

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA  
OPTIMIZACIJA LABORATORIJSKIH PROTOKOLOV  
ZA GENOTIPIZACIJO MIKROSATELITNIH LOKUSOV  
PRI NAVADNI LISICI

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Optimizacija laboratorijskih protokolov za genotipizacijo  
mikrosatelitskih lokusov pri navadni lisici**

(Optimization of laboratory protocols for microsatellite loci genotyping in red  
fox)

Ime in priimek: Rok Salobir

Študijski program: Varstvena biologija

Mentor: prof. dr. Elena Bužan

Somentor: asist. dr. Felicita Urzi

Koper, julij 2022

## Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Rok SALOBIR

Naslov zaključne naloge: Optimizacija laboratorijskih protokolov za genotipizacijo mikrosatelitskih lokusov pri navadni lisici

Kraj: Koper

Leto: 2022

Število listov: 37

Število slik: 15

Število tabel: 5

Število referenc: 32

Mentor: prof. dr. Elena Bužan

Somentor: asist. dr. Felicita Urzi

Ključne besede: *Vulpes vulpes*, DNA izolacijski kit, PCR temperatura prileganja

Izvleček: Namen zaključne naloge je bila optimizacija laboratorijskih protokolov za analizo mikrosatelitskih lokusov pri navadni lisici (*Vulpes vulpes*). Mikrosateliti so zaradi večje nagnjenost k mutacijam pomembni za preučevanje genske raznolikosti med organizmi. V nalogi smo testirali dva kompleta za izolacijo DNA iz živalskega tkiva in izvedli pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov, da bi za izolirano DNA določili optimalno temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov. Za vzorčno tkivo smo uporabili osem tkiv navadnih lisic (*Vulpes vulpes*). Rezultati primerjave izolacije z dvema kompletoma so pokazali, da se koncentracije DNA izolirane s kompletom peqGOLD Blood & Tissue Mini Kit statistično značilno razlikujejo od koncentracij DNA izoliranih s kompletom Tissue DNA Mini Kit (S-Line).

V PCR postopku smo za lokus FH2174, ki se je izkazal kot bolj zahteven za pomnoževanje za optimizacijo temperature prileganja začetnih oligonukleotidov, testirali osem temperaturnih profilov. Uspešnost PCR reakcije smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Genotipizacijo lokusov smo izvedli s sekvenatorjem SeqStudio (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA). Pridobljene podatke smo nato analizirali v programu GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems). Izkazalo se je, da se je poleg zaželenega lokusa v PCR reakcijski mešanici pomnožilo tudi veliko nespecifičnih produktov, zato bodo za optimizacijo postopka PCR potrebne nadaljnje optimizacije pogojev.

### Key document information

Name and SURNAME: Rok SALOBIR

Title of the final project paper: Optimization of laboratory protocols for microsatellite loci genotyping in red fox

Place: Koper

Year: 2022

Number of pages: 37

Number of figures: 15

Number of tables: 5

Number of references: 32

Mentor: Prof. Elena Bužan, PhD

Co-Mentor: Assist. Felicita Urzi, PhD

Keywords: *Vulpes vulpes*, DNA isolation kit, PCR annealing temperature

Abstract: The purpose of this final thesis was to optimize laboratory protocols for the analysis of microsatellite loci in samples of red fox (*Vulpes vulpes*). Microsatellites are important for the study of genetic diversity among organisms due to their greater propensity for mutations. We tested two DNA isolation kits for animal tissue and performed several PCR reactions, to determine the optimal annealing temperature for oligonucleotides. We used eight samples of red fox muscles tissues. The DNA concentrations isolated by different kits showed that the DNA isolated with the “peqGOLD Blood & Tissue Mini Kit” were statistically higher comparing to the concentration of DNA isolated with the “Tissue DNA Mini Kit (S-Line)”.

In the PCR protocol, eight temperature profiles were tested for the FH2174, which was recognized as one of the most difficult to amplified locus to optimize the annealing temperature for the oligonucleotides. The success of the PCR reaction was checked with agarose gel electrophoresis and locus genotyping was performed with a SeqStudio sequencer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). The obtained data was then analysed in GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems). It turned out that in addition to the desired locus many non-specific products we also amplified, which indicate that optimisation of PCR conditions is required.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici dr. Eleni Bužan, ki mi je nalogo predlagala in omogočila delo v laboratoriju, profesorici dr. Feliciti Urzi za vso pomoč in nasvete pri delu v laboratoriju ter vsem ostalim študentom in sodelovcem, ki so mi pomagali pri laboratorijskem delu in obenem zagotovili tudi prijetno druženje.

## KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Navadna lisica ( <i>Vulpes vulpes</i> ) .....	1
1.2	Populacijska struktura in pomen genetskih analiz .....	1
1.3	Izolacija DNA in pomen optimizacije .....	2
1.4	Mikrosateliti in pomen optimizacije PCR reakcije.....	3
1.4.1	Mikrosateliti .....	3
1.4.2	Reakcija PCR.....	4
1.5	Namen in cilji.....	4
2	METODE DELA .....	6
2.1	Priprava vzorcev .....	6
2.2	Izolacija DNA .....	7
2.2.1	Postopek izolacije s kompletom Tissue DNA Mini Kit, S-Line .....	8
2.2.2	Postopek izolacije s kompletom peqGOLD Blood & Tissue DNA Mini Kit ..	9
2.3	Merjenje koncentracije DNA.....	10
2.4	Statistična analiza .....	10
2.5	Optimizacija temperature prileganja za PCR.....	14
2.5.1	Postopek pomnoževanja DNA .....	14
2.5.2	Agarozna gelska elektroforeza .....	15
2.5.3	Genotipizacija.....	16
3	REZULTATI Z DISKUSIJO.....	17
3.1	Analiza koncentracije DNA.....	17
3.2	Optimizacija temperature prileganja začetnih oligonukleotidov v PCR reakciji..	18
4	ZAKLJUČEK .....	24
5	LITERATURA IN VIRI.....	25

## **KAZALO TABEL**

Tabela 1: Koeficienti za Shapiro-Wilkov test .....	11
Tabela 2: p-vrednosti za Shapiro-Wilkov test .....	11
Tabela 3: Preglednica mejnih vrednosti U-statistike .....	13
Tabela 4: Primerjava koncentracij DNA, izoliranih s kompletoma S-Line in peqGOLD ..	17
Tabela 5: Izračun U-testa .....	17

## KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Vzorci lisičjega tkiva v vialah z etanolom pridobljeni s strani VF, postavljenih pred originalne zmrznjene vzorce.....	6
Slika 2: Komplet za izolacijo Tissue DNA Mini Kit, S-Line.....	7
Slika 3: Komplet za izolacijo peqGOLD Blood & Tissue DNA Mini Kit.....	8
Slika 4: Normalna porazdelitev podatkov (Žibert 2012).....	10
Slika 5: Shematski prikaz priprave vzorca za izvedbo poskusa z različnimi temperaturami prileganja v PCR reakciji.....	14
Slika 6: Slika gela elektroforeze pod UV svetlobo.....	18
Slika 7: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 52,3°C.....	19
Slika 8: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 53,4°C.....	19
Slika 9: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 54,4°C.....	20
Slika 10: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 55,4°C.....	20
Slika 11: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 56,6°C.....	21
Slika 12: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 57,7°C.....	21
Slika 13: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 58,7°C.....	22
Slika 14: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 59,4°C.....	22



## **SEZNAM KRATIC**

- DNA - Deoxyribonucleic acid (DNK - Deoksiribonukleinska kislina)
- PCR - Polymerase chain reaction (Verižna reakcija s polimerazo)
- UV - ultra vijolična (svetloba)
- F - forward (naprej)
- R - reverse (nazaj)
- GBS - Genotyping-by-sequencing (genotipiziranje z uporabo sekvenciranja)

## 1 UVOD

Rdeča lisica ali navadna lisica je največji predstavnik rodu pravih lisic (*Vulpes*) in ena najbolj razširjenih vrst iz redu zveri (*Carnivora*). Vrsta je razširjena čez skoraj celotno severno poloblo. Najdemo jo v severni Ameriki, Evropi, Aziji in nekaterih predelih severne Afrike, odsotna pa je na najbolj severnih, mrzlih območjih, kot so Islandija, Grenlandija in Sibirija (IUCN Red List). Zaradi človekove naselitve najdemo vrsto tudi v Avstraliji, kjer velja za škodljivo in invazivno (GISD). Zaradi njene hitre prilagodljivosti na nova okolja lahko pričakujemo, da bo v prihodnje naselila tudi druga območja.

### 1.1 Navadna lisica (*Vulpes vulpes*)

Navadne lisice imajo dolgo telo in relativno kratke noge. Njihov rep je kosmat in daljši od polovice dolžine telesa, tako da seže do tal, ko žival stoji. Sprednje šape imajo pet prstov, zadnje pa samo štiri. Kožuh je lahko različnih barv, najpogosteje rdeč, siv ali mešan (Heptner 1998).

Navadne lisice se v divjini prehranjujejo z malimi sesalci in pticami, pa tudi s sadjem, različnimi travami in gomolji, so torej vsejedi in oportunisti. Prav zaradi teh značilnosti so navadne lisice zelo uspešne pri naseljevanju urbanih območij (Soulsbury in sod. 2010; Bužan in sod. 2020). Najpogosteje naseljujejo redkeje poseljena obmestna območja, opažene pa so bile tudi v bolj gosto naseljenih predelih. V teh območjih so najbolj aktivne ob jutranjem in večernem mraku, ko iščejo hrano. Prehranjujejo se predvsem z živilskimi odpadki, s čimer lahko povzročajo škodo na smetnjakih, škodo pa lahko povzročajo tudi s plenjenjem kokoši in drugih manjših domačih živali (Sillero-Zubiri in sod. 2004).

Kako različna okolja vplivajo na genetsko strukturo lisic pri nas še ni popolnoma jasno. K razjasnitvi tega vprašanja bo pripomogla raziskava genetske populacijske strukture lisic v Sloveniji, katere del je tudi zastavljeno zaključno delo.

### 1.2 Populacijska struktura in pomen genetskih analiz

Za genetsko strukturo populacije je značilno število subpopulacij v njej, pogostost različnih genetskih različic (alelov) v posamezni subpopulaciji in stopnja genetske izolacije subpopulacij. Na njo vplivajo različni procesi, kot so rekombinacije in mutacije genov ter genetski zdrs, demografska zgodovina populacije in naravna selekcija (Hartl in Clark 1997; Andam in sod. 2017).

Geografske in fizične bariere pogosto omejujejo gibanje osebkov in onemogočajo stik med njimi kar vodi k določeni stopnji genetske razdelitve ali populacijske genetske strukture. Poleg tega omejenost ali neenakomerna porazdeljenost virov prispeva k težnji osebkov po

združevanju v skupine. To prostorsko združevanje posameznikov in izražanje družbenega vedenja znotraj skupin ima za posledico nove ekološke in evolucijske procese, ki vključujejo izbrano skupino in prispevajo k različnim genetskim različicam v posamezni subpopulaciji (Hartl in Clark 1997; Keyghobadi 2007; Schlaepfer in sod. 2018; Kimmig in sod 2019).

Z genetskimi analizami lahko opredelimo vpliv razdrobljenosti habitata ali prisotnih ovir na populacijsko strukturo in tako lahko bolje razumemo premike živali. Genetske analize nam omogočajo vpogled v genski zapis organizmov, iz katerega lahko pridobimo številne informacije, kot so npr. genetska variabilnost populacij, sledi evolucijskih selekcijskih pritiskov, genetska ozadja vedenja, odpornost na parazite in patogene (Hartl in Clark 1997; Keyghobadi 2007; Schlaepfer in sod. 2018; Kimmig in sod 2019). Genetske analize se množično uporabljajo tudi za določitev genetske sorodnosti med organizmi (Hartl in Clark 1997; Berry in Kirkwood 2010; Richman in sod. 2001; Kukekova in sod. 2004a, b; Kukekova in sod. 2007; Wesselink 2011).

