

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA

ZAKLJUČNA NALOGA
PREDNOSTI NOVE GENERACIJE DOLOČANJA
NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA V PRIMERJAVI S
SANGERJEVO METODO: PRIMER DEGRADIRANIH
TKIVNIH VZORCEV

LEO DARIŠ

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Prednosti nove generacije določanja nukleotidnega zaporedja v primerjavi s
Sangerjevo metodo: primer degradiranih tkivnih vzorcev**

(New generation sequencing as a promising alternative to Sanger sequencing: A case of
degraded tissue samples)

Ime in priimek: Leo Dariš

Študijski program: Biodiverziteta

Mentor: doc. dr. Elena Varljen Bužan

Somentor: dr. Martina Lužnik

Koper, september 2013

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Leo DARIŠ

Naslov zaključne naloge:

Prednosti nove generacije določanja nukleotidnega zaporedja v primerjavi s Sangerjevo metodo: primer degradiranih tkivnih vzorcev.

Kraj: Koper

Leto: 2013

Število listov: 37

Število slik: 4

Število tabel: 2

Število prilog: 1

Št. strani prilog: 1

Število referenc: 40

Mentor: doc. dr. Elena Varljen Bužan

Somentor: dr. Martina Lužnik

UDK:

Ključne besede: DNA, PCR, nova generacija določanja nukleotidnega zaporedja, Ion Torrent, Nanopore, degradirana DNA, Shotgun sequencing, Hybridization capture

Izvleček:

Na primeru endemične Horvatove kuščarice (*Iberolacerta horvathi*) predstavljamo problematiko in možne izboljšave pomnoževanja in določanja nukleotidnega zaporedja DNA izolirane iz starih muzejskih vzorcev. Zaradi dolgotrajnega hranjenja, vsebujejo taki vzorci ob delovanju inhibitorjev, veliko degradirane DNA, kar otežuje pravilno branje nukleotidnega zaporedja. Nove generacije določanja nukleotidnega zaporedja omogočajo hitrejše in cenejše branje nukleotidov v primerjavi s klasično metodo po Sangerju. Z novejšimi že obstoječimi metodami ter prihajajočimi novimi tehnologijami branja nukleotidnega zaporedja, lahko računamo na veliko bolj uspešno, hitrejšo in cenejšo določanje DNA, kar bi pomenilo veliko revolucijo za biološke vede. Pri klasični metodi je bila nujna uporaba reakcije PCR za ciljno obogatitev fragmentov DNA, vendar se pri novejših metodah le ta izpusti, zaradi drugačnih procedur. Za zdaj je slabost nove tehnike predvsem krajša dolžina pridobljenih fragmentov in zahtevna analiza podatkov, za katere še ni ustreznega programskega orodja s katerim bi se dalo obdelati večje količine pridobljenih podatkov. Tako lahko v bližnji prihodnosti pričakujemo boljšo izrabo tehnik nove generacije, saj se bo v tem času predvidevoma razvila ustrezna bioinformatična programska oprema ki bo omogočala analizo večje količine podatkov v zelo kratkem času.

Key words documentation

Name and SURNAME: Leo DARIŠ

Title of the final project paper:

New generation sequencing as a promising alternative to Sanger sequencing: A case of degraded tissue samples

Place: Koper

Year: 2013

Number of pages: 37

Number of figures: 4

Number of tables: 2

Number of appendix: 1

Number of appendix pages: 1

Number of references: 40

Mentor: doc. dr. Elena Varljen Bužan

Co-Mentor: dr. Martina Lužnik

UDC:

Keywords: : DNA, PCR, nova generacija določanja nukleotidnega zaporedja, Ion Torrent, Nanopore, degradirana DNA, Shotgun sequencing, Hybridization capture

Abstract:

On the case of endemic Horvat lizard (*Iberolacerta horvathi*) we present some problems and possible improvements in the amplification and determining the nucleotide sequence of DNA isolated from old museum specimens. This samples are duo to long-term conservation under the action of inhibitors, where a lot of DNA is degraded and making it difficult to correctly read the nucleotide sequence. The next generation sequencing techniques are able to determine sequences faster and cheaper, compared with a classic Sanger method. With newer existing methods, we can count on much more successful, faster and cheaper DNA sequencing, which could mean a great revolution for the biological science. While using the classic method was necessary to use PCR as a target enrichment technique for DNA fragments, while with the next generation sequence techniques this step is no longer needed because of the diference in the procedure. For now, the weakness of the new techniques are shorter nucleotide sequences and complex data analysis, for which there is no suitable software tool that can process large amounts of data obtained. In the near future we can expect to make better use of next generation sequencing techniques because they will probably develop the appropriate bioinformatics software that allows analysis of larger amounts of data in a very short period of time.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, doc. dr. Eleni Varljen Bužan ter somentorici, dr. Martini Lužnik za vso strokovno pomoč in napotke, s katerimi sta mi omogočili pravočasen zaključek naloge. Poleg sprotne pomoči, se jima iskreno zahvaljujem za možnost opravljanja laboratorijskega dela raziskave v Laboratoriju za molekularno ekologijo v Izoli, Univerze na Primorskem, Znanstveno-raziskovalnega središča.

Iskreno se zahvaljujem komisiji, doc. dr. Dunji Bandelj in mag. Živi Fišer Pečnikar, da sta si vzeli čas in hitro pregledali nalogo, brez katerih ne bi zaključil v roku.

Zahvaljujem se Sari Zupan ter Nataši Fujs, za vso nudeno pomoč, svetovanje in zlata vredne napotke ob opravljanju laboratorijskega dela.

Iskreno se zahvaljujem svoji družini in prijateljem, ki so mi vseskozi nudili pomoč in moralno podporo. Še posebej se zahvaljujem Ferdinand Lipeju ter Marku Štifaniču za vse fraj dneve in zamenjave na delu, brez katerih nebi imel dovolj časa za zaključit nalogo. Rad bi se še iskreno zahvalil puncu Valentini, ki mi je ves čas stala ob strani.

KAZALO

Kazalo vsebine

1	UVOD	1
1.1	Pomen genetike v varstveni biologiji	1
1.2	Muzejski vzorci in njihova uporabnost ter problematika v genetskih raziskavah	1
1.3	Klasično določanje nukleotidnega zaporedja z metodo po Sangerju	2
1.4	Določanje nukleotidnega zaporedja nove generacije	3
1.5	Namen in cilji zaključne naloge	4
2	METODE DELA.....	5
2.1	Potek raziskave.....	5
2.2	Laboratorijsko delo.....	6
2.2.1	Izolacija DNA	6
2.2.2	Koncentracija in čistost izolirane DNA.....	7
2.2.3	Dodatno čiščenje vzorcev in redčenje	8
2.2.4	Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	8
2.2.5	Agarozna elektroforeza	11
2.2.6	Določanje nukleotidnega zaporedja	13
2.3	Računalniška obdelava pridobljenih podatkov.....	14
3	REZULTATI Z DISKUSIJO	16
3.1	Rezultati.....	16
3.1.1	Izmerjena absorbanca in koncentracija	16
3.1.2	Uspešnost reakcije PCR	18
3.1.3	Branje in določanje nukleotidnega zaporedja.....	18
3.2	Diskusija.....	19
3.2.1	Tehnologija nove generacije določanja nukleotidnega zaporedja.....	19
3.2.2	Prihodnost.....	21
3.3	Povzetek prednosti in slabosti nove generacije določanja nukleotidnega zaporedja v primerjavi s klasično Sangerjevo metodo.....	23
4	ZAKLJUČEK.....	24
5	SEZNAM LITERATURE IN VIROV	25

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Pridobljeni rezultati analiziranih vzorcev	17
Preglednica 2: Prednosti in slabosti klasične in nove metodologije.....	23

Kazalo slik

Slika 1: Shematski prikaz verižne reakcije s polimerazo (povzeto po: Erlich, 1989)	9
Slika 2: Primer temperaturnega profila in cikla verižne reakcije s polimerazo (povzeto po: Blaber, 2013)	10
Slika 3: Primer slikanega gela s programom GelCapture.....	12
Slika 4: Primer obdelave nukleotidnega zaporedja določenega vzorca (CodonCode Aligner).....	15

Kazalo Prilog

Priloga 1: Preglednica analiziranih vzorcev	30
---	----

1 UVOD

1.1 Pomen genetike v varstveni biologiji

Genetske raziskave so tekom let omogočile precej natančen vpogled v preteklost živih bitij. Govorimo o evlucijskih poteh, ki so se skozi več tisoč let spreminjale zaradi dejavnikov živega in neživega sveta. Zaradi evlucijskega pritiska so nekatere vrste pustile za sabo sled v neživi obliki, druge pa so še danes prisotne, vendar v nekoliko drugačni obliki kot so bile pred več tisoč leti. Tako se je postopoma oblikovala biotska raznovrstnost.

