



Research Paper

<https://doi.org/10.5564/pib.v39i2.3323>

PROCEEDINGS OF
PIB
THE INSTITUTE OF BIOLOGY

Comparing the methods in sample collection and storage for genomic research

Byambadash SOD-ERDENE , Baatar DELGERZUL , Dechingavaa TSEND-AYUSH ,
Zunduibaatar UNUDBAYASGALAN , Tumendemberel ULZIISA KHAN , Batsukh TSERENDULAM* 

Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

*Corresponding author: tserendulamb@mas.ac.mn <https://orcid.org/0000-0002-8409-0968>

Abstract. The quality of DNA is a crucial factor in molecular genetics and conservation genomics research. Degradation of DNA can be caused due to many factors. To prevent DNA degradation, it's essential to keep samples free from contamination, dry them quickly after collection, and store them in dry places. Therefore careful attention to storage conditions post-collection is important to minimize DNA degradation. In this study, we compared three different sample collection and storage methods by running agarose gel electrophoresis to determine their suitability for long-term storage without compromising DNA quality. We found that DNA from whole organ or large-sized samples degraded, while DNA from thinly sliced, chopped, dehydrated, and dried samples stored in silica gel and ethanol remained intact with high yield.

Keywords: DNA degradation, Genetic samples, Silica gel, RADseq, Sample storage

Received 31 July 2023; received in revised form 18 October 2023; accepted 02 November 2023

© 2023 Author(s). This is an open access article under the [CC BY-NC 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Introduction

Rare species were initially classified based on morphology [1]. However, in recent years, genomic-level taxonomy has been increasingly carried out to develop appropriate conservation management strategies for these species [2]. For instance, the survival of endangered species requires at least five years of monitoring, regular population control, and the maintenance of geographic isolation [3]. Additionally, in order to discern differences at the subspecies level, comprehensive e genome research is necessary [2, 4]. Identifying neutral loci genetic markers is critical for determining population viability and halting further decline. This aspect of conservation genetics is of utmost importance [5, 6]. In conservation genetics, sheared DNA often fails to meet research requirements, but it poses fewer challenges for mtDNA and microsatellite studies [7, 8]. However, with recent advancements in DNA sequencing technology, the use of single nucleotide polymorphism (SNP) analysis, which cannot be determined by traditional markers alone, has increased dramatically [9]. Various methods exist for

detecting single nucleotide polymorphisms (SNPs). For example, restriction-site-associated DNA sequencing (RAD-seq) is a cost-effective method that still provides comprehensive genomic data. This technique involves cutting parts of the genome using a restriction enzyme to create short sequences. Following a specialized library preparation, next generation sequencing data can be bioinformatically assembled, with or without a reference genome. This approach allows for the analysis of 8,000 to 13,000 SNPs, encompassing both adaptive and neutral loci [10].

The quality of DNA is critical for genomic studies. DNA quality refers to intact DNA or long-fragmented DNA in genomic studies [11]. The chosen methodology depends on the quality of the DNA [11]. For genome analysis using RAD sequencing, unfragmented DNA is essential. Degraded or sheared DNA hampers the effectiveness of the target cleavage enzyme, making the genetic material unsuitable for other whole-genome studies, as noted in reference [9]. Thus, to ensure minimal DNA degradation and to maintain sample material in a condition suitable for high quality genomic research (including methods such as RAD sequencing

and Rapture), it is vital to identify the most effective sample collection and storage methods [32].

In this regard, there is a scarcity of comparative research on how sample quality affects genomic research in Mongolian references. During our study, particularly when employing the RADseq method, isolating high quality DNA was imperative. Hence, in this research, we collected and stored samples using three different methods and compared their effectiveness.

Materials and methods

Sample

During the field research, tissue samples of argali sheep (*Ovis ammon*), taimen (*Hucho taimen*) and tree pipit (*Anthus trivialis*) were collected and stored using following three methods.

1. Small tissue samples were either air-dried in paper bags or collected and dehydrated directly in silica gel for storage.
2. Small dorsal fin samples collected and stored in 96% ethanol.
3. Whole liver samples from tree pipits were collected and stored in 96% ethanol.

Extraction of Genomic DNA and Agarose Gel Electrophoresis screening

The tissue samples were minced with a sterile scalpel, transferred into 1.5ml Eppendorf tubes. DNA extraction was performed using method described by Tamaj *et al.*, 2015 [11].

1. 150-300µl of lysis buffer was added depending on the sample size. Then, 10-20 µl of proteinase K (20mg/ml) was added to each sample. The samples were mixed thoroughly by vortexing and then spun down.
2. The mixture was incubated at 55°C overnight and vortexed every 30 minutes during the first 2 hours.
3. If necessary, 2-4µl RNase (1mg/ml) was added, followed by incubation at 37°C for 30 minutes.
4. The mixture was then cooled to room temperature and 0.5V (Volume) 7.5M ammonium-acetate was added. Subsequently, the mixture was placed in a freezer at -20°C for 10-15 minutes.
5. 1V of chloroform:isoamylalcohol 24:1 was added to the mixture, followed by vortexing for 2 sec, and mixed by inverting for 5-10min. Then, mixture was centrifuged for 5 min at 14,000 RPM, and the supernatant was carefully transferred to a clean tube, without chloroform and any precipitated contaminants.
6. 1V of ice-cold isopropanol was added to the samples,

and were mixed by inverting the tubes. The samples were then incubated at -20°C for 2-4 hours. The incubation time was reduced if DNA strands became visible during this process.

7. The samples were centrifuged for 10 min at 14000 RPM, after which the supernatant was carefully discarded.
8. 500µl of 70% ethanol was added to the pellet, followed by centrifugation at 12000 RPM. This washing step was repeated twice.
9. The pellet was left to dry.
10. 50-70µl of 10mM TRIS buffer or distilled, sterile water was added to the pellet.

The isolated genomic DNA was dissolved overnight at 4°C. The following day, the quality of DNA was assessed for degradation using agarose gel electrophoresis prior to analyzing DNA concentration (Qubit® dsDNA HS Assay Kit). Agarose gel electrophoresis is a commonly used method for evaluating DNA degradation while the the Qubit assay is a reliable tool for accurately determining the exact quantity of DNA. This step is crucial because the preparation of the sequencing library requires not only a specific concentration but also an equal amount of high quality DNA from each sample. To assess the relative concentration of genomic DNA and its quality, you can use 1 µl of DNA and 1 µl of DNA marker in 1% agarose gel.

Results

For comparison, samples were collected from 3 different species via 3 different collection methods and stored at -20°C. The degradation of DNA extracted from collected samples were analyzed using agarose gel electrophoresis. This analysis will ascertain whether the degradation of DNA meets requirement of further analysis, such as DNA concentration analysis using Qubit. If the DNA is found to be intact, it can be purified by AmpureX (Neb) size selection method, setting the stage for subsequent genomic sequencing library preparation. The genomic DNA was extracted from following stored sampling:

1. Dried samples: Non-invasive collection of argali sheep tissue samples is challenging, so with the most available samples being those from carcasses. Therefore, pieces about 1 cm of tissue were collected from carcasses and air-dried in paper bags.
2. Samples preserved in ethanol: 0.5-0.7 cm² tissue piece of dorsal fin from Taimen were collected in 96% ethanol and stored at -20°C. Additionally, liver sample from tree pipit was stored in 96% ethanol.

3. Silica gel: Argali sheep tissue samples were stored in silica gel at a ratio of 3:1.

For comparative analysis of Argali sheep samples, DNA quality from samples dried in paper bags in 2017 and 2019 was compared against samples collected in silica gel in 2021. Among the Argali samples, 2 samples were from 2017 (OA21, OA28) and 5 samples were from 2019 (OA4, OA5, OA18, OA19, OA20) while the rest of the samples were from 2021. All samples in 2017 and 2019 were collected from carcasses in paper bags (**Fig. 1**).

The most viable and non-invasive method for collecting genetic samples from fish is to take tissue from the dorsal and caudal fin. In the current study, we collected approximately 1 cm of tissue from dorsal fin, preserved it in 96% ethanol, and stored it at -20°C in the laboratory until DNA extraction. In the case of Taimen, placing the sample in alcohol immediately after collection did not adversely affect the quality of the sample. The DNA from all collected samples were successfully isolated and met the quality requirements necessary for RAD library preparation.

As indicated in **Fig. 3** (in supplementary material) the DNA isolated from the tree pipit liver was found to be unsuitable for genomic research due to its poor quality and extensive fragmentation. Such fragmented DNA is not viable for further genomic research. The degradation of the DNA into numerous short fragments suggests that our target genome is likely to be broken and unusable for the intended research purposes.

