

## ВАЛІДАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ГЕНОТИПУВАННЯ СВИНЕЙ З ВИКОРИСТАННЯМ МАРКЕРІВ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ДНК

**Будаква Єлизавета Олександрівна**

аспірантка, молодший науковий співробітник лабораторії  
Інститут свинарства і агропромислового виробництва  
Національної академії аграрних наук України, м. Полтава, Україна  
ORCID: 0000-0001-5941-1953  
budakvayelyzaveta@gmail.com

**Почерняєв Артем Костянтинович**

судовий експерт  
Полтавський науково-дослідний експертно-криміналістичний центр  
Міністерства внутрішніх справ України, м. Полтава, Україна  
ORCID: 0000-0001-9520-4492  
pochernyaev.ak84@gmail.com

У статті наведено спосіб підтвердження трансфікованості чужорідної ДНК, що призводить до змішаного ДНК-профілю досліджуваного об'єкта. Встановлення ДНК-профілю – це процес в котрому відповідний зразок ДНК, отриманий від свині (тканина, кров, щетина, тощо.) піддається дослідженню на встановлення походження праматеринських порід досліджуваних свиней. Не дивлячись на те, що *Sus scrofa* є унікальним біологічним об'єктом, більша частина ДНК насправді ідентична до ДНК інших представників *Sus scrofa*. Однак, саме конкретні регіони полісайтової системи вказують на відмінність між породами представників підвидів дикої свині та одомашненої, що свідчить про внутріпорідний поліморфізм мітохондріального геному. Кожен представник *Sus scrofa* успадковує унікальну комбінацію поліморфізмів від батьків. З огляду на це, метою дослідження стало провести валідацію результатів генотипування свиней з використанням поліморфізму маркерів мітохондріальної ДНК, проаналізувати отриманні данні для ідентифікації профілю ДНК гібридних свиней (велика біла × ландрас) × Махгро. Типування ДНК для ідентифікації мітохондріального геному гібридних свиней проведено шляхом дослідження зразків щетини (n=9) та епітеліальної тканини (n=28) з вуха свиней. Виявленні слідові відбитки дають об'єктивне свідчення, що дозволяє охарактеризувати відбитки трупної ДНК від інших біологічних об'єктів, виявлених на «місці злочину» при відборі зразків під час забою свиней на м'ясокомбінаті «Глобіно». Виділення ДНК з щетини проводили з використанням іонообмінної смоли Chelex-100. Однак, підтвердити результати генотипування не вдалося, у зв'язку з тим, що у досліджуваних зразках при забої на м'ясокомбінаті були виявлені відбитки чужорідної ДНК. Про це свідчить високочуттєвий метод ПЛР-аналізу та гідроліз ендонуклеазою *Tas1* досліджуваного варіабельного сайту D-петлі мтДНК гібридних свиней, отриманий хибно-позитивний результат електрофореграми показав змішані ДНК-профілі. Перед виділенням ДНК із епітеліальної тканини вуха свиней, досліджувані зразки були піддані обробці вогнем із сухого спирту. Виділення ДНК із епітеліальної тканини проводили сорбентним методом з використанням набору реагентів «ДНК-сорб-Б». Ідентифіковані наступні гаплотипи: 9 свиней з гаплотипом С – підвид дикої свині, ландрас, гемпшир, уельс (Україна, Польща, Франція); 5 свиней є представниками підвиду диких свиней, порід велика біла, уельс (Італія) з гаплотипом G; 5 свиней є носіями гаплотипу O – ландрас, дика свиня (Швеція) згруповані до європейського кластера гаплогрупи E (E1 та E2); 11 свиней з гаплотипом N є представниками великої білої породи та дикої свині азійського типу, відносяться до азійського кластера A(D). Отже, важливим фактором, що визначає валідацію результатів генотипування свиней за допомогою мітохондріальних ДНК-маркерів є не скільки метод екстрагування ДНК, а істинний у чистоті досліджуваний зразок господаря для встановлення чіткої експертизи мітохондріального геному.

**Ключові слова:** свині, ідентифікація, ДНК-профіль, походження, мтДНК, контамінація, валідація, гаплотип, гаплогрупа, клада, кластер, (велика біла × ландрас) × Махгро, ПЛР-ПДРФ.

DOI <https://doi.org/10.32845/bsnau.lvst.2022.3.1>

Залежно від того яку інформацію необхідно отримати при генотипуванні досліджуваного об'єкта, при проведенні молекулярно-генетичної експертизи необхідно протестувати різні методи та способи (Shunsuke Furutani, Hidenori Nagai et al., 2012; Jennifer Ma, Gray Tran et al., 2021). Маркери походження мають особливий попит застосування у судовій генетиці (Fernanda M. Garcia, Bárbara G. O. Bessa et al., 2022; Marek Kowalczyk, Ewelina Zawadzka et al., 2018; Pereira V., Santangelo R. et al., 2020). Аналіз X-хромосоми є корисним у випадках

коли виявлений надлишок чужорідного відбитку ДНК від об'єкта при відборі проб, достатнім є лише невеликий відсоток від стороннього об'єкта. Типові ситуації включають у себе ДНК під нігтями, потовиділення, одяг. Експертами криміналістичного центру МВС України відмічено, що основною причиною експертних помилок у цій сфері визначають контамінацію (випадкове забруднення слідів біологічного походження сторонніми особами, учасниками огляду місця події, а також в умовах лабораторії); виявлення фонові ДНК, яка з'явилася на місці