Raznolikost med osebki določajo predvsem spremembe v genskem zapisu. Pomembne informacije o genetski raznolikosti med skupinami osebkov lahko raziskujemo z mikrosatelitskimi označevalci (ponavljajoča se zaporedja DNA) (Hartl in Clark 1997; Richman in sod. 2001; Kukekova in sod. 2004; Berry in Kirkwood 2010; Wesselink 2011; Vieira in sod. 2016). V populacijski genetiki so mikrosateliti najbolj priljubljeni in vsestranski genetski označevalci z nešteti aplikacijami (Hartl in Clark 1997; Vieira in sod. 2016).

### **1.3 Izolacija DNA in pomen optimizacije**

DNA za molekularne analize izoliramo iz vzorcev po posebnih postopkih, ki smo jih pridobili iz različnih delov organizmov (mišično tkivo, kri, kosti, dlaka, iztrebki itd.) (Buzan in sod. 2020). Iz vzorca s fizikalnimi (npr. rezanje, filtriranje, centrifugiranje) in kemičnimi postopki odstranimo vse neželene komponente, dokler ne ostane čista DNA (navodila za delo so podana v kompletih za izolacijo). Izolirana DNA mora biti popolnoma čista, saj kakoršnekoli nečistoče lahko motijo postopke pri nadaljnjih analizah (Kidwell in Osborn 1992).

Optimizacija procesa izolacije je pomembna, ker včasih nimamo na razpolago veliko vzorca, zato hočemo iz njega dobiti čim več ustrezno čistega genetskega materiala za nadaljne raziskave; več materiala pa pomeni tudi več možnih izvedb poskusov (Kidwell in Osborn 1992).

V tej nalogi smo primerjali dva kompleta za izolacijo DNA iz živalskega tkiva, da bi preverili, kateri med njima nam da višjo koncentracijo izolirane DNA. Postopek pa se ponavadi optimizira samo na posameznih korakih procesa izolacije, kot je na primer liza

(Akinwole in Babarinde 2019), po postopku izolacije pa lahko še dodatno očistimo že izolirano DNA, če ta ni že dovolj čista.

## 1.4 Mikrosateliti in pomen optimizacije PCR reakcije

### 1.4.1 Mikrosateliti

Mikrosateliti so kratke tandemske ponovitve (STR, *angl.* short tandem repeats) ali enostavna zaporedja (SSR, *angl.* short simple repeats), iz kratkih, tandemsko ponovljenih nukleotidnih zaporedij, osnovnega motiva dolžine od ena do šest nukleotidov, ki se ponavljajo v identičnih ali sorodnih kopijah (Guy-Franck in sod. 2008; Jeffrey 2012).

V DNA verigi se mikrosateliti pojavljajo zelo pogosto in so bolj nagnjeni k mutacijam, zaradi česar povzročajo višjo genetsko raznolikost med organizmi (Brinkmann in sod. 1998).

V populacijski genetiki se mikrosateliti uporabljajo predvsem za merjenje genetske raznolikosti med in znotraj populacij (Hartl in Clark 1997; Richman in sod. 2001; Kukekova in sod. 2004; Berry in Kirkwood 2010; Wesselink 2011; Vieira in sod. 2016). Pri lisicah so opredelili mikrosatelitske genetske označevalce z uporabo mikrosatelitskih genskih označevalcev za pasji genom (Kukekova in sod. 2004a, b; Kukekova in sod. 2007; Wesselink 2011).

Označevalce so kasneje uporabili tudi za raziskave sorodnosti in premikov lisic v urbanih območjih (Atterby in sod. 2015; Kimmig in sod. 2019). Identificirali in primerjali so značilne mikrosatelite, ki naj bi nakazovali prisotnost agresivnosti pri lisicah (Richman in sod. 2001; Kukekova in sod. 2004a, b; Kukekova in sod. 2007). Mikrosatelitske lokuse so uporabili tudi za identificiranje sorodnosti lisic na otoku Vlieland (Nizozemska), kjer lisice niso endemične in so želeli opredeliti izvorno populacijo, uporabljeno za translokacijo (Wesselink 2011). Na avstralskem otočku »Phillip Island« lisice močno ogrožajo lokalne populacije manjših živali, zato njihovo populacijo poskušajo upravljati. Da bi bolje razumeli, ali populacija ostaja velika zaradi razmnoževanja ali zaradi priseljevanja, so tudi uporabili mikrosatelitske genske označevalce (Berry in Kirkwood 2010). Z mikrosatelitskimi lokusi so tudi genotipizirali lisice v Berlinu in okolici, z namenom, da bi preučevali njihovo gensko strukturo in in razpršitev po mestno-podeželski pokrajini (Kimmig in sod. 2019). Podobno raziskavo so opravili tudi v Veliki Britaniji (Atterby in sod. 2015). Na ravni celotne Evrope, pa so uporabili genotipiziranje z uporabo sekvenciranja (*angl.* Genotyping-by-sequencing; GBS), za rekonstrukcijo filogeografske zgodovine lisice (McDevitt in sod. 2021). Seveda pa je na lisicah bilo narejenih tudi mnogo drugih genetskih raziskav.

## 1.4.2 Reakcija PCR

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, *angl.* polymerase chain reaction) je tehnika, ki se uporablja za pomnoževanje določenih odsekov DNA (Amplifying DNA 2021; Nobel Prize Press release 2022; Khan Academy), v našem primeru izbranih mikrosatelitskih lokusov, s pomočjo encima DNA polimeraza (Amplifying DNA 2021; Khan Academy - PCR).

Tehniko PCR je leta 1983 izumil Kary Mullis in leta 1993 za to odkritje tudi dobil Nobelovo nagrado (Amplifying DNA 2021; Nobel Prize Press release 2022; Khan Academy - PCR). Tehnika pomnoževanja zagotavlja, da lahko iz majhnih količin izolirane DNA pomnožimo tisoče do milijone kopij odsekov DNA, ki se lahko nato uporabijo v nadaljnjih raziskavah (Amplifying DNA 2021; Nobel Prize Press release 2022; Khan Academy - PCR).

Reakcijska zmes PCR vsebuje encim Taq-DNA polimerazo, nukleotide (dNTP), par začetnih oligonukleotidov (katerih sekvenca je komplementarna matični DNA), pufer z magnezijvimi ioni in matične DNA. Pomnoževanje se izvaja v cikličnem termostatu z večkrat ponovljenimi cikli, ki zajemajo tri glavne korake: denaturacija, pri kateri se pri temperaturi  $\sim 95^{\circ}\text{C}$  veriga matične DNA razklene, sledita korak prileganja, pri katerem se začetni oligonukleotidi priležejo na razklenjene verige in korak podaljševanja, pri katerem DNA polimeraza sintetizira novo nastajajočo verigo z dodajanjem komplementarnih baz na razklenjeno verigo. Te korake se ponavadi ponovi 28-krat do 35-krat (Amplifying DNA 2021; Khan Academy - PCR). Produkte lahko nato analiziramo na različne načine, eden izmed njih je na primer z agarozno gelsko elektroforezo (Khan Academy - PCR).

Elektroforeza z agaroznim gelom se uporablja za frakcioniranje produktov PCR glede na njihovo velikost (Khan Academy - PCR). Produkte obarvamo s specifičnimi barvili ter jih naneseemo na agarozni gel, skozi katerega spustimo električni tok. Na ta način frakcionirane produkte nato opazujemo pod UV svetlobo (Khan Academy - PCR).

## 1.5 Namen in cilji

Delo, ki sem ga opravil v svoji zaključni nalogi, je del širše raziskave opredelitve genetske variabilnosti in razlik med urbanimi lisicami in lisicami iz naravnega okolja. Genetske razlike lahko določamo na osnovi genotipov osebkov, vključenih v raziskavo; da pa bi le-te lahko primerjali, je potrebno iz tkiva izolirati DNA, jo pomnožiti s PCR in analizirati elektroferograme. Namen zaključnega dela je bil optimizacija dveh stopenj v procesu genotipizacije (izolacija DNA iz tkiva ter določitev optimalne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov pri postopku PCR).

Cilj 1: Prvi cilj je bila primerjava uspešnosti izolacije DNA z dvema različnima kompletoma za izolacijo.

Cilj 2: Drugi cilj naloge je bil optimizacija postopka PCR z analizo različnih temperatur prileganja začetnih oligonukleotidov za izbrani lokus FH2174 na vzorcih tkiv navadne lisice.

V zaključni nalogi smo zastavili tudi dve hipotezi, ki sta povezani z uspešnostjo in optimizacijo laboratorijskih protokolov:

Hipoteza 1: Koncentracije izolirane DNA se razlikujejo med izbranimi izolacijskima kompletoma.

Hipoteza 2: Optimizacija pomnoževanja lokusa je odvisna od temperature prileganja začetnih oligonukleotidov.

## 2 METODE DELA

### 2.1 Priprava vzorcev

Vzorci tkiv lisic, ki so nam bili posredovani s strani Veterinarske fakultete, Univerze v Ljubljani (VF), smo najprej pripravili za izolacijo DNA tako, da smo od zmrznjenih velikih kosov tkiva odrezali manjše koščke (velikosti 2mm x 2mm), jih shranili v vialah z etanolom in jih označili s laboratorijsko oznako (Slika 1).



Slika 1: Vzorci lisičjega tkiva v vialah z etanolom pridobljeni s strani VF, postavljenih pred originalne zmrznjene vzorce

## 2.2 Izolacija DNA

Za izolacijo DNA iz tkivnih vzorcev lisic smo uporabili dva komercialno dostopna kompleta: Tissue DNA Mini Kit, S-Line (VWR International, LLC, Avstrija) (v nadaljevanju komplet S-line) in peqGOLD Blood & Tissue DNA Mini Kit (VWR International, LLC, Avstrija) (v nadaljevanju komplet peqGOLD) (sliki 2 in 3).

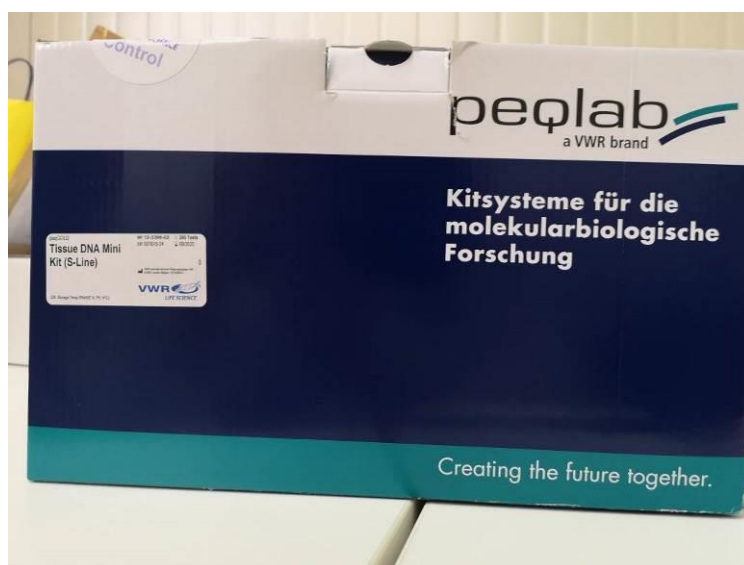
Proizvajalec (VWR International) za oba kompleta navaja, da pri delu z njima ni potrebe po organskih ekstrahiranjih in tudi ne dolgotrajno obarjanje z alkoholom. Oba kompleta imata popolno encimsko razgradnjo celične RNA ter učinkovito ločevanje encimskih inhibitorjev in nečistoč.

Za komplet S-Line je značilno, da se končno eluiranje lahko izvede z nizko-slanim pufrom ali vodo, za komplet peqGOLD pa naj bi bilo značilno hitro čiščenje vzorcev, v manj kot 20 minutah, po lizaciji celic (razpadu celične membrane). Poleg tega naj bi imeli zaradi močne lizacije celic končni produkti visoko koncentracijo, kar smo tudi testirali kot del te naloge.