Discussion

Although DNA is a large molecule, it can be easily degraded by many factors, such as UV rays, bacteria, extreme humidity, pH fluctuations, and sudden temperature changes [14]. To maintain good DNA quality for RAD sequencing genomic study, we assessed sample collection and storage methods via comparing differently collected samples between 2017-2021. Our results showed that samples stored in 96% ethanol, silica gel and paper bags (samples from 2017 stored directly in paper bags) exhibited the best DNA quality. However, the observed DNA degradation in liver samples, despite preservation in alcohol, might be attributed to the sample's excessive size. This degradation could be a result of an overly moist environment, disrupting the ionic balance and causing the DNA strands to break down into smaller fragments [14]. Additionally, samples should be dried as soon as possible, as prolonged exposure to moisture increases the risk of bacterial growth and activates

hydrolytic enzymes, which increases DNA degradation. [15]. Once DNA is degraded, it's important to note that this process is irreversible [16]. Hence, to mitigate these risks, samples should be sliced into thin pieces

Forensic studies have shown that certain tissues retain high-molecular-weight DNA for varying durations post-mortem. For example, the brain, lymph nodes, and skeletal muscle preserve such DNA for up to three weeks. In contrast, the kidney thyroid, and spleen retain it for about a week. Notably, the liver starts to lose all high molecular weight DNA or begins degrading within just 2 days [14]. Therefore, brain tissue emerges as an excellent source for genetic research due to its minimal DNA degradation after the death of the host organism. Alongside the brain, muscle, blood, and other internal organs also maintain good DNA quality over time. On the other hand, the liver, known for its rapid DNA degradation, is considered a poor choice for genetic sampling [17]. However, determining DNA quality directly from the sample type can be misleading because even ancient Egyptian mummified samples can be used as genetic sample, evidenced by ancient human studies [18-20]. Moreover, having more minerals around the DNA prevents DNA degradation. Therefore, this protective effect makes bone samples particularly valuable in the study of ancient DNA [21].

Liver tissue known to have high level of enzymes and bacteria, leading to faster DNA degradation compared to muscle tissue and blood samples [22]. Despite this, there have been successful instances of complete genome assembly from rabbit liver samples [23]. So, samples should be stored in a way that prevents possible degradation risks, since it is impossible to predict what kinds of samples will be collected. Even with preventative storage, DNA degradation can still occur rendering some samples unsuitable for genomic studies. Nonetheless, mtDNA studies can still be performed. Mitochondrial DNA has a circular structure that is less prone to degradation than circular DNA and be able to be amplified by PCR [24].

Numerous researchers have tested various preservation techniques to determine the best ways to maintain DNA quality without compromising it [25]. The quality of DNA is largely determined by the length of time it remains viable for analysis. For instance, to assess the lowest quality DNA, fragments of 250bp [26] or 3500bp [27] in length are used, whereas high-quality DNA is determined by the lengths of 10000bp [28], 15000bp [27], and 20000bp [29]. DNA fragments that are 10,000kb in length are considered high-quality, and

tend to degrade rapidly in certain tissues; for instance, in liver tissue, it may degrade within 8 hours post mortem, whereas in muscle tissue, it can remain intact for up to 16 days [25].

Although there are several techniques (such as probe preparation) that can be used for fragmented DNA [30], it is more advantageous to work with good quality DNA or DNA with long fragments. For example, the RAD (Restriction site-Associated DNA) method for genome cutting can be more efficient by increasing the number of cutting sites and amplification loci [31]. However, when this method is not an option, it is preferable to extract and analyze small, short sequences rather than to have no results [31].

In our case, such fragmented DNA could not be used for further genomic research, but we could use them for traditional mtDNA analysis without problem. Due to DNA degradation, our target genome is likely to be fragmented and thus undetectable via the RAD sequencing approach which requires high quality DNA as mentioned before [10, 32, 33].

Moreover, enhancing the research with a greater number of samples and more comprehensive statistical analysis could have provided a more robust data set and potentially more conclusive results. Nevertheless, the research proposes the right methodology for collecting and preserving high-quality DNA samples during field studies for certain types of genomic research, allowing for more efficient handling of the samples.

Conclusion

The method used for collecting samples has a significant impact on the quality of DNA. Therefore, researchers in conservation genetics and molecular genetics need to be cautious when collecting samples to ensure DNA integrity. Samples must be efficiently dehydrated as quick as possible and stored in small sizes to minimize the risk of DNA degradation. In case of non-invasive tissue sample collection from wild animals, mainly from carcasses, it is recommended to collect samples as much as slim and fresh. Hence, it is better to collect skin samples that dry naturally in a short time. This will ensure that the samples are well-preserved with intact DNA. Furthermore, using silica gel and 96% ethanol to collect tissue samples can cause water in the samples to evaporate quickly, making DNA more stable. Slicing samples as thinly as possible can also reduce the risk of degradation. Overall, the proper collection and preservation of samples are critical steps in ensuring the quality of DNA for genetic analysis.

Acknowledgments

We would like to express our gratitude to the Mongolian Foundation for Science and Technology for funding the basic research project 'IIIyCC2020/22'. Also, we would like to thank the MAS for funding our mobility project between Hungarian and Mongolian Academy of Sciences which gave us great opportunity to learn new research methods and use it in our research.

References

- [1] J. C. Avise, "A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species," *Trends in Ecology & Evolution*, vol. 4, no. 9, pp. 279-281, 1989. [http://doi.org/10.1016/0169-5347\(89\)90203-6](http://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90203-6)
- [2] J. C. Avise, "Perspective: conservation genetics enters the genomics era," *Conservation genetics*, vol. 11, pp. 665-669, 2010. <http://doi.org/10.1007/s10592-009-0006-y>
- [3] F. Vaux, L. Dutoit, C. I. Fraser, and J. M. Waters., "Genotyping-by-sequencing for biogeography," *Journal of Biogeography*, vol. 50, no. 2, pp. 262-281, 2023. <https://doi.org/10.1111/jbi.14516>
- [4] B. R. Wright, K. A. Farquharson, E. A. McLennan, K. Belov, C. J. Hogg, C. E. Grueber., "A demonstration of conservation genomics for threatened species management," *Molecular Ecology Resources*, vol. 20, no. 6, pp. 1526-1541, 2020. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13211>
- [5] N. A. Baird, P.D. Etter, T.S. Atwood, M.C. Currey, A.L. Shiver, Z.A. Lewis, E.U. Selker, W.A. Cresko., "Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers," *PloS one*, vol. 3, no. 10, p. e3376, 2008. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
- [6] F. W. Allendorf, P. A. Hohenlohe, and G. Luikart, "Genomics and the future of conservation genetics," *Nature reviews genetics*, vol. 11, no. 10, pp. 697-709, 2010. <http://doi.org/10.1038/nrg2844>
- [7] A. Bonin, E. Bellemain, P. Bronken Eidesen, F. Pompanon, C. Brochmann, and P. Taberlet, "How to track and assess genotyping errors in population genetics studies," *Molecular ecology*, vol. 13, no. 11, pp. 3261-3273, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02346.x>
- [8] J. B. Ledoux, D. Aurelle, J. P. Féral, and J. Garrabou, "Molecular forensics in the precious Mediterranean red coral, *Corallium rubrum*: testing DNA extraction and microsatellite genotyping using dried colonies,"

