

Veterinarski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu

Lana Pađen

**Izrada vrsno specifičnih početnica za umnažanje
mitohondrijske DNA divljih životinja Hrvatske**

Diplomski rad

Zagreb, 2010.

ZAVOD ZA BIOLOGIJU

Predstojnik: Prof.dr.sc. Ksenija Vlahović

Voditelji: dr. sc. Tomislav Gomerčić

Povjerenstvo za ocjenu diplomskog rada:

- 1) Prof. dr. sc. Đuro Huber
- 2) Prof. dr. sc. Ksenija Vlahović
- 3) Dr. sc. Tomislav Gomerčić
- 4) Prof. dr. sc. Alena Slavicu (zamjena)

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za biologiju, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je izrađen pod vodstvom dr. sc. Tomislava Gomerčića.

Ovaj diplomski rad temeljen je na studentskom znanstvenom radu "Izrada vrsno specifičnih početnica za umnažanje mitohondrijske DNA divljih životinja Hrvatske" koji je nagrađen Rektorovom nagradom 2009. godine.

Zahvaljujem se svojim mentorima dr. sc. Tomislavu Gomerčiću, dr. vet. med. i Magdi Sindičić dr. vet. med. na strpljenju, stručnom i tehničkom vodstvu pri izradi ovog rada.

Sadržaj

Uvod	5
Materijal i metode	13
Rezultati	16
Rasprava	20
Zaključci	22
Literatura	23
Sažetak	26
Abstract	27
Životopis	28

Uvod

Podatak o prisutnosti životinjskih vrsta na određenom području osnovni je ekološki parametar i temelj za razumijevanje populacijske ekologije. To je također i temeljni podatak za istraživanje, zaštitu i upravljanje, kako tih životinjskih vrsta, tako i samog područja. Europska zakonska regulativa zahtjeva izradu Planova upravljanja i Akcijskih planova za zaštitu ugroženih životinjskih vrsta te staništa važnih za očuvanje biološke raznolikosti. Izrada i provedba takvih planova nemoguća je bez znanstvenih podataka o prisutnosti i gustoći vrsta na određenom području. Taj zadatak nije lagan budući da su jedinke mnogih, prvenstveno ugroženih vrsta prisutne u malom broju te su teško dostupne proučavanju. Istraživačke metode kao što su hvatanje i manipuliranje životinjama u ovim su slučajevima teško izvedive i često odstupaju od etičkih načela. Znakovi prisutnosti kao izmet, urin ili dlaka često su jedini dostupan izvor podataka. Da bi se ti problemi nadvladali razvijena je neinvazivna genetička metoda koja kao predmet istraživanja koristi uzorke s malom količinom DNA kao što su izmet, dlaka, urin i različiti uzorci tkiva. Iz uzoraka se izolira mitohondrijska DNA (mtDNA) i pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR) umnaža dio koji se naziva kontrolna regija. Prisutnost PCR produkta provjerava se elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu.

Mitohondriji se nalaze u gotovo svim stanicama u dovoljnom broju pa se mitohondrijska DNA može izolirati iz svih tkiva, iako s različitim prinosom (WHITE i sur. 1998.). Mitohondrijska DNA je koristan genetski biljeg jer je prisutna u svim životinjskim tkivima, ima mali genom jednostavne strukture, haploidna je, naslijeđuje se od majke (uz neke iznimke), nema nekodirajućih dijelova (introna) i ima različitu stopu evolucije u svojim pojedinim dijelovima, što omogućava rješavanje filogenetskih pitanja na različitim taksonomskim razinama (ZHANG i HEWITT, 1996.). Upravo majčinsko naslijeđivanje i haploidnost dvije su glavne razlike mitohondrijskog i nuklearnog genoma (BALLARD i

Kontrolna regija je nekodirajući dio mtDNA dužine oko 1000 bp sa sekvencama koje djeluju u začetku replikacije i transkripcije mitohondrijskog genoma (HARRISON, 1989; ODAK, 2004.). U kontrolnoj regiji kralješnjaka nalazi se D – petlja (D – loop), trolančana struktura koja nastaje tijekom replikacije, a često se taj naziv upotrebljava i kao sinonim za kontrolnu regiju (TABERLET, 1996., WHITE i sur., 1998.). Kontrolna regija ne kodira za sintezu proteina i zbog toga ne podliježe prirodnoj selekciji, još jedan od razloga zbog kojeg je pogodna za filogenetska istraživanja. MtDNA podložna je brzom evoluciji i izuzetno je

vrijedan genetski marker u populacijskoj i evolucijskoj biologiji. Dok su geni za rRNA molekulu izuzetno konzervativni, područje kontrolne regije često je podložno promjenama (SHEDLOCK i sur.,1992). U sisavaca je brzina evolucije mtDNA veća i do 10 puta od jezgrinih gena, a dijelovi kontrolne regije evoluiraju 4-5 puta brže od ostatka molekule mtDNA (TABERLET 1996., PAGE i HOLMES 1998.). Razlog tome je nedostatak nekih enzima u mitohondriju koji služe za popravak oštećenja, a koji postoje u jezgri. Velika varijabilnost u brzini evolucije objašnjava se time što jedan od dva lanca zavojnice biva premješten sintezom novog lanca tijekom replikacije. Za istraživanja srodnih vrsta ili populacija jedne vrste koriste se varijabilniji dijelovi molekule koji daju veću moć razlučivanja, a to su gen za citokrom *b* i kontrolna regija (PALUMBI 1996.). Poznato je da je kontrolna regija jedan od najvarijabilnijih dijelova mtDNA.

Važna osobina mtDNA je da se naslijeđuje majčinom linijom (premda su poznate i neke iznimke), bez rekombinacije. Upravo to svojstvo materinjskog naslijeđivanja i brzina evolucije čini mtDNA važnim genetskim biljekom u molekularno-genetskim istraživanjima populacija, u sistematci vrsta i evoluciji. Počevši od 1980-ih, mnoga su istraživanja populacijske genetike, sistematike vrsta, filogenije i evolucije usredotočena na mitohondrijski genom. Ball i sur. (1988.) istražili su filogeografsku strukturu populacije crvenokrlog kosa (*Agelaius phoeniceus*) u Sjevernoj Americi na osnovu varijacija mtDNA. Barratt i sur. (1997.) pokazali su usporedbom slijeda duljine 630 parova baza gena za citokrom *b* da su dva fonička tipa europskog šišmiša *Pipistrellus pipistrellus* zapravo dvije različite vrste razdvojene prije 5 - 10 milijuna godina. Analiza polimorfizama mtDNA primjenjuje se u rješavanju taksonomskih pitanja, prepoznavanju vrsta, otkrivanju filogenetskih odnosa, praćenju genetske raznolikosti, rasvjetljavanju filogeografske strukture populacija i njihove povijesti.

