

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA
UČINKOVITA IZOLACIJA STARODAVNE DNA IZ
KOSTI IN KOPROLITOV

MINJA KRSTIĆ

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

Učinkovita izolacija starodavne DNA iz kosti in koproilitov

(Effective isolation method of ancient DNA from bones and coprolites)

Ime in priimek: Minja Krstić

Študijski program: Biodiverziteta

Mentorica: prof. dr. Elena Bužan

Delovna somentorica: Sandra Potušek

Koper, september 2019

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Minja KRSTIĆ

Naslov zaključne naloge: Učinkovita izolacija starodavne DNA iz kosti in koproilitov

Kraj: Koper

Leto: 2019

Število listov: 36

Število slik: 5

Število tabel: 8

Število prilog: 1

Št. strani prilog: 1

Število referenc: 70

Mentorica: prof. dr. Elena Bužan

Delovna somentorica: Sandra Potušek

Ključne besede: izolacija starodavne DNA, kosti, koproiliti, arheozoologija, molekularna genetika, PCR

Izvleček: DNA, ohranjena v starih kosteh, zobeh in koproilitih, je običajno zelo razdrobljena in prisotna le v majhnih količinah. Namen zaključnega dela je optimizacija izolacije DNA iz koproilitov in starodavnih degradiranih vzorcev kosti. V zaključni nalogi smo uporabili vzorce kosti šestih živali in koproilit neznane vrste. Za izolacijo starodavne DNA (aDNA) smo uporabili tri različne izolacijske postopke (fenol kloroform, Rohlandov postopek in QIAamp Micro Kit), za vzorec koproilita pa smo uporabili dva izolacijska postopka (DNeasy PowerSoil Kit in QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit). Po izolaciji smo izvedli kvantitativno analizo z uporabo reagenta Qubit® dsDNA BR za merjenje koncentracije na fluorimetru Qubit 3 in na ta način smo izmerili koncentracijo izolirane DNA (ng/μL). Za reakcijo PCR smo uporabili kratke fragmente gena citokrom *b*. Iz rezultatov smo lahko zaključili, da je izbira načina predpriprave vzorca pomembna, saj lahko z uporabo pravilnih protokolov doprinesemo k boljšemu izolacijskemu postopku ter višji koncentraciji in kakovosti izolirane aDNA. Kot pomemben faktor za boljšo izolacijo se je izkazala dolžina inkubiranja vzorca v demineralizacijskem pufu. V vseh primerih je 72-urna inkubacija doprinesla k boljšim rezultatom. Za vzorce kosti se je kot najuspešnejši izkazal postopek 2 (izolacija po Rohlandu). Z njim smo dobili bistveno višje koncentracije DNA, prav tako pa smo s to DNA uspešno pomnožili iskane fragmente za citokrom *b*. V primeru vzorca koproilita smo najvišje koncentracije DNA pridobili s postopkom 1 (DNeasy PowerSoil Kit).

Key words documentation

Name and SURNAME: Minja KRSTIĆ

Title of the final project paper: : Effective isolation method of ancient DNA from bones and coprolites

Place: Koper

Year: 2019

Number of pages: 36

Number of figures: 5

Number of tables: 8

Number of appendix: 1

Number of appendix pages: 1

Number of references: 70

Mentor: Prof. Elena Bužan, PhD

Co-Mentor: Sandra Potušek

Keywords: isolation of ancient DNA, bones, coprolites, zooarcheology, molecular genetics, PCR

Abstract: DNA preserved in old bones, teeth, and coprolites is usually highly fragmented and presented in small amounts. The purpose of the final thesis is to optimize the isolation of DNA from coprolites and ancient degraded bone samples. In the study we used bone samples of six animals and coprolite of unknown species. Three different isolation methods (phenol chloroform, Rohland method, QIAamp Micro Kit) were used to isolate ancient DNA (aDNA), and two isolation kits (Dneasy PowerSoil Kit and QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit) were used for the coprolite sample. Following isolation, quantitative analysis was performed using Qubit® dsDNA BR reagent to measure the concentration on a Qubit 3 fluorimeter. In the PCR reaction, short fragments of the cytochrome *b* gene were amplified. From the results, we could conclude that sample pre-preparation has a big influence on aDNA concentrations and that use of the right isolation method can contribute to a better isolation process and a higher concentration and quality of isolated aDNA. The incubation length of the sample in demineralization buffer proved to be an important factor for better isolation. In all tested cases, 72-hour incubation contributed to better results. Rohland method proved to be the most successful. It yielded significantly higher concentrations of DNA which also successfully amplified the short fragments of cytb. From coprolite sample isolation with DNeasy PowerSoil Kit yielded higher concentrations of DNA.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Eleni Bužan za sprejetje mentorstva in nasvete pri izdelavi zaključne naloge. Iskreno se zahvaljujem tudi za vestno sodelovanje in za celoten pregled zaključne naloge.

Prav tako bi se neizmerno zahvalila Sandri Potušek za vso priporočeno literaturo, strokovne usmeritve in pomoč pri pisanju zaključne naloge. Brez njene pomoči v zaključnem delu naloge ne bi šlo. Neizmerno sem ji hvaležna za razlago vsake nejasnosti v genetskih analizah in za ves čas, ki mi ga je posvetila, da sem lahko pripravila nalogo.

Pri laboratorijskem delu bi se za vso pomoč in nasvete zahvalila Larsu Zveru, Feliciti Urzi in Urški Gerič.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in prijateljem, ki so mi ves čas stali ob strani in mi pomagali med študijem.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD.....	1
1.1 Pomen molekularne genetike v arheozoologiji	1
1.1.1 Starodavna DNA	3
1.2 Izolacija molekule DNA iz razgrajenih kosti in koproilita.....	5
1.2.1 Problematika izolacije molekule DNA in pomnoževanja mitohondrijske DNA .	6
1.2.1.1 Kontaminacija aDNA	6
1.2.1.2 Poškodbe DNA v starih vzorcih	7
1.2.2 Ocena kakovosti izolirane DNA iz kosti in koproilita.....	8
1.2.3 Analiziranje in pomnoževanje aDNA.....	9
1.2.3.1 Problematika pomnoževanja degradirane aDNA	10
1.3 Uporaba molekularnih genetskih markerjev v arheozoologiji	10
2 NAMEN, CILJI IN HIPOTEZE	12
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 Vzorci	12
3.2 Priprava laboratorija in preprečevanje kontaminacije	13
3.3 Izolacija molekule DNA.....	14
3.3.1 Postopek 1: Izolacija DNA iz kosti s fenol kloroformom	14
3.3.2 Postopek 2: Izolacija DNA iz kosti z Rohlandovim postopkom.....	15
3.3.3 Postopek 3: Izolacija DNA s kitom QIAamp® DNA Micro kit	18
3.3.4 Postopek 4: Izolacija DNA iz koproilita.....	19
3.4 DNA – koncentracija in kvantifikacija.....	21
3.4.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	21
3.4.2 Gelska elektroforeza	23
4 REZULTATI Z DISKUSIJO.....	24
4.1 Analiza koncentracije izolirane DNA.....	24
4.1.1 Koncentracije izolirane DNA iz kosti po različnih postopkih izolacije	24
4.1.2 Koncentracija DNA iz koproilita.....	26
4.1.3 Vpliv dodatka reagenta Tween 20 na koncentracijo izolirane DNA.....	26
4.2 Analiza uspešnosti pomnoževanja fragmenta mitohondrijske DNA.....	27
5 ZAKLJUČEK	29
6 LITERATURA IN VIRI.....	32

KAZALO TABEL

Tabela 1: Vzorci, vrsta in koda.....	12
Tabela 2: Vrsta in tip vzorcev, uporabljenih pri različnih postopkih izolacije.....	21
Tabela 3: Priprava reakcijske mešanice za PCR	22
Tabela 4: Izbrani kratki fragmenti, ki so bili pomnoženi v reakciji qPCR ali PCR	22
Tabela 5: Koncentracija izolirane DNA (ng/ μ l), dobljena po različnih postopkih demineralizacije, inkubacije in izolacije	25
Tabela 6: Koncentracije izolirane DNA iz koprolita.....	26
Tabela 7: Vrsta vzorca in koncentracija izolirane starodavne DNA. Podane so koncentracije pred in po dodatku Tween 20.....	26
Tabela 8: Uspešnost pomnoževanja DNA produktov različnih postopkov izolacije	28

KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Uporabljeni vzorci kosti	13
Slika 2: Shematski prikaz predpriprave vzorca za izolacijo po Rohlandovem postopku in z izolacijo s Micro kitom. Označeni krogi predstavljajo korake v pripravi. Na začetku je podana masa kostnega prahu, nato njena razdelitev v dve paralelki in čas demineralizacije.	16
Slika 3: Agarozni gel, ki prikazuje rezultate pomnoževanja DNA, izolirane s Fenol kloroformom.....	27
Slika 4: Agarozni gel, ki prikazuje rezultate pomnoževanja DNA, izolirane s Rohlandovim postopek in Micro kitom	27
Slika 5: Agarozni gel, ki prikazuje rezultate pomnoževanja DNA, izolirane s Rohlandovim postopek in Micro kitom	27

KAZALO PRILOG

Priloga A: Pogoji testiranja uspešnosti prileganja začetnih oligonukleotidov s qPCR

SEZNAM KRATIC

DNA	deoksiribonukleinska kislina
aDNA	starodavna deoksiribonukleinska kislina
mtDNA	mitohondrijska DNK
PCR	verižna reakcija s polimerazo
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (angl. Quantitative polymerase chain reaction)
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina
DTT	ditiotieol
SDS	natrijev dodecilsulfat
Tris-HCl	tris klorovodikova kislina
UV	ultravijolično valovanje
NaClO	natrijev hipoklorit
bp	bazni par
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
-O₂	peroksidni ostanki
H₂O₂	vodikov peroksod
-OH	hidroksi radikali
cytb	citokrom <i>b</i>

1 UVOD

Ljudje in živali imajo univerzalni in intimni odnos, ki se pojavlja od prazgodovine pa vse do moderne dobe. Arheozoologija (*ang.* zooarcheology) je veda, ki analizira živalske ostanke iz arheoloških najdišč in presega vse kulturne, časovne in geografske meje, zato se lahko uporablja kot odgovor na različna vprašanja, ki zajemajo širok spekter arheologije. Ena od največjih sprememb v arheozoologiji je premik od razmišljanja o tem, kako je okolje oblikovalo človeške družbe, do razmišljanja o tem, kako so ljudje spremenili okolje, tako se lahko uporabljeni arheozoološki pristopi osredotočajo tudi na uporabo arheozooloških podatkov za reševanje vprašanj, ki so pomembna za varstveno biologijo (Steele 2015).

Arheozoologija je interdisciplinarna veda, ki združuje teoretične in metodološke pristope iz antropologije, arheologije, biologije, kemije, ekologije in geologije, raziskuje in razlaga interakcije med ljudmi, živalmi in okoljem ter povratne informacije (Murray 2008). Ima izjemen potencial, da razjasni potek preteklih družbeno-političnih, gospodarskih in ideoloških procesov. Domače živali majo osrednjo vlogo v arheozooloških raziskavah (Sadr 2008), od njihove udomačitve in širjenja, do pomena v ekonomiji in gospodarstvu (Arnold in sod. 2013) ter v družbeno-politični in poselitveni organizaciji (Badenhorst 2009). Zbirke podatkov, ustvarjene s temi raziskavami, so nedvomno prispevale k boljšemu razumevanju razvoja človeških življenjskih poti skozi zgodovino (Antonites in sod. 2016).

