виду *Sus scrofa*.Даний спосіб може бути використаний при дослідженнях SNPДНК свиней, як лабораторний контроль якості, що дозволить зменшити витрати лабораторії, поліпшити організацію роботи та уникнути драматичних помилок при виконанні генетичних досліджень.

Вдячності. Дослідження виконано за підтримки Національної академії аграрних наук України в межах виконання завдання 31.01.00.07.Ф. «Дослідити плейотропний ефект генів, SNP яких використовують в маркер-асоційованій селекції свиней» ДР № 0121U109838.

Бібліографічний список

1. Почерняєв, К., Ф. Нові можливості багатосайтового способу визначення мітохондріальних гаплотипів свиней. *Свинарство. Міжвідомчий тематичний науковий збірник Інституту свинарства і АПВ НААН.* 2017. 69, 100-108. https://svinarstvo.com/zbirnyk/archive/69/69-100-108.pdf.

2. Furutani S., Nagai H., Takamura Y., Aoyamaa Y., Kubo I. Detection of expressed gene in isolated single cells in microchambers by a novel hot cell-direct RT-PCR method. *Analyst*. 2012. Vol. 137. P. 2951-2957. https://doi.org/10.1039/C2AN15866C.

3. Shunsuke F., Naoki S., Hidenori N., Yuri A., Izumi K. Development of a Detection System for Expressed Genes in Isolated Single Jurkat Cells. *Sensors and Materials*. 2014. Vol. 26 (8). P. 623–635. URL: https://sensors.myu-group.co.jp/sm_pdf/SM1029.pdf.

4. Luyao L., Xiaobin D., Yunping T., Guijun M., Zhongping Z., Lulu Z., Zewen W., Duli Y., Xianbo Q. Methods and platforms for analysis of nucleic acids from single-cell based on microfluidics. *Microfluidicsand Nanofluidics*. 2021. Vol. 25 (87). https://doi.org/10.1007/s10404-021-02485-0

5. Ma J., Tran G., Wan A. M. D., Young E. W. K., Kumacheva E., Iscove N. N., Zandstra P. W. Microdroplet-based one-step RT-PCR for ultrahigh throughput single-cell multiplex gene expression analysis and rare cell detection. *Scientific Reports*. 2021. Vol. 11 (1). P. 6777. https://doi.org/10.1038/s41598-021-86087-4.

6. Повх А. С., Романчук С. М. Контамінація під час молекулярно- генетичного дослідження. Причини її виникнення та наслідки. *Криміналістичний вісник*. 2018. №30(2). С. 106–115. https://doi.org/10.37025/1992-4437/2018-30-2-106.

7. Степанюк Р. Л., Іонова В. В. Призначення судової молекулярно-генетичної експертизи на стадії досудового розслідування: проблеми та шляхи їх вирішення. *Вісник Луганського державного університету внутрішніх справ імені Е. О. Дідоренка*. 2020. № 3(91). С. 307-319. https://doi.org/10.33766/2524-0323.91.307-319.

8. Balk C. Reducing Contamination in Forensic Science. *Themis*. 2015. Vol. 3. P. 222-239. https://doi.org/10.31979/THEMIS.2015.0312.

9. Angela G., Scot E. D., Susan G., Brian D., Rodrick J. C. Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. *Gut Pathogens*. 2016. Vol. 8(24). https://doi.org/10.1186/s13099-016-0103-7.

10. Van Oorschot R. A. H., Szkuta B., Meakin G. E., Kokshoorn B., Goray M. DNA transfer in forensic science: A review. *Forensic Science International: Genetics*. 2019. Vol. 38. P. 140-166. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.10.014

11. Georgina E. M., Bas K., Roland A. H. O., Bianca S. DNA transfer in forensic science. *WIREs Forensic Sci*. 2021. Vol. 3 (1404). P. 1-19. https://doi.org/10.1002/wfs2.1404.

12. Giovambattista G., Ripoli M. V., Lirón J. P., Villegas Castagnasso E. E., Peral-García P., Lojo M. M. DNA typing in a cattle stealing case. *J. Forensic Sci.* 2001. Vol. 46(6). 1484-6. PMID:11714164.