- Conservation Genetics Resources, vol. 5, pp. 327-330, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9795-2>
- [9] E. R. Mardis, "The impact of next-generation sequencing technology on genetics," *Trends in genetics*, vol. 24, no. 3, pp. 133-141, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.12.007>
- [10] Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81-92. 2016. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.28>
- [11] J. F. Holbrook, D. Stabley, and K. Sol-Church, "Exploring whole genome amplification as a DNA recovery tool for molecular genetic studies," *Journal of biomolecular techniques: JBT*, vol. 16, no. 2, p. 125, 2005.
- [12] A. Maciejewska, J. Jakubowska, and R. Pawłowski, "Whole genome amplification of degraded and nondegraded DNA for forensic purposes," *International journal of legal medicine*, vol. 127, pp. 309-319, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0764-9>
- [13] T. Cserkés, Z. Aczél-Fridrich, Z. Hegyeli, S. Sugár, D. Czabán, O. Horváth, G. Sramkó., "Rediscovery of the Hungarian birch mouse (*Sicista subtilis trizona*) in Transylvania (Romania) with molecular characterisation of its phylogenetic affinities," *Mammalia*, vol. 79, pp. 215 - 224, 2014. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2013-0167>
- [14] K. Bannick, "Mechanisms to Combat DNA Degradation," 2021.
- [15] R. Alaeddini, S. J. Walsh, and A. Abbas, "Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review," *Forensic science international: genetics*, vol. 4, no. 3, pp. 148-157, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.09.007>
- [16] H. Gill-King, "Chemical and ultrastructural aspects of decomposition," in *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains*, 1997, pp. 93-108: CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781439821923_sec2
- [17] H. N. Poinar and B. A. Stankiewicz, "Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 96, no. 15, pp. 8426-8431, 1999. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8426>
- [18] G. Romanowski, M. G. Lorenz, and W. Wackernagel, "Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, no. 4, pp. 1057-1061, 1991. <https://doi.org/10.1128/aem.57.4.1057-1061.1991>
- [19] S. Pääbo, "Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA," *nature*, vol. 314, no. 6012, pp. 644-645, 1985. <https://doi.org/10.1038/314644a0>
- [20] D. Mitchell, E. Willerslev, and A. Hansen, "Damage and repair of ancient DNA," *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 571, no. 1-2, pp. 265-276, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.060>
- [21] M. T. P. Gilbert, I. Barnes, M.J. Collins, C. Smith, J. Eklund, J. Goudsmit, H. Poinar, A. Cooper., "Long-term survival of ancient DNA in Egypt: Response to Zink and Nerlich (2003)," *American journal of physical anthropology*, vol. 128, no. 1, pp. 110-114, 2005. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20045>
- [22] K. R. Chien, J. Abrams, A. Serroni, J. T. Martin, and J. L. Farber, "Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury," *The Journal of biological chemistry*, vol. 253, no. 13, pp. 4809-4817, 1978. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)30461-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30461-1)
- [23] Y. Bai, W. Lin, Jie Xu, J. Song, D. Yang, Y. E. Chen, L. Li, Y. Li, Z. Wang, J. Zhan., "Improving the genome assembly of rabbits with long-read sequencing," *Genomics*, vol. 113, no. 5, pp. 3216-3223, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.05.031>
- [24] S. V. Drovetski, M. Raković, G. Semenov, I. V. Fadeev, and Y. A. Red'kin, "Limited phylogeographic signal in sex-linked and autosomal loci despite geographically, ecologically, and phenotypically concordant structure of mtDNA variation in the Holarctic avian genus *Eremophila*," *PLoS One*, vol. 9, no. 1, p. e87570, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087570>
- [25] H. N. Amarilla-Stevens, R. D. Stevens, C. D. Phillips, and R. D. Bradley, "Temporal rate of postmortem DNA degradation in archived tissue samples: evidence from liver and muscle," *Journal of Mammalogy*, vol. 104, no. 1, pp. 194-202, 2023.
- [26] T. Lindahl, "Instability and decay of the primary structure of DNA," *nature*, vol. 362, no. 6422, pp. 709-715, 1993.
- [27] W. Bär, A. Kratzer, M. Mächler, and W. Schmid, "Postmortem stability of DNA," *Forensic science international*, vol. 39, no. 1, pp. 59-70, 1988. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyac089>
- [28] C. F. Graham, T.C Glenn, A.G Mc. Arthur, D.R. Boreham, T. Kieran, S. Lance, R.G. Manzon., "Impacts of degraded DNA on restriction enzyme

- associated DNA sequencing (RADS eq),” *Molecular ecology resources*, vol. 15, no. 6, pp. 1304-1315, 2015. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12404>
- [29] J. Blethrow, N. Sisneros, S. Chackraborty., “Best practices for whole genome sequencing using the sequel system,” PacBio, Menlo Park, California, USA, 2018.
- [30] J. E. McCormack, B. C. Faircloth, N. G. Crawford, P. A. Gowaty, R. T. Brumfield, and T. C. Glenn, “Ultraconserved elements are novel phylogenomic markers that resolve placental mammal phylogeny when combined with species-tree analysis,” *Genome research*, vol. 22, no. 4, pp. 746-754, 2012. <https://doi.org/10.1101/gr.125864.111>
- [31] L. Lah L, D.Trense, H.Benke, P. Berggren, D. Gunnlaugsson, C. Lockyer, A. Öztürk, B. Öztürk., “Spatially explicit analysis of genome-wide SNPs detects subtle population structure in a mobile marine mammal, the harbor porpoise,” *PloS one*, vol. 11, no. 10, p. e0162792, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162792>
- [32] Tserendulam Batsukh, Ulziisaikhan Tumendemberel, Delgerzul Baatar. “Importance of genetic analysis and genomic tools for wild life conservation”. *Proceedings of the Institute of Biology special edition*. 2023.
- [33] <https://www.illumina.com/science/sequencing-method-explorer/kits-and-arrays/ddradseq.html>

Supplementary materials

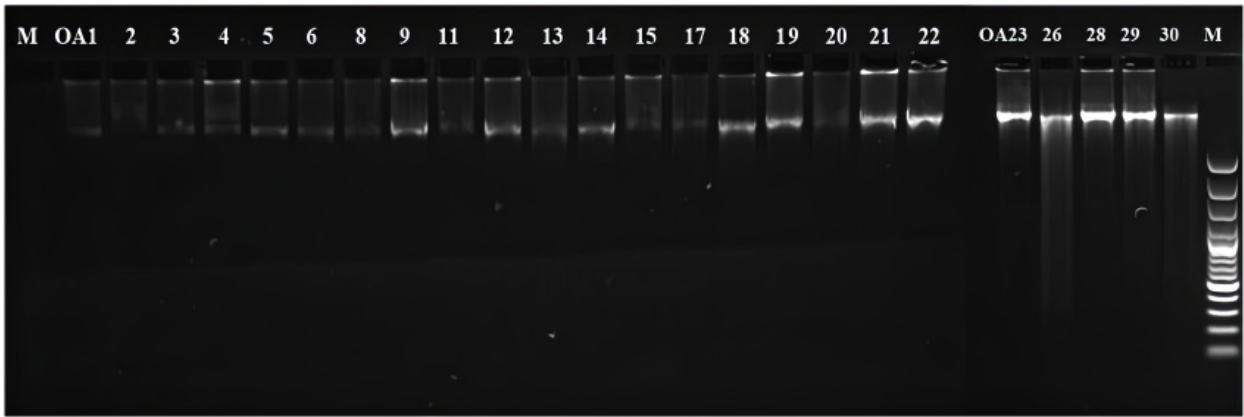


Fig. 1. Gel electrophoresis result of genomic DNA isolated from dried and silica gel-preserved tissue samples. OA: *Ovis ammon* (Argali sheep) 12-30. 1 μ l genomic DNA+ 1 μ l loading, 1 μ l marker were run at 150V, 45min.

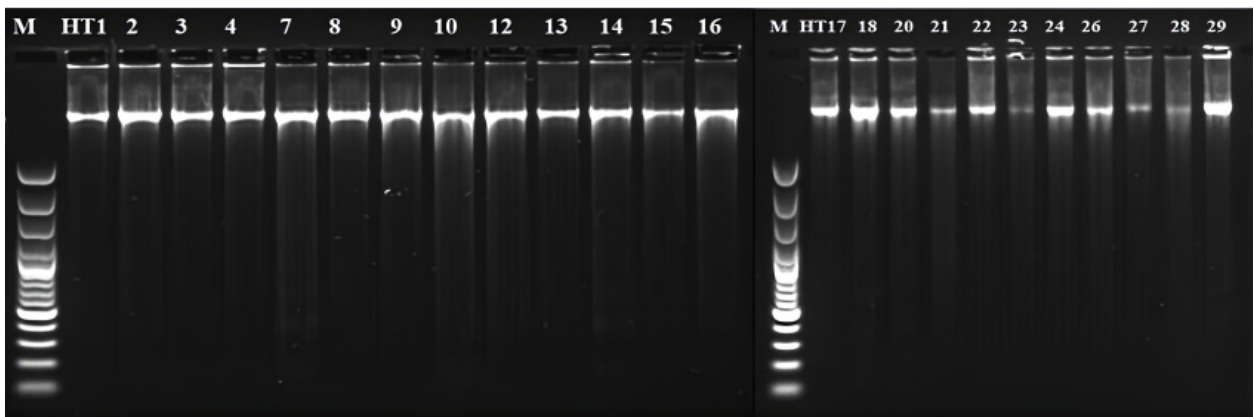


Fig. 2. Gel electrophoresis result of genomic DNA isolated from ethanol preserved dorsal fin samples. HT- *Hucho taimen* (Taimen) 21-29. 1 μ l genomic DNA+ 1 μ l loading, 1 μ l marker were run at 150V, 45min.

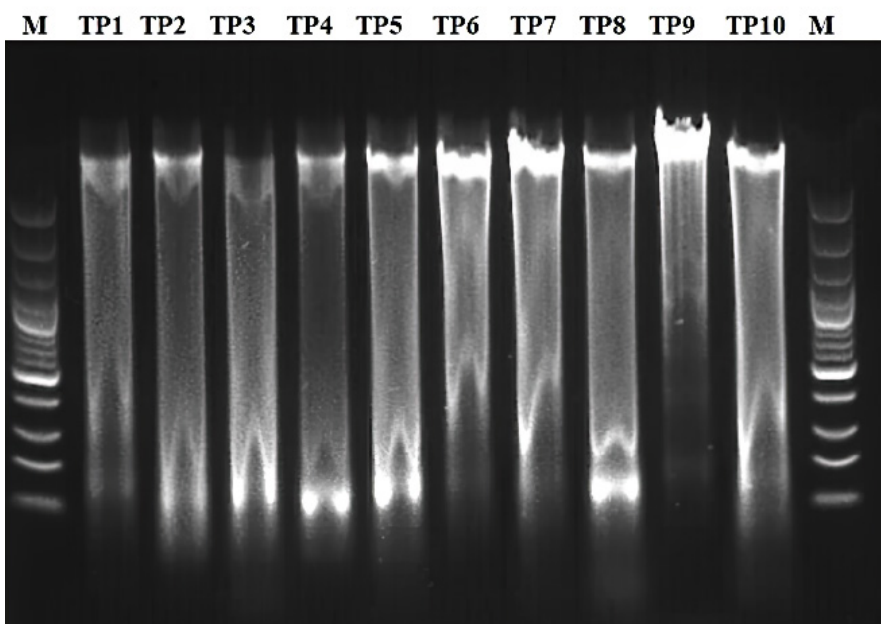


Fig. 3. Gel electrophoresis result of genomic DNA isolated from tree pipit liver. OA: . MT-Tree pipit 1-10. 12-30. 1 μ l genomic DNA+ 1 μ l loading, 1 μ l marker were run at 150V, 45min.