Danes se področje arheozoologije spreminja v smeri boljšega povezovanja raziskovalnih modelov in rezultatov z drugimi arheološkimi podatkovnimi zbirkami. Računalniška tehnologija sedaj omogoča vključitev, primerjavo in kvantitativno analizo velikih podatkovnih zbirk o živalskih vrstah, ki pred tem ni bila mogoča. Metodološki napredek, kot je razvoj arheozoologije z masno spektrometrijo ali ZooMS (Buckley in Wadsworth 2014) in analizo sledi uporabe (Évora 2015), pomaga arheozoologom, da prebijejo meje zgolj makroskopskega pregleda (Antonites in sod. 2016).

1.1 Pomen molekularne genetike v arheozoologiji

Hiter razvoj, uspeh in občasni neuspehi v forenzičnih raziskavah deoksiribonukleinske kisline (DNA) so dobro znani tako znanstvenikom kot tudi javnosti. V istem časovnem obdobju, ko se je pospešeno razvijala forenzična analiza DNA in je postala ena izmed najbolj popularnih metod, se je vzporedno začela razvijati tudi druga sodobna disciplina, ki je dosegla enake ali celo bolj revolucionarne dosežke na istem področju; to je znanost (bio)molekularne arheologije (Graham 2007).

Molekularna (ali biomolekularna) arheologija je veda, ki se ukvarja z analizo katerega koli starodavnega biološkega materiala, ki je opredeljen kot starejši od 75 let (Graham 2007). Danes mnogi znanstveniki uporabljajo metode za izolacijo starodavne DNA (aDNA), saj se v genomu vsake živali ohranijo molekularni zapisi, na podlagi katerih lahko pridobijo vpogled v njeno zgodovino (Beck 2009).

Analiza aDNA se je prvič pojavila v sredini osemdesetih let dvajsetega stoletja, ko so uspešno izolirali 228 baznih parov dolg fragment iz koščka posušene mišice izumrle, zebri podobne vrste *Equus quagga*. aDNA tega vzorca so raziskovalci takrat pridobili s splošno uveljavljeno metodo kloniranja. Pozitivne klone so odkrili z uporabo radioaktivno označene sonde, ki je prepoznala mitohondrijsko DNA zebre (*Equus zebra*) (Higuchi in sod. 1984). Temu odkritju je nato sledilo še poročilo o uspešni izolaciji 3400 bp dolgega fragmenta DNA iz posušenega tkiva 2430 let stare egipčanske mumije (Pääbo 1985). Izolacija DNA iz 8000 let starih možganov, najdenih v močvirju na Floridi, je pokazala, da aDNA ni ohranjena le v posušenem tkivu ali kosteh, temveč tudi v mehkih tkivih (Doran in sod. 1986; Graham 2007; Kefi 2011).

Genetske raziskave v arheologiji so v preteklosti dale že veliko konkretnih odgovorov na vprašanja o interakciji med ljudmi in živalmi (Dayton 2003), na primer da je postopek udomačitve konja potekal iz več različnih vrst prednikov (Jansen in sod. 2002) in da obstaja nizka stopnja genetske variacije med udomačenim in divjim konjem (Orlando in sod. 2013) ter da se je verjetno udomačitev psa zgodila dvakrat pred približno 15.000 leti v Zahodni Evroaziji in pred več kot 12.500 leti v Vzhodni Aziji (Frantz in sod. 2016). Študije aDNA, pridobljene iz skeletov prašičev iz obdobja neolitika, so pomagale določiti geografsko poreklo prašičev Evrope in oceniti čas udomačitve divjih prašičev v Evropi (Larson in sod. 2007). aDNA in filogeografska analiza kosti in koproilitov (fosiliziran fekalni material) puranov (*Meleagris gallopavo*) iz arheoloških najdišč (200 BC–1800 AD) v jugozahodnem delu ZDA je pokazala edinstveno domačo pasmo, ki izvira izven regije (Speller in sod. 2010; Kefi 2011).

Znaten napredek v osemdesetih in zgodnjih devetdesetih letih v metodah molekularne genetike (uporaba verižne reakcije s polimerazo (PCR)) je raziskovalcem omogočil dostop do genetskih informacij na ravni posameznih molekul DNA. S takšnim tehničnim napredkom so raziskovalci začeli neposredno analizirati variabilnost DNA pri številnih živalskih vrstah (Beck 2009). Izolacija DNA je postala mogoča za vse vrste tkiv in vzorcev. Danes se lahko aDNA izolira iz kosti, posušenega tkiva živali ali rastlin, las, zob, mumificiranih organizmov in celo koproilitov (Kefi 2011).

Raziskave v bioloških znanostih, ki uporabljajo starodavno DNA, so zabeležile znižanje genetske raznolikosti za številne vrste, za katere zgodovinski zapisi kažejo, da se število

populacij zmanjšuje. Populacijska genetika podaja podoben opis razmerja med velikostjo populacije in genetsko raznolikostjo, ki je podprta z več neodvisnimi empiričnimi študijami (Leonard 2008; Beck 2009). Molekularne genetske tehnike zagotavljajo vedno več koristnih informacij o razmerju med vrstami in obsegom genske raznolikosti teh vrst. Analiza DNA starodavnih primerkov lahko zagotovi vpogled v preteklo gensko raznolikost in implicitno oceno izgube genetske raznolikosti skozi čas (Rollo in sod. 1994).

Molekularne metode so se izkazale kot ključne za razumevanje pretekle porazdelitve in številčnosti vrst ter predstavljajo še velik potencial za razširitev uporabe na obstoječe arheozoološke zbirke. Z nadaljnjim izpopolnjevanjem teh metod in povečanjem genomskih referenčnih podatkovnih baz bomo lahko pridobili bolj natančno določitev podvrst, ekotipa in populacijske ravni. Sistematična integracija arheoloških in paleontoloških ostankov z visokozmogljivimi metodami molekularne analize, kot je sekvenciranje nove generacije (NGS), bo lahko pokazala spremembe v habitatu, genetski raznolikosti in številčnosti populacij, povezane s podnebnimi in antropogenimi dejavniki, skozi tisočletni časovni okvir (Foote in sod. 2012; Hofman in sod. 2015; Hofreiter in sod. 2016).

1.1.1 Starodavna DNA

Da bi razumeli zapletenost proučevanja degradirane DNA, je v mnogih pogledih pomembno, da imamo celovito razumevanje kemijske strukture in narave molekule DNA. Primarno strukturo DNA sta pojasnila Watson in Crick leta 1953 z uporabo rentgenske difrakcije (Watson in Crick 1953). Primarno strukturo DNA lahko opišemo kot dolgo vezan hetero polimer, pri čemer vsak monomer sestoji iz treh podenot: deoksiriboze, pentoznega sladkorja in fosfata. Ena od štirih organskih baz (adenin, gvanin, citozin in timin) se nato vključi v ta kompleks, da zagotovi informacije o sekvenci. Kadar pride do vezave med sladkorjem in fosfatom, se tvori nukleozid. Ta vezava določa usmerjenost DNA (zapisano kot 5' do 3'), ker je fosfatna skupina vedno prisotna na 5' terminalih, pri čemer je hidroksilna skupina prisotna na koncu 3'. Informacijske enote ali organske baze so vezane na deseti ogljikov atom pentoznega obroča preko b-N-glikozidne vezi. Organske baze se nato združijo preko vodikove vezi, da tvorijo znano dvojno vijačno strukturo DNA, ki jo krepijo zlaganje baz in p-p interakcije. Spiralna molekula DNA se nato ovije okoli proteinov, imenovanih histoni, 100–200 bp DNA okoli vsake enote. Da bi zaščitili DNA pred kemično poškodbo, se DNA, vezana na beljakovine, dodatno zavije, da nastane kromatin. Prav tako je potrebno omeniti, da je na tej točki struktura DNA in vivo nestabilna. To je posledica entalpije, kemijske reakcije v vodnem okolju, ki spodbuja hidrolizo polinukleotidov, da omogoči, da DNA zavzame manj togo, vendar termodinamsko ugodno, naključno strukturo (Graham 2007).

Ponavljajoča skrb v številnih objavljenih raziskavah in preglednih člankih je proces degradacije DNA (Graham 2007).

Starodavna DNA se razgradi v fragmente, katerih dolžina ne presega 300 bp. Sprememba aDNA je posledica posmrtnih kemijskih procesov. Dolgoročno oksidacija zaradi sevanja spremeni dušikove baze in kompleksno DNA v sladkorne fosfate. Poleg tega vodi hidroliza do deaminacije baz in depurinacije. Kopičenje teh degradacijskih procesov sčasoma zmanjšuje količino DNA v arheoloških vzorcih (Briggs in sod. 2007; Briggs in sod. 2010; Kefi 2011; Hofreiter in sod. 2001).

Degradacija se začne v nekaj urah ali dneh po smrti organizma z avtolizo, ki jo povzročajo endonukleaze, saj katalizirajo hidrolizo fosfodiesterских vezi v DNA. Raziskave so pokazale, da so starodavne in forenzične molekule DNA običajno dolge med 100 bp in 200 bp, kar je pripeljalo do domneve, da se ta encimska cepitev dogaja na ranljivih povezovalnih območjih, ki se nahajajo med nukleosomi terciarne strukture DNA. Raziskovalci so zaključili, da je treba za ohranjanje katere koli DNA delovanje teh bioloških encimov upočasniti ali ustaviti, preden pride do popolne razgradnje (Burger in sod. 1999; Graham 2007; Kefi 2011).

To zmanjšanje encimske aktivnosti je v celoti odvisno od okoljskih razmer. Znanstveniki so poskušali obravnavati vpliv različnih okoljskih pogojev na ohranitev DNA (Burger in sod. 1999). Z jemanjem kostnih vzorcev podobne starosti, vendar iz zelo različnih lokacij, so primerjali pogoje za optimalno ohranitev DNA. Z analizo okoljskih parametrov, kot so temperatura, vlažnost, pH in geokemične lastnosti tal, so ugotovili, da predstavljajo suhost, nizka temperatura, nevtralni ali alkalni pH ter odsotnost destruktivnih in kontaminantnih mikroorganizmov najboljše pogoje za ohranjanje DNA (Burger in sod. 1999; Graham 2007).

Eden od dejavnikov, ki vpliva na pravilno ohranjanje DNA v starih ostankih, je količina mikroorganizmov, ki so v stiku z njimi. Mikroorganizmi razgrajujejo DNA z mehanskim delovanjem in s snovmi, ki jih sproščajo. Empirične študije o fizikalnih in kemijskih procesih, ki poškodujejo DNA, so pokazale, da se DNA ne more ohraniti več kot 100.000 let niti v ekstremno hladnih pogojih ali v anoksičnem okolju (Lindahl 1993; Hoss in sod. 1996; Kefi 2011). Medtem ko novejša raziskave, kjer so uspeli izolirati DNA iz vzorcev kosti konja, starih med 560 – 780 tisoč leti, kažejo na to, da se lahko DNA ohrani tudi več sto tisoč let (Orlando in sod. 2013).