Komplet S-line je vseboval kolone za vezavo DNA (angl. PerfectBind DNA Columns), centrifugirke za zbiranje, pufer za lizo (angl. DNA Lysis Buffer T), vezalni pufer (angl. Binding Buffer), čistilni pufer (angl. DNA Wash Buffer), elucijski pufer (angl. Elution buffer) in proteinazo K.

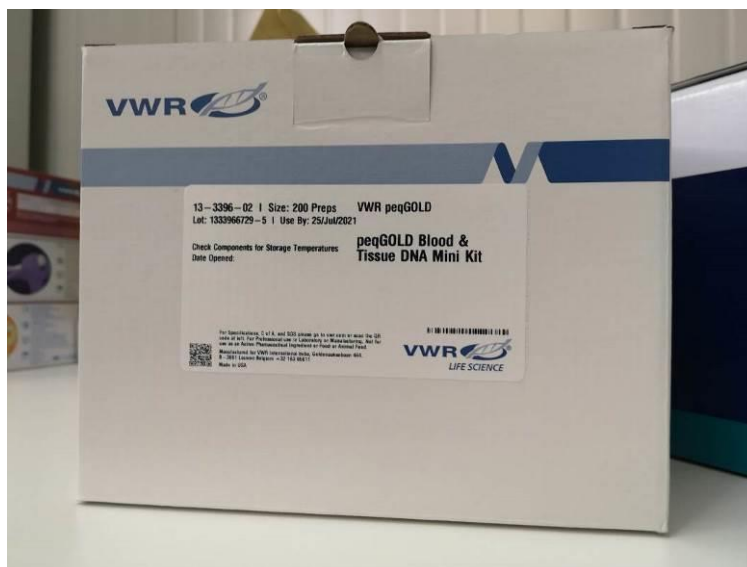
Komplet peqGOLD pa je vseboval kolone za vezavo DNA (angl. peqGOLD DNA Mini Column), centrifugirke za zbiranje, pufer za lizo (angl. TL Buffer), vezalni pufer (angl. BL Buffer), HBC pufer (angl. HBC Buffer), čistilni pufer (angl. DNA Wash Buffer), elucijski pufer (angl. Elution buffer) in proteinazo K.

Pri obeh kompletih pa smo potrebovali tudi drugi laboratorijski material (centrifugirke, pipete, tipsi, centrifuga...) in kemikalije (etanol, izopropanol...).



Slika 2: Komplet za izolacijo Tissue DNA Mini Kit, S-Line





Slika 3: Komplet za izolacijo peqGOLD Blood & Tissue DNA Mini Kit

### 2.2.1 Postopek izolacije s kompletom Tissue DNA Mini Kit, S-Line

V prvem postopku, kjer smo uporabili komplet S-Line, smo od vsakega pripravljenega tkiva odrezali majhen košček (približno 35 mg), jih na drobno nasekljali in dali vsakega v 1,5 ml centrifugirko.

V centrifugirke smo nato dolili 400  $\mu$ l pufru (*angl.* DNA Lysis Buffer T), 20  $\mu$ l Proteinaze K in 15  $\mu$ l RNaze A. Centrifugirke smo nato vsako posebej na vorteksu premešali in jih postavili v stresalni inkubator, kjer so se vzorci eno uro inkubirali pri 50 °C.

Nato smo vsebino 30 sekund centrifugirali pri hitrosti 10000 x g, tako da se je usedlina ločila od supernatanta. Supernatant smo prelili v označene 1,5 ml centrifugirke. V centrifugirke smo nato prilili 200  $\mu$ l vezalnega pufru (*angl.* Binding Buffer) in vzorce med pipeteranjem premešali.

Vzorke smo nato prelili v označene kolone za vezavo DNA (*angl.* PerfectBind DNA Columns), ki smo jih postavili v 2 ml centrifugirke. Te smo nato ponovno postavili v centrifugo in jih centrifugirali s hitrostjo 10000 x g, za dve minuti. Zavrgli smo tekočino, ki je stekla skozi kolone v centrifugirke in kolone premestili v centrifugirke za izpiranje.

V kolone za vezavo DNA smo nato dolili 650  $\mu$ l razredčenega čistilnega pufru (*angl.* DNA Wash Buffer) (pufer : čisti etanol = 1 : 1,5) in jih eno minuto centrifugirali s hitrostjo 10000 x g. Po centrifugiranju smo spraznili centrifugirke, v njih nazaj namestili stolpce in postopek ponovili (dolili razredčen pufer in centrifugirali), potem pa centrifugirke skupaj z vsebino zavrgli.

Kolone za vezavo DNA smo postavili v sveže 2 ml centrifugirke in jih dve minuti centrifugirali pri hitrosti 10000 x g, da so se kolone popolnoma posušile. Centrifugirke smo skupaj z njihovo vsebino zavrgli, kolone pa smo postavili v sveže 1,5 ml

centrifugirke. V kolone smo dokapljali 200 µl elucijskega pufra (*angl.* Elution buffer), ki smo ga najprej segreli na 70 °C, tako, da so kapljice padale direktno na membrano kolone. Centrifugirke s kolonami smo nato nekaj minut inkubirali pri sobni temperaturi, nato pa smo jih eno minuto centrifugirali pri hitrosti 6000 x g. Produkt, sedaj nahajajoč v centrifugirki, smo nato shranili za naslednji postopek - merjenje koncentracije DNA.

### **2.2.2 Postopek izolacije s kompletom peqGOLD Blood & Tissue DNA Mini Kit**

Pri izolaciji s kompletom peqGOLD, smo enako kot pri prvem postopku začeli z rezanjem manjših koščkov tkiva (približno 35 mg), ki smo jih nato sesekljali na drobne koščke in jih dali v 1,5 ml centrifugirke.

V centrifugirke smo dolili 200 µl TL pufra (*angl.* TL Buffer) in 25 µl Proteinaza K raztopine in vsako centrifugirko posebej premešali na vorteksu. Centrifugirke smo nato postavili v stresalni inkubator, kjer so se vzorci inkubirali pri 55 °C eno uro.

Centrifugirke smo nato pet minut centrifugirali pri hitrosti 10000 x g, supernatant predstavili v sveže centrifugirke, stare centrifugirke pa skupaj z usedlino zavrgli. V sveže centrifugirke smo nato dolili 220 µl BL pufra (*angl.* BL Buffer), vsako centrifugirko ponovno premešali na vorteksu in jih postavili v inkubator, kjer so se 10 minut inkubirale na 70 °C. Po inkubaciji smo v centrifugirke prilili 220 µl 100 % etanola in vsako posebej ponovno premešali na vorteksu.

Vsebino centrifugirk smo nato prelili v označene kolone za vezavo DNA (*angl.* peqGOLD DNA Mini Column), te pa postavili v 2 mL centrifugirke. Centrifugirke s kolonami smo centrifugirali eno minuto pri hitrosti 10000 x g, zavrgli tekočino, ki je stekla skozi kolone, ter centrifugirke ponovno uporabili. V kolone smo dolili 500 µl HBC pufra (*angl.* HBC Buffer), razredčenega z 100 % izopropanolom. Kolone smo ponovno centrifugirali pri hitrosti 10000 x g, tokrat 30 sekund, nato pa centrifugirke skupaj z vsebino zavrgli.

Kolone smo nato namestili v sveže 2 ml centrifugirke, v njih dolili 700 µl čistilnega pufra (*angl.* DNA Wash Buffer), razredčenega s 100 % etanolom, jih 30 sekund centrifugirali pri hitrosti 10000 x g, zavrgli tekočino v centrifugirkah, jih namestili nazaj na kolone in postopek še enkrat ponovili. Po ponovitvi postopka smo zamenjali stare centrifugirke s svežimi in kolone še dve minuti centrifugirali pri hitrosti 10000 x g, da so se popolnoma posušile. Centrifugirke smo nato odstranili, pod kolone pa namestili sveže, označene 1,5 mL centrifugirke. V kolone smo po kapljicah dodali 100 µl elucijskega pufra (*angl.* Elution Buffer), segretega na 70 °C, tako da so kapljice padale direktno na membrano kolon in jih pustili inkubirati na sobni temperaturi dve minuti. Kolone z centrifugirkami smo centrifugirali eno minuto pri hitrosti 10000 x g. Ta postopek smo nato še enkrat ponovili (po kapljicah dodali 100 µl elucijskega pufra), kolone odstranili iz centrifugirk in jih zavrgli, centrifugirke pa z njihovo vsebino shranili za naslednji postopek - merjenje koncentracije DNA.

## 2.3 Merjenje koncentracije DNA

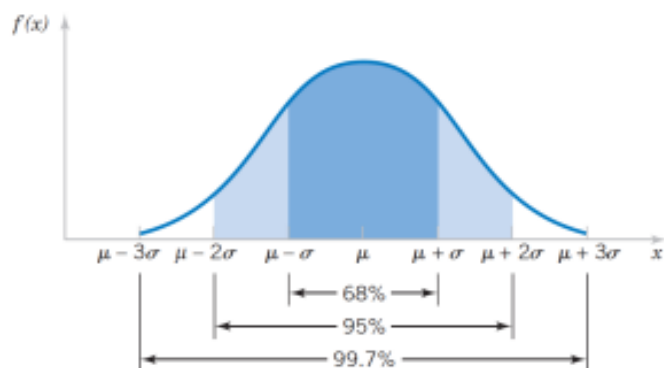
Za merjenje koncentracije DNA smo uporabili metodo fluorometrije s Qubit® 3.0 Fluorometer-om (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA). Za ta postopek smo najprej pripravili raztopino predpisanega pufra in fluorescenčnega barvila (razmerje 199  $\mu\text{l}$  pufra : 1  $\mu\text{l}$  barvila) za vse vzorce. Nato smo pripravili dva kalibracijska standarda (standardna raztopina DNA z znano koncentracijo) za kalibracijo fluorometra Qubit® 3.0 (190  $\mu\text{l}$  raztopine + 10  $\mu\text{l}$  standarda), ju premešali na vorteksu, ju enega za drugim postavili v napravo in z njima kalibrirali Qubit® 3.0. Vzorce smo pripravili za naše meritve, tako da smo k 198  $\mu\text{l}$  raztopine pufra s fluorescenčnim barvilom dodali 2  $\mu\text{l}$  vzorca DNA in jih dobro premešali na vorteksu. Mikrocentrifugirke smo nato vstavili v fluorometer in določili izmerjeno koncentracijo DNA v  $\text{ng}/\mu\text{l}$  ter zapisali rezultate.

## 2.4 Statistična analiza

Za ovrednotenje ali obstajajo statistično značilne razlike med koncentracijami izolirane DNA glede na uporabljeni komplet za izolacijo smo uporabili neparametrični Mann – Whitney U test, izveden v Excelu. Za ta test smo se odločili na podlagi testiranja normalnosti porazdelitve podatkov s Shapiro – Wilkovim testom.

### *Testiranje porazdelitve*

Lastnost normalne porazdelitve so: simetričnost, maksimalna vrednost leži v povprečju in večina vrednosti mora ležati znotraj treh standardnih odklonov od povprečja (slika 4) (Žibert 2012).