Uporaba mtDNA je sve više zastupljena u filogenetskim i populacijsko genetičkim istraživanjima. Za pronalazak nukleotidnih razlika u početku su se koristili restrikcijski

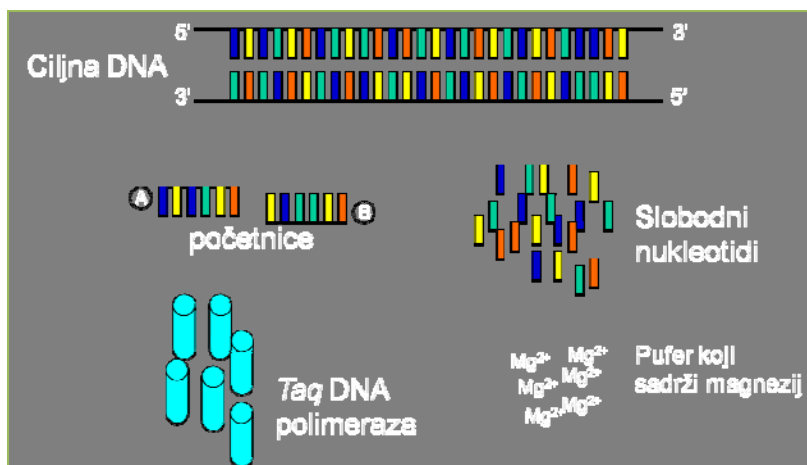
enzimi, a kasnije, s razvojem PCR metodologije i primjenjivosti univarzalnih početnica je omogućeno umnažanje mtDNA.

Molekularne metode najčešće uključuju analizu sljedova mtDNA, a sekvenciranje DNA daje najveću moguću rezoluciju genetičke raznolikosti. Jedan od najvažnijih čimbenika za uspješno sekvenciranje DNA je pravilan dizajn početnice.

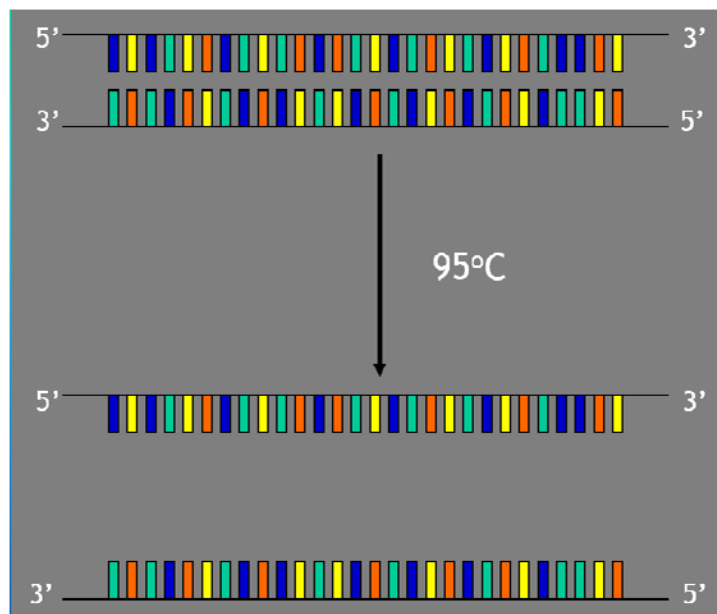
Početnica je kratak, sintetizirani oligonukleotid koji se koristi u molekularnim istraživanjima. Izrađene su da prepoznaju točno određeni slijed nukleotida u DNA, koji zatim služi kao kalup na koji djeluje DNA polimeraza i umnaža željeni dio lanca. Jedan od najvažnijih čimbenika za uspješno umnažanje DNA je pravilan dizajn početnice, koji omogućava vrsnu specifičnost. Početnice trebaju biti dovoljno specifične (komplementarne) za određeni gen i ona je ključan kriterij za uspješnost lančane reakcije polimerazom.

Lančana reakcija polimerazom (PCR) (od engl. polymerase chain reaction) je metoda umnažanja određenog odsječka DNA u uvjetima *in vitro*, koja ima značajnu primjenu u molekularnoj biologiji, molekularnoj medicini, dijagnostici nasljednih i stečenih bolesti, dijagnostici patogena, u forenzici itd. Umnažanje DNA molekule PCR metodom provodi se u DNA-termobloku (PCR uređaju), što omogućava umnažanje ciljnog slijeda više od milijardu puta u samo dva sata. U stanici se replikacija odvija uz pomoć puno različitih proteina i enzima dok se kod PCR reakcije sve izvodi jednim jedinim enzimom DNA polimerazom. U DNA replikaciji se DNA enzimatski odmotava, denaturira, RNA polimeraza sintetizira male komplementarne početnice te se DNA polimeraza veže pa replicira DNA. Tijekom PCR reakcije visoka temperatura se koristi za denaturaciju ciljne DNA (DNA kalup) u osnovne lance (Slika 3.), sintetske početnice koriste se umjesto malih RNA koje uokviruju regiju koja se želi umnožiti; početnice se vežu (hibridizacija) za komplementarne lance, jedna početnica na jedan, druga početnica na drugi lanac (Slika 4.); tako dolazi do produžavanja lanca DNA polimerazom; ponavljanje ciklusa ide 30-35 puta (Slika 5.). U reakciju PCR se dodaje