1.2 Izolacija molekule DNA iz razgrajenih kosti in koprolita

DNA, ohranjena v starih kosteh, zobeh in sedimentih, je običajno zelo razdrobljena in prisotna le v majhnih količinah. Ugotovitev, da lahko DNA preživi več sto tisoč let v ostankih skeleta in celo v sedimentih, je močno pospešila uporabo starodavne DNA analize v evolucijskih študijah. Vendar pa izolacija majhnih količin zelo razgrajene DNA iz takšnega materiala predstavlja izziv, saj je kratke fragmente DNA težko ločiti od drugih organskih molekul, kot so huminske kisline, ki inhibirajo encimske manipulacije DNA, ki jih je treba izvesti pred sekvenciranjem (Rohland in sod. 2018).

Kost predstavlja rastoče tkivo, ki je sestavljeno iz anorganskih mineralnih soli (70 %) in kolagena ter vsebuje majhno število celic, kot so osteoblasti, osteociti, osteogene celice in osteoklasti. Ima značilno strukturo zaradi kolagenskih vlaken, ki zagotavljajo potrebno površino za vezanje kristalov anorganskih soli in kostem omogočajo zaščito pred krhkostjo. Kristali soli se tvorijo, kadar se kalcijev fosfat in kalcijev karbonat združita v hidroksiapatit v procesu kristalizacije ali kalcinacije. Kost je trdo tkivo zaradi kristalov hidroksiapatita, ki v svojo strukturo vežejo še druge anorganske soli, kot so magnezijev hidroksid, fluorid in sulfat (Martini in Bartholomew 2010).

Molekule DNA se lahko razmeroma dolgo ohranijo v kosti prav zaradi strukture kosti. Zato je eden od najbolj uporabljenih pristopov pri različnih raziskavah izolacija molekule DNA, saj omogoča analize tako svežih, kot tudi več tisoč let starih primerkov (Kumar in Narayan 2014). Izolacija DNA iz kosti je lahko omejena zaradi majhnega števila kostnih celic in njihove zamreženosti v kostno strukturo, kar otežuje dostop do molekule DNA, ter zaradi območij obsežne mineralizacije, ki predstavljajo fizične ovire za dostopnost reagentov do celic (Loreille in sod. 2007; Pääbo in sod. 2004).

Koprolit je fosiliziran fekalni material, ki se običajno najde pri izkopavanjih v človeških naseljih in jamah, ki so jih obiskovale živali. Ker so se sodobni fekalni ostanki, ki jih zapuščajo živali, izkazali kot koristen vir molekule DNA, jih je bilo pomembno dobro ohraniti (Höss in sod. 1992; Kohn in sod. 1995; Kohn in sod. 1999). Različne študije so pokazale, da tako koproliti, kot tudi drugi antični ostanki, vsebujejo velike količine povezav med reducirajočimi sladkorji in aminoskupinami, verjetno v proteinih in tudi v DNA. Zato je bil logičen korak poskus odstranitve takih navzkrižnih povezav iz koprolitnih izolatov (Vasan in sod. 1996). S pomočjo koprolitskih analiz je mogoče spremljati, kako so se skozi čas spreminjale prehranjevalne navade živali. Zato so molekularne analize koprolitov bogat vir informacij o genetiki in prehranjevalnih navadah živali in ljudi (Hofreiter in sod. 2001).

Za vzorce rastlin in živali, ki so bili zbrani v nadzorovanih pogojih in shranjeni v muzejskih zbirkah v zadnjih 200 letih, je tehnika PCR omogočila skoraj rutinsko pridobivanje zaporedij DNA. Pridobivanje starodavnih zaporedij pri arheoloških vzorcih je dosti bolj kompleksno, saj se raziskovalci soočajo s težavo degradacije aDNA v takšnih vzorcih. Precejšnje težavo predstavlja tudi kontaminacija starodavnih vzorcev s sodobno DNA, ki je razširjena tako v okolju, kot tudi znotraj laboratorijev in muzejev. Zato so ukrepi za preprečevanje kontaminacije izrednega pomena (Hofreiter in sod. 2001).

1.2.1 Problematika izolacije molekule DNA in pomnoževanja mitohondrijske DNA

1.2.1.1 Kontaminacija aDNA

Kontaminacija s sodobno DNA je glavna težava, s katero se srečujemo pri delu z aDNA. Poleg tega lahko težavo predstavlja tudi degradiranost molekule aDNA, saj so lahko zaradi tega težave pri učinkovitem pomnoževanju v reakciji PCR (Paabo 1989; Handt in sod. 1994; Hofreiter in sod. 2000).

Da bi zmanjšali prisotnosti tujih ali sodobnih DNA molekul v procesu izolacije in nadaljnje analize, je treba laboratorijske analize opraviti v laboratoriju, ki je strogo ločen od dela, ki vključuje sodobno DNA. Obdelava laboratorijske opreme z belilom, UV-obsevanjem in zaščitnimi oblačili so drugi rutinski previdnostni ukrepi (Hofreiter in sod. 2001).

Številne študije so se osredotočile na identifikacijo virov kontaminacije in določitev sredstev za zaščito aDNA. Eno od najpomembnejših pravil je uporaba fizično izolirane čiste sobe, ki mora biti namenjena vsem eksperimentom in analizam aDNA. Priporočeno je čiščenje delovne površine z raztopino 1 % natrijevega hipoklorita in z absolutnim etanolom (Ballantyne in sod. 2015). Raztopine, ki se uporabljajo za izolacijo aDNA, je treba shraniti vse do izvedbe reakcije PCR (Kefi 2011).

Pri izvedbi izolacije in pripravi PCR je pomembno vključiti vsaj eno negativno kontrolo (reagente brez vzorca) (Kefi 2011), da bi se lahko ocenila stopnja kontaminacije DNA, do katere je prišlo med postopkom ekstrakcije (Rohland in sod. 2018). Z vključevanjem večih več negativnih kontrol, zlasti pri večjih ekstrakcijskih sklopih, se povečuje možnost za odkritje primerov kontaminacije. Izolate DNA, ki nastanejo iz teh kontrol, je treba nato spremljati tudi skozi vse nadaljnje korake, kot so pomnoževanje fragmentov, priprava knjižnice in sekvenciranje. Priporočljivo je tudi dodajanje pozitivnih kontrol (Rohland in sod. 2018).

1.2.1.2 Poškodbe DNA v starih vzorcih

Številni dejavniki, kot so struktura kosti, okolje, v katerem so bile kosti shranjene, in različni procesi razgradnje, lahko vplivajo na količino in kakovost izolirane DNA. Zaradi njih se lahko DNA izolira z manjšim številom kopij, je nepopolna, fragmentirana ali kontaminirana (Bouwman in sod. 2008; Loreille in sod. 2007; Rohland in Hofreiter 2007).

Najbolj očitna vrsta poškodbe DNA, pridobljene iz subfosilnih in fosilnih ostankov, je njena degradacija in majhna povprečna velikost razdrobljenih fragmentov, običajno med 100 in 500 bp. Obseg degradacije teh procesov je odvisen od posebnosti ohranjanja in se lahko razlikuje tudi med muzejskimi primerki iste starosti (Cooper in sod. 1992, 2001; Haddrath in Baker 2001). V primerjavi s sodobnimi izolati DNA iz svežih tkiv pa je starodavna DNA vedno krajša (Pääbo in sod. 2004).

Dolžina sekvenc DNA, ki jih lahko pomnožimo z verižno reakcijo s polimerazo, ni omejena le s prekinitvami verig, temveč tudi s poškodbami, ki predstavljajo ovire podaljševanju verig DNA s *Taq* polimerazo. Veliko takšnih poškodb povzročajo prosti radikali, kot so peroksidni ostanki ($-O_2$), vodikov peroksid (H_2O_2) in hidrokso radikali ($-OH$). Mesta, ki so najbolj izpostavljena oksidaciji, so dvojne vezi obeh pirimidinov in purinov, kar vodi do fragmentacije obroča (Lindahl 1993). Poleg tega so kemične vezi deoksiriboznih ostankov dovzetne za oksidacijo, kar povzroči drobljenje sladkornega obroča. DNA, ekstrahirana iz fosilnih ostankov, je dovzetna za cepitev z encimom endonukleazo III, ki je specifična za oksidirane pirimidine (Paabo 1989). Dokazano je, da paleontološki vzorci iz različnih okolij in starosti vsebujejo oksidirane bazne ostanke (Hoss in sod. 1996). Zaporedij DNA ni mogoče ojačati preko PCR iz vzorcev z večjimi količinami dveh oksidiranih pirimidinov (5-hidroksi-5-metilhidantoin in 5-hidroksihidantoin), ki blokirajo *Taq* polimerazo (Hoss in sod. 1996; Pääbo in sod. 2004).

Druga vrsta poškodb so križne vezi, ki prav tako blokirajo polimerazo in se lahko neposredno opazujejo z elektronsko mikroskopijo v starih vzorcih DNA (Paabo 1989). S plinsko kromatografijo – masno spektroskopijo – se v starih fekalnih ostankih (koprolitih) identificirajo hlapne sestavine, ki so nastale iz Maillardovih produktov. Maillardovi produkti nastajajo s kondenzacijskimi reakcijami med sladkorji in primarnimi aminoskupinami v beljakovinah in nukleinskih kislinah. Obdelava z reagentom, N-fenaciltiazolijevim bromidom (Vasan in sod. 1996), ki lomi Maillardove produkte, omogoča, da se sekvence DNA pomnožijo iz nekaterih starodavnih ostankov, ki sicer ne bi bili primerni za pomnoževanje, npr. iz neandertalnih kosti (Krings in sod. 2000; Pääbo in sod. 2004).

Poleg fragmentacije in modifikacije DNA, ki ovirajo delovanje polimeraze, so v starodavni DNA pogosti znani in neznani tipi poškodb DNA. Nekatere od teh modifikacij DNA so problematične, ker kljub temu da omogočajo ojačenje molekul, povzročijo vezavo nepravilnih baz, ki se vključijo v reakciji PCR. Najpogostejša oblika takšnih modifikacij je hidrolitična izguba aminoskupin iz baz adenina, citozina, 5-metilcitozina in gvanina, kar ima za posledico hipoksantin, uracil, timin in ksantin. Deaminacijski produkti citozina (uracila), 5-metil-citozina (timina) in adenina (hipoksantina) so še posebej pomembni za pomnoževanje aDNA, ker povzročajo vstavitve nepravilnih baz (A namesto G in C namesto T) (Pääbo in sod. 2004).