Živimo v času, kjer se zaradi človekovega poseganja v naravo uničuje in krči življenjski prostor mnogih živih bitij, do te mere, da lahko postane neprimeren za nadaljnje bivanje. Dolgoročno negativni vplivi vodijo v povečano smrtnost populacij in navsezadnje v izumrtje same vrste/taksona. Tako s časoma izumirajo evlucijske linije, ki so več tisočletij nastajale v evlucijskem procesu.

Z raziskavami o genetskem ustroju organizmov lahko pripomoremo k varovanju in ohranjanju vrst, ki so zaradi različnih razlogov ogrožene in podvržene kritičnemu upadu številčnosti populacij. Genetski podatki nam ponujajo informacije o filogeniji in filogeografiji vrste. S populacijsko genetiko tako opredelimo stanje določene vrste in morebitne spremembe številčnosti. Skupaj z ekološkimi raziskavami, lahko na ta način zberemo zadostno število podatkov za določitev varstvenega statusa in primernih upravljalških smernic v dobro-bit določene vrste.

1.2 Muzejski vzorci in njihova uporabnost ter problematika v genetskih raziskavah

Za genetske analize (npr. filogeografske, populacijske itd.) je lažje in boljše analizirati sveže vzorce, ki so bili neposredno odvzeti iz narave. Taki vzorci vsebujejo veliko ohranjene DNA, kar olajšuje določanje nukleotidnega zaporedja. Včasih svežih vzorcev ni mogoče pridobiti zaradi majhnega števila težko dostopnih osebkov. V takem primeru imajo velik pomen vzorci, ki so hranjeni v muzejskih zbirkah, in so tako na voljo za razreševanje filogenetskih ali filogeografskih vprašanj (Lužnik in sod., 2011). Molekularna sistematika, filogenija in filogeografija ter evlucijske študije, uporabljajo muzejske vzorce za razumevanje in opisovanje sorodstvenih odnosov med vrstami,

rodovi in družinami. Muzejske zbirke nam prav tako omogočajo dostop do znotrajvrstnih genetskih vzorcev, iz katerih lahko podamo relativno oceno genetske diverzitete vrst v naraščanju in upadanju (Higuchi in sod., 1984; Wandeler in sod., 2007).

V zadnjih dvajsetih letih je bilo veliko raziskav narejenih na osnovi starodavne DNA. Za vrste, ki so že zdavnaj izumrle, so muzejski vzorci edini vir genetska zapisa, ki je še na voljo. Z uporabo takih vzorcev, lahko še danes ugotavljamo morebitne spremembe genetske raznolikosti vrst in populacij v času (Rohland in sod., 2004).

Muzejske zbirke tako predstavljajo pomemben vir DNA, ki je zaradi različnih razlogov drugače nedostopna. Za razliko od svežih, je v muzejskih vzorcih DNA velikokrat degradirana in v manjših koncentracijah, kar otežuje določanje nukleotidnega zaporedja. Degradacija DNA je proces, pri katerem se dolga dvojna vijačnica razbije na krajše fragmente. Razlogov za to je lahko več. Okoljski dejavniki, kot so sončna svetloba ali temperatura, lahko povzročijo degradacijo DNA po naravni poti zaradi pretrganja vezi. Drugi razlog je nepravilno shranjevanje tkivnih in izoliranih vzorcev DNA. V primeru, da DNA ni bil dovolj dobro očiščen, lahko nekateri encimi za razgradnjo ostanejo v raztopini in posledično degradirajo izolirano DNA. Nepravilen medij za shranjevanje brez pufra lahko prav tako vodi v degradacijo. Degradacijo lahko povzroči tudi večkratno odtajanje vzorca zaradi ponovitev analiz ter ponovno zamrzovanje. Poleg tega je lahko vzorec že tako star, da so predhodno delovali nanj dejavniki, ki so vplivali na degradacijo (McCord in sod., 2011).

1.3 Klasično določanje nukleotidnega zaporedja z metodo po Sangerju

V sedemdesetih letih preteklega stoletja so Sanger in sod. (1977) ter Maxam in sod. (1976) predstavili nov način določevanja nukleotidnega zaporedja. S tem so postavili temelje nadaljnjih genetskih raziskav. S to tehnologijo je naprava v enem dnevu lahko analizirala okoli 30.000 baz, pri čemer je bil približen strošek okoli 0,50 ameriškega dolarja na bazo pri končanem zaporedju. Sangerjeva, klasična metoda se uporablja še danes, vendar zahteva dva delovna dneva in veliko količino čiste DNA, za uspešno določanje okoli 700 bp dolgih sekvenc nukleotidnega zaporedja (Deamer in sod., 2000).

Pri klasični metodi, mora biti za določanje nukleotidnega zaporedja, koncentracija tarčne DNA visoka. To se doseže z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), kjer se pomnoži želene DNA fragmente ob uporabi začetnih oligonukleotidov. Namnoženo DNA se nato uporabi v reakciji verižnega pomnoževanja, ki se naključno zaustavi z vključitvijo fluorescentno označenega dideoksinukleotida. Končni produkt je tako mešanica različno dolgih verig DNA, ki so označene z ustreznim fluoroforom glede na končni nukleotid. Visoko-ločljivostno ločevanje označenih verig s kapilarno elektroforezo in določitev fluoroforov omogoča določitev nukleotidnega zaporedja (Berlec in sod., 2010).

V zaključni nalogi smo uporabili standardne molekularno-genetske analize, ki vključujejo izolacijo DNA iz tkiva, preverjanje koncentracije izolirane DNA, verižno reakcijo s polimerazo (PCR), čiščenje PCR produktov, sekvenčno reakcijo in določanje nukleotidnega zaporedja (t. i. »sekveniranje«) z metodo po Sangerju. Zaradi degradirane DNA in delovanja inhibitorjev pri tem postopku, imamo lahko težave že pri pomnoževanju DNA ali določanju nukleotidnega zaporedja (npr. pridobljena nukleotidna zaporedja so slabe kakovosti in neberljiva).

1.4 Določanje nukleotidnega zaporedja nove generacije

V zadnjih letih so se tehnike določanja nukleotidnega zaporedja izboljšale do te mere, da omogočajo hitrejše in uspešnejše pridobivanje genetskih informacij. Z novo generacijo določanja nukleotidnega zaporedja (angl. »*Next-generation sequencing*«) postaja analiza zaporedja DNA enostavnejša in končni rezultati natančnejši. Slabost nove tehnike je predvsem krajša dolžina pridobljenih fragmentov in zahtevna analiza podatkov (Ansorge, 2009).

Nova generacija določanja nukleotidnega zaporedja je spremenila skoraj vsa področja genetike. Za razliko od ostalih področij genetskih raziskav, imajo analize starodavne DNA še posebej veliko korist od te inovacije. Z novimi metodami se raziskave, ki temeljijo na starodavnih vzorcih, premikajo v center evolucijske biologije. V kratkem času, odkar so na voljo nove tehnike določanja nukleotidnega zaporedja, se je zelo povečala količina zbranih podatkov (DNA zaporedij) izumrlih vrst. Nove tehnike nam tako tudi omogočajo obdelavo pomembnih podatkov, ki pripomorejo k razumevanju izvora naše vrste (Knapp, 2010).

1.5 Namen in cilji zaključne naloge

Na primeru endemične velebitske ali Horvatove kuščarice (*Iberolacerta horvathi*), predstavljamo problematiko pomnoževanja nukleotidnega zaporedja DNA, izolirane iz starih muzejskih vzorcev. S pomočjo strokovne literature se osredotočamo na razumevanje tehnik nove generacije določanja nukleotidnega zaporedja ter skušamo ovrednotiti uspešnost novih metod pri genetskih raziskavah starih in degradiranih vzorcev z veliko vsebnostjo fragmentirane DNA. Taki vzorci so zelo pomembni, saj predstavljajo vir informacij iz preteklosti, vendar je bilo s klasičnimi metodami težko iz njih pridobiti pravilno nukleotidno zaporedje. Z metodami nove generacije določanja nukleotidnega zaporedja lahko morda pričakujemo boljše rezultate, tudi v primeru muzejskih vzorcev.

2 METODE DELA

Metode vključujejo opravljeno laboratorijsko delo v Laboratoriju za molekularno ekologijo v Izoli (Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče). Laboratorij je namenjen genetskim raziskavam, kjer poteka izolacija in delo z DNA in RNA (ribonukleinske kisline). Pri delu smo sledili standardnemu protokolu za tovrstne genetske raziskave. Varnost pri delu in uspešnost rezultatov, sta bili zato odvisni od upoštevanja pravil in protokolov za delo v laboratoriju, ki se jih je bilo potrebno držati.

Drugi del zaključne naloge temelji na znanstveni literaturi, ki se nanaša na določanje nukleotidnega zaporedja DNA nove generacije. Novejše metode predstavljajo inovacijo za genetske raziskave, saj omogočajo pridobivanje želenih rezultatov na povsem drugačen način, kot smo jih bili vajeni doslej. Po pregledu novih metod bomo lahko bolje razumeli ali bi z njihovo uporabo lahko pričakovali boljše rezultate pri analizi starejših muzejskih vzorcev.