події до «злочину» (забій підсвинків) та не пов'язана з ним, а в нашому випадку – це забій підсвинків на м'ясокомбінаті; перенесення слідів біологічного походження людини, яка контактувала з певним предметом, на інший предмет через третю особу чи осіб (опосередковане перенесення ДНК) (Stepaniuk, R.K., Ionova, V.V., 2020; Fonnell A. E., Johannessen H. et al., 2016; Fonnell A. E., Egeland T., Gill P. Et al., 2015). Контамінація сьогодні є важливою проблемою, що спонукає до розроблення заходів контролю з метою запобігати забрудненню об'єктів біологічного походження, виділеної та ампліфікованої ДНК, реактивів, лабораторного посуду, обладнання тощо, які використовують під час молекулярно-генетичного дослідження (Povkh, A.S., Romanchuk, S.M., 2018). Тому, аналіз мітохондріальної ДНК є суто важливим для визначення мітохондріального геному тварин з низьким числом мішені за допомогою гаплотипних ДНК-маркерів. А саме, неідентифікованих залишків, що слугують деградованою ДНК. Специфічний нерекомбінантний спосіб усадковування мітохондріальної ДНК послаблює статистичну вагу відповідності між окремими вибірками, проте робить метод ефективним для реконструкції генеалогічної структури, наприклад при конвеєрному русі під час забою тварин на м'ясокомбінаті. На практиці більшість лабораторій проводять аналіз ДНК у співвідношенні з робочим процесом, що характеризує зразок екстракту ДНК з точки зору кількості, стану деградації або співвідношення статі для будь-якого STR – аналізу, що дозволяє прийняти обгрунтоване рішення у виборі кращого методу роботи. Даний процес характеризує Х та У-хромосомальний профіль, істинний результат якого відповідає на виявлення – донора відбитку (слід). Адже, невиключено, що певний генотип може випадково бути виявлений у досліджуваній популяції. Що вимагає створення (запровадження) баз даних диких підвидів та сільськогосподарських тварин для розпізнавання частот гаплотипного профілю, що виявлений в сліді (у відбитку). Співпраця з криміналістичною спільнотою дозволить створити стандарти якості гаплотипного профілю, що є необхідним для судово-медичних експертиз в галузі тваринництва. Х та У-хромосомальна ДНК по суті представляють єдиний локус, керуючись головним правилом, яке використовують для отримання оцінок частоти аутосомних алелей, що непов'язані між собою і неможуть застосовуватись у якості оцінки частоти популяцій певної комбінації повністю зчеплених алелей (гаплотипу). Таким чином, оцінка частоти гаплотипу залежить експертно-еталонної бази даних гаплотипного профіля тварин з урахуванням масштабів структури серед досліджуваних популяцій. Експертно-еталонна база даних гаплотипного профіля тварин особливо важлива для маркерів мітохондріальної та У-хромосомальної ДНК, через гаплотипну особливість успадкування. Оскільки Х та У-хромосомальна локальність диких підвидів тварин та сучасних комерційних ліній сприяє до чутливості прояву генетичного дрейфу. У даній роботі нами запропоновано ефективний механізм контролю, що запобігає виникненню помилок пов'язаних з відбором проб у польових умовах. Він полягає у визначенні контамінації ДНК за допомогою мітохондрі-

альних ДНК-маркерів, а саме ПЛР-ПДРФ варіабельної ділянки мітохондріального геному. Визначення можливої контамінації ДНК дозволить зменшити витрати лабораторії, поліпшити організацію роботи та уникнути помилок при виконанні молекулярно-генетичних експертиз.

**Мета дослідження.** Провести валідацію результатів генотипування свиней з використанням поліморфізму маркерів мітохондріальної ДНК, проаналізувати отримані дані для ідентифікації профілю ДНК гібридних свиней (велика біла × ландрас) × Махрго.

**Матеріали і методи.** Для проведення досліджень було використано 37 зразків (щетина та епітеліальна тканина вуха свиней) транскордонної породи (велика біла × ландрас) × Махрго. Відбір проб був проведений на м'ясокомбінаті «Глобіно» під час забою. Виділення ДНК проведено із зразків щетини вуха свиней (n=9) з використанням іонообмінної смоли Chelex-100 (Korinnyi, S.M., Pocherniaiev, K.F., Balatskyi, V.M. 2005). За допомогою пінцета вищипували з вуха свиней від 5-7 волосин з кореневою цибулиною довжиною 0,5 см. Відібрані зразки поміщали у марковані поліпропіленові пробірки з кришкою ємністю 1,5 см<sup>3</sup> та промивали дистильованою водою струшуючи на Вортекс. Надосадову рідину з домішками від щетини відбирали одноразовим наконечником. Даний етап повторювали 3-4 рази. Після, до вмісту пробірок додавали 120-150 мкл 20% суспензії Chelex-100 та інкубували упродовж 6 год за +56°C. Після струшування пробірок на Вортексі їх поміщали до твердотільного термостату та інкубували 8 хв за температури +98°C. Зразки розчину ДНК зберігались за –20°C.

Виділення ДНК з епітеліальної тканини проводили з використанням набору для виділення нуклеїнових кислот ДНК-сорб-Б виробника ТОВ «ІнтерЛаб Сервіс-Україна». Попередньо досліджувані зразки були оброблені ватним тампоном змоченим у етиловому спирті, після зразки були піддані фламбуванню вогнем із сухого спирту протягом 4-5 секунд. Лізуючий розчин та розчини для відмивки прогрівали на термостаті до температури +65°C до повного розчинення кристалів. 28 поліпропіленових пробірок промаркували та додали подрібненні скальпелем зразки епітеліальної тканини з вуха свиней (0,2 г). До вмісту пробірок внести по 100-150 мкл лізуючого розчину. Проби ретельно перемішати на Вортекс та прогріти на термостаті при +65°C 7-12 хвилин. Процентрифугувати 5 хв. / 12 тис. об. на мікроцентрифузі. Для виділення використовувати надосадову рідину, рідину перенести у нові промарковані пробірки. Ретельно ресуспендувати сорбент універсальний на Вортексі. Окремим наконечником (або одним наконечником неторкаючись стінки пробірок) додати до кожної пробірки по 12,5 мкл ресуспендованого сорбента універсального. Проби перемішати на Вортекс, поставити у штатив на 7 хвилин, через 2 хвилини перемішати на Вортексі та залишити у штативі в стані спокою на 5 хвилин. Осадити сорбент універсальний центрифугуванням при 7 тис. об. / 1 хв. Видалити надосадову рідину окремим наконечником для кожної проби. До проб додати 100-150 мкл розчину для відмивки 1, перемішати на вортексі до повного ресуспендування сорбенту універсаль-