Spojine, ki soobstajajo v vzorcih aDNA, kot so humične in fulvinske kisline in tanini, zavirajo delovanje encima polimeraze (ki zagotavlja pomnoževanje DNA med PCR). Zato se razvijajo nove tehnike, ki bi zmanjšale količino inhibitorjev in pripomogle k uspešnejšemu pomnoževanju aDNA (Kefi in sod. 2003). Visoka fragmentiranost starodavne DNA onemogoča pomnoževanje fragmentov, ki so krajši od 50 bp, s klasično metodo PCR. Novi pristopi, kot je Multiplex PCR, zahtevajo 22–25-krat manj vzorca aDNA in so se izkazali kot dobro orodje za analizo zelo degradirane aDNA (Haak in sod. 2010). Še več, razvijajo se novi pristopi, ki temeljijo na enojnih primarnih fragmentih DNA, ki omogočajo visoko zmogljivost, da se kratki fragmenti DNA popolnoma sekvencirajo (Briggs in sod. 2010; Krause in sod. 2010).

1.2.2 Ocena kakovosti izolirane DNA iz kosti in koproilita

Po izolaciji je lahko raztopina, ki vsebuje aDNA, obarvana in se spreminja od rumene do temno rjave, kar otežuje ali onemogoča kvantifikacijo. Ta obarvanost je posledica prisotnosti spojin, katerih narava je še vedno nejasna, čeprav so nekatere študije lahko identificirale izvlečke fulvinske kisline in humusa v aDNA (Burger in sod. 1999). Zato je tehnika spektrofotometrije, ki se običajno uporablja za določanje količine DNA, neučinkovita. V zadnjih letih so bile razvite nove tehnike, kot je kvantifikacija s hibridizacijo s sondo in kvantitativna verižna reakcija v realnem času (qPCR), ki je dala zadovoljive rezultate (Kefi in sod. 2003; Alonso in sod. 2004; Kéfi in sod. 2005; Haak in sod. 2010; Kefi 2011).

Le majhen delež starih vzorcev lahko vsebuje DNA, ki jo lahko pomnožimo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Zato so hitre presejalne metode ključnega pomena za identifikacijo velikega dela vzorcev, ki so tako slabo ohranjeni, da ni potrebe po poskusih izolacije DNA. Aminokislinske analize lahko podpirajo verodostojnost zaporedja DNA, pridobljenih iz vzorca, tako da pokažejo, da so pogoji ohranjanja takšni, da je mogoče pridobiti makromolekule (Poinar in sod. 1996; Hofreiter in sod. 2001).

Uspešnost reakcije PCR in prisotnost ali odsotnost produkta PCR se lahko vizualno prikaže na elektroforeznem gelu (Handt in sod. 1996). Ta postopek je zelo enostaven, vendar se s pomočjo tega postopka pridobijo samo informacije o uspešnosti pomnoževanja in grobe ocene količine dobljenega produkta.

1.2.3 Analiziranje in pomnoževanje aDNA

Količine DNA v sledovih lahko občasno preživijo razgradnjo organske snovi dolgo časa po smrti organizma. Vendar pa je pridobivanje teh starodavnih molekul DNA močno ovirano zaradi njihove majhnosti. Fragmentacija DNA je vsaj deloma posledica depurinacije (Lindahl 1993; Briggs in sod. 2007), ki se stalno pojavlja. Predvideva se, da se stopnja fragmentacije DNA poveča s starostjo vzorca. Ta povezava je bila dejansko ugotovljena v nedavni študiji, ki je analizirala vzorce različnih starosti iz istih arheoloških najdišč (Collins in sod. 2012), vendar korelacija izgine pri primerjavah med različnimi lokacijami. Pomembna vloga okoljskih pogojev, zlasti temperature, pri ohranjanju DNA je dobro prepoznana in se odraža na primer v konceptu termalne starosti (Dabney in sod. 2013).

Pomembno je omeniti tudi, da direktno pomnoževanje PCR zagotavlja omejeno moč za rekonstrukcijo sekvenc iz kratkih DNA fragmentov, zato ker so fragmenti, ki so dovolj dolgi, da omogočajo hibridizacijo dveh PCR primerjev okoli odseka informativne sekvence, podvrženi direktnemu pomnoževanju in sekvenciranju. Velikost ampikona se zmanjša na približno 50 bp, ostane le približno 10 bp informativnega sekvenčnega zaporedja med osnovnimi mesti, kar ogroža varnost identifikacije sekvenc, medtem ko v najboljšem primeru omogoča genotipizacijo polimorfizmov posameznih nukleotidov (Krause in sod. 2010; Dabney in sod. 2013).

V nasprotju s tem pa lahko s sedanji tehnikami (sekvenciranje nove generacije – NGS) celo krajše fragmente DNA sekvenciramo v celoti, ker se prvotna mesta, potrebna za pomnoževanje in sekvenciranje, dodajo navzven z vezavo umetnih adapterskih sekvenc na molekulske konce. Ta pristop omogoča tudi določanje vzorcev poškodb, ki so edinstvene za starodavne molekule, in tako zagotavlja okvir za preverjanje verodostojnosti starodavnih sekvenc (Krause in sod. 2010; Dabney in sod. 2013). Očiten korak, v katerem se pričakuje, da bo prišlo do izgube kratkih molekul, je pri pripravi knjižnice, ker običajno uporabljene tehnike za odstranitev presežnih adapterskih molekul po ligaciji zahtevajo prečiščevanje DNA, ki je selektivno po velikosti (Dabney in sod. 2013).

1.2.3.1 Problematika pomnoževanja degradirane aDNA

Poleg tega lahko povezava med količino DNA in dolžino fragmentov ter ponovljivostjo rezultatov podpira prisotnost endogene DNA. Tudi rezultati morajo predstavljati filogenetsko in filogeografsko skladnost. Na primer za analizo mitohondrijske DNA morajo biti pridobljene sekvence skladne z obstoječimi mtDNA haplotipi in haplogrupami (Haak in sod. 2010; Kim in sod. 2011).

Pomembno je omeniti, da uporaba novih tehnologij, kot so multipleksni pristopi, kvantitativni PCR v realnem času (qPCR), SNaPshot tipizacija, adapter-ligacija in zaporedje DNA z visoko prepustnostjo, močno izboljša razmerje endogene DNA z DNA onesnaževalcev in identificira nov vir kontaminacije ljudi (Krause in sod. 2010; Haak in sod. 2010; Kim in sod. 2011; Kefi 2011)

Tudi če se upoštevajo vsa priporočena merila in če se domneva, da kontaminacija ni vstopila v reakcijo PCR, se lahko med samim PCR pojavijo številne težave. Uporabljen termostabilna *Taq* polimeraza je odgovorna za napačno vstavitve baze s hitrostjo 1 na 1.000 baz (prehodi C – T). To običajno ni težava, saj je za napačno odčitavanje baz zelo verjetno, da se bodo na istem položaju pojavile več kot enkrat, zato lahko ponovljeni poskusi in več zaporednih izvedb nadoknadijo to napako. Pojav skokov PCR, ki ga je povzročila poškodovana DNA vzorca, je bil prvič opisan leta 1990 (Handt in sod. 1994). Skakanje se pojavi, ko *Taq* polimeraza doseže konec molekule in vstavi adenzin, ki zaključi podaljšanje. Ta molekula lahko nato skoči na drugo, polimerizacija pa se nadaljuje, kar ima za posledico proizvodnjo himernega zaporedja. Ta rekombinantna molekula se nato pomnoži v nadaljnjih krogih PCR in ostane prisotna v velikih količinah do konca reakcije. Pri večini dela aDNA se pričakuje, da bo pridobljena sekvenca edinstvena, kar lahko povzroči, da raziskovalec verjame, da je ta himerna molekula DNA resnična sekvenca. Tudi ta problem je mogoče prepoznati z večkratnim zaporedjem. Predlagano je bilo, da se lahko prepoznavanje skakalnega fenomena uporabi kot merilo avtentičnosti ojačane DNA. To temelji na vedenju, da se bo skakanje pojavilo le, če je predloga močno poškodovana, kot se pričakuje v primeru aDNA (Paabo in sod. 1990; Graham 2007).

1.3 Uporaba molekularnih genetskih markerjev v arheozoologiji

Pomembna molekula za razumevanje evolucijskih povezav med posamezniki, populacijami in vrstami, ki se deduje po materi, je mitohondrijska DNA (mtDNA) (Irwin, Kocher in Wilson 1991). S prihodom verižne reakcije s polimerazo (PCR) je bilo mogoče neposredno iz taksonov pridobiti zaporedje mtDNA, ki se jih lahko poravna v večjem časovnem razponu. Zgodnje molekularne raziskave so bile usmerjene v mitohondrijsko

DNA (mtDNA) s sorazmerno kratkimi diagnostičnimi fragmenti (150–500 bp) kontrolnega območja ali genom citokroma *b* (*cytb*) za identifikacijo različnih taksonov (Hofreiter in sod. 2016).

Del mitohondrijske DNA je gen za citokrom *b*, ki je dolg 1140 bp (Irwin in sod. 1991) in je centralna podenota citokroma *c*, ki je odgovoren za transmembranski transport elektronov (Espostl in sod. 1993). V številnih študijah so uporabili gen za citokrom *b*, ker se je zaradi svoje variabilnosti izkazal kot najbolj koristen za primerjavo vrst v istem rodu ali v isti družini (Castresana 2001).

Število kopij mtDNA je v celici višje kot število jedrnega genoma. Zato je identifikacija starodavne DNA z uporabo mtDNA bolj učinkovita.

Deleži mitohondrijske DNA (mtDNA) obstajajo v jedrnem genomu in predstavljajo možen vir lažnih rezultatov. Včasih jih je mogoče odkriti z opazovanjem več sekvenc mtDNA iz ekstrakta ali z iskanjem istega zaporedja pri drugi, zelo sorodni vrsti. Če prekrivanje pomnoževanja z različnimi oligonukleotidnimi začetniki zazna enako zaporedje na območju, ki je zelo spremenljivo, je malo verjetno, da zaporedje izhaja iz vstavitve jedra (Hofreiter in sod. 2001).

Analiziranje sekvenc DNA starodavnih živali je bilo pri različnih raziskavah zelo uspešno, saj so se pridobljena zaporedja DNA lahko ločila od zaporedij drugih vrst v isti taksonomski skupini. To je bil eden od glavnih razlogov, zakaj se je večina raziskovalcev odločila za izolacijo DNA iz mitohondrijev pri sesalcih in iz kloroplasta pri rastlinah (Hofreiter in sod. 2001).

Pri filogenetskih študijah izumrlih živali je zelo pomembna analiza sekvenc mitohondrijske DNA (mtDNA). Kadar se proučuje odnose med ozko sorodnimi vrstami ali rešuje vprašanja populacijske genetike, je pomembno poudariti, da mtDNA predstavlja del genetskega zapisa, ki lahko ali pa ne odraža zgodovino celotnega genoma. Ta problem ni prisoten pri raziskovanju vrst, ki med seboj niso tesno povezane, saj se v času med speciacijo pričakuje, da bodo vsi deli genoma pokazali enako filogenost. Zato je potrebna previdnost pri razlagi rezultatov (Hofreiter in sod. 2001).