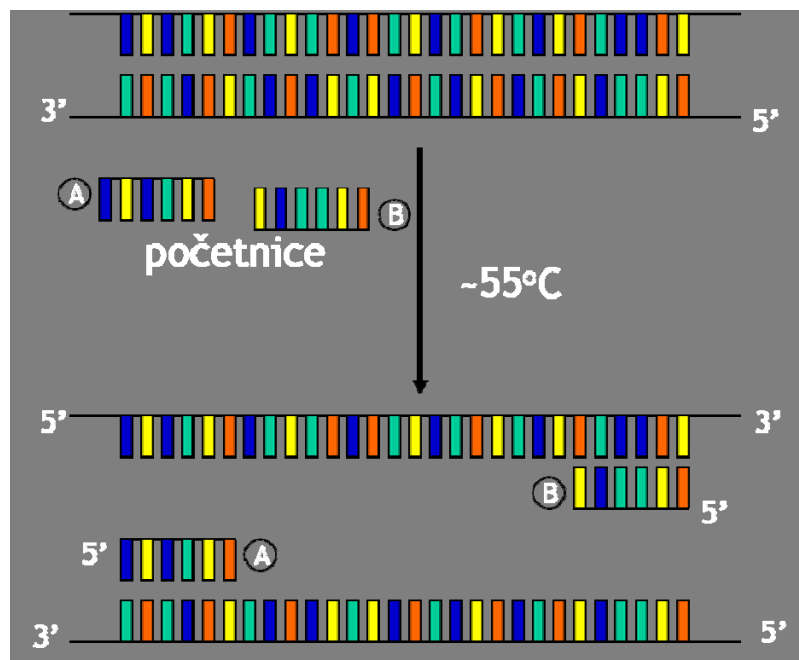
molekula DNA (određeni uzorak čija se DNA želi umnožiti), termorezistentni enzim DNA polimeraza, s odgovarajućim puferom, dvije specifične početnice komplementarne 3' – krajevima DNA koja se umnožava (DNA kalup), četiri deoksinukleotida, kofaktor $MgCl_2$ (Slika 2.) Program PCR uređaja u kojem se odvija PCR reakcija je slijedeći: 1-10 min inicijalne denaturacije 94-96 °C, jedna do nekoliko min pri 50-65 °C tijekom kojih se početnice hibridiziraju na denaturirane lance, jedna do nekoliko min pri 72 °C tijekom koje DNA polimeraza nastavlja lanac DNA. Svaki ciklus ima duplo više molekula, pa ih nakon 30 ciklusa teoretski nastane milijarda. Neke od inovacija koje su omogućile upotrebu PCR reakcije su temperaturno stabilna DNA polimeraza izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus*. Ovaj enzim, nazvan Taq polimeraza, je aktivan usprkos ciklusima zagrijavanja i hlađenja te PCR uređaji (DNA thermal cyclers) koji koriste kompjutersku tehnologiju za finu regulaciju temperature u ciklusima.



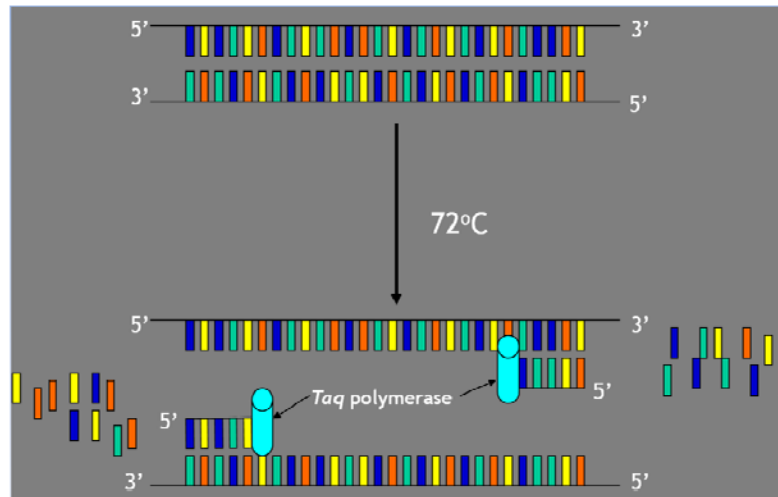
Slika 2. Sadržaj smjese za PCR reakciju



Slika 3. Denaturacija DNA lanca



Slika 4. Vezanje specifičnih početnica na DNA lanac



Slika 5. Produljivanje PCR produkta

Poželjno je da temperatura hibridizacije ili sparivanja (T_a , *annealing temperature*) bude između 50-65°C. Temperatura koja se odabire za prvu reakciju PCR treba biti 5°C manje od temperature taljenja (T_m , od engl. *melting temperature*), a koja se izračunava po formuli.

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

U teoriji postoje pravila o reakciji PCR, ali u praksi ne postoji univerzalni protokol, pa svaku reakciju PCR treba optimizirati mijenjajući sve parametre pojedinačno

- DNA kalup (potrebna je vrlo mala količina; nekad mogu smetati nečistoće, ali vrlo često zbog razrjeđenja to nije toliko bitno)
- Taq polimeraza (ne smije je biti ni previše ni premalo)
- Početnice (temperatura hibridizacije je bitna)
- $MgCl_2$ (par početnica je više ili manje osjetljiv na promjenu koncentracije)
- Određeni dodatci PCR reakciji mogu poboljšati specifičnost

Nakon svakog ciklusa broj kopija je dvostruko veći nego u prethodnom ciklusu $2^{30}=1,073,741,824$. Ipak eksponencijalni porast broja kopija je ograničen.

Cilj ovoga rada je razvijanje neinvazivne metode za razlikovanje životinjskih vrsta iz uzoraka s malom količinom DNA. Da bi se to postiglo cilj je bio dizajnirati početnice za umnažanje kontrolne regije mtDNA različitih vrsta divljih životinja koje su najčešći stanovnici hrvatskih šuma (jelen, lisica, medvjed, vuk, srna i divlja svinja), a na temelju kojih bi iz pronađenih uzoraka mogli identificirati vrstu životinje koristeći samo izolaciju DNA, PCR i elektroforezu. Ta metoda bi olakšavala ekološka istraživanja i gospodarenje s određenim životinjskim vrstama.