ного. Осадити сорбент універсальний при 7 тис. об. / 1 хв. на мікроцентрифузі. Видалити надосадову рідину окремим наконечником для кожної проби. До проб додати 170-200 мкл розчину для відмивки 2, перемішати на Вортекс та процентрифувати при 10 тис. об. / 1 хв. Видалити надосадову рідину окремим наконечником для кожної проби. Повторити процедуру з розчином відмивки 2. Помістити пробірки до термостату з відкритими кришками при температурі +65°C на 7-8 хвилин для підсушування сорбента. До пробірок додати 30-50 мкл ТЕ-буфера для елюції ДНК, перемішати на Вортекс. Проби помістити до термостату при температурі +65°C на 5 хвилин періодично струшуючи на Вортексі. Процентрифувати пробірки при 12 тис. об. / 1 хв. Надосадова рідина містить очищену ДНК. За потреби відібрати надосадову рідину з очищеною ДНК до нових пробірок неторкаючись сорбента та зберігати до наступної постановки ПЛР при температурі -20°C. Проби готові до постановки ПЛР. Очищена ДНК зберігається при температурі -20°C протягом 6-8 місяців, однак ефективність складає 50-60%. При температурі +2-4°C – 5-7 днів.

Найбільш варіабельною ділянкою мітохондріального геному є некодуюча ділянка D-петлі. Аналізу підлягають ділянки D-петлі мітохондріального геному свині розміром 428 пар нуклеотид. Генотипування зразків ДНК дослідних свиней за мітохондріальним маркером було здійснено з залученням полісайтового способу згідно методичних рекомендацій в лабораторії генетики Інституту свинарства і АПВ НААН (Рочерніаєв, К.Ф., Вєрезовський, М.Д. 2014). ПЛР-ампліфікацію тестуючих зразків проводила з власними модифікаціями з підбору термодинамічних характеристик ПЛР, за оптимальною концентрацією і довжиною геля для розділення фрагментів рестрикції, а також часу протікання електрофорузу і напруги електричного поля (Табл. 1):

Структуру олігонуклеотидних праймерів для дослідження поліморфізму мітохондріальної ДНК свині наведено в таблиці 2.

Параметри ампліфікації: початкова денатурація – 5 хв за 95°C; 2. 35 циклів; денатурація – 94°C (40 с); випалювання праймерів – 56–63°C (40 с); синтез – 70–72°C (40 с); завершальний синтез – 72°C (5 хв); зберігання –

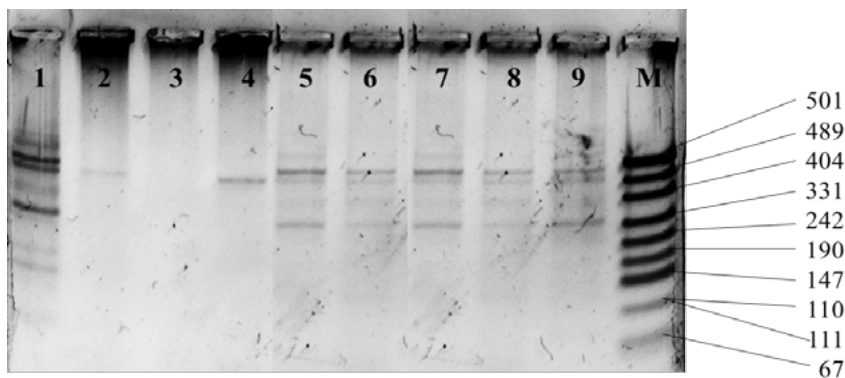


Рис. 1. Ампліфікована у ПЛР мтДНК підсвинків (велика біла × ландрас) × Махго з парою олігонуклеотидних праймерів MITPRO2F та MITPROR розміром продукту ПЛР 428 п.н., фракціонованих у 2% агарозному гелі. Маркер молекулярної маси pUC19/MspI (HpaII)

Таблиця 1

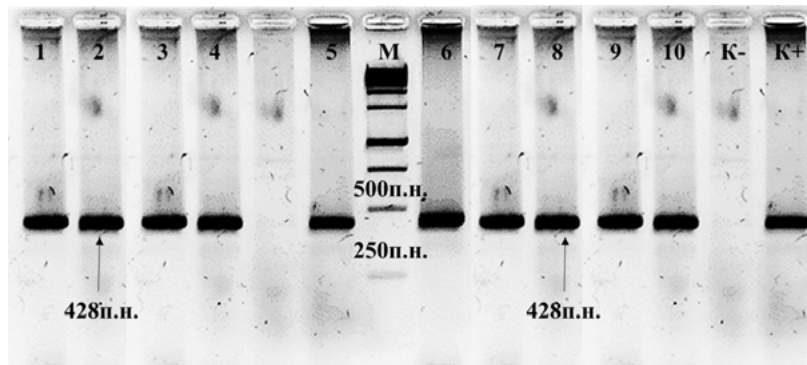
Умови ПЛР ампліфікації мітохондріального геному свині методом ПЛР