Slika 4: Normalna porazdelitev podatkov (Žibert 2012)

Normalnost porazdelitve smo testirali s Shapiro – Wilkovim testom (Real statistics). Ta test se uporablja za manjše vzorce (od 3 do 50), kar se ujema z našim primerom (imamo 16 vzorcev, oziroma 14, če ne štejemo dveh, ki sta pod mejo detekcije). Za izvedbo testa najprej podatke razporedimo od najmanjšega do največjega. Največjemu podatku nato odštejemo najmanjšega, drugemu največjemu odštejemo drugega najmanjšega in tako dalje, dokler se ne srečamo na sredini. Nato v tabeli za koeficiente (Tabela 1) odčitamo vrednosti za našo količino podatkov in jih povrsti zmnožimo z razlikami naših podatkov (prvi koeficient z razliko največjega in najmanjšega podatka, drugi koeficient z razliko drugega največjega in drugega najmanjšega podatka in tako dalje). Vse te zmnožke nato seštejemo (to je vrednost b). Nato izračunamo vrednost SS in vrednost W po formulah:

$$W=b^2/SS$$

$$SS = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$b = \sum_{i=1}^m a_i (x_{n+1-i} - x_i)$$

Izračunano vrednost W poskusimo najti v tabeli p-vrednosti (Tabela 2), za našo količino podatkov. Ker smo za obe možni količini podatkov (14 in 16) dobili vrednost p pod 0,01 (W za 14 podatkov je 0,816899, W za 16 podatkov pa 0,79004), lahko z 99 % verjetnostjo ovržemo nulto hipotezo, da so podatki normalno razporejeni.

Ker torej podatki niso normalno porazdeljeni, smo za statistično analizo izbrali neparametrični test.

Tabela 1: Koeficienti za Shapiro-Wilkov test

n =	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
a1	0.7071	0.7071	0.6872	0.6646	0.6431	0.6233	0.6052	0.5888	0.5739	0.5601	0.5475	0.5359	0.5251
a2			0.1677	0.2413	0.2806	0.3031	0.3164	0.3244	0.3291	0.3315	0.3325	0.3329	0.3318
a3					0.0875	0.1401	0.1743	0.1976	0.2141	0.2260	0.2347	0.2412	0.2460
a4							0.0561	0.0947	0.1224	0.1429	0.1586	0.1707	0.1802
a5									0.0399	0.0695	0.0922	0.1099	0.1240
a6											0.0303	0.0539	0.0727
a7													0.0240
n =	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
a1	0.5150	0.5056	0.4968	0.4886	0.4808	0.4734	0.4643	0.4590	0.4542	0.4493	0.4450	0.4407	
a2	0.3306	0.3290	0.3273	0.3253	0.3232	0.3211	0.3185	0.3156	0.3126	0.3098	0.3069	0.3043	
a3	0.2495	0.2521	0.2540	0.2553	0.2561	0.2565	0.2578	0.2571	0.2563	0.2554	0.2543	0.2533	
a4	0.1878	0.1939	0.1988	0.2027	0.2059	0.2085	0.2119	0.2131	0.2139	0.2145	0.2148	0.2151	
a5	0.1353	0.1447	0.1524	0.1587	0.1641	0.1686	0.1736	0.1764	0.1787	0.1807	0.1822	0.1836	
a6	0.0880	0.1005	0.1109	0.1197	0.1271	0.1334	0.1399	0.1443	0.1480	0.1512	0.1539	0.1563	
a7	0.0433	0.0593	0.0725	0.0837	0.0932	0.1013	0.1092	0.1150	0.1201	0.1245	0.1283	0.1316	
a8		0.0196	0.0359	0.0496	0.0612	0.0711	0.0804	0.0878	0.0941	0.0997	0.1046	0.1089	
a9				0.0163	0.0303	0.0422	0.0530	0.0618	0.0696	0.0764	0.0823	0.0876	
a10						0.0140	0.0263	0.0368	0.0459	0.0539	0.0610	0.0672	
a11								0.0122	0.0228	0.0321	0.0403	0.0476	
a12									0.0000	0.0107	0.0200	0.0284	
a13											0.0000	0.0094	

Tabela 2: p-vrednosti za Shapiro-Wilkov test

n \ P	0.01	0.02	0.05	0.1	0.5	0.9	0.95	0.98	0.99
3	0.753	0.756	0.767	0.789	0.959	0.998	0.999	1.000	1.000
4	0.687	0.707	0.748	0.792	0.935	0.987	0.992	0.996	0.997
5	0.686	0.715	0.762	0.806	0.927	0.979	0.986	0.991	0.993
6	0.713	0.743	0.788	0.826	0.927	0.974	0.981	0.986	0.989
7	0.730	0.760	0.803	0.838	0.928	0.972	0.979	0.985	0.988
8	0.749	0.778	0.818	0.851	0.932	0.972	0.978	0.984	0.987
9	0.764	0.791	0.829	0.859	0.935	0.972	0.978	0.984	0.986
10	0.781	0.806	0.842	0.869	0.938	0.972	0.978	0.983	0.986
11	0.792	0.817	0.850	0.876	0.940	0.973	0.979	0.984	0.986
12	0.805	0.828	0.859	0.883	0.943	0.973	0.979	0.984	0.986
13	0.814	0.837	0.866	0.889	0.945	0.974	0.979	0.984	0.986
14	0.825	0.846	0.874	0.895	0.947	0.975	0.980	0.984	0.986
15	0.835	0.855	0.881	0.901	0.950	0.975	0.980	0.984	0.987
16	0.844	0.863	0.887	0.906	0.952	0.976	0.981	0.985	0.987

### U-test

Mann – Whitneyjev U test je neparametrični test, ki omogoča primerjavo dveh skupin podatkov, ne da bi pri tem predpostavljali, da so podatki normalno porazdeljeni.

Testiramo nulto hipotezo (hipoteza določa, da sta mediani dveh skupin podatkov enaki), da je za katerikoli naključno izbrani vrednosti X in Y iz dveh populacij podatkov verjetnost, da je X večji kot Y, enaka verjetnosti, da je Y večji kot X.

Za manjše število podatkov (manj kot 20) lahko za primerjavo dveh skupin podatkov uporabimo direktno metodo.

Izračunamo statistični parameter U po enačbi,

$$U = \sum_{i=1}^{n_1} \sum_{j=1}^{n_2} S(X_i, Y_j) \quad , \quad U = U_1 + U_2 = n_1 * n_2$$

kjer je:

$$S(X, Y) = \begin{cases} 1, & \text{if } Y < X, \\ \frac{1}{2}, & \text{if } Y = X, \\ 0, & \text{if } Y > X. \end{cases}$$

$n_1$  = število podatkov iz prve skupine (X)

$n_2$  = število podatkov iz druge skupine (Y)

Po direktni metodi torej primerjamo dva seta podatkov, tako da primerjamo kolikokrat je podatek iz enega seta večji ali enak od vsakega podatka iz drugega seta. Vsota »zmag« in »izenačenj« (zmaga = 1, izenačenje = 1/2) je vrednost statističnega parametra U za ta set ( $U_1$  za prvi set in  $U_2$  za drugi set).

Nato iz preglednice (Tabela 3 ) odčitamo t.i. mejne vrednosti za U statistiko in preverimo, kateremu razponu (1% ali 5%) je bližja manjša izračunana vrednost U ( $U_1$  ali  $U_2$ ). To mejno vrednost nato odštejemo od 100%, kar nam poda stopnjo zaupanja s katero lahko zavržemo nulto hipotezo.

Maksimalno vrednost statističnega parametra  $U$  dobimo, ko so vsi podatki enega seta manjši ali večji kot vsi podatki drugega seta, torej je v tem primeru nulta hipoteza zavržena z največjo možno verjetnostjo.

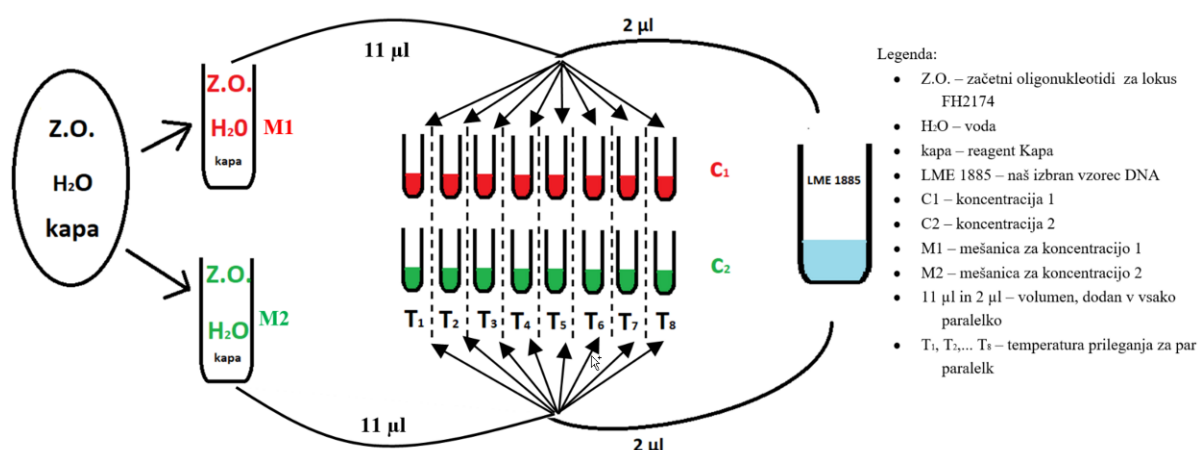
Tabela 3: Preglednica mejnih vrednosti  $U$ -statistike

$n_2$	$\alpha$	$n_1$																	
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
3	.05	--	0	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8
	.01	--	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	2	2	3	3
4	.05	--	0	1	2	3	4	4	5	6	7	8	9	10	11	11	12	13	14
	.01	--	--	0	0	0	1	1	2	2	3	3	4	5	5	6	6	7	8
5	.05	0	1	2	3	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	17	18	19	20
	.01	--	--	0	1	1	2	3	4	5	6	7	7	8	9	10	11	12	13
6	.05	1	2	3	5	6	8	10	11	13	14	16	17	19	21	22	24	25	27
	.01	--	0	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	15	16	17	18
7	.05	1	3	5	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34
	.01	--	0	1	3	4	6	7	9	10	12	13	15	16	18	19	21	22	24
8	.05	2	4	6	8	10	13	15	17	19	22	24	26	29	31	34	36	38	41
	.01	--	1	2	4	6	7	9	11	13	15	17	18	20	22	24	26	28	30
9	.05	2	4	7	10	12	15	17	20	23	26	28	31	34	37	39	42	45	48
	.01	0	1	3	5	7	9	11	13	16	18	20	22	24	27	29	31	33	36
10	.05	3	5	8	11	14	17	20	23	26	29	33	36	39	42	45	48	52	55
	.01	0	2	4	6	9	11	13	16	18	21	24	26	29	31	34	37	39	42
11	.05	3	6	9	13	16	19	23	26	30	33	37	40	44	47	51	55	58	62
	.01	0	2	5	7	10	13	16	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48
12	.05	4	7	11	14	18	22	26	29	33	37	41	45	49	53	57	61	65	69
	.01	1	3	6	9	12	15	18	21	24	27	31	34	37	41	44	47	51	54
13	.05	4	8	12	16	20	24	28	33	37	41	45	50	54	59	63	67	72	76
	.01	1	3	7	10	13	17	20	24	27	31	34	38	42	45	49	53	56	60
14	.05	5	9	13	17	22	26	31	36	40	45	50	55	59	64	67	74	78	83
	.01	1	4	7	11	15	18	22	26	30	34	38	42	46	50	54	58	63	67
15	.05	5	10	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	70	75	80	85	90
	.01	2	5	8	12	16	20	24	29	33	37	42	46	51	55	60	64	69	73
16	.05	6	11	15	21	26	31	37	42	47	53	59	64	70	75	81	86	92	98
	.01	2	5	9	13	18	22	27	31	36	41	45	50	55	60	65	70	74	79
17	.05	6	11	17	22	28	34	39	45	51	57	63	67	75	81	87	93	99	105
	.01	2	6	10	15	19	24	29	34	39	44	49	54	60	65	70	75	81	86
18	.05	7	12	18	24	30	36	42	48	55	61	67	74	80	86	93	99	106	112
	.01	2	6	11	16	21	26	31	37	42	47	53	58	64	70	75	81	87	92
19	.05	7	13	19	25	32	38	45	52	58	65	72	78	85	92	99	106	113	119
	.01	3	7	12	17	22	28	33	39	45	51	56	63	69	74	81	87	93	99
20	.05	8	14	20	27	34	41	48	55	62	69	76	83	90	98	105	112	119	127
	.01	3	8	13	18	24	30	36	42	48	54	60	67	73	79	86	92	99	105

## 2.5 Optimizacija temperature prileganja za PCR

### 2.5.1 Postopek pomnoževanja DNA

V drugem delu naloge smo za lokus FH2174 poskusili določiti optimalno temperaturo za proces prileganja začetnih oligonukleotidov (*angl.* annealing temperature) v PCR reakciji. Za PCR reakcijo je bil izbran vzorec z visko vsebnostjo DNA (vzorec LME 1885, izoliran z kompletom peqGOLD). Postopek prileganja smo testirali pri dveh različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov (C1 in C2), pri osmih temperaturnih profilih, pri katerih smo spreminjali temperaturo prileganja ( $T_1 = 52,3^{\circ}\text{C}$ ,  $T_2 = 53,4^{\circ}\text{C}$ ,  $T_3 = 54,4^{\circ}\text{C}$ ,  $T_4 = 55,4^{\circ}\text{C}$ ,  $T_5 = 56,6^{\circ}\text{C}$ ,  $T_6 = 57,7^{\circ}\text{C}$ ,  $T_7 = 58,7^{\circ}\text{C}$  in  $T_8 = 59,4^{\circ}\text{C}$ ), kot je prikazano na sliki 4.