Materijali i metode

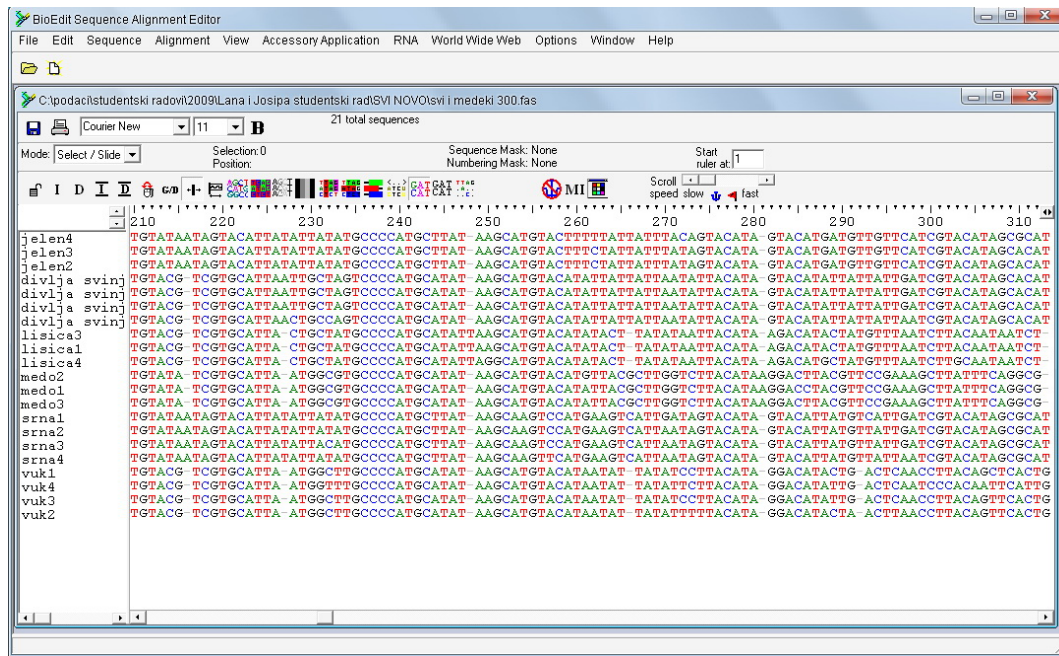
Za izradu početnica koristila sam sekvence mitohondrijske DNA ciljnih životinjskih vrsta iz genske baze podataka, GenBank, koja se nalazi na internet adresi: www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/. U radu sam koristila po tri sekvence kontrolne regije mtDNA jelena (*Cervus elaphus*), lisice (*Vulpes vulpes*) i medvjeda (*Ursus arctos*) te četiri kontrolne regije mtDNA vuka (*Canis lupus*), srne (*Capreolus capreolus*) i divlje svinja (*Sus crofa*). U tablici 1. navedena je vrsta životinje, identifikacijski broj u genskoj bazi, te zemljopisno područje iz kojeg potječu uzorci čije su sekvence korištene u ovom radu.

Tablica 1. Podaci o korištenim sekvencama preuzetim iz GenBank baze

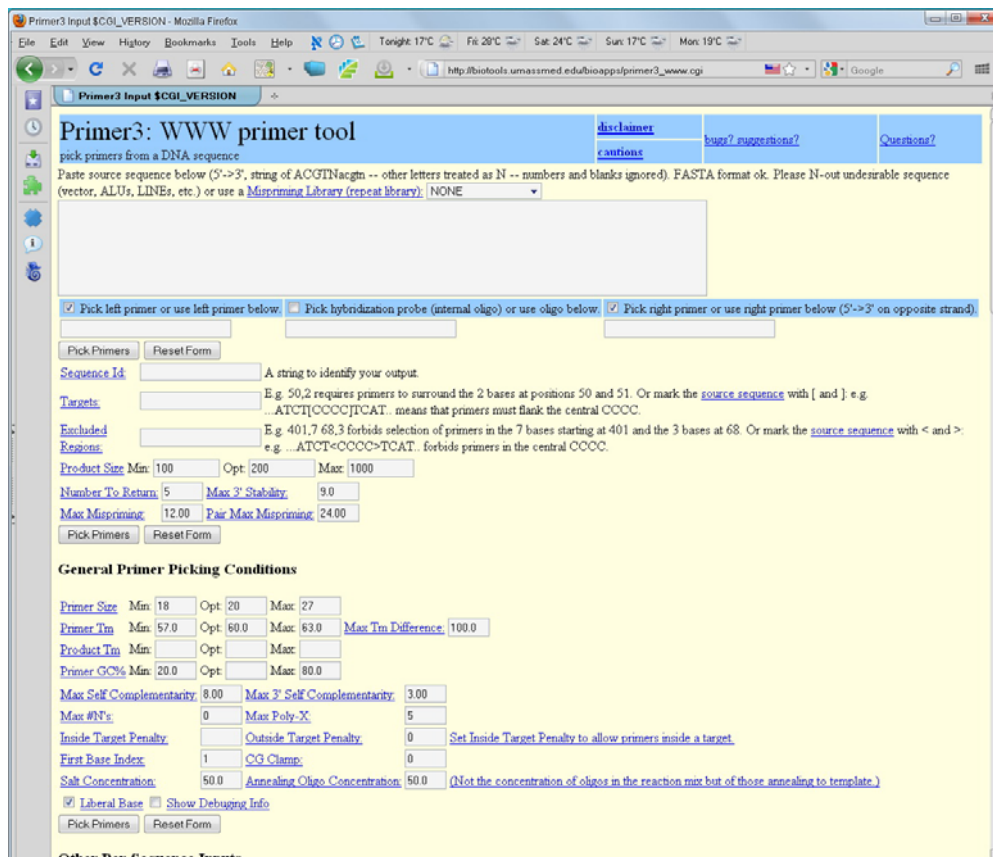
oznaka životinje	identifikacijski broj GenBank baze	područje iz kojeg potječe uzorak	referenca
jelen 4	EU004016	Norveška	SKOG i sur., 2007
jelen 3	EU004017	Norveška	SKOG i sur., 2007
jelen 2	EU004018	Norveška	SKOG i sur., 2007
divlja svinja 1	EU979215	Kina	WANG i sur., 2008
divlja svinja 4	EU979212	Kina	WANG i sur., 2008
divlja svinja 3	EU979213	Kina	WANG i sur., 2008
divlja svinja 2	EU979214	Kina	WANG i sur., 2008
lisica 3	AF338801	Francuska	VALIERE i sur., 2002.
lisica 1	AF338789	Francuska	VALIERE i sur., 2002.
lisica 4	AF338800	Francuska	VALIERE i sur., 2002.
medvjed 2	AB055141	Japan	MASUDA i sur., 2001
medvjed 1	AB055136	Japan	MASUDA i sur., 2001
medvjed 3	AB055139	Japan	MASUDA i sur., 2001
srna 1	DQ114763	Španjolska	PAJARES i sur., 2005.
srna 2	DQ114760	Španjolska	PAJARES i sur., 2005.
srna 3	DQ114761	Španjolska	PAJARES i sur., 2005.
srna 4	DQ114762	Španjolska	PAJARES i sur., 2005.
vuk 1	FJ213916	SAD	STRAUGHAN i sur., 2008.
vuk 4	FJ213913	SAD	STRAUGHAN i sur., 2008.
vuk 3	FJ213914	SAD	STRAUGHAN i sur., 2008.
vuk 2	FJ213915	SAD	STRAUGHAN i sur., 2008.