13. Budowle B., Garofano P., Hellman A., Ketchum M., Kanthaswamy S., Parson W., et al. Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *Int J Legal Med.* 2005. Vol. 119(5). P.295-302.https://doi.org/10.1007/s00414-005-0545-9.

14. Vashchenko P. A, Balatsky V. M, Pocherniaev K. F, Voloshchuk V. M, Tsybenko V. H, Saenko A. M, Oliynychenko Ye. K, Buslyk T. V, Rudoman H. S. Genetic characteristic of the Mirhorod pig breed by analysing single nucleotide polymorphisms. *Agricultural Science and Practice.* 2019. Vol. 6(2). P.47-57. https://doi.org/10.15407/agrisp6.02.047.

References

1. Pocherniaiev, K., F. (2017). Novi mozhlyvosti bahatosaitovoho sposobu vyznachennia mitokhondrialnykh haplotypiv svynei [New possibilities of the multi-site method of determination of mitochondrial haplotypes of pigs] *Svynarstvo. Mizhvidomchy itematychnyinaukovy izbirnyk Instytutu svynarstva i APV NAAN.* 69, 100-108 https://svinarstvo.com/zbirnyk/archive/69/69-100-108.pdf [inUkranian].

2. Furutani, S., Nagai, H., Takamura, Y., Aoyamaa, Y., & Kubo, I. (2012). Detection of expressed gene in isolated single cells in microchambers by a novel hot cell-direct RT-PCR method. *Analyst*. Vol. 137. P. 2951-2957. https://doi.org/10.1039/C2AN15866C.

3. Shunsuke, F., Naoki, S., Hidenori, N., Yuri, A., & Izumi,K. (2014). Development of a Detection System for Expressed Genes in Isolated Single Jurkat Cells. *Sensors and Materials*, 26(8), 623–635. URL: https://sensors.myu-group.co.jp/sm_pdf/SM1029.pdf

4. Luyao, L., Xiaobin, D., Yunping, T., Guijun, M., Zhongping, Z., Lulu, Z., Zewen, W., Duli, Y., & Xianbo, Q. (2021). Methods and platforms for analysis of nucleic acids from single-cell based on microfluidics. *Microfluidics and Nanofluidics*, 25(87). https://doi.org/10.1007/s10404-021-02485-0.

5. Ma, J., Tran, G., Wan, A., M., D., Young, E., W., K., Kumacheva, E., Iscove, N., N., Zandstra, & P., W. (2021). Microdroplet-based one-step RT-PCR for ul-

trahigh throughput single-cell multiplex gene expression analysis and rare cell detection. *Scientific Reports*, 11(1), 6777. https://doi.org/10.1038/s41598-021-86087-45.

6. Povkh, A. S., & Romanchuk, S., M. (2018). Kontaminatsiia pid chas molekuliarno- henetychnoho doslidzhennia. Prychyny yii vynyknennia ta naslidky. [Contamination during molecular-genetic research. Its causes and consequences]. *Forensis Herald*, 30(2), 106–115. https://doi.org/10.37025/1992-4437/2018-30-2-106 [in Ukranian].

7. Stepaniuk, R. K, & Ionova, V. V. (2020). Pryznachennia sudovoi molekuliarno-henetychnoi ekspertyzy na stadii dosudovoho rozsliduvannia: problemy ta shliakhy yikh vyrishennia. [The assignment of forensic molecular-genetic examination during pre-trial investigation: problems and ways to solve them]. *Bulletin of Luhansk State University of Internal Affairs Named After E. Didorenko*, 3(91), 307-319. https://doi.org/10.33766/2524-0323.91.307-319 [in Ukranian].