Table 1. Information of samples. The concentration of DNA is measured using the QUBIT QS assay kit, which is sensitive to double-stranded DNA. For RAD sequencing, the quality of the DNA is first measured using agarose gel electrophoresis. The DNA concentration is then checked using Qubit. If the DNA concentration of the sample is less than 10ng/mkl, it is not sufficient for genome analysis. This is because there are many purification steps involved in preparing the RAD library, which leads to significant loss of DNA.

№	Species	Name	Year	Sample type	Storage	Concentration ng/ml
1	<i>Hucho taimen</i>	HT1	2021	Fin (1cm small tissue)	96% ethanol	104.00
2		HT2				35.00
3		HT3				30.00
4		HT4				108.00
5		HT7	2020			75.4
6		HT8				65.8
7		HT9				68.4
8		HT10				74.6
9		HT12	2021			62.8
10		HT13				60.8
11		HT14				47.8
12		HT15				47.2
13		HT16	2020			35.8
14		HT17				28.4
15		HT18				51.00
16		HT20				22.6
17		HT21	2020			16.7
18		HT22				26.2
19		HT23				12.1
20		HT24				83.00
21		HT26	2022			19.8
22		HT27				12.7
23		HT28				18.1
24		HT29				54.8

1	<i>Ovis ammon</i>	OA21	2017	Muscle (Sliced slim skin)	Paper bag	39.4
2		OA28-1				76.1
3		OA9	2020		76.2	
4		OA11			14.2	
5		OA12			47.00	
6		OA14			99.00	
7		OA26			58.2	
8		OA15	2021		12.00	
9		OA2	2019		10.1	
10		OA4			20.00	
11		OA5			25.00	
12		OA6			27.6	
13		OA8			27.2	
14		OA18			50.00	
15		OA19			54.00	
16		OA20			10.1	
17		OA1	2021		49.2	
18		OA3			25.6	
19		OA13			23.6	
20		OA17			10.1	
21		OA22			38.4	
22		OA23			36.4	
23		OA29			29.2	
24		OA30			15.3	
1	<i>Tree pipit (Anthus trivialis)</i>	TP1	2021	Whole liver	96% ethanol	7.4
2		TP2				3.5
3		TP3				1.9
4		TP4				6
5		TP5				6.6
6		TP6				3.3
7		TP7				6.6
8		TP8				8.5
9		TP9				6
10		TP10				9.9
11		TP11				4.8
12		TP12				4.4
13		TP13				9.2
14		TP14				8.5
15		TP15				2.8
16		TP16				0.7
17		TP17				5.7
18		TP18				6.6
19		TP19				9.8
20		TP20				1.4
21		TP21				7.5



Геномын судалгааны дээж цуглуулалт, түүний хадгалах аргуудын харьцуулалт

Бямбадаш Сод-Эрдэнэ , Баатар Дэлгэрзул , Дэчингаваа Цэнд-Аюуш , Зундуйбаатар Өнөдбаясгалан , Түмэндэмбэрэл Өлзийсайхан , Батсүх Цэрэндулам*

Монгол Улс, Улаанбаатар, Шинжлэх ухааны академи, Биологийн хүрээлэн, Генетикийн лаборатори

*Холбоо барих зохиогч: iserendulamb@mas.ac.mn <https://orcid.org/0000-0002-8409-0968>

Хураангуй. Молекул генетик болон хамгааллын генетикийн судалгааны чанарт нөлөөлдөг хамгийн чухал хүчин зүйл нь ДНХ-ийн чанар байдаг. ДНХ нь маш олон хүчин зүйлээс болж задардаг тул ДНХ-ийг задрахаас сэргийлэхийн тулд судалгааны дээжийг авахдаа бохирдуулахгүйгээр, хурдан хатааж хуурай нөхцөлд хадгалах нь чухал юм. Тиймээс аливаа судалгааны дээжийг анх цуглуулахад ДНХ-ийн задралыг бага байлгах үүднээс хадгалалтын нөхцөлд сайтар анхаарах хэрэгтэй байдаг. Иймд бид энэхүү судалгаагаар дээж цуглуулах, хадгалах 3 өөр арга зүйг туршсан ба аль нь ДНХ-ийн чанарыг алдагдуулахгүй, удаан хадгалахад тохиромжтой байгааг агарозын гель элетрофорезод гүйлгэн харьцуулав. Ингэхэд эрхтэнээр нь буюу том хэмжээтэй авсан дээжийн ДНХ задарсан, харин нимгэн, жижиглэж усгүйжүүлж хатаасан болон силика гельд хадгалсан дээжийн ДНХ-ийн чанар хамгийн сайн буюу задраагүй, гарц ихтэй байв.

Түлхүүр үгс: ДНХ задрал, Генетикийн дээж, Силика гель, RADseq, Дээж хадгалалт

Хүлээн авсан 2023.07.31; хянан тохиолдуулсан 2023.10.18; зөвшөөрсөн 2023.11.02

© 2023 Зохиогчид. [CC BY-NC 4.0 лиценз](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Оршил

Ховор зүйл амьтдыг анх морфологоор нь ангилж хамгаалах арга хэмжээг авдаг [1] байсан бол сүүлийн жилүүдэд геномын түвшинд ангилалзүйг хийж, тухайн зүйл амьтанд тохирсон хамгааллын менежментийг боловсруулах судалгаа ихээр хийгдэж байгаа [2]. Тухайлбал, ховор зүйл амьтныг хамгаалахад хамгийн багадаа 5 жилийн мониторинг хийж, тоо толгойг тогтмол хянах мөн газарзүйн тусгаарлалтад орсон [3], дэд зүйлийн түвшинд ялгаатай болсон эсэх судалгааг бүтэн геномын түвшинд хийх шаардлагатай болсон [2] [4]. Ингэхийн тулд маш олон генетик маркер ашиглаж саармаг локусуудыг ихээр тодорхойлох хэрэгтэй болох ба эдгээр нь тухайн популяцын мэнд үлдэлт, цус ойртолт зэргийг тодорхойлж тоо толгойг улам буурахаас өмнө арга хэмжээ авах хамгийн чухал хэсэг юм [5] [6].

Хамгааллын генетикийн судалгаанд өргөн тохиолддог асуудлын нэг бол судалгааны шаардлага хангахгүй задарсан эсвэл тасарсан ДНХ байдаг.

Энэ нь мтДНХ болон микросателлит зэрэг богино хэмжээтэй ДНХ-ийн судалгаанд тийм ч санаа зовоосон асуудал биш юм [7, 8]. Гэсэн хэдий ч ДНХ-ийн нуклеотидийн дарааллыг тогтоох технологид сүүлийн жилүүдэд маш их дэвшилт гарч байгаа энэ үед дан ганц уламжлалт маркераар тогтохгүй нэг нуклеотидийн полиморфизмын анализыг (SNP) хийх нь эрс ихэссэн билээ [9]. Нэг нуклеотидийн полиморфизмийг тодорхойлох олон арга зүй байдаг [10]. Тухайлбал, хамгийн өртөг бага хэдий ч геномыг төлөөлж чадахуйц арга зүй нь RAD секвенсингийн арга зүй юм [5]. Энэхүү техник нь геномын хэсгүүдийг хэрчигч энзимээр хэрчин богино дараалал үүсгэн RAD секвенсийн сан (RAD library) бэлтгэх тусгай бэлтгэлийн дараа NGS буюу геномын богино дараалуудыг лавлагаа геномтой эсвэл лавлагаагүйгээр биоинформатикийн арга зүй ашиглан угсарч гаргадаг. Энэ арга нь дасан зохицох болон саармаг локусаас бүрдэх 8000-13000 дан нуклеотидийн полиморфизмд анализ хийх боломжтойгоороо давуу талтай арга юм [10].