2.1 Potek raziskave

Raziskavo zaključne naloge smo pričeli z izolacijo DNA iz starih muzejskih vzorcev. Uspešnost izolacije smo ovrednotili s preverjanjem koncentracije in absorbance izolirane DNA. Sledilo je pomnoževanje želenih fragmentov DNA z uporabo verižne reakcije s polimerazo (PCR). Pri nekaterih vzorcih, razmerje pri koncentraciji in absorbanci ni bilo optimalno, zato smo pričakovali neuspešen PCR. Uspešnost PCRja smo nato preverili z agarozno elektroforezo, ki je overila naše sume glede neuspešnih vzorcev z neoptimalnimi koncentracijami. Te vzorce smo ponovno očistili in nato ponovno izmerili koncentracijo in absorbanco. Koncentracija pri nekaterih še vedno ni dosegla optimalnega razmerja (1,8 - 2,0), zato smo le te redčili, da bi zmanjšali vsebnost DNA glede na volumen. Ponovno smo izvedli PCR reakcijo za te vzorce, in nato preverili produkt z agarozno elektroforezo. Tokrat je bil PCR pri večini uspešen, pri manjšem delu pa ponovno ni bilo uspeha. Še enkrat smo ponovili samo PCR reakcijo pri neuspešnih vzorcih, vendar tudi tokrat le ta ni bila uspešna. Nato smo delo nadaljevali le z vzorci ki so bili uspešno namnoženi. Preden smo vzorce postavili na sekvenator, za določanje nukleotidnega zaporedja, smo jih predhodno očistili, tako smo omogočili boljše branje nukleotidov. Dobljene rezultate smo z uporabo računalniških programov kot je npr. CodonCode Aligner uspešno obdelali, in s pomočjo algoritma BLAST potrdili naše rezultate za ciljno vrsto.

2.2 Laboratorijsko delo

Za raziskavo filogeografije velebitske kuščarice smo želeli pomnožiti nukleotidno zaporedje mitohondrijskega gena za citokrom b (cyt b) iz vzorcev, hranjenih v Prirodoslovnem muzeju Slovenije. Celoten gen za cyt b je sicer dolg 1140 bp, vendar smo predvidevali, da bo DNA fragmentirana, zato smo načrtovali pomnoževanje krajših nukleotidnih zaporedij.

Uporabili smo 14 vzorcev velebitske kuščarice, ki so bili hranjeni v mešanici etanola in glicerina (glej prilogo 1 za izvor in leto vzorca). Leta 2010 so bili odvzeti vzorci tkiva in preneseni v absolutni etanol.

2.2.1 Izolacija DNA

Izolacijo DNA smo izvedli po protokolu QIAamp Mikro kit (Qiagen protocol, 2010).

1.) Priprava tkiva na izolacijo DNA

Fragment tkiva, velikega približno 2x2 mm, smo razrezali s skalpelom na zelo drobne koščke. Tako pripravljeno tkivo smo nato prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko. Da bi izključili možnost kontaminacije, smo pri vsakem vzorcu skalpel namočili v etanol in ga obžgali.

2.) Liza tkiva

Liza tkiva je postopek, pri katerem razgradimo tkivo in povezave med celicami ter sprostimo celično DNA v medij.

V pripravljeno mikrocentrifugirko z vzorcem smo dodali 180 μL puфра ATL in 20 μL encima proteinaze K. Dobljeno vsebino smo premešali na vorteksu za 15 sekund. Vzorce v mikrocentrifugirkah smo inkubirali celo noč pri 56 $^{\circ}\text{C}$.

Po inkubaciji smo dodali 200 μL puфра AL ter ponovno premešali vsebino za 15 sekund. Da smo zagotovili učinkovito razgradnjo tkiva je bilo bistveno, da se vzorec in pufer temeljito zmešata, tako smo dobili želeno homogeno raztopino. V dobljeno raztopino smo dodali 200 μL 96 mM etanola, katerega funkcija je inhibicija uporabljenih encimov. Vzorce smo nato ponovno mešali za 15 sekund in jih nato inkubirali za 5 minut na sobni temperaturi (15 - 25 $^{\circ}\text{C}$). Pred naslednjim korakom smo še enkrat na kratko premešali vzorce, da smo odstranili morebitne kapljice s sten mikrocentrifugirke.

3.) Vezava DNA na kolono

Celotno vsebino mikrocentrifugirke smo pazljivo, prenesli na kolono (QIAamp MinElute column), postavljeno na 2 ml zbiralno mikrocentrifugirko. Kolono z mikrocentrifugirko smo 1 minuto centrifugirali na 6.000 x g (800 rpm). Po centrifugiranju smo filtrat zavrgli in v primeru, da ni prešla celotna vsebina kolone v zbiralno mikrocentrifugirko, smo centrifugiranje ponovili.

4.) Čiščenje DNA

Po vezavi DNA na kolono smo pričeli s čiščenjem DNA tako, da smo v kolono dodali 500 µL pufru AW1. Kolono smo centrifugirali 1 minuto na 6000 x g (800 rpm). Po centrifugiranju smo filtrat zavrgli, kolono pa prenesli v novo 2 ml mikrocentrifugirko. Postopek smo ponovili z 500 µL pufru AW2. Tokrat smo centrifugirali 3 minute pri največji možni hitrosti 20.000 x g (13.200 rpm), tako da se je membrana popolnoma posušila.

5.) Ekstrakcija DNA iz kolone

Po končanem centrifugiranju smo filtrat zavrgli, kolono pa postavili na novo mikrocentrifugirko. Na sredino kolone smo dodali 80 µL elucijskega pufru AE in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi (15-25 °C). Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali pri največji možni hitrosti 20.000 x g (13.200 rpm).

2.2.2 Koncentracija in čistost izolirane DNA

Po izolaciji smo preverili koncentracijo in čistost izolirane DNA z uporabo spektrofotometra Epoch (Preglednica 1). Pri valovni dolžini 260 imajo dušikove baze nukleotidov najvišjo absorbanco, pri 280 nm pa imajo najvišjo absorbanco proteini. Razmerje med absorbancami pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm nam pove, kako čista je izolirana DNA. Predvideno optimalno razmerje je med 1,8 in 2,0 (Clark in sod., 2000). Poleg absorbance smo izmerili tudi masno koncentracijo, ki je optimalna pri 50 ng/ µL.

V ploščo z majhnimi vdolbinami za vzorce, smo v prvi dve kapnili po eno kapljico čiste vode za kontrolo, v vse ostale pa nanesli po 3 µL vsakega vzorca. Ploščo smo nato dali v nosilec spektrofotometra in odprli program GEN 5. Z uporabo računalniškega programa smo tako izmerili absorbanco in masno koncentracijo izolirane DNA.

2.2.3 Dodatno čiščenje vzorcev in redčenje

V primeru, da pri vzorcih razmerje koncentracije in čistosti ni bilo optimalno, smo ponovili čiščenje po enakem protokolu. Koncentracija DNA, pri določenih vzorcih, je neglede na ponovno čiščenje ostala previsoka, zato smo take vzorce redčili z deionizirano vodo do željene koncentracije.

2.2.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR) je *in vitro* metoda pri kateri z uporabo dveh oligonukleotidnih začetnikov in DNA polimeraze pomnožimo enega ali nekaj manjših delov DNA, pri čemer dobimo na tisoče kopij določenega nukleotidnega zaporedja (Erlich 1989). PCR poteka v treh preprostih korakih (Slika 1 in Slika 2).

1.) Denaturacija dvojne vijačnice

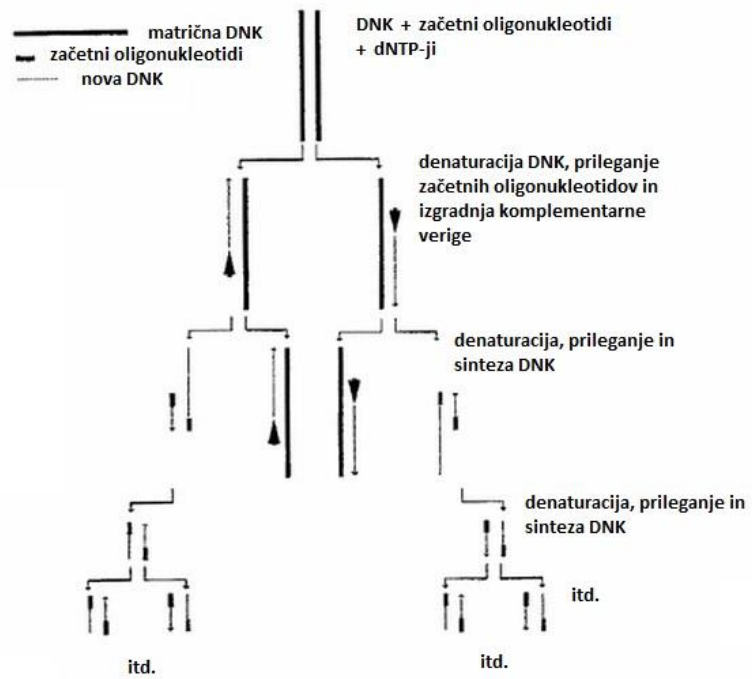
V začetni mešanici je DNA prisotna v obliki dvojne vijačnice. Prvi korak je zato denaturacija dvojne vijačnice v enojno. Ta proces poteka pri visoki temperaturi (95-96 °C), da se vijačnici uspešno ločita.