2 NAMEN, CILJI IN HIPOTEZE

Namen zaključne naloge je optimizacija izolacije DNA iz koprolitov in starodavnih degradiranih vzorcev kosti bobra (*Castor fiber*), domačega goveda (*Bos taurus*, *Bos* sp.), stepskega bizona (*Bison priscus*), gamsa (*Rupicapra rupicapra balcanica*) in slona (*Elephas maximus* / *Loxodonta* sp.). Glavni cilj je razvoj ekonomične in učinkovite metode za izolacijo DNA iz različnih vzorcev starih kosti in koprolitov.

Hipotezi, na katerih temelji zaključna naloga, sta:

1. Uspešnost izolacije DNA iz vzorcev kosti je odvisna od uporabe demineralizacijskega postopka, kakor tudi od izbire ustreznega izolacijskega postopka.
2. Na izolacijo DNA iz koprolitov vplivajo stopnja ohranjenosti vzorca, predpriprava vzorca in izbira ustreznega izolacijskega postopka.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vzorci

V zaključni nalogi smo uporabili vzorce kosti šestih živali, in sicer bobra (*Castor fiber*), domačega goveda (*Bos taurus*, *Bos* sp.), stepskega bizona (*Bison priscus*), gamsa (*Rupicapra rupicapra balcanica*) in slona (*Elephas maximus* / *Loxodonta* sp.), ter koprolit neznane vrste (Tabela 1) (Slika 1).

Tabela 1: Vzorci, vrsta in koda.

Vzorci	Vrsta vzorca	Koda vzorca
<i>Castor fiber</i>	femur	1542
<i>Rupicapra rupicapra balcanica</i>	rog	1360
<i>Elephas maximus</i> / <i>Loxodonta</i> sp.	odlomki/drobci zoba	533
<i>Bos taurus</i>	phalanx	9247
<i>Bos taurus</i>	femur	9530
<i>Bison priscus</i>	femur	LZ02
<i>Bison priscus</i>	tibia	8713
<i>Bos/Bison</i>	zob M1/M2	LZ03
<i>Canis familiaris</i> ali <i>Homo sapiens</i> ?	koprolit	LZ04



Slika 1: Uporabljeni vzorci kosti

A) Bober (*Castor fiber*) – stegnenica (femur) B) Gams (*Rupicapra rupicapra balcanica*) – rog C) Slon (*Elephas maximus* / *Loxodonta* sp.) – odlomki/drobci zoba D) Domače govedo (*Bos taurus*) – prstnica (phalanx) E) Domače govedo – stegnenica (femur) F) Stepski bizon (*Bison priscus*) – stegnenica (femur) G) Stepski bizon – golenica (tibia) H) Govedo ali bizon (*Bos/Bison*) – zob.

3.2 Priprava laboratorija in preprečevanje kontaminacije

Pred pripravo vzorcev smo vse delovne površine v laboratoriju dvakrat očistili z raztopino 1 % natrijevega hipoklorita in dvakrat z absolutnim etanolom (Ballantyne in sod. 2015). Zunanost pripomočkov za enkratno uporabo in instrumente smo temeljno obrisali z 1 % raztopino natrijevega hipoklorita in obsevali z UV-lučjo. Pred, med in po uporabi smo vse površine in pripomočke dodatno očistili.

Posebno pozornost smo namenili preprečevanju kontaminacije vzorcev, saj bi imeli v nasprotnem primeru težave pri analizi rezultatov. Če pride do kontaminacije, se namesto kratkih fragmentov aDNA pomnožijo še fragmenti sodobne DNA.

3.3 Izolacija molekule DNA

Za izolacijo starodavne DNA smo uporabili tri različne izolacijske postopke, saj smo želeli ugotoviti, kateri izmed njih je najbolj učinkovit za izolacijo takšnih težavnih vzorcev. Za vzorec koproilita smo uporabili dva izolacijska postopka.

3.3.1 Postopek 1: Izolacija DNA iz kosti s fenol kloroformom

Predpriprava vzorca:

Vzorci kosti smo pred izolacijo obdelali z uporabo demineralizacijskega postopka. Za demineralizacijo smo pripravili ekstrakcijski pufer, sestavljen iz 90 ml 0,5 M EDTA, 1 ml 11 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1g SDS, 6,5 ml 1 M DTT in 400 µl Proteinaza K/10 ml pufra (Bon in sod. 2012).

Ta postopek je zelo pomemben pri izolaciji molekule DNA iz kosti in koproilitov, saj zviša količine in kakovost izolirane DNA. Ti reagenti namreč izboljšajo postopek demineralizacije, saj EDTA deluje kot kelacijski agent, ki veže kalcij in vodo, medtem ko DTT cepi disulfidne vezi v kolagenskih vlaknih (Loreille in sod. 2007). Za bolj učinkovito delovanje ekstrakcijskega pufra smo poleg EDTA in DTT dodali reagent SDS, ki denaturira proteine, tako da cepi polipeptidne vezi med nukleinskimi kislinami in proteini (Cleveland in sod. 1971).

Prvi del izolacijskega postopka (predpriprava vzorca) smo izvedli po protokolu raziskovalcev (Bon in sod. 2012), drugi del pa po protokolu proizvajalca s pomočjo kompleta izolacijskih reagentov QIAamp DNA Micro Kit, (Qiagen, Hilden, Nemčija; v nadaljevanju QIAamp).

Materiali:

Ekstrakcijski pufer – 0,45 M EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 0,8), 0,1 % SDS, 65 mM DTT, 0,5 mg/ml proteinaza K (dodamo pred uporabo) (100 ml):

Postopek:

1. Pripravimo 58–120 g kostnega prahu, prenesemo v 50 ml centrifugirko in centrifugiramo 1 minuto pri 3500 rpm.
2. Vzorcem dodamo 5 ml ekstrakcijskega pufra in 400 µl proteinaze K (0,5 mg/ml) ter centrifugirke zatesnimo s parafilmom.
3. Vzorce prenesemo na stresalnik in jih inkubiramo 24 ur pri 42 °C ob stalnem mešanju.
4. Po inkubaciji centrifugiramo 1 minuto na 6000 x g (8000 rpm).
5. Supernatant prenesemo v novo centrifugirko.

6. Dodamo 4,5 ml fenol/kloroform/izoamil alkohola (25 : 24 : 1). Premešamo in centrifugiramo 5 minut pri 3000 rpm.
7. Vodno fazo prenesemo v novo centrifugirko, dodamo 4,5 ml fenol/kloroform/izoamil alkohola (25 : 24 : 1) in ponovno centrifugiramo 5 minut pri 3000 rpm.
8. Vodno fazo (600 μ l) prenesemo v QIAamp MiniElute kolono z membrano ter centrifugiramo 1 minuto na 6000 x g (8000 rpm). QIAamp MiniElute kolono prenesemo v novo 2 ml zbiralno centrifugirko.
Če vzorec ni popolnoma prešel membrano centrifugiranju, ponovno centrifugiramo pri višji hitrosti, dokler se QIAamp MiniElute kolona popolnoma ne izprazni.
9. Previdno odpremo QIAamp MiniElute kolono in dodamo 500 μ l AW1 pufra (čistilni pufer 1). Zapremo pokrovček in centrifugiramo 1 minuto na 6000 x g (8000 rpm). QIAamp MiniElute kolono prenesemo v novo 2 ml zbiralno centrifugirko.
10. Previdno odpremo QIAamp MiniElute kolono in dodamo 500 μ l AW2 pufra (čistilni pufer 2). Zapremo pokrovček in centrifugiramo 1 minuto na 6000 x g (8000 rpm). QIAamp MiniElute kolono prenesemo v novo 2 ml zbiralno centrifugirko.
11. Centrifugiramo 3 minute pri maksimalni hitrosti (20000 x g; 14000), da se membrana popolnoma posuši.
Ta korak je obvezen in zelo pomemben, ker lahko etanol pri prenosu v izolat vpliva na nekatere nadaljnje aplikacije.
12. QIAamp MiniElute kolono prenesemo v čisto 1,5 ml mikrocentrifugirko (DNA LoBind Tube 1,5 ml). Previdno odpremo QIAamp MiniElute kolono in dodamo 70 μ l AE pufra (elucijski pufer) v center membrane.
13. Zaprto kolono QIAamp MiniElute, v kateri je 70 μ l AE pufra (elucijski pufer), inkubiramo 10 minut na sobni temperaturi (15-25 °C) pred centrifugiranjem (1 minuto) pri maksimalni hitrosti (20000 x g; 14000).

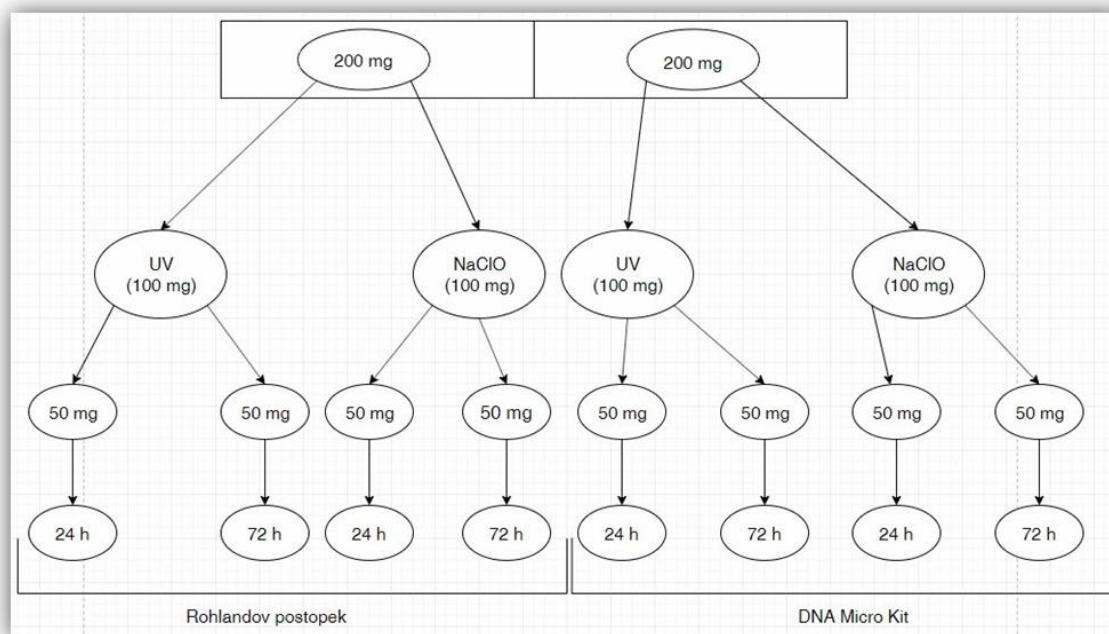
DNA se med hranjenjem v hladilniku lahko veže na plastiko mikrocentrifugirke in s tem se zniža koncentracija DNA v izolatu. Da bi izboljšali koncentracijo vzorcem, hranjenim na –20 °C, smo dodali 0,1 μ l reagenta Tween 20. Da bi preverili vpliv reagenta Tween 20 na koncentracijo vzorcev, smo izolirano DNA shranili v zmrzovalniku ter ob naslednji uporabi dodali Tween 20 in izmerili dobljeno koncentracijo pred in po dodatku reagenta.