Эдгээр геномын судалгааг хийхэд хамгийн чухал

нь ДНХ-ийн чанар байдаг. Чанар сайтай ДНХ гэдэг нь геномын судалгаанд задраагүй ДНХ буюу урт хэмжээтэй фрагмент бүхий ДНХ-ийг хэлнэ [11]. ДНХ-ийн чанар ямар байхаас хамаарч ямар арга зүйг ашиглах вэ гэдгийг шийддэг [11]. Тухайлбал, RAD сэквенсинг хийж геномын анализ хийх тохиолдолд ДНХ задраагүй байх шаардлагатай. Хэрэв ДНХ задарсан, тасарсан бол зорилтот хэрчигч энзимээр хэрчигдэх боломжгүй болохоос гадна бусад бүтэн геномын судалгаанд ч ашиглах боломжгүй болдог [9]. Чанар сайтай ДНХ шаардлагатай байдаг геномын судалгаанд (жишээ нь, RAD сэквенсинг, Rapture гэх мэт) дээжийг ДНХ-ийн задрал хамгийн бага байхаар хамгийн зохимжтой цуглуулах, хадгалах аргыг тодорхойлох нь маш чухал юм [32].

Энэ талаар харьцуулсан судалгаа буюу дээжийн чанар геномын судалгаанд хэрхэн нөлөөлдөг талаарх мэдээлэл, Монгол эх сурвалж хомс байна. Иймд хамгийн тохиромжтой аргыг олохын тулд, дээжүүдийг 3 өөр арга зүйгээр цуглуулж хадгалаад харьцуулан судалж үзлээ.

Материал арга зүй

Дээж

Хээрийн судалгааны ажлын явцад харьцуулах зорилгоор Аргаль хонь, Тул загас, Ойн шийхнүүхэйн эдийн дээжүүдийг 3 төрлөөр цуглуулан хадгалав.

1. Жижиг хэмжээний эдийн дээжийг цаасан ууганд хийж агаарт хатаах
2. Жижиг хэмжээтэй өөхөн сэлүүрийн дээжийг 96% этанолд хийх
3. Шувууны элгийг бүхлээр нь 96%-ийн этанолд хийх.

Геномын ДНХ-ийг ялгах, агарозын гель электрофорезоор шалгах

Эдийн дээжийг жижиглээд (дээжийг ариутгасан скалпелиар жижиглэн хэрчинэ, өднөөс ялгах үед үзүүр хэсэг буюу булцуутай хэсэгт цусны улаан эс байх учраас энэ хэсгээс ДНХ ялгана) 1.5мл эппендорфын түбэнд хийгээд Тамаж нарын (2015) арга зүйн дагуу ялгав [13]

1. Дээжийн хэмжээнээс хамаарч 150-300мкл задлагч буфер хийнэ. Дээж бүр дээр 10-20мкл протейназа К (20мг/мл) хийгээд вортексоор уусмалыг сайн холиод 10сек центрифугдэж (spin down) хананд наалдсан урвалжийг доош буулгана.
2. Холимгийг 55°C-д хонуулна (overnight). Эхний 2 цагт 30мин тутамд вортексдоод хонуулна.
3. Шаардлагатай бол 2-4мкл РНАза (1мг/мл) хийгээд 37°C-д 30мин инкубацлаж РНХ-ийг задална.

4. Өрөөний температурт хөргөөд холимгийн эзлэхүүний 0.5 дахин хэмжээтэй дүйцэхүйц 7.5М Аммонийн ацетат нэмж -20°C-д 10-15мин байлгана.

5. Холимгийн эзлэхүүний 1 дахин хэмжээтэй дүйцэхүйц хлороформ:изоамилийн спирт (24:1) хийгээд 2 сек вортексдоод, 5-10мин инверт хийж холино. Үүний дараа 14000эрг/мин хурдаар 5мин центрифугдээд супернатант буюу дээд хэсгийн шингэнийг болгоомжтой соруулж аван шинэ түбэнд шилжүүлнэ (хлороформ болон бусад дээжийн хэсгээс оруулахгүй байх!).

6. Холимгийн эзлэхүүний 1 дахин хэмжээтэй дүйцэхүйц хүйтэн изопропанол хийж зөөлөн инверт хийнэ (ДНХ-ийн утаслаг харагдана, хэрвээ утаслаг харагдвал инкубацийн хугацааг богиносгож болно). Үүнийгээ -20°C-д 2-4цаг инкубацлан тунадасжуулна.

7. Үүний дараа 14000эрг/мин хурдаар 10мин центрифугдэхэд цагаан өнгийн тунадас харагдана (зарим тохиолдолд харагдахгүй байж болно). Маш болгоомжтой шингэн хэсгийг соруулж хаяна.

8. Тунадас дээр 500мкл 70%-ийн этанол нэмж 12000 эрг/мин хурдаар центрифугдэж, шингэн хэсгийг асгаж 2 удаа угаана.

9. Хоёр удаа угаасны дараа спиртийг ууршуулна (хэт их хатааж болохгүй).

10. Хатаасны дараа тунадасны хэмжээнээс хамаарч 50-70мкл 10ММ Трис юмуу усанд уусгана.

Ялгаж дуусаад геномын ДНХ-ийг 4°C-д хонуулж сайтар уусгана. Маргааш нь ДНХ-ийн концентрацыг шалгах агаарозын гель электрофорезоор ДНХ-ийг задарсан эсэхийг шалгана. Үүний дараа зараагүй ДНХ-ийн концентрацыг Qubit багажаар (Qubit® dsDNA HS Assay Kit) шалгана. Qubit нь давхар утаслаг ДНХ-ийн бодит байгаа хэмжээг илрүүлэх хамгийн тохиромжтой төхөөрөмж юм. Учир нь геномын сан бэлтгэх үед ялган авсан чанар сайтай ДНХ-ийн дээж бүрээс тодорхой концентрацтай төдийгүй ижил хэмжээтэйг ашиглах шаардлагатай байдаг. Электрофорезоор 1%-ийн агарозын гелинд 1мкл ДНХ, 1мкл ДНХ-ийн маркер хийж геномын ДНХ-ийн чанар ба концентрацыг шалган үзэх боломжтой (**1-р зураг**).

Судалгааны үр дүн

Харьцуулах зорилгоор 3 өөр зүйл амьтны, 3 өөр төрлийн дээжээс цуглуулсан дээжүүдийг -20°C-д хадгалсан. Үүнийгээ агарозын гель электрофорезоор шалган задарсан ДНХ-ийг геномын анализаас

хасаж, задраагүй буюу шаардлага хангасан ДНХ-ийн концентрацыг (Qubit) шалгаж, AmpureX –ээр цэвэрлээд (Neb size selection) цаашид геномын сэквенсингийн сан бэлдэхэд ашиглаж болно. Геномын ДНХ-ийг дараах 3 байдлаар хадгалсан дээжүүдээс ялгав. Үүнд:

1. Хатаасан дээж: Аргалийн эдийн дээжийг цуглуулах нь олдоц муу бөгөөд хамгийн боломжтой нь үхсэн амьтны сэг байдаг. Тиймээс аль болох удаагүй сэг зэмээс 1 см орчим хэсгийг авч цаасан уутанд хатаав.
2. Спиртэд хадгалсан дээж: Тулын өөхөн сэлүүрийн эдээс 0.5-0.7 см² хэмжээтэйг авч 96% этанолд хийж, -20°C -д хадгалсан. Мөн шувууны элгийг авч 96% этанолд хийж хадгалав.
3. Силика гель: Аргаль хонины эдийн дээжийг 3:1 харьцаатайгаар силика гелинд хийж хадгалав.

Аргаль хонины дээжээс харьцуулах зорилгоор 2017 болон 2019 онуудад цаасан уутанд хатааж цуглуулсан дээжийг 2021 онд силика гелинд цуглуулсан дээжүүдийн ДНХ-ийн чанарыг харьцуулав. Үүнд: 2017 оны 2 дээж (ОА21, ОА28), 2019 оны 5 дээж (ОА4, ОА5, ОА18, ОА19, ОА20) байсан бол бусад нь 2021 онд цугуулсан шинэ дээж байв. 2017 болон 2019 онд цуглуулсан дээжүүд нь бүгд сэг зэмээс дээжлэн авч цаасан уутанд хадгалсан дээжүүд байв.

Загасны генетикийн дээж цуглуулах хамгийн боломжит хувилбар нь өөхөн сэлүүр болон хойд сэлүүрийн эд авах байдаг. Бид энэ судалгааны ажлаар тул загасны өөхөн сэлүүрээс 1 см орчмыг аваад 96%-ийн этанолд хийгээд, лабораторид -20°C-д ДНХ ялгах хүртэл хадгалсан. Тул загасны хувьд дээж авсан даруйдаа спиртэд хийсэн нь дээжийн чанарт муугаар нөлөөлөөгүй байна. Бүх дээжийн ДНХ-ийг амжилттай ялгаж, RAD секвенсингийн сан бэлтгэх чанарын шаардлага хангаж байлаа.

Шувууны элэгнээс ялгасан ДНХ нь геномын судалгаанд шаардлага хангаж чадахааргүй, чанар муутай хадгалагдсан байгаа нь 3-р зургаас харагдаж байна. Ийм задарсан ДНХ-ийг цаашид геномын судалгаанд ашиглах боломжгүй. Учир нь ДНХ маш олон богино хэсгүүд болон задарсан байгаа учраас бидний зорилгот геномын хэсэг тасарсан байх магадлалтай.