t=63°C	Концентрація	Реакційна концентрація на 25 мкл	Реакційний об'єм, мкл		Номер лабораторного зразка			
			щетина n=9	епітелій n=28	21.12.2021		23.12.-27.12.2021	
H <sub>2</sub> O		5	-	140	1	9	1	9
Taq буфер NH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10x	1,25	18	35	2	K-	2	10
dNTP	20 мМ	1,25	18	35	3	K+	3	11
MgCl <sub>2</sub>	25 мМ	1,0	10,8	28	4		4	12
MITPRO2F	10 пкМ/мкл	0,25	3,6	7	5		5	13
MITPROR	10 пкМ/мкл	0,25	3,6	7	6		6	14
Taq.Polymerase	5 од.акт/мкл	0,5	4,5	14	7		7	15
DNA			12 мкл	8-14 мкл	8		8	K-K+

Таблиця 2

Структура олігонуклеотидних праймерів для ампліфікації мітохондріальної ДНК свині у ПЛР

Цільова послідовність	Назва 1-ї пари праймерів	Структура олігонуклеотидів	NCBI GenBank: AM040651.1
D-петля мтДНК свині	MITPRO 2F	CATACAAATATGTGACCCCAAA	Розмір продукту, п.н. 428 п.н.
	MITPRO R	GTGAGCATGGGCTGATTAGTC	



**Рис. 2. Ампліфікована у ПЛР мтДНК підсвинків (велика біла × ландрас) × Махго з парою олігонуклеотидних праймерів MITPRO2F та MITPROR розміром продукту ПЛР 428 п.н., фракціонованих у 2% агарозному гелі. Маркер молекулярної маси 1 kb DNA Ladder**

4°C. У разі необхідності пробірки з продуктами ПЛР зберігались за –20°C. Якість та специфічність продуктів ПЛР перевіряла за допомогою електрофорезу у 2% агарозному гелі. Як маркери молекулярної маси використовували: ДНК *pUC19/MspI* (*HpaII*) та 1 kb DNA Ladder від (Thermo Scientific™). Електрофорез проводено упродовж 1 год за сили струму 50 мА. Після закінчення електрофорезу гель фарбували розчином бромистого етидію (10 мг/см<sup>3</sup>) упродовж 4–7 хв, промивали гель дистильованою водою та документували результати електрофорезу цифровою камерою на транслюмінаторі (MicroDOC Gel Documentation Digital camera with UV Transilluminator, Cleaver Scientific).

Всі реагенти, що використовували для гідролізу продуктів ПЛР, зберігались у морозильній камері за –20°C. Перед використанням їх розморожували за кімнатної температури. Необхідну кількість чистих поліпропіленових мікропробірок з кришкою ємністю 0,5 см<sup>3</sup> маркували порядковими номерами. В окремій пробірці збирали усі компоненти буферу для рестрикції та ендонуклеази (Thermo Scientific™), окрім продукту ПЛР, за схемою, що наведена в таблиці 3.

Ендонуклеаза, яка була використана у дослідженні, сайти пізнавання, чутливість до метилювання та тем-

пературні умови її використання наведено в таблиці 4. У разі необхідності пробірки з гідролізованими продуктами ПЛР зберігались за температури –20°C.

Гідролізовані продукти ПЛР розділяли за допомогою електрофорезу у 8% поліакриламідному гелі (ПААГ) у 1×TBE буфері. Співвідношення акриlamіду до метиленбісакриlamіду ПААГ було 29:1. Для полімеризації до 25 см<sup>3</sup> 8 % розчину поліакриlamіду у 1×TBE буфері додавали 100мкл 10% розчину амонію персульфату (АМП) та 27 мкл ТЕМЕД. До пробірок зі зразками гідролізованих продуктів ПЛР додавали 10× буфер для нанесення зразків і ретельно перемішували. До першої лунки вносили 4 мкл маркера молекулярної маси ДНК плазмиди *pBR322 MspI* (*HaeIII*) та *pUC19/MspI* (*HpaII*) від (Thermo Scientific™), а до наступних – по 9-10 мкл гідролізованих продуктів ПЛР. Електрофорез проводили упродовж 2 год за сили струму 60мА. Після закінчення електрофорезу гель фарбували розчином бромистого етидію (10 мг/см<sup>3</sup>) упродовж 4–7 хв, промивали гель дистильованою водою та документували результати електрофорезу цифровою камерою на транслюмінаторі (MicroDOC Gel Documentation Digital camera with UV Transilluminator, Cleaver Scientific).

**Результати.** Для експериментальної перевірки за розробленою Почерняєвим К. Ф. схемою багато-

Таблиця 3

**Схема збору компонентів реакції гідролізу продуктів ПЛР із розрахунку на одну пробірку об'ємом 0,3 см<sup>3</sup>**

Компонент	Концентрація розчину компонентів	Об'єм в см <sup>3</sup>	На 1 пробірку, мкл	На 37 пробірок, мкл
H <sub>2</sub> O		0,018	2,80	103,6
Buffer для гідролізу Tango/B	10 ×	0,002	2,0	74
Ендонуклеаза рестрикції <i>Tas I</i>	10 одиниць/ 0,001см <sup>3</sup>	0,001	0,1	3,7
			5	4,9