Slika 5: Shematski prikaz priprave vzorca za izvedbo poskusa z različnimi temperaturami prileganja v PCR reakciji

Postopek smo začeli s pripravo mešanic reagentov, ki sta se razlikovali v koncentraciji začetnih oligonukleotidov (Slika 4):

- Za pripravo paralelk s koncentracijo začetnih oligonukleotidov C1 smo v večjo 2 ml mikrocentrifugirko najprej odpipetirali 37,35 µl ( $4,15 \mu\text{l} \cdot 9$  (8 vzorcev + 1)) vode, primerne za PCR reakcijo. Nato smo dodali 56,25 µl ( $6,25 \mu\text{l} \cdot 9$ ) reagenta Kapa, ki smo ga prej vorteksirali. Na koncu smo dodali še par začetnih oligonukleotidov za lokus FH2174, ki smo jih najprej odtalili in premešali s pipeto, in sicer 2,7 µl ( $0,3 \mu\text{l} \cdot 9$ ) istosmernega (*angl.* F, forward) in 2,7 µl ( $0,3 \mu\text{l} \cdot 9$ ) protismerne (*angl.* R, reverse). Mešanico M1 smo nato na hitro vorteksirali in razdelili v osem paralelk, tako da smo v manjše 0,2 ml mikrocentrifugirke odpipetirali po 11 µl pripravljene mešanice. V vse paralelke smo za izvedbo PCR reakcije na koncu dodali še po 2 µl izbranega vzorca DNA (LME1885). Končna

koncentracija C1 posameznega začetnega oligonukleotida v mešanici M1 je bila 0,28  $\mu\text{mol/L}$ .

- Za pripravo paralelk s koncentracijo začetnih oligonukleotidov C2 smo postopali podobno. V večjo 2 ml mikrocentrifugirko smo najprej odpipetirali 33,75  $\mu\text{l}$  ( $3,75 \mu\text{l} \cdot 9$  (8 vzorcev + 1)) vode, primerne za PCR reakcijo. Nato smo dodali 56,25  $\mu\text{l}$  ( $6,25 \mu\text{l} \cdot 9$ ) reagenta Kapa, ki smo ga prej vorteksirali. Na koncu smo dodali še par začetnih oligonukleotidov za lokus FH2174, ki smo jih najprej odtalili in premešali s pipeto, in sicer 4,5  $\mu\text{l}$  ( $0,5 \mu\text{l} \cdot 9$ ) istosmernege (*angl.* F, forward) in 4,5  $\mu\text{l}$  ( $0,5 \mu\text{l} \cdot 9$ ) protismernege (*angl.* R, reverse). Mešanico M2 smo nato na hitro vorteksirali in razdelili v osem paralelk, tako da smo v manjše mikrocentrifugirke odpipetirali po 11  $\mu\text{l}$  pripravljene mešanice. V vse paralelke smo za izvedbo PCR eksperimenta na koncu dodali še po 2  $\mu\text{l}$  izbranega vzorca DNA (LME1885). Končna koncentracija C2 posameznega začetnega oligonukleotida v mešanici M2 je bila 0,38  $\mu\text{mol/L}$ .

Vse paralelke (mikrocentrifugirke) smo nato postavili v ciklični termostat za PCR (program z nastavljenim temperaturnim gradientom) v vodoravni smeri, kar nam je omogočilo, da smo za vsak par paralelk (ena s koncentracijo začetnih oligonukleotidov C1 in druga s koncentracijo C2) lahko nastavili različne temperature prileganja (T1-T8).

Program smo nastavili tako, da je prvi korak začel s tremi minutami na 95°C (denaturacija matrične DNA). Temu je sledilo 35 ciklov s 15 sekund na 95°C za korak denaturacije, nato je sledil korak prileganja začetnih oligonukleotidov z različnimi prej omenjenimi temperaturami (T1-T8), ki je trajal 30 sekund. Temu je sledili še korak podaljševanja DNA verige, 30 sekund na temperaturi 72°C, postopek pa se je zaključil s korakom končnega podaljševanja DNA verige, ki je trajal 10 minut, tudi pri 72°C. Ko je bil postopek končan, smo koncentracijo in velikost produktov preverili na agarozni gelski elektroforezi.

## 2.5.2 Agarozna gelska elektroforeza

Za postopek agarozne elektroforeze smo najprej pripravili gel. V čašo smo odmerili 3,3 g agaroze, ki smo ji nato primešali 130 mL 0,5 x TBE pufra (*angl.* TBE buffer 0,5x). Mešanico smo nato postavili v mikrovalovno pečico za dve minuti, da se je agarozna popolnoma raztopila. Raztopino smo nato nekoliko ohladili z ohlajanjem čaše pod mrzlo vodo. Ko je bila raztopina malo ohlajena, a še vedno topla in tekoča, smo ji primešali 10  $\mu\text{l}$  fluorescentnega barvila Midori Green (NIPPON Genetics EUROPE, Nemčija). Raztopino smo nato prelili v model, tako da je nastalo čim manj mehurčkov; tiste, ki pa so nastali, pa smo poskusil pomakniti čim bolj ob rob. Na koncu smo v model postavili še glavniček v prvo režo in počakali, da se je gel strdil.

Nato smo pripravili še vzorce. Na stojalu za mikrocentrifugirke smo si z voščeno folijo pripravili vdolbine, v katere smo kapnili po eno kapljico nanašalnega barvila. V vdolbine



smo nato odpipetirali po 5  $\mu$ l vzorca PCR produkta in vsakega posebej med pipetiranjem premešali z barvilom (16 vzorcev iz prejšnjega postopka). Poleg vzorcev smo pripravili tudi eno kapljico z velikostnim standardom za določanje dolžine PCR produktov.

Ko se je gel strdil, smo ga iz modela prestavili v banjico za elektroforezo in iz njega odstranili glavniček. V luknjice, ki jih je ustvaril glavniček, smo nato previdno odpipetirali pripravljene vzorce PCR produktov. Napravo smo nato pokrili in priklopili na električno napetost 120 V in pustil teči 35 minut.

Ko je bila elektroforeza končana, smo gel postavili pod kamero z UV svetlobo in na sliki opazovali rezultate oz. pomnožene produkte.

### **2.5.3 Genotipizacija**

Poleg gelske elektroforeze smo izbrane lokuse vzorcev tudi genotipizirali na sekvenatorju SeqStudio (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA), pridobljene podatke pa smo nato analizirali na računalniku s programom GeneMapper v.5.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA).

### 3 REZULTATI Z DISKUSIJO

#### 3.1 Analiza koncentracije DNA

Namen zaključne naloge je bil ugotoviti, s katerim od dveh kompletov (komplet 1 - starejši: S-Line in komplet 2 - novejši: peqGOLD) lahko iz vzorcev tkiva izoliramo višjo koncentracijo DNA. Rezultati izoliranih koncentracij DNA so prikazani v Tabeli 4.

Tabela 4: Primerjava koncentracij DNA, izoliranih s kompletoma S-Line in peqGOLD

Vzorci (laboratorijske oznake)	S-Line	peqGOLD
LME 1780	2,01 ng/μl	119 ng/μl
LME 1781	3,14 ng/μl	120 ng/μl
LME 1869	Pod mejo detekcije	123 ng/μl
LME 1870	1,55 ng/μl	139 ng/μl
LME 1871	1,23 ng/μl	95 ng/μl
LME 1872	1,39 ng/μl	173 ng/μl
LME 1873	1,38 ng/μl	135 ng/μl
LME 1874	Pod mejo detekcije	49,9 ng/μl
<b>Povprečje <math>\bar{x}</math></b>	1,78	119,2
<b>Standardni odklon (deviacija) <math>\sigma</math></b>	0,72	35,7
<b>Mediana</b>	1,47	121,5

Kot je razvidno iz Tabele 5, je povprečje meritev prve serije (koncentracija DNA izolirane s kompletom S-Line)  $1,78 \pm 0,72$  ng/μl, povprečje meritev druge serije (koncentracija DNA izolirane s kompletom peqGOLD) pa  $119,2 \pm 35,7$  ng/μl. Mediana prve serije je 1,47, mediana druge serije pa 121,5.

Tabela 5: Izračun U-testa

	»VWR/peqlab« Tissue DNA Mini Kit (S-Line)	»VWR« peqGOLD Blood & Tissue DNA Mini Kit
Število podatkov v setu ( $n_1, n_2$ )	6	8
Vsota zmag in izenačenj ( $U_1, U_2$ )	0+0+0+0+0+0=0	6+6+6+6+6+6+6+6=48

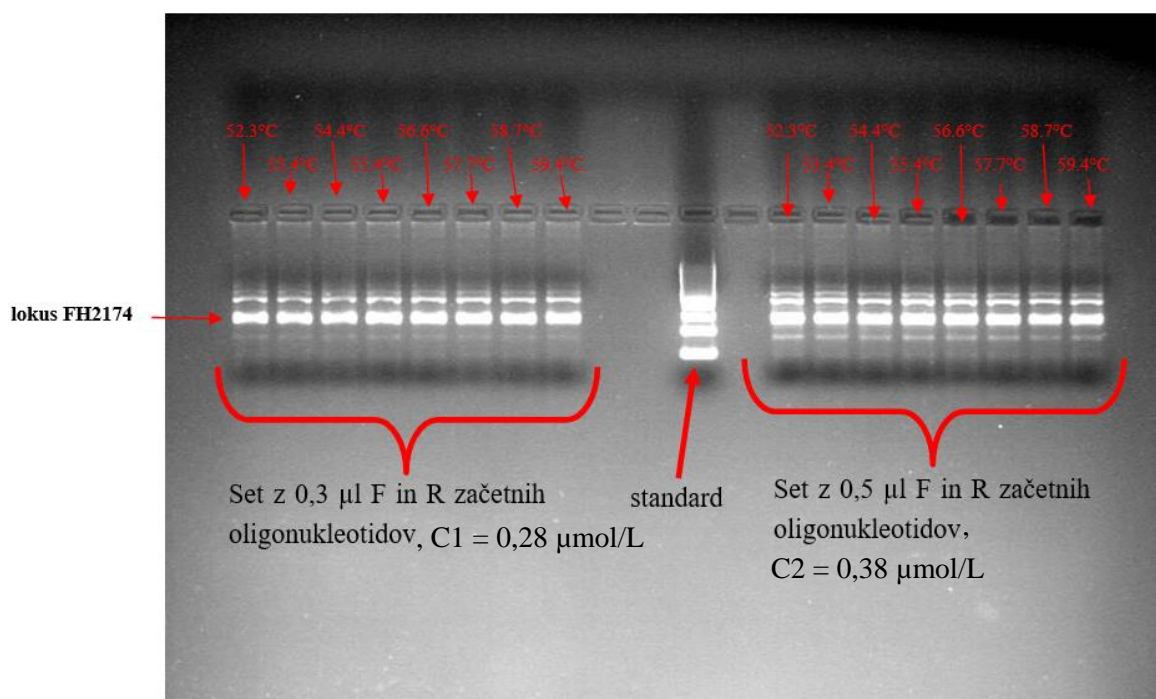
$$U = U_1 + U_2 = 0 + 48 = 48$$

Mejni vrednosti za U-statistiko odčitani iz Preglednice 1 za  $n_1=6$  in  $n_2=8$  sta 8 za 5 % stopnjo zaupanja in 4 za 1 % stopnjo zaupanja. Manjša vrednost od obeh setov podatkov je 0 ( $U_1$ ), kar je bližje mejni vrednosti 4, torej lahko vsaj s stopnjo zaupanja 99 % (100 %-1 %) ovržemo nulto hipotezo (t.j. da imata oba vzorca enako mediano).