Pomoću programskog dodatka u Microsoft Wordu, MBCS1.2, sekvence mtDNA pretvorile smo u fasta format, da bi ih mogle koristiti u daljnjoj obradi. Koristeći programe BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 7.0.9.0 (HALL, 1999.) (Slika 6.) i ClustlW Multiple alignment (THOMPSON i sur., 1994.), sekvence različitih životinja iste vrste smo usporedile međusobnim poravnanjem (multiple alignment). Pomoću internetskog programa „Primer 3“ http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi (Slika 7.) izradile smo početnice poštujući pravila za dizajn početnica (INNIS I GELFAND, 1990):

1. početnice bi trebale biti veličine 17-28 nukleotida
2. sadržaj G-C parova bi se trebao kretati oko 50-60%, izbjegavati duge A-T i G-C parove
3. na 3' kraju početnice preferira se G ili C dušična baza
4. temperatura denaturacije (T_m) bi se trebala kretati između 55-80°C; razlika T_m između jednog para početnica može iznositi 2-3 °C
5. ako se na 3' kraju početnice nalaze ≥ 3 C ili G dušičnih baza, može doći do pogrešnog vezanja početnice na području bogatog G-C parovima
6. 3' krajevi početnica ne smiju biti komplementarni jer će inače doći do stvaranja dimera početnica
7. treba izbjegavati komplementarnost početnice samoj sebi koja može dovesti do stvaranja sekundarnih struktura kao što su ukosnice
8. na 5' kraju početnice preferira se 1 ili 2 G-C par, a na 3' kraju ne više od 1 G-C para.



Slika 6. Izgled programa BioEdit Sequence Alignment Editor



Slika 7. Izgled web programa „Primer 3“

Rezultati

Koristeći kompjuterske programe i poštujući pravila za dizajn početnica, izradila sam početnice za umnažanje kontrolne regije mitohondrijske DNA jelena, lisice, medvjeda, vuka, srne i divlje svinje (Tablica 2 i Tablica 3).

Tablica 2. Specifične početnice za određene vrste sa slijedom nukleotida, temperaturom denaturacije, duljinom početnice te očekivanom duljinom PCR produkta.

Slijed nukleotida u početnici	Vrsta životinje	Tm °C	Duljina parova baza	Duljina PCR produkta
5' GTAAATCTTATGCGCTTATAG 3'	jelen	57.7	21	192
3' GGACGGGATATGCATGTT 5'		65.2	18	
5' GCCCATGCTCACACATAACTG 3'	divlja	70.0	21	185
3' GTCCCGTAACCATGACTGA 5'	svinja	66.9	20	
5' CTTGCCCTATGTACGTCGTGC 3'	lisica	71.3	21	241
3' TAGAAACCCCCACGTTGACA 5'		69.8	20	
5' CTTATTTTCAGGCGTATGGTCT 3'	medvjed	64.5	21	52
3' AGCTCCCGGACTAAGTG 5'		62.1	17	
5' ACCCAATTATATACGCTACAT 3'	srna	59.2	21	218
3' GACTTAATGCGCTATG 5'		53.2	16	
5' GAATCACCCCTACTGTGCTAC 3'	vuk	64.7	21	74
3' GCCATTAATGCACGACGTAC 5'		67.5	20	

Početnice za jelena duge su 21 i 18 bp, vežu se na 78. i 120. mjesto te daju PCR produkt duljine 192 bp. Početnice za divlju svinju duge su 21 i 20 bp, vežu se na 485. i 155. mjesto te daju PCR produkt duljine 185 bp. Početnice za lisicu duge su 21 i 20 bp, vežu se na 25. i 299. mjesto te daju PCR produkt duljine 241 bp. Za medvjeda smo dizajnirale početnice duge 21 i 17 bp, koje se vežu na 134. i 220. mjesto a PCR produkt je dug 52 parova baza. Za srnu su početnice duge 21 i 16 bp, vežu se na 21. i 106. mjesto, s PCR produktom dugim 218 bp. Za vuka su dizajnirane vrsno specifične početnice duge 21 i 20 bp, vežu se na 68. i 157. mjestu, a PCR reakcija rezultira proizvodom dugim 74 parova baza.