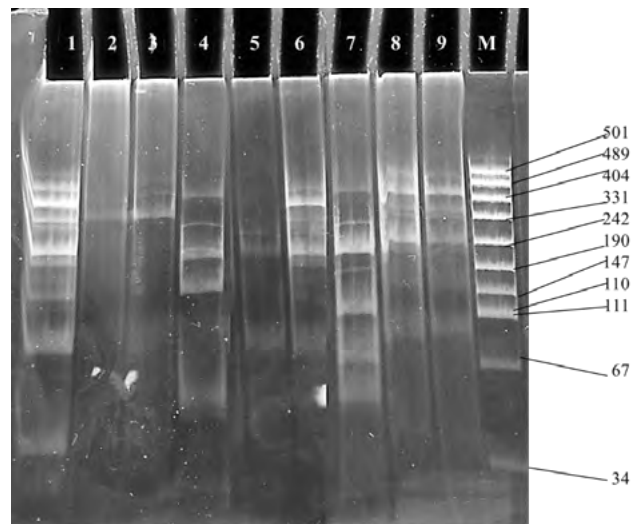
Таблиця 4

**Використана ендонуклеаза *Tas I* у дослідженні, сайти пізнавання, склад реакційного буферу та температурні умови її використання**

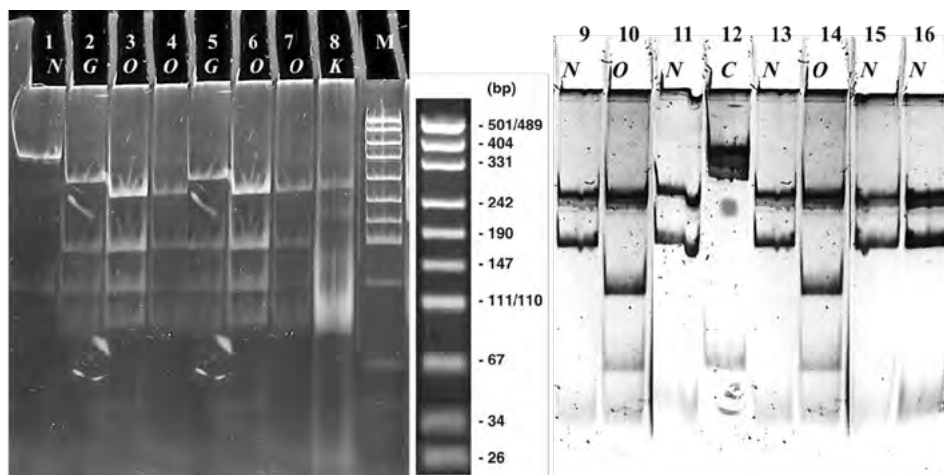
№ з/п	Ендонуклеаза	Сайт пізнавання	Склад реакційного буферу ×1	Температурні умови
1.	<i>Tas I</i> ( <i>Tsp EI</i> )	↓AATT	10мМ Тріс-НСІ (рН 7,5), 10мМ MgCl <sub>2</sub> , 0,1мкг/ см <sup>3</sup> BSA	+65°C

сайтової системи гаплотипування свиней було здійснено ампліфікацію фрагменту D-петлі мтДНК розміром 428 п.н. (n=28) підсвинків (велика біла × ландрас) × Махгро (Pochernyaev, K.F., 2017; Pochernyaev, K.F., 2014; Pochernyaev, K.F., 2012). Рестриктивний аналіз цього фрагменту D-петлі мтДНК з використанням ендонуклеази *Tas I* (↓AATT) унеможливив визначення фрагментів ДНК розміром 406 та 22 п.н.. Результат електрофореграми гідролізованої ДНК підтвердив трансфіковані відбитки, які є результатом змішаного ДНК-профіля досліджуваних свиней (Рис. 3).

Отже, фрагменти досліджуваного мітохондріального геному підсвинків (велика біла × ландрас) × Махгро (n=9) виявились специфічно нехарактерними від очікуваних. Це наштовхнуло на випробування методики DNA-sorb-B у попередженні прояву контамінації (рис. 4). Після гідролізу обраної ділянки фрагменту D-петлі мітохондріального геному були утворені наступні можливі комбінації рестриктних фрагментів: **C** – (346/60/22), **D** – (346/37/23/22 п.н.), **E** – (245/159/22 п.н.), **G** – (245/99/60/22), **K** – (203/159/44/22 п.н.), **N** – (203/136/44/23/22 п.н.), **O** – (203/99/60/44/22 п.н.). Утворення після гідролізу ендонуклеазою *Tas I* всіх можливих комбінацій фрагментів мтДНК свиней великої білої



**Рис. 3. Ампліфікована у ПЛР та гідролізована з використанням ендонуклеази *Tas I* (↓AATT) мтДНК свині, фракціонована у 8 % ПААГ: М – маркер рUC19/*MspI* (*HpaII*), 1–9 змішані ДНК-профілі підсвинків (велика біла × ландрас) × Махгро**



**Рис. 4. Ампліфікована у ПЛР та гідролізована з використанням ендонуклеази *Tas I* (↓AATT) мтДНК свині, фракціонована у 8% ПААГ: М – маркер рUC19/*MspI* (*HpaII*) та рBR322 *MspI* (*HaeIII*), 1–16 ДНК підсвинків (велика біла × ландрас) × Махгро**

Таблиця 5

**Характеристика мітохондріальних гаплотипів підсвинків (велика біла × ландрас) × Махгро ТОВ НВП «Глобинський свинокомплекс» ідентифікованих за допомогою ПЛР-ПДРФ, *Tas I* (↓AATT)**

№ п/п	Гаплогенотипи	Поліморфні позиції фрагмента D-петлі мітохондріального геному свині (ендонуклеаза <i>Tas I</i> (AATT))					Розміри рестриктних фрагментів, п.н.				
		15558	15580	15616	15714	15758					
1	<b>D</b>	T					346	37	23	22	
2	<b>E</b>	T	C	C	T	C	247	159	22		
3	<b>C</b>	T	C	T	C	C	346	60	22		
4	<b>G</b>	T	C	T	T	C	247	99	60	22	
5	<b>K</b>						203	159	44	22	
6	<b>O</b>	T	C	T	T	T	203	99	60	44	22
7	<b>N</b>	T	T	C	T	T	203	136	44	23	22