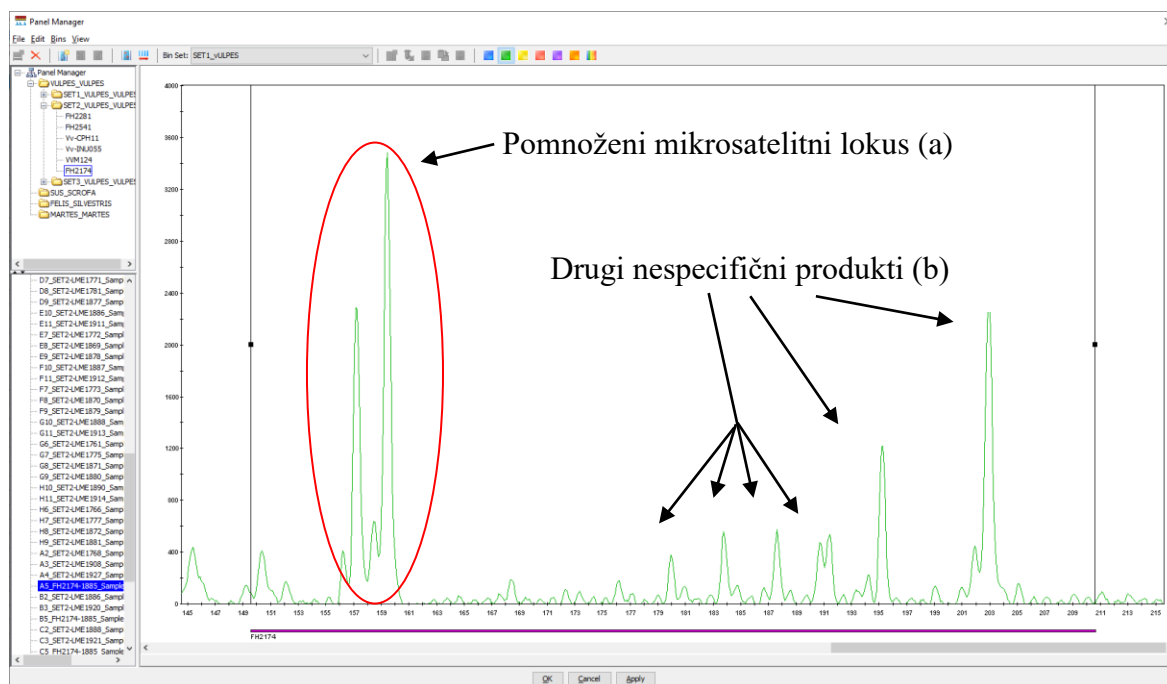
### 3.2 Optimizacija temperature prileganja začetnih oligonukleotidov v PCR reakciji

Namen drugega poskusa je bilo iskanje najbolj primerne temperature za proces prileganja začetnih oligonukleotidov. Slika gela (Slika 5) prikazuje pomnožene produkte vzorca LME 1885 (izoliran z kompletom peqGOLD) osvetljene z UV svetlobo. Iz slike je razvidno, da se je lokus pri vseh temperaturah in obeh koncentracijah dobro pomnožil.

Po uspešnem pomnoževanju smo opravili genotipizacijo izbranega lokusa na sekvenatorju SeqStudio (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA). Podatke smo analizirali s programom GeneMapper v.5.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA). Na digitalnih slikah gradienta vzorcev z višjo koncentracijo začetnih oligonukleotidov ( $C_2 = 0,38 \mu\text{mol/L}$ ) (Slike 7 - 15), ki prikazujejo, na katerih delih verige so se zaporedja namnožila, je razvidno, da se je poleg mikrosatelitskega lokusa (na slikah označeno z a) pomnožilo tudi veliko drugih nespecifičnih produktov (na slikah označeno z b). Prvi velik vrh na gradientu elektroferograma je mikrosatelitni lokus, ostali vrhovi pa so drugi nespecifični produkti.

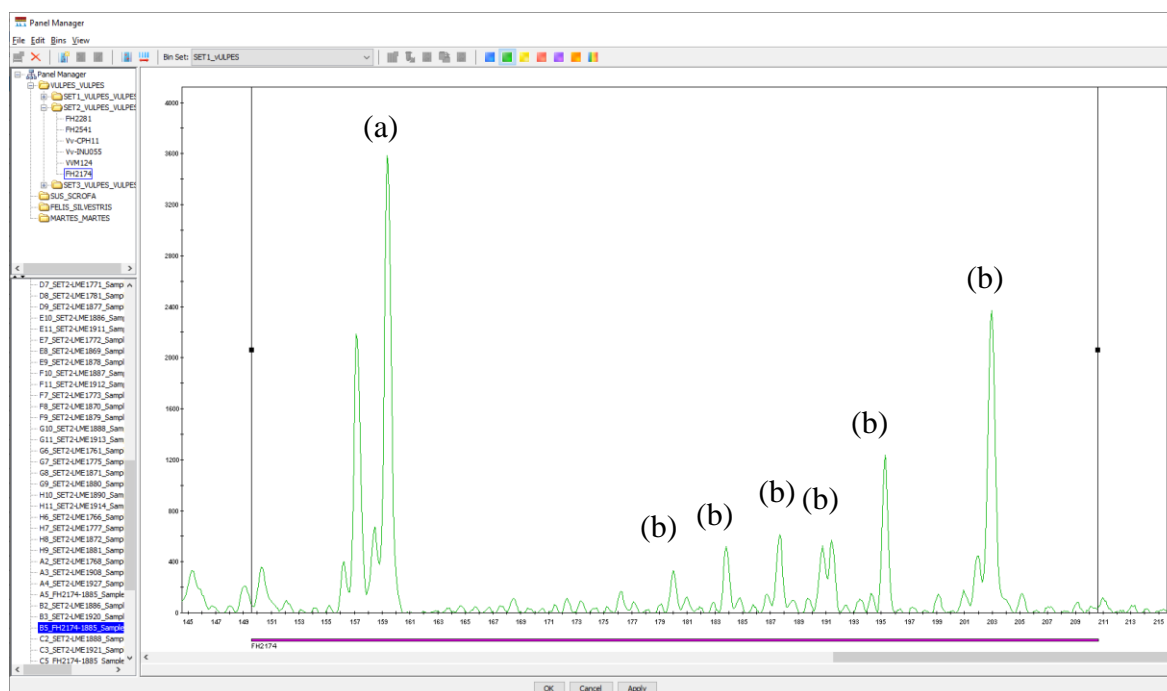


Slika 6: Slika gela elektroforeze pod UV svetlobo



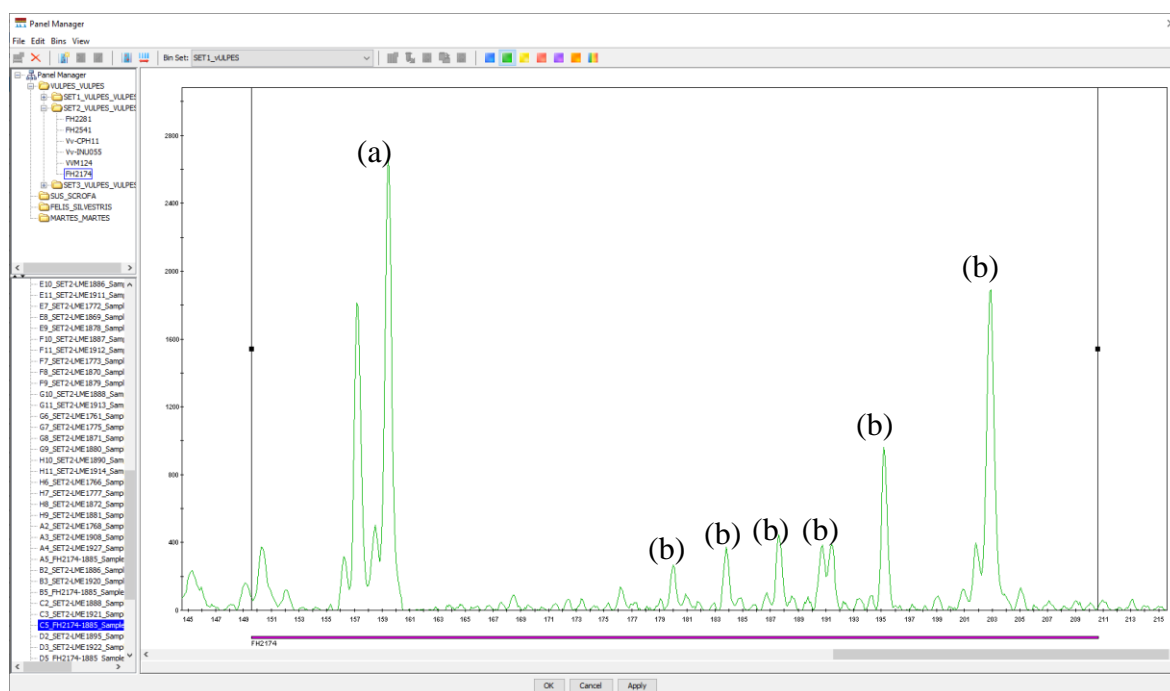
Slika 7: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 52,3°C

Slika 8 prikazuje alele pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi 52,3°C. Iz slike je razvidno, da se je poleg iskanega lokusa (a) pomnožili tudi nespecifični produkti (b).



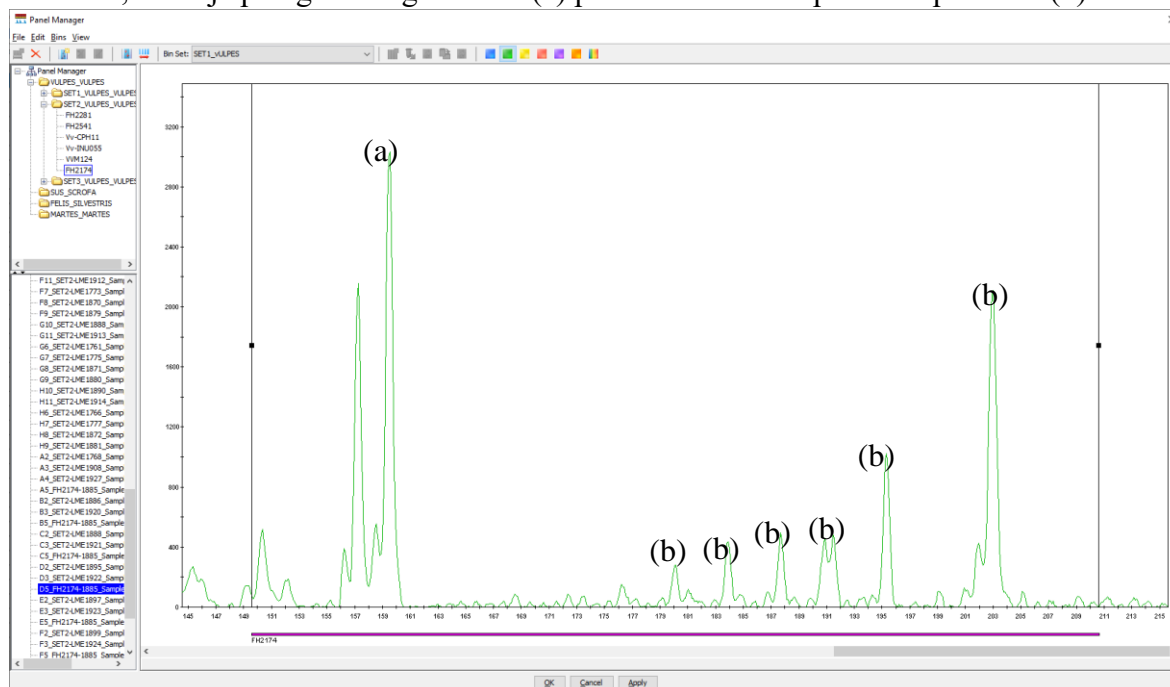
Slika 8: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 53,4°C

Slika 9 prikazuje alele pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi 53,4°C. Iz slike je razvidno, da se je poleg iskanega lokusa (a) pomnožili tudi nespecifični produkti (b).