Хэлэлцүүлэг

ДНХ нь хэдий том молекул ч гэсэн олон хүчин зүйлийн нөлөөнд маш амархан задардаг. Тухайлбал, хэт ягаан туяа, бактери, хэт чийгшил, рН өөрчлөгдөх,

температур огцом өөрчлөгдөх гэх мэт олон хүчин зүйл нөлөөлдөг [14]. Бид энэ судалгааны ажлаар “RAD секвенсингийн судалгаанд дээжийг хэрхэн цуглуулж, хадгалбал чанар сайтай хэвээр байх вэ?” гэдгийг 2017-2021 онд цуглуулж, өөр нөхцөлд хадгалсан дээжүүд дээр туршлаа. Бидний судалгааны үр дүнгээр спирт (96% этанол) болон силика гелинд хадгалсан дээжүүдийн ДНХ-ийн чанар хамгийн сайн, мөн шууд цаасан уутанд авч хадгалсан ч чанар алдагдаагүй 2017 оны дээж байлаа. Харин шинээр нь спиртэд хадгалсан хэдий ч элэгний дээжийн ДНХ задарсан байгаа нь дээжийн хэмжээ хэтэрхий том байснаас үүдсэн байж болзошгүй. Учир нь хэт их чийгтэй орчинд ионы тэнцвэр алдагдсанаар ДНХ-ийн утаслаг эвдэрч жижиг хэрчмүүд болон задардаг [14]. Мөн аль болох хурдан хатаах хэрэгтэй бөгөөд чийгтэй орчинд удаан байх нь бактери үржих эрсдэлийг нэмэгдүүлэхээс гадна гидролизийн энзимийг идэвхжүүлж, ДНХ-ийн задралыг нэмэгдүүлдэг [15]. Нэгэнт задарсан ДНХ-ийг засварлах арга байдаггүй [16] тул дээжээ авахдаа аль болох нимгэн жижиг хэмжээтэйгээр авснаар дээрх эрсдлээс зайлсхийх боломжтой юм.

Шүүхийн шинжилгээний судалгаагаар тархи, тунгалгийн зангилаа, араг ясны булчингуудад урт фрагмент бүхий чанартай ДНХ 3 долоо хоног хүртэл хадгалагдсан бол бөөр, бамбай булчирхай, дэлүүнд 1 долоо хоног хадгалагддаг. Харин элэг нь 2 хоногийн дараа бүх өндөр молекул масстай ДНХ-ээ алддаг буюу задрал орж эхэлдэг байна [15]. Үүнээс харахад тархины эд нь эзэн организм үхсэний дараа ДНХ-ийн задрал хамгийн бага байдаг генетикийн судалгааны сайн эх үүсвэрүүдийн нэг ба үүний дараа булчин, цус, бусад дотор эрхтнүүд байдаг бол элэг нь ДНХ-ийн задрал хурдан явагддаг сул талтай тул генетикийн дээж болгоход дутагдалтай эх үүсвэр юм [17]. Гэсэн хэдий ч дээжийн төрлөөс нь шууд ДНХ-ийн чанарыг тодорхойлох нь өрөөстөл ойлголт болно. Учир нь эртний Египетэд мумми болсон дээжүүдээс ч генетикийн судалгаа хийх боломжтой байдаг нь эртний хүний судалгаануудаар батлагддаг [18-20]. ДНХ-ийн эргэн тойронд эрдэс их байх нь ДНХ-ийг задрахаас мөн сэргийлдэг. Тиймээс эртний ДНХ-ийн судалгаанд ясны дээжийг өргөн ашигладаг [21].

Элгэнд маш олон энзим болон бактери байдаг учраас ДНХ нь бусад булчингийн эд болон цусны дээжтэй харьцуулахад хурдан задардаг [22]. Гэсэн хэдий ч туулайны элэгнээс бүтэн геномыг амжилттай угсарсан судалгааны ажил ч бий [23]. Тиймээс дээжийг ямар байхыг таамаглах боломжгүй учраас

учирч болох эрсдэлүүдээс сэргийлж хадгалах нь зөв. Мөн урьдчилан сэргийлж хадгалсан ч ДНХ-ийн задрал явагдах боломжтой тул ийм тохиолдолд геномын судалгаа хийх боломжгүй ч мтДНХ-ийн судалгааг хийх боломжтой. Учир нь богино хэмжээний ДНХ-ийг ПГУ-аар олшруулах боломжтойгоос гадна мтДНХ нь цагариг бүтэцтэй тул задралд орох нь бөөмийн ДНХ-ээс харьцангуй бага байдаг [24].

Олон судлаачид ДНХ-ийн чанарыг алдагдуулахгүйгээр хадгалах арга зүйг янз бүрийн аргаар туршиж ДНХ-ийн чанарыг тодорхойлсон байдаг[25]. ДНХ-ийн чанар сайтай гэдэг ойлголт нь тухайн ДНХ-д анализыг хийхэд хэр урт хэмжээтэй ДНХ-ийг ашиглах боломжтой вэ гэдгээс хамаардаг. Тухайлбал, хамгийн чанар муутай ДНХ-ийг тодорхойлоходоо 250хн [26] эсвэл 3500хн урттай ДНХ-ийн фрагментүүдийг [27] тооцдог бол чанартай ДНХ-ийг 10000хн [28], 15000хн [27], 20000хн [29] гэж тус тус тооцсон байна. Эдгээр чанартай ДНХ болох 10000хн бүхий урттай ДНХ-ийн фрагмент нь элгэнд дээж авснаас хойш 8 цагийн дараа буурдаг бол булчингийн эдэд 16 хоног хүртэл тэсвэртэй байдаг байна [25]. Нэгэнт задарсан ДНХ-ийг ашиглах боломжтой хэд хэдэн аргазүй (проб бэлтгэх) байдаг ч [30] сайн чанартай ДНХ буюу урт фрагмент бүхий ДНХ-ийн хэрэглээ нь илүү ашигтай. Тухайлбал, хэрчигч энзим ашигладаг (RAD) арга зүйгээр геномын хэсгийг хэрчихэд хэрчилтийн сайт байх магадлал болон олшруулах локусийн тоо нэмэгдэж илүү их үр дүнтэй болох боломжтой [31]. Гэсэн хэдий ч энэ арга зүйг ашиглах боломжгүй болсон тохиолдолд бага хэмжээний, богино дарааллыг гаргаж авч анализ хийсэн нь ямар ч үр дүнгүй үлдсэнээс дээр юм [31].

Бидний судалгаагаар ажиглагдсан задарсан ДНХ-ийг геномын судалгаанд ашиглах боломжгүй ч уламжлалт арга болох мтДНХ-ийн анализыг хийх боломжтой юм (3-р зураг). ДНХ задарч богино фрагментүүдтэй болсноор өмнө дурдсанчлан ДНХ өндөр чанартай байхыг шаарддаг RAD секвенсингийн судалгааны дүнд зорилтот геномын хэсгийг илрүүлэх магадлал маш бага болно гэсэн үг юм [10], [32], [33].

Мөн бид энэ судалгааг илүү олон тооны дээжид статистикийн анализ хийж сайжруулж болох байсан. Гэсэн хэдий ч, энэ судалгаа нь дээжийг хээрийн судалгаагаар хэрхэн цуглуулж, хадгалснаар геномын тодорхой зарим судалгаануудад зориулан ашиглах шаардлага хангасан чанар сайтай ДНХ-ийг ялган авч чадах талаар оновчтой зөв аргазүйг санал болголоо.

Дүгнэлт

Дээжийг хэрхэн цуглуулах нь ДНХ-ийн чанарт маш чухал үүрэгтэй. Иймд, хамгааллын генетик, молекул генетикийн судалгааны дээж материалыг цуглуулж хадгалахдаа маш анхаарах нь зүйтэй. Дээжийг ДНХ-ийн задралаас сэргийлэхийн тулд аль болох хурдан үр дүнтэйгээр усгүйжүүлж, жижиг хэмжээтэй болгон хадгалах нь үр дүнтэй байна. Тухайлбал, зэрлэг амьтны эдийн дээжийг амьтанд хор хөнөөлгүй цуглуулах нэг арга нь сэг зэм учраас ийм төрлийн дээж цуглуулахдаа аль болох жам ёсоороо богино хугацаанд эвэрч хатдаг арьсны дээж авах нь илүү гэдэг нь ажиглагдсан. Мөн эдийн дээжийг силика гель болон спиргэд авах нь усыг хурдан ууршуулж ДНХ-ийг задрах аюулгүй болгож байгаа нэг процесс бөгөөд ингэхдээ дээжийг аль болох нимгэн жижиг хэсэг болгон хадгалах нь задрах эрсдэлээс сэргийлэх боломжтой байна. Эцэст нь дүгнэхэд дээжийг зөв арга зүйгээр цуглуулж, хадгалах нь генетикийн судалгааны шаардлага хангасан чанартай ДНХ-ийг удаан хугацаанд хадгалах боломжтой чухал алхам юм.