2.) Prileganje začetnih oligonukleotidov

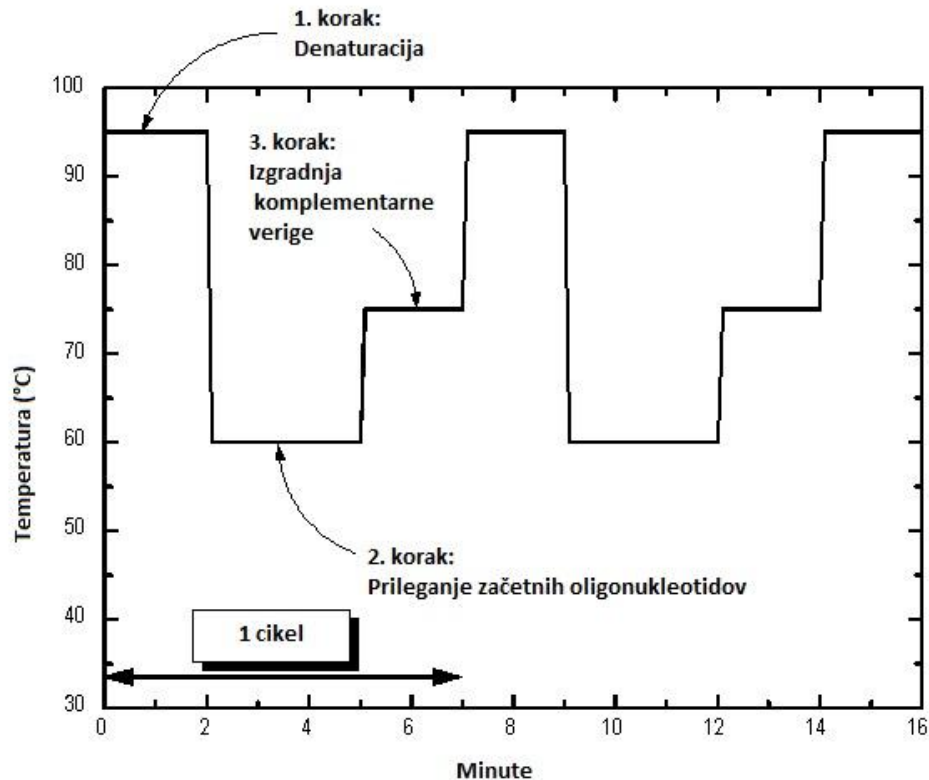
Ob uspešni ločitvi dvojne vijačnice v enojno, lahko začetni oligonukleotidi najdejo komplementarna mesta prileganja na posamezno enojno vijačnico. Par oligonukleotidov je zasnovan tako, da sta komplementarna matrični DNA in sta med seboj nekomplementarna. Ko se reakcijska mešanica ohladi, začetni oligonukleotidi najdejo komplementarna mesta na DNA, vezava poteka v smeri 5'-3'. Na mestu vezave postane DNA ponovno dvovijačna. Novo nastali verigi sta antiparalelni. Temperatura v tej fazi je odvisna od začetnih oligonukleotidov, običajno znaša okoli 50-65 °C.

3.) Sinteza in izgradnja komplementarne verige

V zadnji fazi se ob delovanju DNA polimeraze sintetizira komplementarna veriga. Na podlagi matrice encim na 3' konce začetnih oligonukleotidov vgradi nadaljnje nukleotide. Običajno ta faza poteka pri 72 °C.



Slika 1: Shematski prikaz verižne reakcije s polimerazo (povzeto po: Erlich, 1989)



Slika 2: Primer temperaturnega profila in cikla verižne reakcije s polimerazo (povzeto po: Blaber, 2013)

Celoten proces se večkrat ponovi (Slika 1) preko več temperaturnih faz (Slika 2). Število ponovitev je odvisno od količine produkta, ki ga želimo pridobiti, običajno je 30 do 40-krat. Zadnji korak je elongacija pri 72 °C za 5-10 minut, kar omogoči dokončno podaljšanje fragmentov.

2.2.4.1 Protokol PCR za uporabljene vzorce

Pri izvedbi verižne reakcije smo uporabili univerzalni par oligonukleotidov L14841 (Kocher in sod., 1989) in H15149 (Irwin in sod., 1991). S tem parom smo lahko dobili okoli 395 bp dolg segment cyt b. Nukleotidno zaporedje oligonukleotidov je slednje:
L14841: 5' – CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA - 3' in
H15149: 5' – GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA - 3'

Končna reakcijska mešanica za eno reakcijo je vsebovala 6,1 μL dH₂O, 1,0 μL 10 mM amonijevega pufra (NH₄), 1,0 μL 25 mM MgCl₂, 0,5 μL 10 mM dNTP-jev, 0,30 μL 10 mM vsakega oligonukleotida ter 0,10 μL 5 mM Taq polimeraze.

Po pripravi reakcijske mešanice, smo za posamezen vzorec uporabili 9 μL mešanice in 1 μL DNA vzorca. Vzorce smo nato vstavili v ciklični termostat in nastavili temperaturni profil.

- 1.) Denaturacija dvojne vijačnice pri 94 °C (5 min)
- 2.) Denaturacija, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje (30 ciklov): 94 °C (45 sec), 48 °C (45 sec), 72 °C (45 sec)
- 3.) Končno podaljšanje (elongacija) verige pri 72 °C (3 min)

Vloga reakcijskih komponent (povzeto po Palumbi iz Hillis in sod., 1996)

- 1.) Matrična DNA: nosi nukleotidno zaporedje, ki ga želimo večkrat namnožiti
- 2.) Začetni oligonukleotidi: začetna točka sinteze DNA
- 3.) MgCl₂: Mg⁺⁺ ioni tvorijo kompleks z dNTP, začetnimi oligonukleotidi in matrično DNA, optimalno koncentracijo je treba eksperimentalno določiti
- 4.) Taq DNA polimeraza: termično stabilen encim, ki dodaja nukleotide k že obstoječi verigi, od začetnih oligonukleotidov naprej
- 5.) dNTP-ji (angl. »*Deoxynucleotide Triphosphates*«): predstavljajo zalogo gradbenih elementov, ki so potrebni, da DNA polimeraza izgradi novo verigo
- 6.) Pufer: njegova primarna funkcija je vzpostavitev okolja z enovalentnimi solmi in optimalnim pH-jem
- 7.) dH₂O: deionizirana voda predstavlja tekočinski medij v katerem poteka celotna reakcija

2.2.5 Agarozna elektroforeza

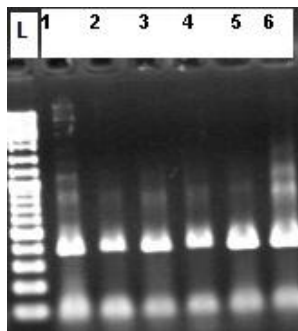
Agarozna elektroforeza je metoda, ki se uporablja za ločevanje DNA fragmentov na podlagi njihove velikosti. Z uporabo električnega polja se negativno nabiti fragmenti DNA premikajo skozi agarozni gel proti pozitivni elektrodi s hitrostjo, ki je obratno sorazmerna logaritmu njihove molekulske mase (Andrews, 1986). Krajši fragmenti se tako hitreje premikajo kot daljši. Na podlagi tega lahko natančno določimo dolžino fragmenta DNA v primerjavi s poznanim molekularnim standardom, ki potuje skozi gel istočasno kot vzorci (povzeto po Murphy in sod. iz Hillis in sod., 1996).

Geli z nizko gostoto so primerni za ločevanje in analizo večjih fragmentov, in obratno. Za analizo krajših fragmentov DNA, kot so bili v naši raziskavi, je primeren 1,5 mM gel.

V našem primeru smo za 125 ml gelske raztopine potrebovali za pripravo 1,5 mM gostote, 1,88 g agaroze. V erlenmajerico smo stresli odtehtano količino agaroze, dodali, 125 ml 0,5 x elektroforetskega pufa TBE, ter premešali. Pripravljeno raztopino smo počasi segrevali v mikrovalovni pečici do vretja. Pazljivo smo preverili, če se je vsa agarozna raztopila in premešali ter ohlajali do približno 55 °C. Raztopino smo nato pazljivo vlili v kalupe in počakali, da se zgosti. V žepke v gelu smo dodali po 5 µL pripravljenega vzorca.