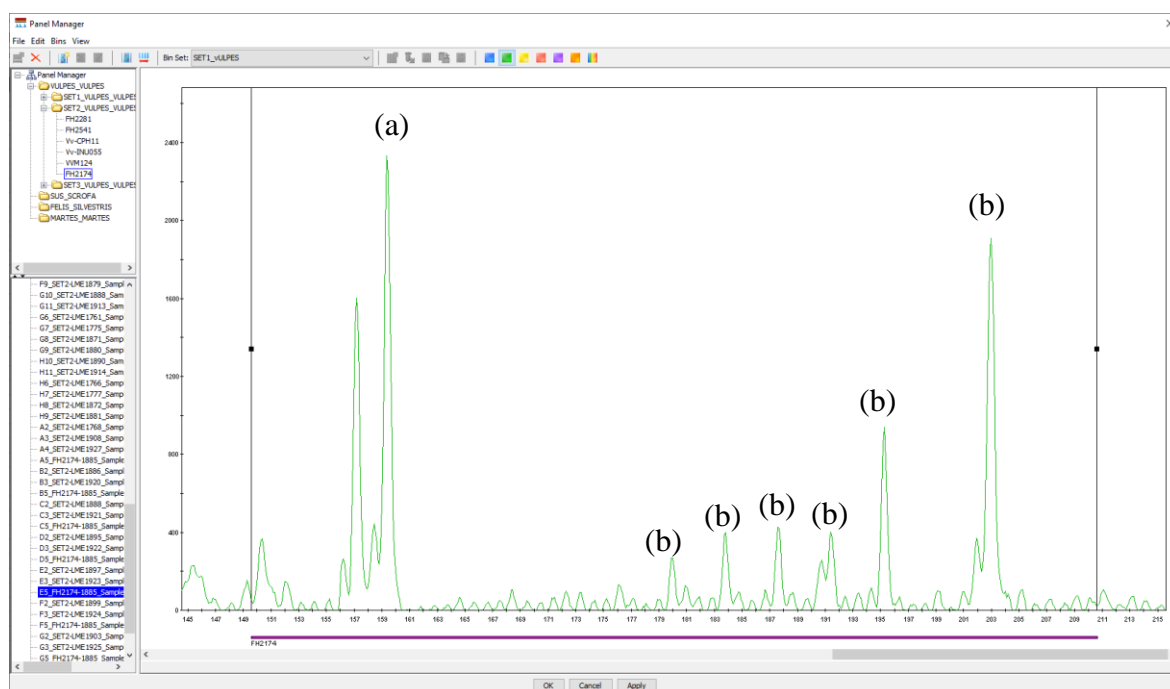
Slika 9: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 54,4°C

Slika 10 prikazuje alele pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi 54,4°C. Iz slike je razvidno, da se je poleg iskanega lokusa (a) pomnožili tudi nespecifični produkti (b).



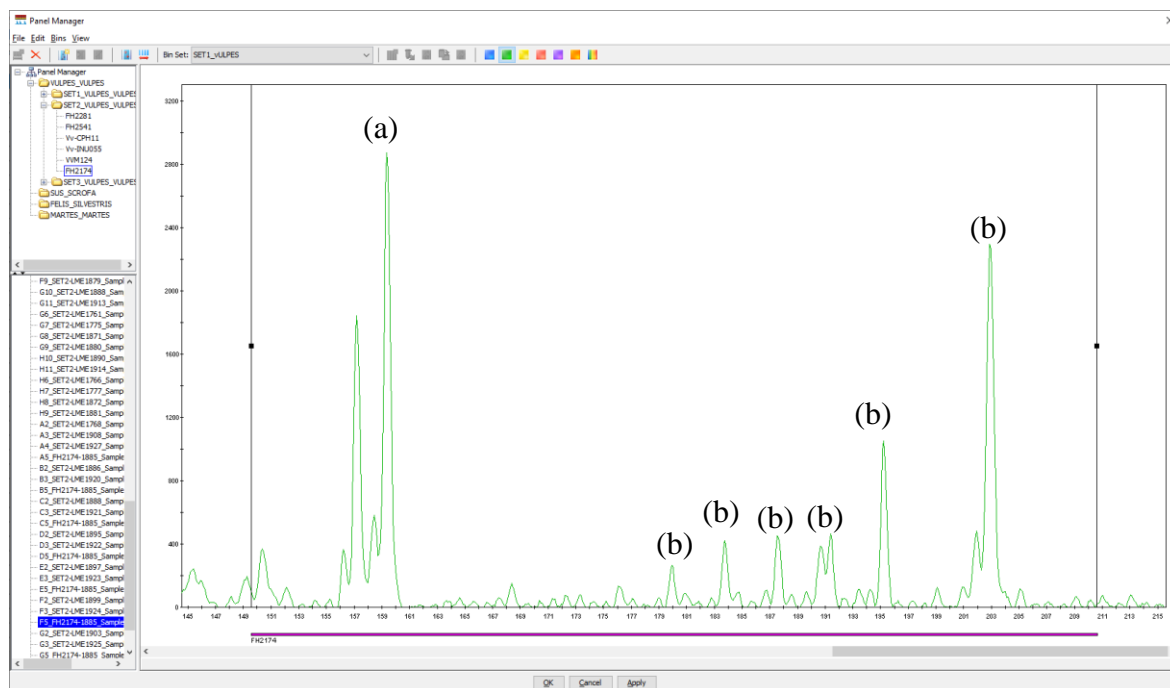
Slika 10: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 55,4°C

Slika 11 prikazuje alele pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi 55,4°C. Iz slike je razvidno, da se je poleg iskanega lokusa (a) pomnožili tudi nespecifični produkti (b).



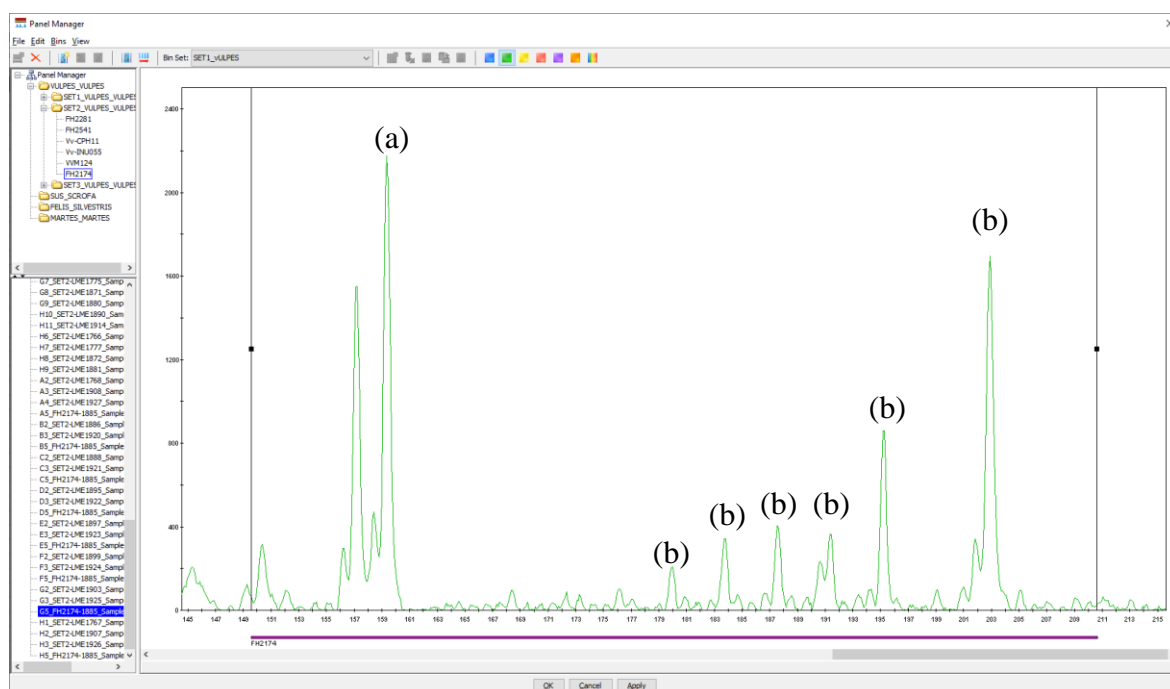
Slika 11: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 56,6°C

Slika 12 prikazuje alele pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi 56,6°C. Iz slike je razvidno, da se je poleg iskanega lokusa (a) pomnožili tudi nespecifični produkti (b).



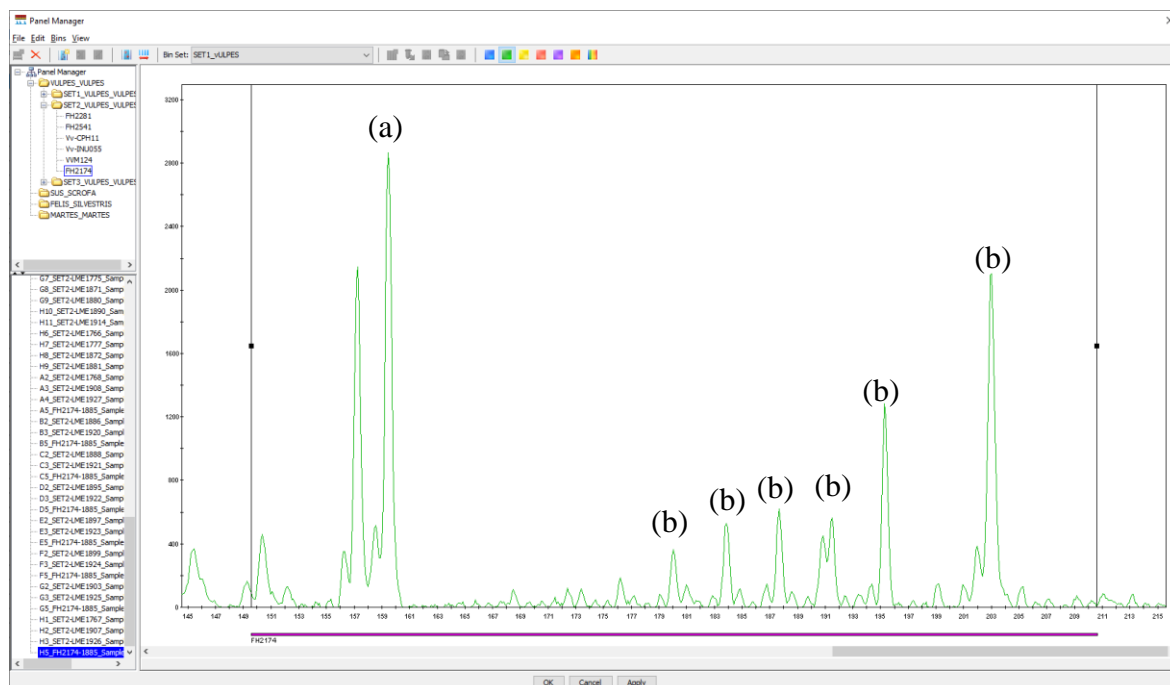
Slika 12: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 57,7°C

Slika 13 prikazuje alele pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi 57,7°C. Iz slike je razvidno, da se je poleg iskanega lokusa (a) pomnožili tudi nespecifični produkti (b).