Талархал

Энэхүү судалгааны ажлыг хийх боломжийг олгосон, суурь судалгааны (ШУСС 2020/22) төслийг санхүүжүүлсэн ШУТСанд талархал илэрхийлэхийн сацуу Унгар - Монголын ШУА-ийн хамтарсан мобилити төслийг дэмжин, судалгааны шинэ арга зүй сурах, арга зүйгээ судалгаандаа ашиглах боломж олгосон ШУА-д талархал илэрхийлье.

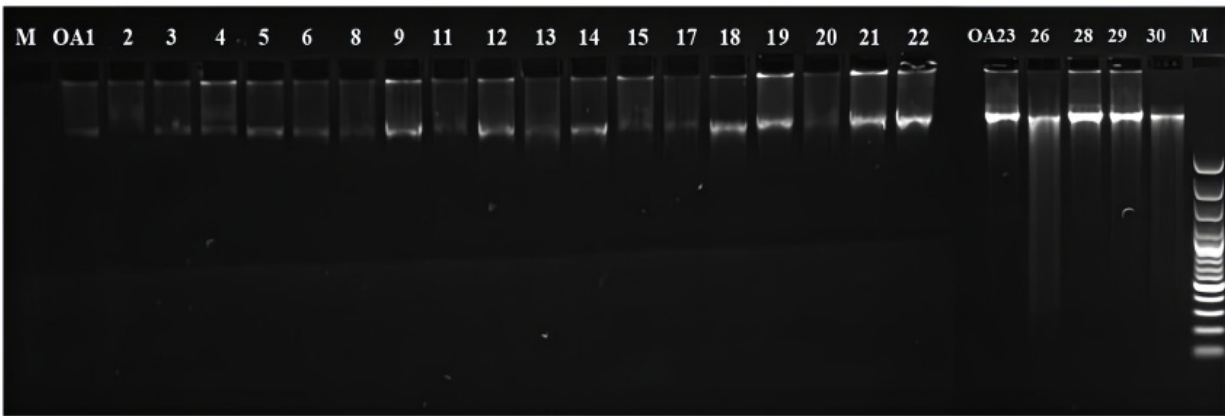
Ашигласан бүтээл

- [1] J. C. Avise, "A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species," *Trends in Ecology & Evolution*, vol. 4, no. 9, pp. 279-281, 1989. [http://doi.org/10.1016/0169-5347\(89\)90203-6](http://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90203-6)
- [2] J. C. Avise, "Perspective: conservation genetics enters the genomics era," *Conservation genetics*, vol. 11, pp. 665-669, 2010. <http://doi.org/10.1007/s10592-009-0006-y>
- [3] F. Vaux, L. Dutoit, C. I. Fraser, and J. M. Waters., "Genotyping-by-sequencing for biogeography," *Journal of Biogeography*, vol. 50, no. 2, pp. 262-281, 2023. <https://doi.org/10.1111/jbi.14516>
- [4] B. R. Wright, K. A. Farquharson, E. A. McLennan, K. Belov, C. J. Hogg, C. E. Grueber., "A demonstration of conservation genomics for threatened species

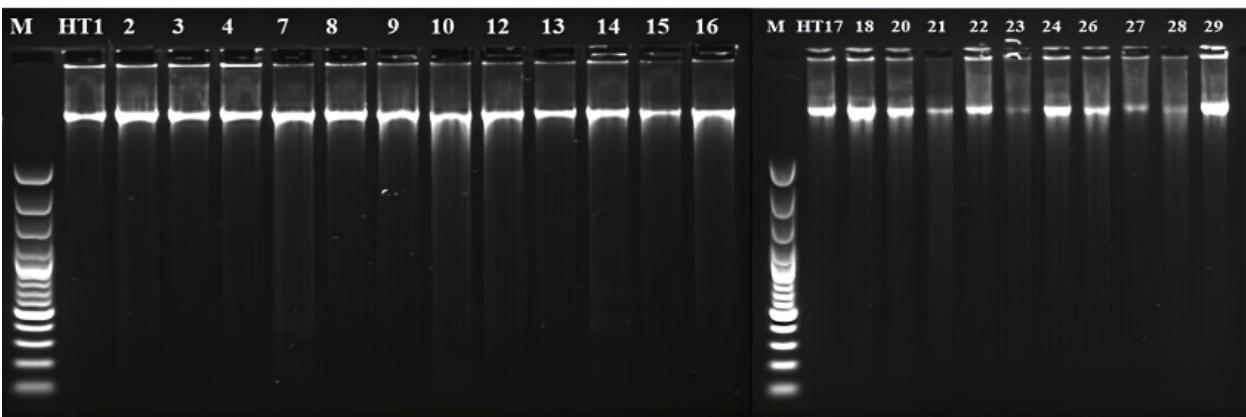
- management,” *Molecular Ecology Resources*, vol. 20, no. 6, pp. 1526-1541, 2020. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13211>
- [5] N.A. Baird, P.D. Etter, T.S. Atwood, M.C. Currey, A.L. Shiver, Z.A. Lewis, E.U. Selker, W.A. Cresko., “Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers,” *PloS one*, vol. 3, no. 10, p. e3376, 2008. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
- [6] F. W. Allendorf, P. A. Hohenlohe, and G. Luikart, “Genomics and the future of conservation genetics,” *Nature reviews genetics*, vol. 11, no. 10, pp. 697-709, 2010. <http://doi.org/10.1038/nrg2844>
- [7] A. Bonin, E. Bellemain, P. Bronken Eidesen, F. Pompanon, C. Brochmann, and P. Taberlet, “How to track and assess genotyping errors in population genetics studies,” *Molecular ecology*, vol. 13, no. 11, pp. 3261-3273, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02346.x>
- [8] J.-B. Ledoux, D. Aurelle, J.-P. Féral, and J. Garrabou, “Molecular forensics in the precious Mediterranean red coral, *Corallium rubrum*: testing DNA extraction and microsatellite genotyping using dried colonies,” *Conservation Genetics Resources*, vol. 5, pp. 327-330, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9795-2>
- [9] E. R. Mardis, “The impact of next-generation sequencing technology on genetics,” *Trends in genetics*, vol. 24, no. 3, pp. 133-141, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.12.007>
- [10] Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81-92. 2016. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.28>
- [11] J. F. Holbrook, D. Stabley, and K. Sol-Church, “Exploring whole genome amplification as a DNA recovery tool for molecular genetic studies,” *Journal of biomolecular techniques: JBT*, vol. 16, no. 2, p. 125, 2005.
- [12] A. Maciejewska, J. Jakubowska, and R. Pawłowski, “Whole genome amplification of degraded and nondegraded DNA for forensic purposes,” *International journal of legal medicine*, vol. 127, pp. 309-319, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0764-9>
- [13] T. Cserkés, Z. Aczél-Fridrich, Z. Hegyeli, S. Sugár, D. Czabán, O. Horváth, G. Sramkó., “Rediscovery of the Hungarian birch mouse (*Sicista subtilis trizona*) in Transylvania (Romania) with molecular characterisation of its phylogenetic affinities,” *Mammalia*, vol. 79, pp. 215 - 224, 2014. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2013-0167>
- [14] K. Bannick, “Mechanisms to Combat DNA Degradation,” 2021.
- [15] R. Alaeddini, S. J. Walsh, and A. Abbas, “Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review,” *Forensic science international: genetics*, vol. 4, no. 3, pp. 148-157, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.09.007>
- [16] H. Gill-King, “Chemical and ultrastructural aspects of decomposition,” in *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains*, 1997, pp. 93-108: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781439821923.sec2>
- [17] H. N. Poinar and B. A. Stankiewicz, “Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 96, no. 15, pp. 8426-8431, 1999. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8426>
- [18] G. Romanowski, M. G. Lorenz, and W. Wackernagel, “Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, no. 4, pp. 1057-1061, 1991. <https://doi.org/10.1128/aem.57.4.1057-1061.1991>
- [19] S. Pääbo, “Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA,” *nature*, vol. 314, no. 6012, pp. 644-645, 1985. <https://doi.org/10.1038/314644a0>
- [20] D. Mitchell, E. Willerslev, and A. Hansen, “Damage and repair of ancient DNA,” *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 571, no. 1-2, pp. 265-276, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.060>
- [21] M. T. P. Gilbert, I. Barnes, M.J. Collins, C. Smith, J. Eklund, J. Goudsmit, H. Poinar, A. Cooper., “Long-term survival of ancient DNA in Egypt: Response to Zink and Nerlich (2003),” *American journal of physical anthropology*, vol. 128, no. 1, pp. 110-114, 2005. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20045>
- [22] K. R. Chien, J. Abrams, A. Serroni, J. T. Martin, and J. L. Farber, “Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 253, no. 13, pp. 4809-4817, 1978. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)30461-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30461-1)
- [23] Y. Bai, W. Lin, Jie Xu, J. Song, D. Yang, Y. E. Chen, L. Li, Y. Li, Z. Wang, J. Zhan., “Improving the genome assembly of rabbits with long-