[illegible]

```

srna 3      T..CT.A.....T.....T.....A.....C.....
srna 4      T..CT.A.....T.....T.....A.....C.....
vuk 1      CTG.GC..C.TCAG...CTCCA...CT.C.C.CC--C...CG-.C.G...GGCT...
vuk 4      CTG.GC..C.TCAG...CTCCAGGT...CCCT.C.T.CCTCC.C...CG-.C.G...GG.T...
vuk 3      CTG.GC..C.TCAG...CTCCA...CCT.C.C.CC--C...CG-.C.G...GGCT...
vuk 2      CTG.GC..C.TCAG...CTCCA...CCT.C.C.CC--C...CG-.C.G...GGCT...

          170      180      190      200      210      220      230      240
jelen 4      TGCTTAT-AAGCATGTACTTTTATTATTACAGTACATA-GTACATGATGTTGTCATCGTACATAGCGCAT--TAAGT
jelen 3      .....C.....T.....A.....
jelen 2      .....C.....T.....A.....
lisica 3      ..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----
lisica 1      ..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----
lisica 4      ..A..T.G.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...C.A.GT..A..T.G..ATAAT.T-----
divlja svinja 1  ..A.....A.A.....A.T.T.....AT.A.A.G.....A..ATC.T..
divlja svinja 4  ..A.....A.A.....A.T.T.....AT.A.A.G.....A..ATC.T..
divlja svinja 3  ..A.....A.A.....A.T.T.....AT.A.A.G.....A..ATC.T..
divlja svinja 2  ..A.....A.A.....A.T.T.....AT.A.A.G.....A..ATC.T..
medvjed 2      ..A.....A.G...CGC...GGTCT...A.G.T.ACGT.CCGAA.GTT.TT.CAG..G-----
medvjed 1      ..A.....A.A...CGC...GGTCT...A.G.C.ACGT.CCGAA.GTT.TT.CAG..G-----
medvjed 3      ..A.....A.A...CGC...GGTCT...A.G.T.ACGT.CCGAA.GTT.TT.CAG..G-----
srna 1          ..A..C.A.GAAG.C...G.T.....T...CA..G.....
srna 2          ..A..C.A.GAAG.C...A.T.....T...A..G.....
srna 3          ..A..C.A.GAAG.C...A.T.....T...A..G.....
srna 4          ..A..T.A.GAAG.C...A.T.....T...A..A.....
vuk 1          ..A.....A.AA...-TA.AT.CT.....G...AC..-AC.CA.C.T...GCT.A.TG----A.
vuk 4          ..A.....A.AA...-TA.ATTCT.....G...AT..-AC.CA...CC...ATT.ATTG----A.
vuk 3          ..A.....A.AA...-TA.AT.CT.....G...AT..-AC.CA.C.T...GTT.A.TG----A.
vuk 2          ..A.....A.AA...-TA.ATTTT.....G...AC.A-AC..A.C.T...GTT.A.TG----A.

          250      260      270      280      290      300      310      320
jelen 4      CAAATCAATTCTTGTCACATGCATATCCCGTCCCTAGATCAGGAGCTTGATCACCATGCCGCGTGAACACGACACCC
jelen 3      .....
jelen 2      .....
lisica 3      .T.TCAGGAA.A.A.ATGAC...CG..A.T.AGT.C...-T.A.G.A..T.....T..A.....T...T..
lisica 1      .TGTACAGGAG.A.A.ATGAC...CG..A.T.AGT.C...-T.A.G.A..T.....T..A.....T...T..
lisica 4      .T.TCAGGAG.A.A.ATGAC...CG..A.T.AGT.C...-T.A.G.A..T.....T..A.....T...T..
divlja svinja 1  .....C..CA.....A.CA..A.....A.CT.....
divlja svinja 4  .....C..CA.....A.CA..A.....A..T.....
divlja svinja 3  .....C..CA.....A.CA..A.....A..T.....
divlja svinja 2  .....C..CA.....A.CA..A.....A..T.....
medvjed 2      -----T.TGGTC...CA.G...T..T..A.T.AGT.CG--G...A.....G...T..A.....T..
medvjed 1      -----T.TAGTC...A.G...T..T..A.T.AGT.CG--G...A.....G...T..A.....T..
medvjed 3      -----T.TGGTC...A.G...T..T..A.T.AGT.CG--G...A.....G...T..A.....T..
srna 1          .....CG.C.....G.....A.....
srna 2          .....TG.C.....G.....A.....
srna 3          .....TG.C.....G.....A.....
srna 4          .....TG.C.....G.....A.....
vuk 1          .T.TCA.CAGT.G..-T.A.....A.T.AGT.C.A--T.....
vuk 4          .T.TCA.CAGT-AA.-C.A.....C..A.T.AGT.C.A--T.....
vuk 3          .T.TCA.CAGT.G..-T.A.....A.T.AGT.C.A--T.....
vuk 2          .T.TCA.CAGT.G..-T.A.....A.T.AGT.C.A--T.....

          330      340      350      360      370      380      390      400
jelen 4      GC-TAGGCAGGGATCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAA-ATTGTGGGGTAGCTATTTAATGAATTTTATCAGACATCT
jelen 3      ...-C.....G-.C.....
jelen 2      .....C.....
lisica 3      TTGCTC.A.-T.....GTC.AC.....TT...C..TG...C.A..C.T.G----
lisica 1      TTGCTC.A.-T.....GTC.AC.....TT...C..TG...C.A..C.T.G----
lisica 4      TTGCTC.A.-T.....TC.AC.....TT...C..TG...C.A..C.T.G----
divlja svinja 1  ...T.....CC.....TT.....G...C...A..G...
divlja svinja 4  ...T.....CC.....TT.....G...C...A..G...
divlja svinja 3  ...T.....CC.....TT.....G...C...A..G...
divlja svinja 2  ...T.....CC.....TT.....G...C...A..G...
medvjed 2      TTGCGA.T.C.TG.AT.....G-.A.....TT...G-TTGA..C.A...T.G....
medvjed 1      TTGCGA.T.C.TG.A.....GG-GG.....TT...G-TTGA..C.A...C.T.G....
medvjed 3      TTGCGA.T.C.TG.A.....GG-GG.....TT...G-TTGA..C.A...C.T.G....
srna 1          ...T.....C.....G-----
srna 2          ...T.....C.....G-----
srna 3          ...T.....C.....G-----
srna 4          ...T.....C.....G-----
vuk 1          .....
vuk 4          .....
vuk 3          .....
vuk 2          .....

          410      420      430      440      450      460      470      480
jelen 4      GGTTCCTTT-----
jelen 3      .....
jelen 2      .....
lisica 3      .....
lisica 1      .....
lisica 4      .....
divlja svinja 1  .....ACTTCAGGACCATCTCACCTAAAATCGCCCACTCTTCCCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTA

```

```

divlja svinja 4 .....ACTTCAGGACCATCTCACCTAAAAATCGCCCACTCTTTCCCCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTA
divlja svinja 3 .....ACTTCAGGACCATCTCACCTAAAAATCGCCCACTCTTTCCCCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTA
divlja svinja 2 .....ACTTCAGGACCATCTCACCTAAAAATCGCCCACTCTTTCCCCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTA
medvjed 2 .....ACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAGACTCCAATCCTACTGACT-----
medvjed 1 .....ACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTACTAACC-----
medvjed 3 .....ACTTCAGGGCCATGATAGCTCTAGATTCCAATCCTACTAACC-----
srna 1 -----
srna 2 -----
srna 3 -----
srna 4 -----
vuk 1 -----
vuk 4 -----
vuk 3 -----
vuk 2 -----