3.3.2 Postopek 2: Izolacija DNA iz kosti z Rohlandovim postopkom

Predpriprava vzorca:

Površino vsakega vzorca kosti smo previdno zbrusili in s pomočjo sterilnega orodja za brušenje in skalpelnega rezila odvzeli vzorec kosti. Odvzem vzorca smo naredili na dveh različnih mestih. Del vzorca smo 10 minut obsevali pod UV-svetlobo. Drugi del smo očistili z raztopino 1 % natrijevega hipoklorita (NaClO), sprali z destilirano vodo in inkubirali 2 minuti pri 50 °C. Tako sterilizirane vzorce smo prenesli v 2 ml mikrocentrifugirko in jih za 15 min zamrznili s pomočjo suhega ledu. V vsak vzorec smo dodali 2 sterilni kovinski kroglici in stresali 5 minut s frekvenco 25 Hz na

homogenizatorju. Kovinske kroglice smo izvlekli s sterilno pinceto. Vzorcem smo dodali lizni pufer, jih dobro premešali in inkubirali 24 oz. 72 ur pri temperaturi 37 °C ob stalnem stresanju s hitrostjo 300 rpm (Slika 2).



Slika 2: Shematski prikaz predpriprave vzorca za izolacijo po Rohlandovem postopku in z izolacijo s Micro kitom. Označeni krogi predstavljajo korake v pripravi. Na začetku je podana masa kostnega prahu, nato njena razdelitev v dve paralelki in čas demineralizacije.

Izolacijski postopek:

Izolacijo DNA smo izvedli po protokolu iz članka Extraction of highly degraded DNA from ancient bones, teeth and sediments for high-throughput sequencing (Rohland in sod. 2018).

Materiali:

Pred pričetkom izolacije smo pripravili vse potrebne pufre in reagent, kot navajajo Rohland in sod. 2018.

1. Lizni pufer (Lysis buffer)

Za pripravo 25 ml pufra smo združili 22,5 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0), 1,863 ml vode, 12,5 µl Tween 20 in 625 µl 10 mg/ml proteinaze K.

Opomba: Rastopino smo obsevali z UV-svetlobo pred dodajanjem proteinaze K. Ta pufer se lahko shrani pri sobni temperaturi vsaj 1 leto pred dodajanjem proteinaze K, po dodatku encima tega pufra ni mogoče shraniti.

2. Vezni pufer D (Binding buffer D)

Za pripravo 260 ml pufra smo zatehtali 124 g 5 M gvanidijevega hidroklorita in do 152,6 ml dopolnili z vodo. Po kratkem segrevanju smo steklenico premešali, dokler se sol ni popolnoma raztopila. Dodali smo 104 ml 40 % izopropanola, 7,8 ml 3 M natrijevega acetatnega pufra (pH 5,2) in 130 μ l reagenta Tween 20. Pufer se lahko hrani do 4 tedne pri sobni temperaturi.

3. Vezni pufer G (Binding buffer G)

Za pripravo veznega pufra G smo zatehtali 47,75 g gvanidijevega hipoklorita v steklenico in do 75 ml dopolnili z vodo. Mešali smo s stresanjem, dokler se sol ni popolnoma raztopila. Dodali smo 175 ml 70 % 2-propanola in 125 μ l reagent Tween 20. Ta pufer lahko hranimo pri sobni temperaturi do 4 tedne.

Opomba: Za izolacijo smo uporabili samo en vezni pufer, ali G ali D. Vezni pufer D je optimiziran za pridobivanje fragmentov DNA \geq 35 bp. Vezni pufer G povrne fragmente \geq 25 bp.

4. Čistilni pufer (Wash buffer)

Za pripravo 500 ml čistilnega pufra smo 100 ml pufra PE koncentrata dodali 400 ml absolutnega etanola. Ta pufer se lahko hrani pri sobni temperaturi do 1 leto.

5. Elucijski pufer (Elution buffer)

Za pripravo 1000 ml elucijskega pufra smo združili 49,4 ml vode, 500 μ l 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 100 μ l 0,5 M EDTA (pH 8,0) in 25 μ l Tween 20. Ta pufer se lahko hrani pri sobni temperaturi najmanj 1 leto.

Postopek:

1. Centrifugiramo 2 minuti pri 16,100 g.
2. Supernatant prenesemo v centrifugirko (15 ml), dodamo 10,4 ml vezivnega pufra (Binding Buffer) in premešamo.
3. Priprava aparata za vezavo: rezervoar kolone Zymo-Spin V (Zymo Research) pred uporabo 20 minut potopimo v kopal z belilom, splahnemo z vodo in obsevamo z UV-svetlobo.
4. Sterilni rezervoar vstavimo v QIAamp MinElute kolono z membrano in celotno konstrukcijo vstavimo v 50 ml centrifugirko.
5. Pufer s supernatantom prelijemo v rezervoar in zapremo centrifugirko.
6. Centrifugiramo 4 minute pri 500 g, obrnemo za 90° in ponovno centrifugiramo 2 minuti pri 1,500 g.
7. Kolono z rezervoarjem prenesemo v čisto 2 ml zbiralno centrifugirko (odlomimo zgodnji del rezervoarja).
8. Odstranimo rezervoar in MinElute kolono centrifugiramo 1 minuto pri 3,400 g.
9. Na kolono dodamo 750 μ l čistilnega pufra in centrifugiramo 30 sekund pri 3,400 g.

10. Ponovimo pranje!
11. Kolono centrifugiramo 1 minuto pri 16,400 g in jo prenesemo v novo 1,5 ml zbiralno centrifugirko.
12. S pipeto naneseemo 50 µl elucijskega pufra na membrano in inkubiramo 5 minut.
13. Centrifugiramo 1 minuto pri 16,400 g.
14. Eluat naneseemo na membrano in ponovno centrifugiramo 1 minuto pri 16,400 g.
15. Eluat (DNA ekstrakt) pipetiramo v 1,5 ml LoBind centrifugirko in shranimo pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do uporabe.

3.3.3 Postopek 3: Izolacija DNA s kitom QIAamp® DNA Micro kit

Predpriprava vzorca:

Predpriprava vzorca je potekala enako kot pri izolacijskem postopku 2, vendar je inkubacija vzorca potekala le 15 ur.

Izolacijski postopek:

Izolacijo DNA smo izvedli po protokolu proizvajalca s pomočjo kompleta izolacijskih reagentov QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija; v nadaljevanju QIAamp).

1. Vzorec centrifugiramo 1 minuto pri 6000 rpm.
2. Supernatant prenesemo v novo centrifugirko. Pelet, ki je ostal, stehtamo in ga zamrznemo.
3. V vsako centrifugirko dodamo 200 µl AL pufra, zapremo pokrovček in premešamo na stresalniku 7 sekund.
Za zagotovitev učinkovite lize je bistveno, da se vzorec in AL pufer temeljito premešata, da dobimo homogeno raztopino.
4. Dodamo 200 µl etanola (96–100 %), zapremo pokrovček in 7 sekund dobro mešamo s stresalnikom.
5. Inkubiramo 5 minut na sobni temperaturi.
6. Po inkubaciji kratko centrifugiramo, da odstranimo kapljice izpod pokrova.
7. Supernatant naneseemo na QIAamp MiniElute kolono z membrano, centrifugiramo 1 minuto pri 6000 x g (8000 rpm). Postopek ponovimo, dokler celotnega vzorca ne spustimo preko kolone.
8. QIAamp MiniElute kolono prenesemo v novo 2 ml zbiralno centrifugirko.
9. Previdno odpremo QIAamp MiniElute kolono in dodamo 500 µl AW1 pufra (čistilni pufer 1). Zapremo pokrovček in centrifugiramo 1 minuto na 6000 x g (8000 rpm). QIAamp MiniElute kolono prenesemo v novo 2 ml zbiralno centrifugirko.
10. Previdno odpremo QIAamp MiniElute kolono in dodamo 500 µl AW2 pufra (čistilni pufer 2). Zapremo pokrovček in centrifugiramo 1 minuto na 6000 x g (8000 rpm). QIAamp MiniElute kolono prenesemo v novo 2 ml zbiralno centrifugirko.
11. Centrifugiramo 3 minute pri maksimalni hitrosti (20000 x g; 14000), da se membrana popolnoma posuši. Ta korak je obvezen in zelo pomemben, saj lahko etanol pri prenosu v izdat vpliva na nekatere nadaljnje postopke.
12. QIAamp MiniElute kolono prenesemo v čisto 1,5 ml mikrocentrifugirko (DNA LoBind Tube 1,5 ml). Previdno odpremo QIAamp MiniElute kolono in dodamo 70 µl AE pufra

(elucijski pufer) in 0,05 % Tween 20. Zapremo pokrovček in inkubiramo 1 minuto na sobni temperaturi.

13. Centrifugiramo 1 minuto pri maksimalni hitrosti (20000 x g; 14000).

3.3.4 Postopek 4: Izolacija DNA iz koproilita

Predpriprava vzorca:

Zaradi krhkosti vzorca dekontaminacija zunanje površine ni bila možna.

Postopek za izolacijo DNA iz koproilita:

Izolacijo DNA smo izvedli z uporabo kitov DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) in QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) po navodilih proizvajalca.

Postopek 1 (DNeasy PowerSoil Kit):

1. Zatehtamo 0,35 g vzorca in ga prenesemo v PowerBead centrifugirko (PowerBead Tube). Postavimo na stresalnik za 1 minuto.
2. Dodamo 60 µl reagenta Solution C1 in nekajkrat postavimo na stresalnik. Reagent Solution C1 lahko dodamo v PowerBead centrifugirko pred dodatkom vzorca.
3. Potem vzorce stresamo 10 minut s frekvenco 15 Hz na stresalniku TissueLyser.
4. Ponovno stresamo 10 minut na maksimalni hitrosti.
5. Centrifugiramo 30 sekund na 10,000 x g.
6. Supernatant prenesemo v novo 2 ml centrifugirko (Collection Tube). Količina supernatanta je med 400 in 500 µl.
7. Dodamo 250 µl reagenta Solution C2 in za 5 sekund postavimo na stresalnik. Inkubiramo 5 minut na temperaturi 2–8 °C.
8. Centrifugiramo 1 minuto na 10,000 x g.
9. Izogibamo se peleta in 600 µl dobljenega supernatanta prenesemo v čisto 2 ml centrifugirko (Collection Tube).
10. Dodamo 200 µl reagenta Solution C3, postavimo na stresalnik. Inkubiramo 5 minut na temperaturi 2–8 °C.
11. Centrifugiramo 1 minuto na 10,000 x g.
12. Izogibamo se peleta in 750 µl dobljenega supernatanta prenesemo v čisto 2 ml centrifugirko (Collection Tube).
13. V 1200 µl supernatanta dodamo reagent Solution C4 in damo na stresalnik za 5 sekund.
14. Dopolnimo do 675 µl v MB kolono (MB Spin Column) in centrifugiramo 1 minuto na 10,000 x g.
15. Postopek ponovimo, dokler celotnega vzorca ne spustimo preko kolone.
16. Dodamo 500 µl reagenta Solution C5. Centrifugiramo 30 sekund na 10,000 x g.
17. Ponovno centrifugiramo 1 minuto na 10,000 x g.
18. Previdno prenesemo MB kolono v novo 2 ml zbiralno centrifugirko.
19. Dodamo 60 µl reagenta Solution C6. Reagent nanašamo direktno na membrano.