Характеристика концентрації мітохондріальних гаплогенів підсвинків (велика біла × ландрас) × Махгро ТОВ НВП «Глобинський свиноккомплекс»

Популяція	Розповсюдження	Гаплоген	Гаплогрупа	Концентрація, %	Розмір фрагментів рестрикції ДНК, п.н.
дика свиня, Ландрас, Гемпшир, Уельс	Україна, Польща, Франція	C *(FJ36998), (AY574046), (AF486866), (AF304202), (AF486874), (KF752550), (JN601074), (KC250275)	E	23	346/60/22
Не зустрічається серед свині свійської	Континенти Євроазії	D	A, E	10	346/37/23/22
		E	A, E	8	247/159/22
дика свиня, Уельс	Італія	G *(AF304201)	E	13	247/99/60/22
Угорська	Континенти Євроазії	K	A, E	5	203/159/44/22
дика свиня, Велика Біла	Азія	N *(KC250275), (JN601074), (AF486874), (AY574048)	A (D)	28	203/136/44/23/22
дика свиня, Ландрас	Швеція	O *(AJ002189.1)	E	13	203/99/60/44/22

\* Аналіз даних мітохондріальних гаплогенів з Gene Bank NCBI.

породи було також підтверджено експериментально (Рис. 4).

З використанням багатосайтового методу гаплогенування мітохондріальної ДНК за поліморфізмами 15558, 15580, 15616, 15714, 15758 та 15918 проведено популяційно-генетичні дослідження транскордонної породи підсвинків, яких розводять в Україні, оцінено параметри їх гаплогенної різноманітності, виявлено породоспецифічні гаплогрупи (Табл. 5, 6, Рис. 5).

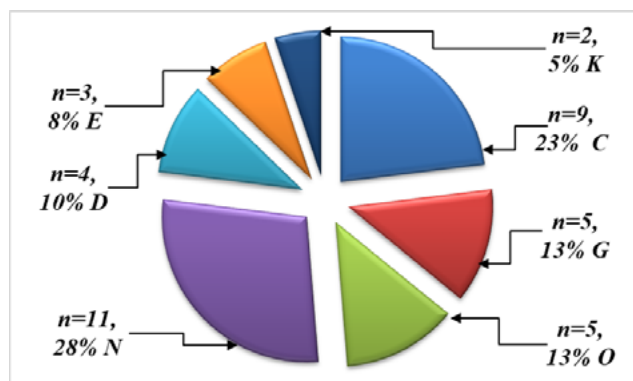


Рис. 5. Концентрація різних мітохондріальних гаплогенів у вибірці підсвинків (велика біла × ландрас) × Махгро

У досліджуваній вибірці свиней (n=28) визначено концентрацію гаплогенів (%). Встановлено, що виявлені мітохондріальні гаплогени C (23%) – характерні для свиней породи ландрас, гемпшир, уельс, дика свиня (Україна, Польща); гаплоген O (13%) – властивий дикій свині та породі свиней ландрас (Швеція); гаплоген G (13%) – унікальний для валійської породи та дикої свині (Італія); гаплоген N (28%) – характерний для породи свиней велика біла, представники є носіями азіатського типу. Варто відмітити, що азіатський гаплоген N характерний для азіатської дикої свині та беркширської породи. Представлені данні про гібридизацію мітохондріального геномів азіатського і європейського походження є основою для створення сучасних ліній гібридних свиней по материнській лінії. Можливо, що гаплогени D (10%), E (8%), K (5%) відносяться

до гаплогрупи A(D). Дикі свині азіатського типу з гаплогеном N належать до гаплогрупи A. Йоркшир та беркшир відносяться до підгаплогруп D1a1 та D1b, D1e, D3, що підтверджує материнський вклад аборигенних азіатських свиней у сучасні транкордонні породи. Виявилось, що гаплогрупа E у гібридних свиней є домінуючою, проте, гаплогрупа A є попередником гаплогрупи E. Припускаємо думки, що свині великої білої породи з гаплогенами N, D, E, K – містять аборигенні генетичні ресурси. Свині з гаплогенами D, E, K – результат гібридизації з європейськими дикими свинями. З часом це призвело до повного зникнення основних близькосхідних предків з ядерного геному одомашнених європейських свиней. Припущення, що традиційне сезонне тваринництво, далекі щорічні міграції, що мали місце у минулому, торгівля ядрами пояснюють спостережливу закономірність сприятливого потоку генів у гібридних свиней. Однак, ми не можемо виключити можливість того, що азіатські свині приймали безпосередню участь у створенні або більш пізньому схрещуванні з місцевими породами свиней з України.

**Обговорення.** Завдання, поставлене у данному дослідженні, було ускладнено необхідністю ідентифікації мітохондріальних гаплогенів у межах одного виду ДНК-профіля – *Sus scrofa domestica*. Даний метод був використаний для виявлення відбитків трансфікованої ДНК у вигляді контамінації досліджуваних зразків щетини з вуха свиней (n=9). Однак, типування ДНК зразків до 10 щетинок часто проблематично у криміналістиці. Шерсть свиней містить дуже невелику кількість ДНК або зразок шерсті складається із шерсті з пошкодженою луковицею або навіть із зламанним стрижнем щетини без луковиці. Перед дослідженням взяті проби були промиті дистильованою водою, через те, що вуха свиней були з домішками крові, пилового бруду. Попередня обробка досліджуваних зразків вогнем із сухого спирту виявилась ефективним методом на основі результатів ПЛР-аналізу варіабельної ділянки D-петлі мітохондріального геному свиней. Гаплогенна мтДНК, транспортується мітохондріями клітинної цитоплазми характеризується материнським типом успадкування (свині і взагалі досліджувані об'єкти успадковують від матері, а не від батька).