```

```

                                     490       500       510       520
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
jelen 4 -----
jelen 3 -----
jelen 2 -----
lisica 3 -----
lisica 1 -----
lisica 4 -----
divlja svinja 1 ATCAGCCCATGCTCACACATAACTGAGGTTTCATACATTT
divlja svinja 4 ATCAGCCCATGCTCACACATAACTGAGGTTTCATACATTT
divlja svinja 3 ATCAGCCCATGCTCACACATAACTGAGGTTTCATACATTT
divlja svinja 2 ATCAGCCCATGCTCACACATAACTGAGGTTTCATACATTT
medvjed 2 -----
medvjed 1 -----
medvjed 3 -----
srna 1 -----
srna 2 -----
srna 3 -----
srna 4 -----
vuk 1 -----
vuk 4 -----
vuk 3 -----
vuk 2 -----

```

Rasprava

Cilj ovog rada bio je dizajnirati vrsno specifične početnice za umnažanje kontrolne regije mtDNA različitih vrsta divljih životinja koje su najčešći stanovnici hrvatskih šuma (jelen, lisica, medvjed, vuk, srna i divlja svinja), a na temelju kojih bi iz pronađenih uzoraka mogli identificirati vrstu životinje koristeći samo izolaciju DNA, PCR i elektroforezu. Neinvazivne metode za identifikaciju životinjskih vrsta većinom se temelje na detekciji DNA sekvenci, kroz sekvencioniranje i filogenetsku analizu (FARELL i sur. 2000.). Pri tome se najčešće koriste početnice dizajnirane za sekvencioniranje regije koja je konzervirana među različitim vrstama, tako da početnice nisu vrsno specifične i PCR se ne može potvrditi pripadnost vrsti, već je potrebno sekvencionirati PCR produkt i provesti filogenetsku analizu. Izradom vrsno specifičnih početnica htjela sam olakšati i ubrzati identifikaciju životinjskih vrsta koje su najbrojnije u hrvatskim šumama, a da se pri tome mogu koristiti uzorci dobiveni neinvazivnim putem (bez direktnog kontakta sa životinjom) i uzorci s malom količinom DNA. Dakle, upotrebom vrsno specifičnih početnica omogućuje se identifikacija vrste samo pomoću PCR reakcije, a izostavlja se skuplje i dugotrajnije sekvencioniranje. Osim istraživanja prisutnosti i gustoće životinjskih vrsta na određenom području, ova metoda je posebno korisna i za analizu prehrane mesoždera iz uzoraka izmeta, u kojem se DNA donorske vrste, plijena, mikroorganizama, a često i parazita i člankonožaca pojavljuju zajedno a i potrebno je obraditi veliki broj uzoraka. Analiza takvih uzoraka klasičnim metodama neprecizna je, dugotrajna i često rezultira lažno negativnim rezultatom. No ako se pri analizi prehrane iz izmeta koriste vrsno specifične početnice za identifikaciju različitih životinjskih vrsta rezultati će biti iznimno precizni. Ovakve početnice mogu imati i široku primjenu u forenzici, te u slučajevima kada je predmet istraživanja mala količina tkiva u kojem je došlo do razgradnje DNA.

Početnice koje sam izradila specifične su za određenu životinjsku vrstu, što uvelike pridonosi evolucijskim istraživanjima, u ekologiji, zaštiti i gospodarenju pojedinim divljim vrstama. Tako su PALOMARES i sur. (2002.) dizajnirali 4 vrsno specifična primera za istraživanja iberijskog risa, što je uvelike unaprijedilo istraživanje i zaštitu te ugrožene vrste (JOHNSON i sur., 2004; PERTOLDI i sur., 2005). Vrsno specifične početnice za umnažanje citokroma b mitohondrijske DNA dizajnirane su za zvijeri Iberijskog poluotoka (FERNANDES i sur., 2008), dok su početnice u ovom radu prve vrsno specifične početnice za umnažanje kontrolne regije mitohondrijske DNA hrvatskih divljih životinja.

Zaključci

1. Dizajnirano je 6 parova početnica specifičnih za različite vrste životinja; jedan par čini uzvodnu i nizvodnu početnicu. Njihov slijed je slijedeći:

- Uzvodna početnica specifična za jelena 5' GTAAATCTTATGCGCTTATAG 3'
- Nizvoda početnica specifična za jelena 3' GGACGGGATATGCATGTT 5'
- Uzvodna početnica specifična za divlju svinju
5'GCCCCATGCTCACACATAACTG 3'
- Nizvoda početnica specifična za divlju svinju 3'
GTCCCGTAACCATGACTGA 5'
- Uzvodna početnica specifična za lisicu 5' CTTGCCCTATGTACGTCGTGC 3'
- Nizvoda početnica specifična za lisicu 3' TAGAAACCCCCACGTTGACA 5'
- Uzvodna početnica specifična za medvjeda
5' CTTATTTTCAGGCGTATGGTCT 3'
- Nizvoda početnica specifična za medvjeda 3' AGCTCCCGGACTAAGTG 5'
- Uzvoda početnica specifična za srnu 5' ACCCAATTATATACGCTACAT 3'
- Nizvoda početnica specifična za srnu 3' GACTTAATGCGCTATG 5'
- Uzvoda početnica specifična za vuka 5' GAATCACCCCTACTGTGCTAC 3'
- Nizvoda početnica specifična za vuka 3' GCCATTAATGCACGACGTAC 5'

Literatura

- BALL, R.M., S. FREEMAN, F.C. JAMES, E. BERMINGHAM, J.C. AVISE (1998): Phylogeographic population structure of Red-winged Blackbirds assessed by mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 1558-1562
- BALLARD, J.W.O., M.C. WHITLOK (2004): The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13, 729-744.
- CABLES, L. (2001): Mitochondria. Horsepower.
<http://homepages.ihug.co.nz/~lcables/mitochondria.htm>
- FARRELL, LE, J. ROMAN, M.E. SUNQUIST (2000): Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology* 9, 1583–1590.
- FERNANDES, C.A., C. GINJA, I. PEREIRA, R. TENREIRO, M. W. BRUFORD, M. SANTOS-REIS (2008): Species-specific mitochondrial DNA markers for identification of non-invasive samples from sympatric carnivores in the Iberian Peninsula. *Conservation genetics* 9, 691-690.
- HALL, T. A. (1999.): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- HARRISON, G. (1989): Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolution biology. *Tree* 4, 6 – 12.
- INNIS M.A., GELFAND D.H. (1990): Optimization of PCRs. U: Innis, Gelfand, Sninsky, White (ur.): *PCR Protocols*. Academic Press, New York, str. 3-12.
- JOHNSON W.E., J. A. GODOY, F. PALOMARES, M. DELIBES, M. FERNANDES, E. REVILLA, S. J. O'BRIEN (2004): Phylogenetic and Phylogeographic analysis of Iberian lynx population. *Journal of heredity* 95, 19-28.