- read sequencing,” *Genomics*, vol. 113, no. 5, pp. 3216-3223, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.05.031>
- [24] S. V. Drovetski, M. Raković, G. Semenov, I. V. Fadeev, and Y. A. Red’kin, “Limited phylogeographic signal in sex-linked and autosomal loci despite geographically, ecologically, and phenotypically concordant structure of mtDNA variation in the Holarctic avian genus *Eremophila*,” *PLoS One*, vol. 9, no. 1, p. e87570, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087570>
- [25] H. N. Amarilla-Stevens, R. D. Stevens, C. D. Phillips, and R. D. Bradley, “Temporal rate of postmortem DNA degradation in archived tissue samples: evidence from liver and muscle,” *Journal of Mammalogy*, vol. 104, no. 1, pp. 194-202, 2023.
- [26] T. Lindahl, “Instability and decay of the primary structure of DNA,” *nature*, vol. 362, no. 6422, pp. 709-715, 1993.
- [27] W. Bär, A. Kratzer, M. Mächler, and W. Schmid, “Postmortem stability of DNA,” *Forensic science international*, vol. 39, no. 1, pp. 59-70, 1988. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyac089>
- [28] C. F. Graham, T.C Glenn, A.G Mc. Arthur, D.R. Boreham, T. Kieran, S. Lance, R.G. Manzon., “Impacts of degraded DNA on restriction enzyme associated DNA sequencing (RADS eq),” *Molecular ecology resources*, vol. 15, no. 6, pp. 1304-1315, 2015. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12404>
- [29] J. Blethrow, N. Sisneros, S. Chackraborty., “Best practices for whole genome sequencing using the sequel system,” PacBio, Menlo Park, California, USA, 2018.
- [30] J. E. McCormack, B. C. Faircloth, N. G. Crawford, P. A. Gowaty, R. T. Brumfield, and T. C. Glenn, “Ultraconserved elements are novel phylogenomic markers that resolve placental mammal phylogeny when combined with species-tree analysis,” *Genome research*, vol. 22, no. 4, pp. 746-754, 2012. <https://doi.org/10.1101/gr.125864.111>
- [31] L. Lah L, D.Trense, H.Benke, P. Berggren, Þ. Gunnlaugsson, C. Lockyer, A. Öztürk, B. Öztürk., “Spatially explicit analysis of genome-wide SNPs detects subtle population structure in a mobile marine mammal, the harbor porpoise,” *PloS one*, vol. 11, no. 10, p. e0162792, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162792>
- [32] Tserendulam Batsukh, Ulziisaikhan Tumendemberel, Delgerzul Baatar. “Importance of genetic analysis and genomic tools for wild life conservation”. *Proceedings of the Institute of Biology special edition*. 2023.
- [33] <https://www.illumina.com/science/sequencing-method-explorer/kits-and-arrays/ddradseq.html>

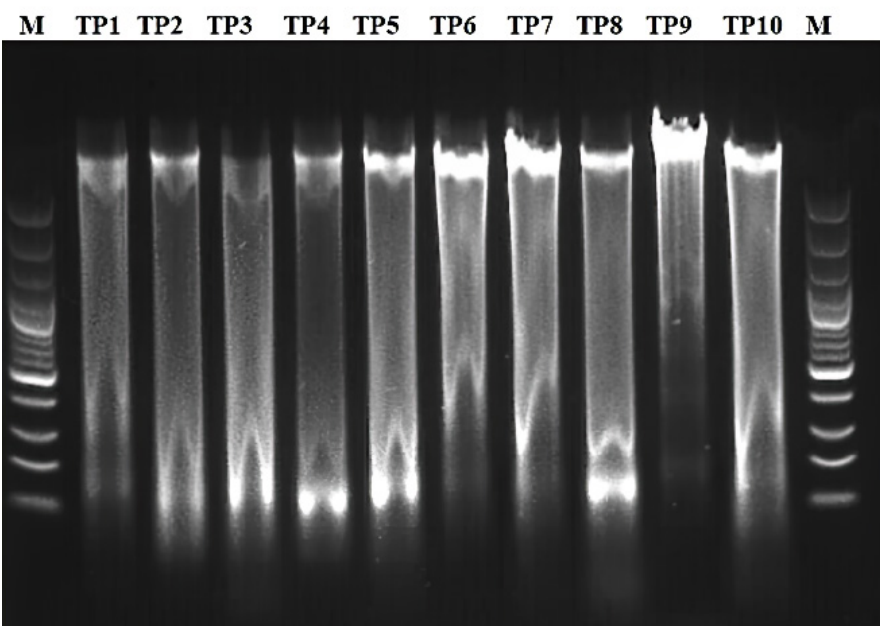
Хавсралт 1.



1-р зураг. Хатаасан болон силика гелинд хадгалсан эдийн дээжээс ялгасан геномын ДНХ-ийн гель электрофореграм. *Ovis ammon* 1-30 Гельд: 1мкл геном+1мкл лоадинг, М -GeneRuler 100bp, 150В-д 45мин гүйлгэв.



2-р зураг. Спиртэд хадгалсан өөхөн сэлүүрээс ялгасан геномын ДНХ-ийн гель электрофореграм. HT-*Hucho taimen* 21-29, М -GeneRuler 100bp, 150В-д 45мин гүйлгэв.



3-р зураг. Ойн шийхнүүхэйн элэгнээс ялгасан задарсан геномын ДНХ-ийн гель электрофореграм. TP-Tree pipit 1-10 дээжүүд, М -GeneRuler 100bp, 150В-д 45 мин гүйлгэв.

Хавсралт 2

1-р хүснэгт. RAD sequencing сан бэлдэхэд ашигласан дээжийн мэдээлэл. ДНХ-ийн концентрацыг QUBIT кит ашиглан шалгасан бөгөөд энэ нь давхар утаслаг ДНХ-ийн концентрацыг илрүүлэхдээ хамгийн тохиромжтой багаж юм. Үүгээр геномын судалгаанд ашиглах ДНХ-ийн концентрацыг хэмжсэнээр судалгаанд шаардлагатай ДНХ бүхий дээжийг сонгон цаашид судалгааг хийдэг. Мөн ДНХ-ийн концентрац хамгийн багадаа 10нг/мкл байх хэрэгтэй. Учир нь геномын судалгааг хийх сан бэлдэхэд цэвэрлэх шат маш их байдаг учраас ДНХ-ийг их алддаг. Мөн ДНХ-ийг задарсан үгүйг эхлээд агарозоор шалгахаас өөр арга байдаггүй. Яагаад гэвэл тухайн дээж задарсан ч ДНХ ямар нэг хэмжээгээр байх нь тодорхой учраас хамгийн чухал шаардлага нь ДНХ-ийн чанар сайн байх ёстой. Энэ нь задрал явагдаагүй урт фрагмент бүхий ДНХ юм.

№	Зүйлийн нэр	Өгсөн нэршил	Он	Дээжийн төрөл	Хадгалалт	Концентрац (нг/мкл)
1	Тул <i>Hucho taimen</i>	НТ1	2021	Өөхөн сэлүүр 1см	96% Этанол	104.00
2		НТ2				35.00
3		НТ3				30.00
4		НТ4				108.00
5		НТ7	2020			75.4
6		НТ8				65.8
7		НТ9				68.4
8		НТ10				74.6
9		НТ12	2021			62.8
10		НТ13				60.8
11		НТ14				47.8
12		НТ15				47.2
13		НТ16	2020			35.8
14		НТ17				28.4
15		НТ18				51.00
16		НТ20				22.6
17		НТ21	2022			16.7
18		НТ22				26.2
19		НТ23				12.1
20		НТ24				83.00
21		НТ26	2022			19.8
22		НТ27				12.7
23		НТ28				18.1
24		НТ29				54.8

1	Аргаль хонь <i>Ovis ammon</i>	OA21	2017	Сэг зэмээс авсан арьс, булчингийн эд	Цаасан уут	39.4	
2		OA28-1				76.1	
3		OA9	2020		Силика гель	76.2	
4		OA11				14.2	
5		OA12				47.00	
6		OA14				99.00	
7		OA26				58.2	
8		OA15	2021			12.00	
9		OA2	2019			10.1	
10		OA4				20.00	
11		OA5				25.00	
12		OA6				27.6	
13		OA8				27.2	
14		OA18				50.00	
15		OA19				54.00	
16		OA20				10.1	
17		OA1	2021			49.2	
18		OA3				25.6	
19		OA13				23.6	
20		OA17				10.1	
21		OA22				38.4	
22		OA23				36.4	
23		OA29				29.2	
24		OA30				15.3	
1	Ойн шийхнүүхэй <i>Anthus trivialis</i>	TP1	2021	Бүтэн элэг		96% Этанол	7.4
2		TP2					3.5
3		TP3			1.9		
4		TP4			6		
5		TP5			6.6		
6		TP6			3.3		
7		TP7			6.6		
8		TP8			8.5		
9		TP9			6		
10		TP10			9.9		
11		TP11			4.8		
12		TP12			4.4		
13		TP13			9.2		
14		TP14			8.5		
15		TP15			2.8		
16		TP16			0.7		
17		TP17			5.7		
18		TP18			6.6		
19		TP19			9.8		
20		TP20			1.4		
21		TP21			7.5		