Predhodno smo pripravili vzorce tako, da smo 2 µL produkta reakcije PCR zmešali s 3 µL aplikacijskega pufra (angl. »loading dye«). Puffer je obarval vzorce, zato smo lahko sledili njihovemu potovanju po gelu. V robni žepki smo dodali molekularni standard (angl. »gene ladder«), na podlagi katerega smo določili dolžino posameznih fragmentov. Elektroforeza je potekala 30 minut pri napetosti 120 V v 0,5 x TBE elektroforetskem pufu.

Po elektroforezi smo gel namočili za 15 minut v raztopino etidijevega bromida. Etidijev bromid se nespecifično veže tako na DNA kot na RNK, vezan pa oddaja 20-30 krat več fluorescence, kar nam omogoča da vidimo liso na gelu. Svetloba, ki jo nato oddaja etidijev bromid ima valovno dolžino 590 nm, kar je v rdeče-oranžnem delu vidnega spektra (povzeto po Murphy in sod. iz Hillis in sod., 1996). Z uporabo kamere Mini Bis smo vizualizirali produkte ter gel dokumentirali s programom GelCapture (Slika 4).



Slika 3: Primer slikanega gela s programom GelCapture

2.2.6 Določanje nukleotidnega zaporedja

Pred določanjem nukleotidnega zaporedja na sekvenatorju AbiPrism 3130 smo vzorce očistili po standardnemu protokolu za čiščenje PCR produktov in jih pomnožili s sekvenčno reakcijo.

AbiPrism 3130 je štirikapilarni sekvenator, ki deluje po Sangerjevem principu določanja nukleinskih kislin. Omogoča hkratno analizo vzorcev in več kot 99 % zanesljivost rezultatov. Omogoča analizo nukleotidnega zaporedja DNA ter fragmentno analizo mikrosatelitov, AFLP, SNP, itd. (Applied Biosystems, 2013).

2.2.6.1 Direktno čiščenje PCR produktov

Produkte PCR reakcije smo pred izvedbo sekvenčne reakcije očistili po protokolu za direktno čiščenje PCR produktov. Uporabili smo encima Fast Thermosensitive Alkaline Pfosfatase (AP) in Exonuclease I (Exo I), proizvajalcev Fermentas. Prvi odstrani 5' in 3' fosfatne skupine, drugi pa cepi verige na njihovih končnih delih. V mikrocentrifugirki smo pripravili mešanico za čiščenje s končnim volumnom 5 μL na vzorec in sicer: 0,1 μL Exo I (1 enota); 2 μL AP in 2,8 μL 1x pufra z NH_4SO_2 ter 10 μL PCR produkta. Nato smo vzorce najprej inkubirali 45 minut pri 37°C, da smo razgradili začetne oligonukleotide, ki smo jih uporabili pri pridobitvi PCR produktov ter odstranili odvečne nukleotide, nato pa še 15 minut pri 80°C, da smo inaktivirali oba uporabljena encima (Exo I in AP).

2.2.6.2 Sekvenčna reakcija

Za izvedbo sekvenčne reakcije smo uporabili barvilo BigDye 1.1 (za kratke produkte), proizvajalca Applied Biosystems. V 0,5 ml mikrocentrifugirko smo po protokolu pripravili mešanico sledečih kemikalij, da smo dobili 10 μL reakcijskega volumna:

- 3 μL PCR produkta
- 0,2 μL primerja (10 mM)
- 0,5 μL BigDye
- 2 μL BigDye pufra
- 4,3 μL H_2O (brez DNAaz in RNKaz, angl. DNA and RNA free)

Pripravljene vzorce smo nato po sledečem temperaturnem profilu inkubirali na ciklični cikličnem termostatu:

- 3 minute pri 96 °C (začetno segrevanje mešanice za aktivacijo polimeraze)
- 10 sekund pri 96 °C (denaturacija), 10 sekund pri 48 °C (prileganje začetnih oligonukleotidov), 4 minute pri 60 °C (podaljševanje verige); se ponovi 50 krat
- 7 minut pri 72 °C (sinteza DNA)

2.2.6.3 Čiščenje s precipitacijo

Pred branjem nukleotidnega zaporedja na sekvenatorju smo opravili še zadnji korak čiščenja produktov sekvenčne reakcije s precipitacijo z etanolom in EDTA. Ploščo z vzorci, na kateri smo delali sekvenčno reakcijo smo najprej na kratko centrifugirali in nato dodali po 2,5 µL 125 mM EDTA (pH 8.0). Ponovno smo na kratko centrifugirali in tako omogočili stik EDTA in produktov. Po centrifugiranju smo dodali vsaki reakciji po 30 µL absolutnega etanola. Ploščo z vzorci smo prekrili in premešali tako, da smo jo 5-10 x obrnili. Z alufolijo smo vzorce na plošči zaščitili pred svetlobo in jih nato za 15 minut inkubirali na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo opravili precipitacijo, in sicer smo vzorce centrifugirali pri 4 °C za 55 minut pri maksimalni hitrosti (14.000 obratov na minuto). Po končanem centrifugiranju smo s hitrim gibom navzdol izlili etanol, nato smo vzorce na plošči centrifugirali obrnjene navzdol za 2 minuti pri 190 obratih na minuto, da smo ploščo osušili še preostalega etanola. Ploščo smo nato prekrili in zaščitili pred svetlobo s alufolijo ter inkubirali za 5 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vsakemu vzorcu dodali po 12 µL formamida, da se je DNA raztopila. Tako pripravljene vzorce smo nato postavili na sekvenator AbiPrism 3130 (Applied Biosystems) in jim določili nukleotidno zaporedje.

2.3 Računalniška obdelava pridobljenih podatkov

Po opravljenem laboratorijskem delu je sledila obdelava in analiza pridobljenih podatkov. Z uporabo programa CodonCode Aligner 1.63 smo zaporedja obdelali in nato z algoritmom Blast (Basic Local Alignment Search Tool) preverili namnožitev gena velebitske kušarice.

Program se uporablja za urejanje (poravnavanje) in lepljenje posameznih fragmentov ter odkrivanja mutacij določenega nukleotidnega zaporedja. Je vsestranski in enostaven za uporabo (CodonCode aligner manual, 2013).

Želene sekvence tako pripravimo za analizo, npr. določanje in primerjavo z drugimi vrstami s pomočjo algoritma BLAST in nadaljno filogenetsko analizo.

V program smo vnesli nukleotidna zaporedja vzorcev ter v prvem koraku odstranili začetek in konec, kjer se ni dalo pravilno brati nukleotidov. Iz baze GenBank smo pridobili referenčno nukleotidno zaporedje cyt b velebitske kuščarice, in nato postopoma primerjali naše nukleotide. Ko so bila zaporedja primerno obdelana, smo jih vstavili v BLAST.



Slika 4: Primer obdelave nukleotidnega zaporedja določenega vzorca (CodonCode Aligner)

BLAST je iskalno orodje, ki deluje na principu primerjanja nukleotidnega zaporedja z ostalimi zaporedji v bazi podatkov. Na podlagi primerjave nam določi, do vrste natančno, kateremu živemu bitju pripada vstavljeno nukleotidno zaporedje.

Naša nukleotidna zaporedja smo vstavili v BLAST. Tako smo preverili uspešnost pomnoževanja zelenih fragmentov DNA tarčne vrste in ocenili ali je morebiti prišlo do kontaminacije.

3 REZULTATI Z DISKUSIJO

3.1 Rezultati

Podatki o analiziranih vzorcih z rezultati meritev ter uspešnost določanja nukleotidnega zaporedja, so zbrani v preglednici 1.

3.1.1 Izmerjena absorbanca in koncentracija

Od 14ih analiziranih vzorcev, je bila polovica znotraj optimalnega razmerja absorbance pri valovnih dolžinah 160 in 280 nm (1,8 in 2,0), kar je pomenilo ustrezno čistost DNA v vzorcih. Tudi po izolaciji DNA pa lahko ostane na nukleinske kisline vezanih nekaj proteinov. Tako lahko za vzorce, kjer je razmerje izven optimalnega, predvidevamo, da je to posledica prisotnosti velike količine proteinov oziroma drugih nečistoč. Poleg standardnega razmerja absorbance pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm, bi lahko izračunali tudi absorbanco pri valovnih dolžinah 260 in 234 nm. DNA ima namreč pri 234 nm absorpcijski minimum. Čist vzorec pa ima prav tako razmerje med 1,8 in 2,0 (Hillis in sod., 1996). Z uporabo spodaj navedene formule bi lahko izračunali koncentracijo DNA tudi iz vrednosti absorbance pri 260 in 234 nm. Tako bi lahko bolje preverili prisotnost proteinov ali morebitnih ostankov fenolatnih ionov, tiocinатов in ostalih organskih spojin.

$$N(\mu\text{g ml}^{-1})=52,6 A_{260} - 5,24 A_{234}$$

Z merjenjem absorbcije DNA pri valovni dolžini 260 nm izmerimo tudi njeno kvantiteto. Optimalen obseg masne koncentracije DNA znaša od 5 do 50 ng/ μL . V našem primeru je bila polovica vzorcev izven optimalne masne koncentracije. Da bi zagotovili boljše nadaljnje rezultate, smo vzorce redčili in ponovno čistili (Preglednica 1).