Ці характеристики дозволяють реконструювати внутрішньо-еволюційні відносини шляхом оцінки патернів мутацій мтДНК. Встановлений поліморфізм варіабельної ділянки D-петлі у значній мірі сприяє ідентифікації нащадків диких та одомашнених свиней, створенню географічних моделей генетичного різноманіття, визначення європейської та азіатської гаплогруп. Зацікавленість до типування одонуклеотидного поліморфізму *SNP* у криміналістичній експертизі зростає не лише у зв'язку з корисністю *SNP* для визначення гаплогруп, гаплотипів мтДНК, а також для аналізу географічного походження досліджуваних об'єктів. Власне, наш інтерес до поліморфізму *SNP* був мотивован потенційною перевагою тестів через низьку частоту мутацій, особливо при аналізі деградованих зразків з використанням ампліконів з варіабельної ділянки D-петлі 428 пар нуклеотид. Експериментально протестована методика (спосіб) виділення ДНК з проб відібраних при забої свиней (щетина та епітеліальна тканина з вуха свиней) – рекомендована до використання на практиці.

**Висновок.** Протестований спосіб проявляє виражену гібридаційну активність по відношенню до ДНК-матриці при 65°C з концентрацією іонів магнія у реакційній

суміші 1,5 мМ/мкл. Показники представлені чутливістю тесту, межою виявлення та специфічністю методики, що вказує на те, що її можна використовувати для виявлення трансфікованої ДНК. На ділянці фрагменту D-петлі розміром 428 п.н. було визначено один мономорфний сайт рестрикції ендонуклеази *Tas I* (↓AATT) – в позиції 15558, та чотири поліморфні – в позиціях 15580, 15616, 15714 та 15758 пн. Протестований спосіб може бути використаний при дослідженні мітохондріального геному ту в цілому ДНК свиней за QTL ДНК-маркерами, як лабораторний контроль якості. Даний спосіб дозволить зменшити витрати лабораторії, поліпшити організацію роботи та уникнути драматичних помилок при виконання молекулярно-генетичних експертиз. Процес фламбування – опалювання у полум'ї спиртівки біологічного матеріалу (епітеліальна тканина з вуха свиней) виявився дієвим лабораторним прийомом в очищенні зразків від чужорідного біологічного матеріалу. Отже, важливим фактором, що визначає валідацію результатів генотипування свиней за допомогою гаплотипних ДНК-маркерів є не скільки метод екстрагування ДНК, а істинний у чистоті досліджуваний зразок господаря для встановлення чіткої експертизи мітохондріального геному.

#### Бібліографічні посилання:

1. Fernanda, G.M., Bárbara Bessa, G.O., Eldamária dos Santos, V.W., Julia Pereira, D.P., Lyvia Alves, N.R., Lucas Vianna A., Matheus Casotti, C., Raquel Trabach, S.R., Victor Stange, S., Débora Meira, D., Iuri Louro, D. (2022). Forensic Applications of Markers Present on the X Chromosome [Genes]. 13, 1597. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes13091597>
2. Fonnell, A.E., Egeland, T., Gill, P. (2015). Secondary and subsequent DNA transfer during criminal investigation [Forensic Science International: Genetics]. 17, 155–162. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.009>.
3. Fonnell, A.E., Johannessen, H., Egel, T., Gill, P. (2016). Contamination during criminal investigation: Detecting police contamination and secondary DNA transfer from evidence bags [Forensic Science International: Genetics]. 23, 121–129. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.04.003>.
4. Jennifer Ma, Gary Tran, Alwin Wan, M.D., Edmond Young, W.K., Eugenia Kumacheva, Norman Iscove, N., Peter Zandstra, W. (2021). Microdroplet-based one-step RT-PCR for ultrahigh throughput single-cell multiplex gene expression analysis and rare cell detection [Scientific Reports]. 11(6777). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86087-4>
5. Korinnyi, S.M., Pocherniaiev, K.F., Balatskyi, V.M. (2005). Sherst tvaryn yak zruchnyi ob'iekt vydilennia DNK dlia analizu za dopomohoiu PLR. [Animal hair as a convenient objectification of DNA for analysis using PCR]. Veterinary biotechnology. (7), 80–83 (in Ukrainian).
6. Marek Kowalczyk, Ewelina Zawadzka, Dariusz Szewczuk, Magdalena Gryzińska, Andrzej Jakubczak. (2018). Molecular markers used in forensic genetics [Medicine, Science and the Law]. 58(4), 201-209. DOI: <https://doi.org/10.1177/0025802418803852>
7. Pereira V., Santangelo R., Børsting C., Tvedebrink T., Almeida A.P.F., Carvalho E.F., Morling N., Gusmão L. (2020). Evaluation of the Precision of Ancestry Inferences in South American Admixed Populations [Front. Genet]. 11, 966. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00966>.
8. Pocherniaiev, K.F. (2012). Otsinka henetychnoi riznomanitnosti lokalnykh porid syunei Ukrainy za polimorfizmom mitokhondrialnoi DNK. [Evaluation of genetic diversity of local breeds of pigs in Ukraine on the basis of mitochondrial DNA polymorphisms]. Pig breeding. Poltava: LTD "Firma "Tehservis". (60), 71-13 (in Ukrainian).
9. Pocherniaiev, K.F. (2014). Henetychna ekspertyza chystoporodnosti syunei za dopomohoiu markeriv mitokhondrialnogo henomu. [Genetic examination of purebred pigs using markers of the mitochondrial genome]. Scientific Bulletin of S. Z. Gzhitskyi LNUVMBT. 16, 3(60), 170-174. (in Ukrainian).
10. Pocherniaiev, K.F. (2017). Novi mozhlyvosti bahatosaitovoho sposobu vyznachennia mitokhondrialnykh haplotypiv syunei. [New possibilities of multi-site method for determining mitochondrial haplotypes of pigs]. Pig breeding. Poltava: LTD "Firma "Tehservis". (69), 100-108. (in Ukrainian).
11. Pocherniaiev, K.F., Berezovskyi, M.D. (2014). Vykorystannia mitokhondrialnykh DNK-markeriv dlia kontroliu dostovirnosti pokhodzhennia henealohichnykh struktur svynomatok. [The use of mitochondrial DNA markers to control the authenticity of origin of genealogical structures of sows: a methodical recommendations]. Poltava: Firm Techservice LLC. (in Ukrainian).
12. Pochernyaev K. F. (2004). Reconstruction of origin of modern pig breeds on the basis of polymorphism of mitochondrial genomes [Cytology and Genetics]. 38(6), 19-22.
13. Povkh, A.S., Romanchuk, S.M. (2018). Kontaminatsiia pid chas molekuliarno- henetychnoho doslidzhennia. Prychyny yii vynykennia ta naslidky. [Contamination during molecular-genetic research. Its causes and consequences]. Forensis Herald. 30(2), 106–115. DOI: <https://doi.org/10.37025/1992-4437/2018-30-2-106> (in Ukrainian).