20. Centrifugiramo 30 sekund na 10,000 x g na sobni temperaturi.

Dobljeno DNA je priporočeno shraniti pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, saj raztopina Solution C6 ne vsebuje EDTA.

Postopek 2 (QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit):

1. Zatehtamo 220 mg vzorca in ga prenesemo v 2 ml centrifugirko.
2. V vsako centrifugirko dodamo po 1 ml InhibitEX pufru. Vzorce postavimo na stresalnik za 1 minuto, dokler se vzorec blata ne homogenizira.
3. Centrifugiramo 1 minuto pri maksimalni hitrosti, da dobimo pelet.
Opomba: Če so v supernatantu še vedno vidni trdi delci, je treba vzorec ponovno centrifugirati.
4. V novo 2 ml mikrocentrifugirko dodamo 25 μl proteinaze K.
5. Dodamo 600 μl supernatanta v 2 ml mikrocentrifugirko, v katero smo predhodno dodali proteinazo K.
6. Dodamo 600 μl AL pufru in postavimo na stresalnik za 15 sekund.
Proteinaze K ne dodamo direktno v AL pufer. Pomembno je, da se vzorec in AL pufer dobro premešata, da nastane homogena raztopina.
7. Inkubiramo 10 minut pri 70°C . Na kratko centrifugiramo, da odstranimo kapljice z notranje strani pokrova.
8. Dodamo 600 μl etanola (96–100 %) in postavimo na stresalnik. Na kratko centrifugiramo, da odstranimo kapljice z notranje strani pokrova.
9. 600 μl dobljenega vzorca previdno naneseemo na QIAamp kolono z membrano (QIAamp spin column), centrifugiramo 1 minuto na maksimalni hitrosti. Postopek ponovimo, dokler celotnega vzorca ne spustimo preko kolone.
10. QIAamp kolono prenesemo v novo 2 ml zbiralno centrifugirko.
11. Previdno odpremo QIAamp kolono in dodamo 500 μl AW1 pufru (čistilni pufer 1). Zapremo pokrovček in centrifugiramo 1 minuto na maksimalni hitrosti. QIAamp kolono prenesemo v novo 2 ml zbiralno centrifugirko.
12. Previdno odpremo QIAamp kolono in dodamo 500 μl AW2 pufru (čistilni pufer 2). Zapremo pokrovček in centrifugiramo 3 minute na maksimalni hitrosti. QIAamp kolono prenesemo v novo 2 ml zbiralno centrifugirko.
13. Centrifugiramo 3 minute pri maksimalni hitrosti, da se membrana popolnoma posuši.
14. QIAamp kolono prenesemo v čisto 1,5 ml mikrocentrifugirko. Previdno odpremo QIAamp kolono in dodamo 100 μl ATE pufru (elucijski pufer) direktno na QIAamp membrano. Zapremo pokrovček in inkubiramo 1 minuto na sobni temperaturi. Centrifugiramo 1 minuto pri maksimalni hitrosti.

Tabela 2: Vrsta in tip vzorcev, uporabljenih pri različnih postopkih izolacije.

Vzorec	Vrsta	Mesto vzorčenja	Postopek izolacije				
			Fenol kloroform	Rohland		Micro kit	
			Postopek 1	Postopek 2		Postopek 3	
			24 h	24 h	27 h	24 h	27 h
9247	<i>Bos taurus</i>	phalanx	+	-	-	-	-
9530	<i>Bos taurus</i>	femur	+	-	-	-	-
8713	<i>Bison priscus</i>	tibia	+	-	-	-	-
LZ02	<i>Bison priscus</i>	femur	+	+	+	+	+
LZ03	<i>Bos/Bison</i>	zob (korenina)	+	+	+	+	+
1542	<i>Castor fiber</i>	femur	-	-	-	+	+
1360	<i>Rupicapra rupicapra balcanica</i>	rog	-	+	+	+	+
533	<i>Elephas maximus</i> / <i>Loxodonta</i> sp.	odlomki/drobci zoba	-	+	+	+	+
Pozitivna kontrola	<i>Bos taurus</i> (2018)	Sklepna kost	+	+	+	+	+

* Za standardni postopek smo uporabili sveže vzorce tkiva, ki smo jih izolirali v skladu z navodili proizvajalca s peqGold Tissie DNA mini kitom * Fenol kloroform – Postopek 1 * Rohland – Postopek 2 * Micro kit – Postopek 3 * (+) postopek izolacije smo uporabili * (-) postopka izolacije nismo uporabili

3.4 DNA – koncentracija in kvantifikacija

Po izolaciji smo izvedli kvantitativno analizo z uporabo reagenta Qubit® dsDNA BR za merjenje koncentracije (Invitrogen, Kalifornija, ZDA) na fluorimetru Qubit 3,0 (Life Technologies, Kalifornija, ZDA), na ta način smo izmerili koncentracijo izolirane DNA v končnem volumnu. Pri tej analizi smo uporabili 2 µl izolirane DNA. Količina izolirane DNA je bila prikazana v enoti ng/µL.

3.4.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) predstavlja *in vitro* metodo za pomnoževanje DNA s selektivnim pomnoževanjem dela DNA, na katerega se vežejo začetni oligonukleotidi (Griffiths in sod. 2008). Za reakcijo PCR sta potrebna izolirana DNA in *Taq* DNA polimeraza, da bi se začetni oligonukleotidi lahko vezali na obeh straneh verige. Izolirana DNA in *Taq* DNA polimeraza sta pomembni za potek reakcije, ker določata začetno mesto sinteze DNA. Reakcija je zelo občutljiva, ker je matrična DNA prisotna v zelo majhni količini (Brown 2007).

Pri PCR reakciji smo uporabili kratke fragmente gena citokrom *b*, saj smo predvidevali, da se starodavna DNA z daljšimi fragmenti zaradi degradiranosti težje pomnožuje. Pomnožili

smo tri zaporedne fragmente, ki so bili dolgi nekje do 100 bp, z uporabo reagentov AllTaq PCR Core kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Za reakcijo PCR smo naredili reakcijsko zmes s končnim volumnom 60 μ l (Tabela 3). Za reakcije PCR smo zaradi racionalizacije stroškov uporabili DNA, izolirano po postopkih, ki so se po izmerjenih koncentracijah izkazali za najbolj uspešne.

Tabela 3: Priprava reakcijske mešanice za PCR.

Uporabljeni reagenti	C _{stock}	enota	C _{reac.}	enota	μ l
Polimeraza AllTaq	5	U	0,08	U	0,90
5x reakcijski pufer	5	x	1,25	x	15,00
MgCl ₂	25	μ M	3,13	μ M	7,50
dNTPs	10	mM	0,25	mM	1,50
Začetni oligonukleotid 1	10	μ M	0,15	μ M	0,90
Začetni oligonukleotid 2	10	μ M	0,15	μ M	0,90
Reagent Q solution	5	x	0,25	x	3
H ₂ O					24,30
DNA			0		6
Končni volumen (μ l)					60

Reakcija je potekala v cikličnem termostatu PeqLab pod naslednjimi pogoji: Začetni denaturaciji pri 95 °C za 3 minute je sledilo 10 ciklov, ki so bili sestavljeni iz denaturacije pri temperaturi 95 °C za 10 sekund, prileganja začetnih oligonukleotidov pri 55 °C za 30 sekund in podaljševanja verige pri 72 °C za 20 sekund. Temu je sledilo še 30 ciklov denaturacije pri 95 °C za 10 sekund, prileganje pri 47 °C in podaljševanje verige pri 72 °C za 20 sekund. Zaključili smo s končnim podaljševanjem na 72 °C za 10 minut.

Tabela 4: Izbrani kratki fragmenti, ki so bili pomnoženi v reakciji qPCR ali PCR.

Uporabljen par začetnih oligonukleotidov	Začetni oligonukleotid	Sekvenca 5'-3'	Dolžina fragmenta
Forward 1	FDW1	TTTGAGGAGCAACAGTCATT	97 bp
	RW1	TTTGTCTACTGAGAATCCGC	
Forward 2	FDW2	ATCGGCACAAATCTAGTCG	95 bp
	RW2	AAATGGAAGGATAAAGTGGAAAG	
Forward 3	FDW3	CAACCCTTACCCGATTTTTC	100 bp
	RW3	GTTAGAACCTGTTTCGTGGA	
Forward 4	FDW4	GCAATTGCCATAGTTCACC	100 bp
	RW4	TAGTAGGGGTGGAATGGAAT	

Pred pomnoževanjem izbranih fragmentov smo oligonukleotidne začetnike testirali tudi z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR), da bi določili optimalno temperaturo

prileganja in preverili kakovost uspešnost pomnoževanja izbranih fragmentov. Postopek reakcije je opisan v prilogi A. Pri izvedbi reakcij PCR smo vsakič dodali tudi izolirano pozitivno kontrolo (svež kostni vzorec goveda), da bi preverili pravilno pomnoževanje in izvedbo reakcije in ugotovili, ali se fragmenti ne pomnožujejo zaradi napake v postopku PCR ali zaradi slabše kakovosti DNA. Vsaki izvedbi reakcije PCR smo dodali tudi negativno kontrolo (namesto vzorca DNA smo dodali vodo), da bi preverili morebitno kontaminacijo reagentov s sodobno DNA.

3.4.2 Gelska elektroforeza

Gelska elektroforeza predstavlja metodo ločevanja DNA molekule s pomočjo električnega toka, tako da negativno nabite molekule potujejo proti katodi, pozitivno nabite molekule pa proti anodi. Za elektroforezo uporabljamo agarozni gel. Agaroz je polisaharid, ki formira pore, velike od 100 nm do 300 nm. Njihova velikost je odvisna od koncentracije agaroze v gelu (Brown 2007).

Postopek priprave agaroznega gela:

1. Zatehtamo 1,9 g agaroze.
2. V merilni valj izmerimo 125 ml x TBE (Tris boratni puffer EDTA).
3. Agarozo in TBE zmešamo in segrevamo 1 do 2 minuti v mikrovalovni pečici do vrenja.
4. Erlenmajerico damo pod mrzlo tekočo vodo, da se gel ohladi na 60 °C in dodamo 10 µl barvila Midori green.
5. V model postavimo nastavke za luknjice in vlijemo še tekoči gel. Odstranimo mehurčke in pustimo gel, da se popolnoma ohladi in strdi.

Za preverjanje uspešnosti reakcije PCR smo uporabili 1,5 % gel in 3 µl pomnoženega produkta PCR. Elektroforeza je potekala 30 min pri napetosti 120 V in 400 mA. Fragmente smo detektirali z uporabo Mini Bis kamere.

4 REZULTATI Z DISKUSIJO

4.1 Analiza koncentracije izolirane DNA

4.1.1 Koncentracije izolirane DNA iz kosti po različnih postopkih izolacije

Izolacija DNA iz vzorca LZ02 (*Bison priscus* – stegnenica) je bila uspešna po vseh treh postopkih izolacije. Najvišja koncentracija izolirane DNA je bila 15,5 ng/μl pri izolaciji s Rohlandovim postopkom (postopek 2) po 72-urni inkubaciji, ko smo vzorec obsevali z UV-svetlobo. Najnižja koncentracija izolirane DNA je bila 2,10 ng/μl pri izolaciji z Micro kitom (postopek 3) po 24-urni inkubaciji in obsevanjem vzorca pod UV-svetlobo.