Preglednica 1: Pridobljeni rezultati analiziranih vzorcev

Vzorec	Absorbanca (260/280)	Koncentracija ng/μL	Redčenje	PCR obnovitev	PCR uspešen	Branje nukleotidov delovalo	Dolžina pridobljenih zaporedij
PMS 5525	1,914	100,795	2x	1.	Da	Da	309 bp
PMS 5526	1,85	31,945	2x	2.	Da	Da	367 bp
PMS 5524	1,891	63,248	/	1.	Da	Da	290 bp
PMS 5564	1,86	309,16	10x	1.	Da	Da	280 bp
PMS 4375	1,851	59,829	/	2.	Da	Da	256 bp
PMS 4380	1,843	72,961	/	2.	Da	Ne	/
PMS 4381	1,797	37,233	2x	2.	Da	Ne	/
PMS 67	2,123	176,471	5x	1.	Da	Ne	/
PMS 4376	1,621	37,941	2x	1.	Da	Ne	/
PMS 1261	1,664	19,017	/	3.	Ne	/	
PMS 195	1,632	50,442	/	3.	Ne	/	
PMS 483	1,733	37,926	/	3.	Ne	/	
PMS 192	1,701	34,35	/	3.	Ne	/	
PMS 2746	1,944	22,532	/	3.	Ne	/	

3.1.2 Uspešnost reakcije PCR

Z uporabo verižne reakcije s polimerazo smo pomnožili ciljne fragmente vzorčne DNA. Uspešnost pomnoževanja smo preverili z metodo agarozne elektroforeze (Preglednica 1).

Pri petih vzorcih je bilo pomnoževanje uspešno že v prvem poskusu, pri štirih vzorcih pa v drugem. Pri petih vzorcih po več poskusih pomnoževanje ni bilo uspešno, zato smo te zanemarili.

Razlogov za neuspeh določenega pomnoževanja je lahko več. Obstajajo možnosti individualnih napak pri delu in mešanju reagentov ter možnosti delovanja inhibitorjev v vzorcih (Pallen, 1992). Kar se tiče napak pri delu, oziroma mešanju reagentov, se lahko to zgodi enkrat, morda dvakrat, vendar smo večkrat ponovili postopek pri vzorcih, ki niso uspeli. Za pet vzorcev reakcija ni uspela niti v tretjem poskusu, zato lahko to možnost izključimo. Delovanje inhibitorjev se zdi najbolj razumna možnost, saj je potrebno upoštevati dejstvo, da so to stari vzorci, z degradirano DNA. Ob ovrednotenju izmerjene absorbance in koncentracije DNA je moč opaziti odstopanja neuspešnih vzorcev od standardnih vrednosti in potrjujejo zelo majhno prisotnost DNA.

3.1.3 Branje in določanje nukleotidnega zaporedja

Za devet vzorcev, pri katerih je PCR uspel, smo želeli določiti nukleotidno zaporedje. Izmed teh, je bilo zaporedje uspešno prebrano le pri petih vzorcih, pri ostalih pa to ni uspelo (Preglednica 1). S programom CodonCode Aligner smo nato brez težav določili nukleotidno zaporedje petim vzorcem. Nekaterim od neuspešnih vzorcev je bilo mogoče le na določenih mestih odčitati nukleotide, vendar so bili v večji meri vzorci neberljivi. Dobljena nukleotidna zaporedja smo preverili z algoritmom BLAST in potrdili, da pripadajo velebitski kuščarici. Zaradi starosti vzorcev in degradiranosti tarčne DNA, bi pričakovali kontaminacije (npr. s človeško DNA). česar pa nismo zaznali.

3.2 Diskusija

Uporaba reakcije PCR za pomnoževanje mitohondrijske DNA (mtDNA) je metoda, ki se uporablja pri genetskih raziskavah za lažje branje določevanje nukleotidnega zaporedja DNA. Zaradi velike količine v celicah, je mtDNA zelo uporabna pri tovrstnih genetskih raziskavah (Minarovič in sod., 2010). V zaključni nalogi smo od štirinajstih analiziranih vzorcev, uspeli določiti kratko nukleotidno zaporedje citokroma b petim. Z uporabo reakcije PCR smo pričakovali boljše pomnoževanje in branje nukleotidov.

3.2.1 Tehnologija nove generacije določanja nukleotidnega zaporedja

Nedavne izboljšave reakcije PCR so na nek način pripomogle k reševanju problemov in težav, ki posledično omejujejo analizo starih vzorcev. Vendar nobena inovacija na tem področju ni revolucionirala raziskave DNA, tako kot jo je nova generacija določanja nukleotidnega zaporedja (ang. »next-generation sequencing; NGS«) (Knapp in sod., 2010). Leta 2005 je bila prvič javno objavljena nova tehnologija, zelo kmalu zatem pa so jo že uporabljali za analizo DNA z uspešnejšimi rezultati (Margulies in sod., 2005 in Knapp in sod., 2010). V nekaj mesecih so z uporabo NGS objavili 13 milijonov baznih parov jedrnega genoma izumrlega mamuta (Pionar in sod., 2006). Pred uporabo tovrstne tehnologije je bilo najdaljše pridobljeno nukleotidno zaporedje mamuta dolgo 27000 baznih parov. Z uporabo NGS (Roche/454 in Illumina/Solexa) so Pionar in sodelavci pridobili 480 krat daljše zaporedje. Še novejša tehnologija uporablja metodo zajema zaporedja (ang. »sequence or hybridization capture«) (Knapp in sod., 2010). Zaradi različnega analiziranega tkiva se tehnike zajema zaporedja razlikujejo v določenih postopkih. Preučena metoda »primer ex-tension capture« (PEC) temelji na izoliranju specifičnega zaporedja DNA iz kompleksnih knjižnic zelo fragmentirane DNA. Ob primerjavi s standardno PCR metodo, so bili rezultati pridobljeni z obema metodama zelo skladni (Briggs in sod., 2009). Prav tako se je v raziskavi človeškega exoma (kodirajoča regija človeškega genoma) izkazala metoda zajemanja zaporedja skoraj primerljiva s PCR (Ng in sod., 2009). PCR se počasi nadomešča z novimi metodami, ki obogatijo nukleotide določenega fragmenta. Na podlagi ostalih raziskav lahko sklepamo, da bi z uporabo nove tehnologije, v našem primeru, lahko pričakovali večjo uspešnost pri branju nukleotidnega zaporedja.

Z novimi metodami so v uporabo prišli tudi novi aparati. Najpogosteje se za NGS uporablja štiri najbolj razširjene aparate, pri katerih je potrebno predhodno

pomnoževanje za ojačanje signala. To so Roche (454) GS FLX Titanium, Illumina (Solexa) Genome Analyzer IIe, Applied Biosystems SOLiD in Helicos BioSciences HeliScope. Aparat GS FLX lahko prebere od 400 do 600 milijonov baznih parov (angl. »megabases«, MB) v enem celotnem delovnem ciklu, z bralno dolžino do 400 baznih parov. Illumina pa lahko prebere 48 GB (angl. »gigabases«), z bralno dolžino do dvakrat 100 baznih parov v paru. Roche (454) GS FLX Titanium se ponavadi uporabi pri branju zaporedij daljših od 400 baznih parov. Slabost tega instrumenta je, da od vseh NGS naprav proizvede najmanjšo količino podatkov v enem delovanju. Vsi ostali aparati pa proizvedejo krajše bralne dolžine, ampak bistveno več podatkov nukleotidnega zaporedja. Glede na majhno količino DNA in značilne kratke dolžine molekul, je množično pridobivanje nukleotidnih zaporedij velika prednost za študije DNA (Knapp in sod., 2010).

Glede na fizično sestavo vzorca in zastavljene cilje raziskav, se uporablja več različnih strategij za določanje nukleotidnega zaporedja.

1.) Hitri postopek določanja nukleotidnega zaporedja (angl. »Shotgun sequencing«)

Ta metoda temelji na naključnem razbijanju DNA na majhne fragmente različnih dolžin in kloniranju le-teh v vektorje. Tako dobimo več razpoložljive DNA v klonih, kot pa se ji dejansko določa nukleotidno zaporedje. Pridobljeno zaporedje je zelo natančno, z majhnim številom napak (Venter in sod., 1998). Čeprav večina študij zahteva različne strategije ciljnih obogatitev zaporedij (angl. »target enrichment«), je ta metoda ena najpreprostejših in cenovno ugodnih kar se tiče NGS.