8. Balk, C. (2015). Reducing Contamination in Forensic Science. *Themis*, 3, 222-239. https://doi.org/10.31979/THEMIS.2015.0312

9. Angela, G., Scot, E., D., Susan, G., Brian, D., & Rodrick, J., C. (2016). Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. *Gut Pathogens*, 8(24); https://doi.org/10.1186/s13099-016-0103-7

10. Van Oorschot, R. A., H., Szkuta, B., Meakin, G. E., Kokshoorn, B., & Goray, M. (2019). DNA transfer in forensic science: A review. *Forensic Science International: Genetics*, 38; 140-166. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.10.014

11. Georgina, E. M., Bas, K., Roland, A. H. O., & Bianca, S. (2021). DNA transfer in forensic science. *WIREs Forensic Sci*, 3(1404); 1-19. https://doi.org/10.1002/wfs2.1404

12. Giovambattista, G., Ripoli, M. V., Lirón, J. P., Villegas Castagnasso, E. E., Peral-García P., & Lojo, M. M. (2001). DNA typing in cattle stealing case. *J Forensic Sci.* 46(6);1484-6.PMID:11714164

13. Budowle, B., Garofano, P., Hellman, A., Ketchum, M., Kanthaswamy, S., Parson, W., et al. (2005). Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *Int J. Legal Med.* 119(5); 295-302.https://doi.org/10.1007/s00414-005-0545-9

14. Vashchenko, P. A,, Balatsky, V. M., Pocherniaev, K. F., Voloshchuk, V. M., Tsybenko, V. H., Saenko, A. M., Oliynychenko,Ye. K., Buslyk, T. V., & Rudoman, H. S. (2019). Genetic characteristic of the Mirhorod pig breed by analysing single nucleotide polymorphisms. *Agricultural Science and Practice.* 6(2); 47-57. https://doi.org/10.15407/agrisp6.02.047

BIOLOGICAL SAMPLES CONTAMINATION CONTROL OF THE SUS SCROFA USING HAPLOID DNA MARKERS

Y. O. Budakva, K. F. Pochernyaev, Institute of Pig Breeding and Agroindustrial Production NAAS

A. K. Pochernyaev, Poltava Scientific Research Forensics Center, MIA of Ukraine

This paper proposes an effective method for controlling the contamination of biological samples of Sus scrofa with alien material in the preanalytical phase of a PCR study. Because PCR is highly sensitive, even a small amount of DNA containing alien biological substances can lead to false results. In the case of analysis of contaminated biological samples using diploid DNA markers, a mixture of two different homozygotes will be defined as a heterozygote. Unlike diploid DNA markers, a mixture of two differ-

ent haplotypes is uniquely determined. To perform the study in the slaughter shop of the Globinsky Meat Processing Plant, after slaughter, one ear was cut off from the carcasses of pigs with an animal identification number tag. DNA was isolated from the epithelial tissue of the auricle. Five SNPs of the mitochondrial genome were used as a haploid marker. The study was carried out using a multisite PCR-RFLP method, the peculiarity of which was the analysis of the D-loop fragment between positions 15531 and 15959 of the porcine mitochondrial genome (GenBank: AJ002189.1). This sequence contains one monomorphic site (15558W) and five polymorphic Tas I restriction enzyme sites (15616T > C, 15714T > C, 15758T > C, and 15916A > T). The presence or absence of the Tas I site in the above positions determines mitochondrial haplotypes, denoted by Latin letters from A to P. PCR-RFLP analysis of DNA samples revealed DNA fragments on the electrophoregram, indicating a mixture of two or more haplotypes. It was possible to establish the presence of contamination due to the use of a multisite PCR-RFLP method, which implies a strictly discrete set of restrictive fragments for the mitochondrial DNA of an individual animal. The total size of the restriction fragments should be 428 bp and the presence of additional DNA bands indicate the association of two or more haplotypes. Thus, it was demonstrated that the use of haploid DNA markers makes it possible to determine the contamination of samples with alien material. This method can be used in the study of porcine nuclear DNA as a laboratory quality assurance of the preanalytical phase, which will reduce laboratory costs, improve the organization of work and avoid dramatic errors when performing genetic examinations.

Keywords: pigs, epithelium, mitochondrial genome, haploid DNA markers, PCR, contamination.