Slika 13: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 58,7°C

Slika 14 prikazuje alele pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi 58,7°C. Iz slike je razvidno, da se je poleg iskanega lokusa (a) pomnožili tudi nespecifični produkti (b).



Slika 14: Prikaz alelov pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 59,4°C

Slika 15 prikazuje alele pomnoženega lokusa FH2174 pri temperaturi 59,4°C. Iz slike je razvidno, da se je poleg iskanega lokusa (a) pomnožili tudi nespecifični produkti (b).

Kot je razvidno iz slik elektroferogramov, so bili rezultati vseh testiranih temperatur prileganja začetnih oligonukleotidov in DNA koncentracij podobni, saj se gradienti praktično ne razlikujejo. To pomeni, da bo za optimalno pomnožitev lokusa brez pomnoževanj nespecifik potrebna dodatna optimizacija, ki vključuje ponovno dizajniranje začetnih oligonukleotidov, spremenjene koncentracije reagentov pri PCR reakciji ali pa izvedbo reakcije pri drugačnih temperaturah.



## 4 ZAKLJUČEK

V zaključni nalogi smo izvedli poskus optimizacije pomoževanja in izolacije DNA za uspešno genotipizacijo mikrosatelitskih lokusov pri vzorcih lisic. V nalogi smo testirali dva kompleta za izolacijo DNA iz živalskega tkiva in opravili gradientni PCR, da bi za izolirane vzorce DNA določili optimalno temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov.

Rezultati zaključne naloge so potrdili prvo zastavljeno hipotezo, da se koncentracije izolirane DNA značilno razlikujejo glede na uporabljen komplet za izolacijo. Izmerjene koncentracije izolirane DNA so bile višje pri vzorcih izoliranih s kompletom *peqGOLD* (povprečno 119,2 ng/μl, mediana = 121,5), v primerjavi s koncentracijami izoliranimi z kompletom *S-Line* (povprečno 1,782 ng/μl, mediana = 1,47). To smo dokazali tudi s statistično analizo (U-test), s katero smo z 99% verjetnostjo ovrgli nulto hipotezo (ki pravi, da sta mediani rezultatov iz obeh kompletov enaki) (Mann–Whitney  $U_1=0$ ,  $n_1=6$ ,  $n_2=8$ ,  $P<0,01$ ). V skladu s temi rezultati pri nadaljnjih projektih za izolacijo DNA priporočamo uporabo kompleta »VWR« *peqGOLD Blood & Tissue DNA Mini Kit*. Menimo pa, da bi bila smiselna primerjava še z kakšnim drugim kompletom za izolacijo DNA, ki bi nam lahko dal še višje koncentracije, pa tudi bolj čisto izolirano DNA.

S protokoli za analizo mikrosatelitskih lokusov pri lisicah, ki smo jih testirali za optimizacijo temperature prileganja začetnih oligonukleotidov, nismo uspeli ne potrditi, ne ovreči druge hipoteze, da je optimizacija odvisna od temperature prileganja. Ugotovili smo namreč, da se pri vseh testiranih temperaturah prileganja začetnih oligonukleotidov ( $T_1 = 52,3^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 53,4^\circ\text{C}$ ,  $T_3 = 54,4^\circ\text{C}$ ,  $T_4 = 55,4^\circ\text{C}$ ,  $T_5 = 56,6^\circ\text{C}$ ,  $T_6 = 57,7^\circ\text{C}$ ,  $T_7 = 58,7^\circ\text{C}$  in  $T_8 = 59,4^\circ\text{C}$ ) poleg iskanega lokusa pomnožujejo tudi nespecifični produkti, kar je verjetno posledica nespecifično dizajniranih začetnih oligonukleotidov za lisice (začetni oligonukleotid za lokus FH2174 je prvotno bil dizajniran za pse (*Canis familiaris*) (Richman in sod. 2001; Kukekova in sod. 2004a, b; Kukekova in sod. 2007)). Zato je potrebna dodatna optimizacija protokola in kontrola čistosti izolirane DNA.

## 5 LITERATURA IN VIRI

Akinwole M. T., Babarinde I. A. 2019. Assessing Tissue Lysis with Sodium Dodecyl Sulphate for DNA Extraction from Frozen Animal Tissue. *Journal of Forensic Research* 10

Amplifying DNA - The Polymerase Chain Reaction. (2021, January 3):

[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A\\_Microbiology\\_\(Boundless\)/7%3A\\_Microbial\\_Genetics/7.13%3A\\_Bioinformatics/7.13E%3A\\_Amplifying\\_DNA\\_-\\_The\\_Polymerase\\_Chain\\_Reaction](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Boundless)/7%3A_Microbial_Genetics/7.13%3A_Bioinformatics/7.13E%3A_Amplifying_DNA_-_The_Polymerase_Chain_Reaction) (datum dostopa: 29.03.2022)

Andam C. P., Challagundla L., Azarian T., Hanage W. P., Robinson D. A. 2017. *Genetics and Evolution of Infectious Diseases (Second Edition)*. Elsevier Inc.: 51

Atterby H., Allnutt T. R., MacNicol A. D., Jones E. P., Smith G. C. 2015. Population genetic structure of the red fox (*Vulpes vulpes*) in the UK. *Mammal Research* 60: 9–19

Berry O., Kirkwood R. 2010. Measuring Recruitment in an Invasive Species to Determine Eradication Potential. *Journal of Wildlife Management* 74: 1661–1670

Brinkmann B., Klintschar M., Neuhuber F., Hühne J., Burkhard R. 1998. Mutation Rate in Human Microsatellites: Influence of the Structure and Length of the Tandem Repeat. *The American Journal of Human Genetics*. 62: 1408–1415

Bužan E., Potušek S., Urzi F., Pokorny B., Šprem N. 2020. Genetic characterisation of wild ungulates: successful isolation and analysis of DNA from widely available bones can be cheap, fast and easy. *Zookeys* 965: 141–156

Bužan E., Lužnik M., Alagić A., Flajšman K., Adamič M., Pokorny B. 2020. Divjad v naseljih: težave, izzivi in rešitve. *Zlatorogov zbornik VII*: 3–51

DNA isolation, blood and tissue DNA mini kits, peqGOLD:

<https://si.vwr.com/store/product/27582701/dna-isolation-blood-and-tissue-dna-mini-kits-peqgold> (datum dostopa: 15. 7. 2021)

Global Invasive Species Database (GISD) (2021) Species profile: *Vulpes vulpes*. :

<https://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=66> (datum dostopa: 15. 7. 2021)

Guy-Franck R., Kerrest A., Dujon B. 2008. Comparative Genomics and Molecular Dynamics of DNA Repeats in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 72: 686–727

- Hartl D.L., Clark A. G. 1997. Principles of Population Genetics Third Edition. Sinauer Associates Inc.
- Heptner V. G. 1998. Mammals of the Soviet Union. Smithsonian Institution Libraries and National Science Foundation: 341–365, 453–502, 513–562.
- IUCN Red List: <https://www.iucnredlist.org/species/23062/46190249> (datum dostopa: 15. 7. 2021)
- Jeffrey G. 2012. Microsatellite Markers for Linkage and Association Studies. Cold spring harbor protocols. 2012: 424–432
- Keyghobadi N. 2007. The genetic implications of habitat fragmentation for animals. Canadian Journal of Zoology 85: 1049–1064.
- Khan Academy - Polymerase chain reaction (PCR):  
<https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr> (datum dostopa: 29.03.2022)
- Kidwell K. K., Osborn T. C. 1992. Simple plant DNA isolation procedures. Plant Genomes: Methods for Genetic and Physical Mapping. Springer Science+Business Media Dordrecht: 1–13
- Kimmig S. E., Beninde J., Brandt M., Schleimer A., Kramer-Schadt S., Hofer H., Börner K., Schulze C., Wittstatt U., Heddergott M., Halczok T., Staubach C., Frantz A. C. 2019. Beyond the landscape: resistance modelling infers physical and behavioural gene flow barriers to a mobile carnivore across a metropolitan area. Molecular ecology volume 29: 466–484
- Kukekova A. V., Trut L. N., Oskina I. N., Kharlamova A. V., Shikhevich S. G., Kirkness E. F. , Aguirre G. D., Acland G. M. 2004. A Marker Set for Construction of a Genetic Map of the Silver Fox (*Vulpes vulpes*). Journal of Heredity 95: 185–194
- Kukekova A. V., Trut L. N., Oskina I. N., Johnson J. L., Temnykh S. V., Kharlamova A. V., Shepeleva D. V., Gulievich R. G., Shikhevich S. G., Graphodatsky A. S., Aguirre G. D., Acland G. M. 2007. A meiotic linkage map of the silver fox, aligned and compared to the canine genome. Genome Res. 17: 387–399
- McDevitt A. D., Coscia I., Browett S. S., Ruiz-González A., Statham M. J., Ruczyńska I., Roberts L., Stojak J., Frantz A. C., Norén K., Ågren E. O., Learmount J., Basto M., Fernandes C., Stuart P., Tosh D. G., Sindicic M., Andreanszky T., Isomursu M.,

Panek M., Korolev A., Okhlopkov I. M., Saveljev A. P., Pokorny B., Flajšman K., Harrison S. W. R, Lobkov V., Čirović D., Mullins J., Pertoldi C., Randi E., Sacks B. N., Kowalczyk R., Wójcik J. M. 2021. Next-generation phylogeography resolves post-glacial colonization patterns in a widespread carnivore, the red fox (*Vulpes vulpes*), in Europe. *Molecular ecology* volume 31: 993–1006

Press release. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2022:

<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/press-release/> (datum dostopa: 29.03.2022)

Real statistics using Excel. Shapiro – Wilk original test: <https://www.real-statistics.com/tests-normality-and-symmetry/statistical-tests-normality-symmetry/shapiro-wilk-test/> (datum dostopa: 29.06.2022)

Richman M., Mellersh C. S., André C., Galibert F., Ostrander E. A. 2001. Characterization of a minimal screening set of 172 microsatellite markers for genome wide screens of the canine genome. *J. Biochem. Biophys. Methods* 47: 137–149

Schlaepfer D. R., Braschler B., Rusterholz H. P., Baur B. 2018. Genetic effects of anthropogenic habitat fragmentation on remnant animal and plant populations: a meta-analysis. *Ecosphere An esa open access journal* Volume 9: Article e02488

Sillero-Zubiri C., Hoffman M., MacDonald D. W. 2004. Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs, Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Canid Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: 132–133

Soulsbury C. D., Baker P. J., Iossa G., Harris S. 2010. Red foxes (*Vulpes vulpes*). V: Urban carnivores: Ecology, conflict, and conservation. Baltimore, John Hopkins University Press: 63–75.

Tissue DNA Mini Kits, peqGOLD: <https://de.vwr.com/store/product/en/16763411/tissue-dna-mini-kits-peqgold?languageChanged=en> (datum dostopa: 15. 7. 2021)

Vieira M. L. C., Santini L., Diniz A. L., Munhoz C. F. 2016. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology* 2016 Jul.–Sep.; 39: 312–328

Wesselink M., Kuiper I. 2011. Individual identification of fox (*Vulpes vulpes*) in forensic wildlife investigations. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 3: e214–e215

Žibert J. 2012. skripta za predmet VERJETNOST IN STATISTIKA V TEHNIKI IN NARAVOSLOVJU na študijskem programu Računalništva in informatike na 2. stopnji UP FAMNIT.: 44