2.) Strategije obogatitve tarčne DNA

Pri uporabi že omenjenih novih aparatov za določanje nukleotidnega zaporedja je potrebno predhodno obogatiti nukleotidna zaporedja fragmentov za lažje branje. Najpogosteje se za to uporabljata 2 tehniki.

- Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Tako za klasično metodo po Sangerju, kot za metode NGS, je PCR še vedno najpogosteje uporabljena tehnika za ciljno obogatitev tarčne DNA. V prihodnosti se to lahko spremeni zaradi novejših metod, ki se počasi uveljavljajo. Pri PCR reakciji se soočimo s problemom potrebne dolžine fragmenta ter morebitno kontaminacijo.

Za uspešno analizo moramo poznati določeno dolžino DNA fragmenta, da lahko dobimo želen rezultat. V primeru, da je vsak začetni oligonukleotid dolg 20 baznih parov, potrebujemo molekulo dolgo vsaj 70 baznih parov, da pridobimo 30 baznih parov dolgo novo nukleotidno zaporedje. Glede na to, da je pri zelo starih in uničenih vzorcih lahko že taka dolžina problematična, predstavlja to dejstvo pomanjkljivost za PCR metodo. Poleg tega, se v primeru kontaminacije s tujo DNA, lahko namnoži kontaminant (Knapp in sod., 2010).

- »*Hybridization capture*«

V primerjavi s PCR-jem, pri tej metodi ne pride do istih problemov, saj je postopek drugačen. Ta metoda temelji na podobnosti med sondo in tarčno molekulo, vendar pa se zato tu pojavi drugi problem: razviti sistem, ki dopušča obogatitev variabilnih regij znotraj vrste. Tarčne sonde konzervativnih regij, ki mejijo na variabilne regije, lahko predstavljajo uspešen, čeprav še ne potrjen pristop, za določanje nukleotidnega zaporedja. Ta metoda je primerna za vse NGS aparate, vendar je potrebno predhodno pripraviti sondo iz DNA ekstrakta, za zelo majhno število kopij. Nato se večkrat pomnoži sondo, da se omogoči pridobitev zadostne količine nukleotidov. Kljub večkratnim korakom pomnoževanja, ta metoda preseže določene omejitve PCR reakcije, saj zahteva veliko krajši fragment in lahko pripravi veliko večji nabor zelo degradiranih molekul. Tako se izognemo pridobitvi nukleotidov samo dolgih fragmentov, pri čemer izpade tudi možnost kontaminacije, saj se zaradi krajših fragmentov le-ta nebi namnožila (Knapp in sod., 2010).

Sklepamo lahko, da je metoda zajema zaporedja bolj učinkovita pri krajših fragmentih, kar predstavlja prednost pred metodami s PCR. Metoda je obetavna, saj se s tehnološkimi inovacijami vzpenjajo tudi novejša metode pomnoževanja, oziroma metode obogatitve nukleotidnega zaporedja, ki lahko s časoma izpodrinejo do sedaj najpogosteje uporabljeno metodo PCR.

3.2.2 Prihodnost

Tehnologija se neprestano razvija na vseh področjih. Na področju genetike se je predvidevalo, da bo način določanja nukleotidnega zaporedja dosegel vrhunec nekje v prejšnjem desetletju, ko naj bi bil celoten človeški genom dostopen vsakomur preko spleta (Deamer in sod., 2000).

Danes nam še to ni omogočeno, vendar so pa nove tehnike določanja nukleotidnega zaporedja že v uporabi. Najsodobnejše tehnike ne temeljijo več na predhodni ciljni obogatitvi nukleotidnih fragmentov, kar skrajša čas analize in zmanjša stroške.

1.) »Ion Torrent«

Ion Torrent izkorišča moč polprevodniške tehnologije, pri čemer zaznava protone, ki se sprostijo ob vključevanju nukleotidov med sintezo. DNA fragmenti so povezani s specifičnimi sekvenčnimi adapterji in nato klonsko pomnoženi s PCR emulzijami na površini kroglice s premerom treh mikronov, poznani kot, *Ion Sphere Particles*. Kroglice so nato naložene v protonsko zaznavne "vodnjake", ki so obložene s silikonskimi ploščicami. Nato se nukleotidno zaporedje dopolni iz specifičnih lokacij v sekvenčni adapter. Med določanjem zaporedja se vsaka od štirih baz vključi zaporedno. Če se baza določenega tipa vključi, se proton sprosti, kar aparat zazna kot signal, sorazmeren s številom vključenih baz (Quail in sod., 2012).

2.) Nanopore

Pri metodi nanopore električno polje povzroči, da se posamezne molekule DNA premikajo skozi nanoporo premera 2 nm v eni mikro ali mili sekundi. Ker je nanopora tako ozka, omeji prehod molekulam in so zato nujno prenesene posamezno namesto v dupleksih. Nato se premikajo skozi nanoporo v strogem linearnem zaporedju, kjer vsaka baza ustvari značilen električni signal, ko preide nanoporo. Ta metoda je zato odvisna od možnosti, da vsaka baza ob prehodu oddaja določen signal, ki se ga da izmeriti. V takem primeru bi lahko določili zeleno nukleotidno zaporedje v razmerju od 1000 do 10.000 baznih parov na sekundo (Deamer in sod. 2000). Težko si je predstavljati, da bo v bodoče možno analizirati celoten genom določene vrste v nekaj minutah, vendar bo s pomočjo današnje tehnologije v kratkem to mogoče.

3.3 Povzetek prednosti in slabosti nove generacije določanja nukleotidnega zaporedja v primerjavi s klasično Sangerjevo metodo

V bližnji prihodnosti lahko pričakujemo boljšo izrabo tehnik nove generacije, saj lahko predvidevamo, da se bo do takrat uspešno razvila programska oprema, ki bo zmožna obdelave velike količine pridobljenih podatkov z novimi metodami določevanja nukleotidnega zaporedja. Do sedaj predstavlja obdelava tovrstnih podatkov velik problem in izziv, zato se za analize še vedno uporablja klasično metodo, čeprav so nove tehnike hitrejše, boljše in cenovno ugodnejše. Novejša bioinformatična programska oprema bo lahko omogočila uspešno obdelavo podatkov, in s tem zamenjavo klasične metode po Sangerju z novodobnimi metodami določevanja nukleotidnega zaporedja, kar bo po vsej verjetnosti predstavljalo pomembno inovacijo za biološke vede.

Preglednica 2: Prednosti in slabosti klasične in nove metodologije

Metoda	Klasična (Sanger)	NGS
Prednosti	<ul style="list-style-type: none"> - pridobljena nukleotidna zaporedja so zelo dolga (natančnejše določanje variabilnosti) - možnost analiziranja dobljenih rezultatov z računalniškimi programi (veliko možnih načinov) - ogromno referenc z uporabo te metode 	<ul style="list-style-type: none"> - delovna raziskava je krajša in cenejša - manj kemikalij - manjša možnost napak (kontaminacij) - ni potrebno ciljno obogatiti fragmente DNA
Slabosti	<ul style="list-style-type: none"> - potrebna zadostno velika količina matrične DNA - koncentracija DNA je optimalna med 1,8 in 2,0 (zaželjeni sveži vzorci) - nujno potreben PCR (ciljna obogatitev), možne napake polimeraze - nujne so vmesne detekcije vzorcev (elektroforeza, gel, EtBr) - delovna raziskava dolga 	<ul style="list-style-type: none"> - pridobljena nukleotidna zaporedja so kratka - aparature so zelo drage - pomankljiva bioinformatična programska oprema (velika količina podatkov, težko jih analizirati) - do sedaj malo raziskav opravljenih s to metodo

4 ZAKLJUČEK

Genetika je pomembna znanstvena veda, s katero raziskujemo strukture in delovanje genov v različnih organizmih, ob uporabi različnih analiznih metod. Z genetskimi raziskavami lahko danes uspešno beležimo stopnjo globalne biodiverzitete, s spremljanjem številčnosti populacij živih bitij, ter njihov genski pretok. Od sedemdesetih let dalje so bile v uporabi standardne metode genetskih raziskav za določanje nukleotidnega zaporedja. Z inovacijami na področju genetske tehnologije, novejša tehnika nove generacije določanja nukleotidnega zaporedja omogočajo hitrejše in cenejše določanje zaporedja DNA z le nekaj pomanjkljivosti. Z uporabo metod nove generacije se na ta način počasi odmikamo od starih standardnih, ki so prevladovali vse do sedaj. PCR je še edina do sedaj najpogosteje uporabljena metoda za tovrstne raziskave, ki je v primerjavi z metodami nove generacije, na primer hybridization capture, precej primerljiva, saj ni večjih odstopanj pri dobljenih rezultatih. Zaradi tega bo verjetno trajalo še nekaj časa preden se jo bo nadomestilo z novimi uspešnejšimi metodami amplifikacije. Obstaja možnost, da nam v prihodnosti ne bo več potrebno pomnoževati vzorcev DNA, kot smo sedaj to počeli s PCR-jem oziroma drugimi novejšimi metodami. Razvija se precej obetavna tehnologija, ki temelji na prehodu posamičnih baz skozi zelo majhne pore, pri čemer bi uspeli zaznati in določiti vsako bazo posebej in bi tako lahko določili celotno nukleotidno zaporedje v zelo kratkem času, z majhnimi stroški. Te metode so sedaj v testni uporabi, saj potrebujejo še nekaj dopolnitev, da bodo lahko za nadaljnjo uporabo. Ko bo to omogočeno, bodo genetske raziskave opravljene v zelo kratkem času, pri čemer bodo dobljeni rezultati analiziranih živečih in izumrlih vrst predstavljali zelo pomembne informacije, ki bodo pripomogle k lažjemu varovanju in upravljanju z določenimi tarčnimi vrstami.