- ODAK, T. (2004.): Molekularno-biološka obilježja endemske Mekousne pastrve (*Salmothymus obtusirostirs salonitana*). Magistarski rad. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- PAGE, R. D. M., E. C. HOLMES (1998.): Molecular evolution a phylogenetic approach. Oxford University press. Oxford.
- PALUMBI, S.R. (1996.): Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. U: Hillis DM, Moritz C (ed.) Molecular Systematics, 2nd ed.. Sunderland, Sinauer Associates, Inc., 205-247.
- PALOMARES, F., J. A. GODOY, A. PIRIZ, S. J. O'BRIEN, W. E. JOHNSON (2002.): Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for Iberian lynx. Molecular ecology 11, 2171–2182.
- PAUK, M. (2007.): Određivanje slijeda kontrolne regije mitohondrijske DNA dobrog dupina *Tursiops truncatus*. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- PERTOLDI, C., R. GARCÍA-PEREA, J. A. GODOY, M. DELIBES, V. LOESCHCKE (2005): Morphological consequences of range fragmentation and population decline on the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). Journal of Zoology 268,73-86.
- SHEDLOCK, A. M., J. D. PARKER, D. A. CRISPIN, T. W. PIETSCH, G. C. BURMER (1992): Evolution of the salmonid mitochondrial control region. Molecular phylogenetics and evolution 1, 179 – 192.
- TABERLET, P. (1996.): The use mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. U: Molecular genetics approaches in conservation (T. B. Smith, R. K. Wayne, urednici). Oxford University press. New York, Oxford. pp. 125–142
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, T. J. GIBSON (1994.): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22, 4673-4680.

- WHITE, P. S. O. L. TATUM, H. TEGELSTROM, L. D. DENSMORE III (1998): Mitochondrial DNA isolation, separation and detection of fragments. U: Molecular genetic analysis of population (A. R. Hoelzel, urednik). Oxford University press. New York. pp. 65–101.
- ZHANG D–X, G. M. HEWITT (1996.): Nuclear intergrations: chellenges for mitochondrial DNA markers. Trends in ecology and evolution 11,247–251.

Izrada vrsno specifičnih početnica za umnažanje mitohondrijske DNA divljih životinja Hrvatske

LANA PAĐEN

Zavod za biologiju, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

PAĐEN, L. (2009): Izrada početnica za umnažanje mitohondrijske DNA i razlikovanje divljih životinja Hrvatske

Sažetak

Cilj ovog rada je bio izraditi vrsno specifične početnice za vuka (*Canis lupus*), lisicu (*Vulpes vulpes*), medvjeda (*Ursus arctos*), srnu (*Capreolus capreolus*), jelena (*Cervus elaphus*) i divlju svinju (*Sus crofa*). Početnice su dizajnirane temeljem sekvenci navedenih životinjskih vrsta uzetih iz genske baze podataka GenBank te uz korištenje kompjuterskih programa BioEdit i Primer 3. Određena je duljina početnica, mjesto vezivanja i duljina PCR produkta za svaku navedenu vrstu. Pomoću dobivenih vrsno specifičnih početnica životinjske vrste se mogu identificirati iz minimalnih količina različitih tkiva koristeći se samo izolacijom DNA, PCR reakcijom i elektroforezom, tako da imaju široku primjenu u mnogim ekološkim istraživanjima i forenzičkim slučajevima.

Ključne riječi: početnica, mitohondrijska DNA, kontrolna regija, vuk, lisica, medvjed, srna, jelen, divlja svinja

Design of species specific primers for amplification of mitochondrial DNA of Croatian wild animals

LANA PAĐEN

Department for biology, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb

PAĐEN, L. (2009): Design of species specific primers for amplification of mitochondrial DNA of Croatian wild animals

Abstract

The goal of this paper was to design species specific primers for wolf (*Canis lupus*), fox (*Vulpes vulpes*), bear (*Ursus arctos*), roe deer (*Capreolus capreolus*), red deer (*Cervus elaphus*) and wild boar (*Sus crofa*). Primers have been designed using sequences of the listed species from GenBank, using software BioEdit and Primer 3. We have defined the size and location of primers for each species, and size of the PCR product. With this species specific primers animal species can be identified using minimal quantities of different tissues using only DNA isolation, PCR and electrophoresis, so they can be used in a variety of ecological researches and in forensic cases.

Ključne riječi: primer, mitochondrial DNA, control region, wolf, fox, brown bear, roe deer, red deer, wild boar

Životopis

Rođena sam 20. prosinca 1983. godine u Zagrebu. Završila sam Opću gimnaziju u Sisku 2002. godine. Iduće godine sam upisala dodiplomski studij na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od druge i treće godine studija obavljala sam demonstraturu na vježbama na Zavodu za biologiju i priključila se znanstvenom istraživanju pod vodstvom dr.sc. Tomislava Gomerčića. Kao koautorica rada " Filogenetska analiza životinja iz reda zvijeri usporedbom kontrolnih regija mitohondrijske DNA", 2005. dobila sam Rektorovu nagradu. Kao koautorica rada "Genetska razlika između vuka i psa usporedbom kontrolnih regija mitohondrijske DNA", 2006. dobila sam Dekanovu nagradu. Kao koautorica rada "Izrada vrsno specifičnih početnica za umnažanje mitohondrijske DNA divljih životinja Hrvatske", 2009. dobila sam Rektorovu nagradu. Bila sam sudionik na Biloškom kongresu u Rovinju 2006. godine kao i sudionik na Studentskoj znanstvenoj konferenciji u Košicama 2005. godine. Bila sam nagrađivana Dekanovom nagradom za izvrstan uspjeh na svih pet godina studija. Na Zavodu za patološku fiziologiju obavljala sam demonstraturu 2010. godine.