14. Shunsuke Furutani, Hidenori Nagai, Yuzuru Takamura, Yuri Aoyamaa, Izumi Kubo. (2012). Detection of expressed gene in isolated single cells in microchambers by a novel hot cell-direct RT-PCR method [*Analyst*]. 13(137), 2951-2957. DOI: <https://doi.org/10.1039/C2AN15866C>

15. Stepaniuk, R.K, Ionova, V.V. (2020). Pryznachennia sudovoi molekuliarno-henetychnoi ekspertyzy na stadii dosudovoho rozsliduvannia: problemy ta shliakhy yikh vyreshennia. [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. DOI: <https://doi.org/10.33766/2524-0323.91.307-319> (in Ukrainian).

**Budakva Ye.O.**, Ph.D. student, Junior Researcher at the Laboratory, Institute of Pig Breeding and Agroindustrial Production of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Poltava, Ukraine

**Pochernyaev A.K.**, Forensic Expert, Poltava Scientific Research Forensics Center of Ministry of Internal Affairs of Ukraine, Poltava, Ukraine

#### **Validation of the results of genotyping of pigs using markers of mitochondrial DNA**

The article provides a method of confirming the transfection of foreign DNA, which leads to a mixed DNA profile of the object under study. Establishing a DNA profile is the process in which a corresponding DNA sample is obtained from a pig (tissue, blood, bristles, etc.) and is amenable to research to establish the origin of the pro-maternal breeds of the studied pigs. Despite the fact that *Sus scrofa* is a unique biological object, most of the DNA is actually identical to the DNA of other representatives of *Sus scrofa*. However, it is the specific regions of the polysite system that indicate the difference between the breeds of representatives of the subspecies of wild pig and domesticated, indicating interbreed polymorphism of the mitochondrial genome. Each representative of *Sus scrofa* inherits a unique combination of polymorphisms from parents. With this in mind, the purpose of the study was to validate the results of genotyping of pigs using polymorphism of mitochondrial DNA markers, to analyze the obtained data to identify the DNA profile of hybrid pigs (Large White × Landrace) × Maxgro. DNA typing to identify the mitochondrial genome of hybrid pigs was performed by examining bristle samples (n=9) and epithelial tissue (n=28) from pig ears. The detected trace prints provide objective evidence that allows us to characterize the prints of cadaveric DNA from other biological objects, discovered at the “scene of the crime” during the selection of samples during the slaughter of pigs at the Globyno meat processing plant. Isolation of DNA from bristles was carried out using Chelex-100 ion exchange resin. However, it was not possible to confirm the results of genotyping, due to the fact that prints of foreign «cadaveric DNA» were found in the studied samples during slaughter at the meat processing plant. This is evidenced by the highly sensitive method of PCR analysis and hydrolysis by *TaqI* endonuclease of the studied variable site of the D-loop of mtDNA of hybrid pigs, the resulting false-positive result of the electrophoregram showed mixed DNA profiles. Before DNA was isolated from the epithelial tissue of the pig’s ear, the samples under study were treated with dry alcohol fire. DNA isolation from epithelial tissue was carried out by the sorbent method using a set of reagents «DNA-Sorb-B». The following haplotypes have been identified: 9 pigs with haplotype C – wild pig subspecies, Landrace, Hampshire, Wales (Ukraine, Poland, France); 5 pigs are representative of the subspecies of wild pigs, breeds of Large White, Wales (Italy) with haplotype G; 5 pigs are carriers of haplotype O – Landrace, wild pig (Sweden) grouped into a European cluster of haplogroup E (E1 and E2); 11 pigs with haplotype N are representatives of a Large White breed, and an Asian-type wild pig, belong to the Asian cluster A(D). Therefore, an important factor determining the validation of the results of genotyping of pigs using mitochondrial DNA markers there is not so much a method of DNA extraction, but a pure sample of the host under study to establish a clear examination of the mitochondrial genome.

**Key words:** pigs, identification, DNA profile, origin, mtDNA, contamination, validation, haplotype, haplogroup, clade, cluster, (Large White × Landrace) × Maxgro, PCR-RFLP.