5 SEZNAM LITERATURE IN VIROV

Addgene. Plasmid Reference, Agarose gel Electrophoresis.

https://www.addgene.org/plasmid_protocols/gel_electrophoresis/#FAQ (22. april 2013)

Andrews A.T. 1986. Electrophoresis. Press C. (ur.) New York, Oxford University Press.

Ansorge W. J. 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. New Biotechnology, 25: 195-203.

Applied Biosystems 3130 and 3130xl Genetic Analyzers. System Profile.

http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_041990.pdf (23. julij 2013)

Berlec A., Štrukelj B. 2010. Nova generacija tehnik določanje nukleotidnega zaporedja: korak k osebni medicini. Pregledni znanstveni članki, Farmacevtski vestnik 61: 203-208.

Biotechnology Index. Agarose Gel Electrophoresis of DNA, Preparing and Running Standard Agarose DNA Gels.

<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html> (22. april 2013)

Briggs A.W., Good J.M., Green R.E., Krause J., Maricic T., Stenzel U., Lalueza-Fox C., Rudan P., Brajković D., Kucan Ž., Gušić I., Schmitz R., Doronichev V.B., Golovanova L.V., de la Rasilla M., Fortea J., Rosas A., Pääbo S. 2009. Targeted Retrieval and Analysis of Five Neandertal mtDNA Genomes. Science, 325: 318-321.

Burgener M., Hubner P. 1998. Mitochondrial DNA enrichment for species identification and evolutionary analysis. Z Lebensm Unters Forsch A, 207: 261-263.

Clark W., Christopher K. 2000. Chapter 5: An Introduction to DNA: Spectrophotometry, Degradation, and the 'Frankengel' Experiment, Department of Biological Sciences, University of Alberta. <http://www.ableweb.org/volumes/vol-22/5-clark.pdf> (18. maj 2013).

CodonCode Aligner User Manual.

<http://mvz.berkeley.edu/egl/resources/manuals/AlignerHelp.pdf> (26 junij 2013)

Deamer D.W., Akeson M. 2000. Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing. *Trends in Biotechnology*, 18: 147-51.

Delidow C. B., Lynch P. J., Peluso J. J., White A. B. 1993. Polymerase Chain Reaction, Basics Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 15.

Blaber M. Biotechnology and Molecular Biology. BCH 5425, Lecture Section 5. <http://www.ufrgs.br/depbiot/blaber/section5/section5.htm> (21. Julij 2013).

Erlich A. H. 1989. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Immunology*, 9: 437-438.

Gleen T.C. 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x

Harismendy O., Pauline C. Ng, Strausberg R. L., Wang X., Stockwell T. B., Beeson K. Y., Schork J. N., Murray S. S., Topol J. E., Levy S., Frazer A. K. 2009. Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome Biology*, 10: R32.1-R32.13. DOI: 10.1186/gb-2009-10-3-r32.

Higuchi R., Bowman B., Freiberger M., Ryder O.A., Wilson A.C. 1984. DNA-sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*. 312: 282-284.

Hillis M. D., Moritz C., Mable K. B., *Molecular Systematics*, druga izdaja. Sinauer Associates, Inc., U.S.A., 1996.

Irwin D. M., Kocher T. D., Wilson A. C. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*; 32: 128-44.

Isolation of Genomic DNA from Tissues: Protocol; iz QIAamp® DNA Micro Handbook, druga izdaja, 2010.

Knapp M., Hofreiter M. 2010. Next Generation Sequencing of Ancient DNA: Requirements, Strategies and Perspectives. *Genes* 1: 227-243.

Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6196-6200.

Lužnik M., Bužan V. E., Kryštufek B. 2011. Mitochondrial sequences do not support the independent taxonomic position of the extinct Alpine newt subspecies *Mesotriton alpestris lacusnigri*. *Amphibia-Reptilia*; 32: 435-440.

Mardis E. R. 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9:387-402.

Mardis E. R. 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, 24: 133-141.

Margulies M., Egholm M., Altman, W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A. Berka J., Braverman M.S., Chen Y.J., Chen Z.T. 2005. Genome sequencing in microfabricated highdensity picolitre reactors. *Nature*, 437: 376-380.

Maxam M. A., Gilbert W. 1976. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the Nation Academy of Science of the United States of America*, 74: 560-564.

McCord B., Opel K., Funes M., Zoppis S., Jantz L. M. 2011. An investigation of the effect of DNA degradation and inhibition on PCR amplification of single source and mixed forensic samples. U.S. Department of Justice, Document No.: 236692: 1-66.

Metzker M. L. 2009. Sequencing technologies – the next generation. *Nature reviews, Genetics*, 11: 32-46.

Minarovič T., Trakovická A., Rafayová A., Lieskovská Z. 2010. Animal Species Identification by PCR – RFLP of Cytochrome b. *Animal Science and Biotechnologies*, 43: 296-299.

Murphy W. R., Sites W. J., Jr., Buth G. D., Haufler H. C. Chapter 4, Proteins: Isozyme Electrophoresis; povzeto iz Hillis M. D., Moritz C., Mable K. B., *Molecular Systematics*, druga izdaja. Sinauer Associates, Inc., U.S.A., 1996.

Ng S.B., Turner E.H., Robertson P.D., Flygare S.D., Bigham A.W., Lee C., Shaffer T., Wong M., Bhattacharjee A., Eichler E.E., Bamshad M., Nickerson D.A., Shendure J. 2009. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*, 461: 272-U153.

Pallen J. M., Puckey H. L., Wren W. B. 1992. A rapid, simple method for detecting PCR failure. *Genome Research*, 2: 91-92.

Palumbi R. S. Chapter 7, *Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction*; povzeto iz Hillis M. D., Moritz C., Mable K. B., *Molecular Systematics*, druga izdaja. Sinauer Associates, Inc., U.S.A., 1996.

Poinar H.N., Schwarz C. Qi, J., Shapiro B., MacPhee R.D.E., Buigues B., Tikhonov A., Huson D.H., Tomsho L.P., Auch A., Rampp M., Miller W., Schuster S.C. 2006. Metagenomics to paleogenomics: Large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science*, 311: 392-394.

Quail A. M, Smith M., Coupland P., Otto D. T., Harris R. S., Connor R. T., Bertoni A., Swerdlow P. H., Gu Y. 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13: 341.

Rohland N., Siedel H., Hofreiter M. 2004. Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analyses of museum specimens. *BioTechniques*, 36: 814-821.

Sanger F., Nicklen S., Coulson R. A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the Nation Academy of Science of the United States of America*, 74: 5463-5467.

Venter C. J., Adams D. M., Sutton G. G., Kerlavage R. A., Smith O. H., Hunkapiller M. 1998. Shotgun Sequencing of the Human Genome. *Science*, 280: 1540-1542.

Wandeler p., Hoeck P.E., Keller LF. 2007. Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 22: 634-642.

PRILOGE

Priloga 1: Preglednica analiziranih vzorcev

Št.	Vzorec	Lokacija	Nabran dne
1	PMS 5525	Rakov Škocjan	5.6.2001
2	PMS 5526	Rakov Škocjan	5.6.2001
3	PMS 5524	Rakov Škocjan	5.6.2001
4	PMS 5564	Rakov Škocjan	9.6.2001
5	PMS 4375	Velebit; Mirovo	16.7.1974
6	PMS 4380	Velebit; Mrkvište	16.7.1974
7	PMS 4381	Velebit; Mrkvište	16.7.1974
8	PMS 67	Kanin	11.8.1955
9	PMS 4376	Velebit, Alan	15.7.1974
10	PMS 1261	Istra; Učka	15.7.1970
11	PMS 195	Planina pod Skalo	6.7.1956
12	PMS 483	Julijske Alpe; Črno jezero	8.8.1958
13	PMS 192	ob Črnem jezeru	3.7.1956
14	PMS 2746	Trnovski gozd; Predmeja-Goljaki	25.6.1965
15	PMS 5525	Rakov Škocjan	5.6.2001
16	PMS 5526	Rakov Škocjan	5.6.2001