Kot najuspešnejši postopek se je izkazal Rohlandov postopek, saj so bile koncentracije DNA med seboj primerljive (od 14,60 ng/μl do 15,50 ng/μl) ne glede na uporabljeno metodo predpriprave vzorca ali čas inkubacije. V povprečju je Rohlandov postopek doprinesel k bistveno višji koncentraciji DNA kot Micro kit ali Fenol kloroform (postopek 1) (Tabela 5).

Ob uporabi postopka za izolacijo z Micro kitom smo opazili razliko v dobljeni koncentraciji glede na čas inkubacije. Daljša inkubacija se je v tem primeru izkazala za uspešnejšo in je doprinesla k višji koncentraciji DNA. Prav tako se je pri izolacijskem postopku z Micro kitom dezinfekcija kosti z NaClO izkazala kot uspešnejša, medtem ko se je pri Rohlandovem postopku obsevanje z UV-svetlobo izkazalo kot rahlo boljše, vendar so razlike zanemarljive.

Izolacijo DNA iz vzorca LZ03 (*Bos/Bison* – zob M1/M2) smo uspešno opravili z vsemi postopki za izolacijo. Najvišja koncentracija izolirane DNA je bila 14,30 ng/μl, pri izolaciji s Rohlandovim postopkom (postopek 2) po 24-urni inkubaciji. Najnižja izmerjena koncentracija izolirane DNA je bila 1,00 ng/μl dobljena s postopkom za izolacijo s Fenol kloroform (postopek 1), medtem ko Micro kit tako po 24-urni kot 72-urni inkubaciji ni doprinesel zadostne količine DNA za uspešno meritev. Koncentracije, dobljene po Rohlandovem postopku, so bile po 24 urah približno enake za oba demineralizacijska postopka. Pri Micro kitu pa se je 72-urna inkubacija izkazala za boljše. Koncentracije DNA so bile približno enake za oba postopka predpriprave vzorca (UV ali NaClO) tako pri Rohlandovem izolacijskem postopku kot tudi pri Micro kitu (Tabela 5).

Izolacijo DNA iz vzorca 1542 (*Castor fiber* – stegnenica) smo opravili samo po enem postopku za izolacijo, in sicer po postopku za izolacijo z Micro kitom (postopek 3), zaradi majhne količine vzorca. Najvišja koncentracija izolirane DNA je bila 11,40 ng/μl po 72-urni inkubaciji ob uporabi UV-svetlobe, najnižja izmerjena koncentracija pa 1,02 ng/μl po 24-urni inkubaciji, kjer je bila za predpripravo vzorca uporabljena UV-svetlobo. Ob

uporabi istega protokola s tretiranjem z NaClO izolacija DNA ni bila uspešna. V obeh primerih (tako pri 24-urni kot 72-urni inkubaciji) se je izkazalo tretiranje vzorca z NaClO za manj učinkovito (Tabela 5).

Pri vzorcu 1360 (*Rupicapra rupicapra balcanica* – rog) smo uporabili dva izolacijska postopka, in sicer Rohlandov postopek (postopek 2) in Micro kit (postopek 3). Najvišja izmerjena koncentracija izolirane DNA je bila 14,00 ng/μl dobljena, s Rohlandovim postopkom za izolacijo, pri tem smo uporabili demineralizacijski postopek z UV-svetlobo, inkubacija pa je trajala 72 ur. Najnižjo koncentracijo, 1,69 ng/μl, smo dobili z Micro kitom, pri tem smo uporabili demineralizacijski postopek z UV-svetlobo, inkubacija je trajala 24 ur (Tabela 5).

DNA iz vzorca 533 (*Elephas maximus* / *Loxodonta* sp. - odlomki/drobci zoba) smo izolirali po dveh postopkih za izolacijo, in sicer Rohlandovem postopku (postopek 2) in Micro kitu (postopek 3). Pri obeh postopkih smo vzorce demineralizirali le z NaClO in inkubirali 72 ur zaradi majhne količine vzorca, saj se je pri predhodnih izolacijah aDNA izkazalo, da je 72-urna inkubacija pri pridobivanju višje koncentracije DNA uspešnejša. Višjo koncentracijo smo izmerili pri izolacijskem postopku z Micro kitom, in sicer je bila 15,90 ng/μl, čeprav smo tudi s Rohlandovim izolacijskim postopkom dobili precej visoko koncentracijo, in sicer 10,9 ng/μl (Tabela 5).

Tabela 5: Koncentracija izolirane DNA (ng/μl), dobljena po različnih postopkih demineralizacije, inkubacije in izolacije.

Vzorec	Postopek izolacije								
	Fenol kloroform	Rohland				Micro kit			
	Postopek 1	Postopek 2				Postopek 3			
	24h	24h		72h		24h		72h	
		UV	NaClO	UV	NaClO	UV	NaClO	UV	NaClO
	Koncentracija DNA (ng/μl)								
9247	1,12	–	–	–	–	–	–	–	–
9530	4,23	–	–	–	–	–	–	–	–
8713	1,16	–	–	–	–	–	–	–	–
LZ02	4,52	/	15,10	15,50	14,60	2,10	3,08	6,74	7,47
LZ03	1,00	14,30	14,30	/	/	Too low	Too low	7,72	6,74
1542	–	–	–	–	–	1,02	Too low	11,40	8,75
1360	–	/	/	14,00	/	1,69	2,56	/	/
533	–	–	–	–	10,90	–	–	–	15,90
Pozitivna kontrola	1,84	1,99		23,90		1,99		23,90	

* Fenol kloroform – Postopek 1 * Rohland – Postopek 2 * Micro kit – Postopek 3 * 24 h/72 h, čas inkubacije

* UV/NaClO, postopek demineralizacije vzorca * Vse DNA koncentracije so izražene v enoti ng/μl

* (–), postopka izolacije nismo uporabili * (/), material se je izgubil med postopkom izolacije

4.1.2 Koncentracija DNA iz koprolita

Vzorec koprolita smo izolirali v dveh paralelkah za vsak posamezni postopek. Rezultati obeh koncentracij (v paralelkah) so med seboj primerljivi. Če pa med seboj primerjamo oba postopka, lahko opazimo, da ob uporabi kita DNeasy PowerSoil Kit pridobimo višje koncentracije DNA (Tabela 6). Razlogi za to so lahko naslednji:

- 1) DNeasy PowerSoil Kit res bolje veže fragmentno DNA na kolono in s tem zviša koncentracijo DNA, ker je optimiziran za težavne vzorce prsti, ki vsebujejo nizko količino DNA, lahko tudi različnih vrst, ali
- 2) gre za kit, ki je optimiziran za vezavo vseh nukleinskih kislin in vzorcev prsti, zato poleg aDNA izolira tudi DNA vrst, ki se nahajajo v vzorcu prsti, ki je obdajala koprolit (koprolit, se je namreč nahajal v prsti na arheološkem nahajališču).

Tabela 6: Koncentracije izolirane DNA iz koprolita.

Vzorci	Datum izolacije	Postopek izolacije	Koncentracija DNA (ng/μl)
LZ04 1	1. 8. 2019	DNeasy PowerSoil Kit	9,44
LZ04 2	1. 8. 2019	DNeasy PowerSoil Kit	8,82
LZ04 3	1. 8. 2019	QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit	2,47
LZ04 4	1. 8. 2019	QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit	2,34

4.1.3 Vpliv dodatka reagenta Tween 20 na koncentracijo izolirane DNA

DNA se med hranjenjem v hladilniku lahko veže na plastiko mikrocentrifugirke in s tem znižuje koncentracijo DNA v izolatu. Reagent Tween 20 deluje kot detergent in prepreči vezavo DNA na plastiko. Ugotovili smo, da se ob dodatku reagenta Tween 20 koncentracija DNA bistveno zviša (Tabela 7) in tako lahko pripomore k boljšemu amplifikacijskemu uspehu PCR.

Tabela 7: Vrsta vzorca in koncentracija izolirane starodavne DNA. Podane so koncentracije pred in po dodatku Tween 20.

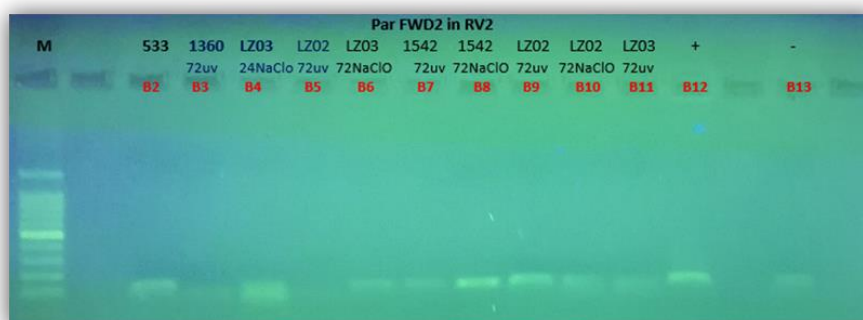
Vzorec	Datum izolacije	Koncentracija izolirane DNA (ng/μl)	Datum preverjanja količine DNA (ng/μl) v zmrznjenih vzorcih	Koncentracija izolirane DNA (ng/μl) brez Tween 20	Koncentracija izolirane DNA (ng/μl) s Tween 20
8713	30. 4. 2019	1.16	19. 6. 2019	Too low	4.52
9247	30. 4. 2019	1.12	19. 6. 2019	Too low	3.74
LZ03	30. 4. 2019	1.00	19. 6. 2019	Too low	10.0

4.2 Analiza uspešnosti pomnoževanja fragmenta mitohondrijske DNA

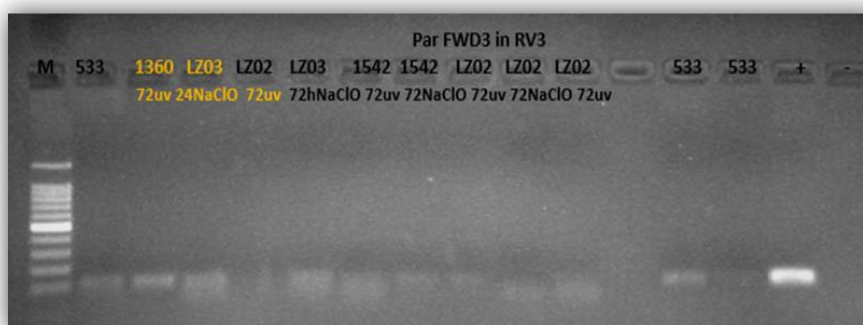
Za pomnoževanje DNA v verižni reakciji s polimerazo smo uporabili vzorce izolirane DNA z vsemi tremi izolacijskimi postopki. Zaradi racionalizacije sredstev smo za vsak postopek uporabili vzorce, ki smo jih inkubirali 72 ur (razen za Fenol kloroform (postopek 1)), saj so se glede na rezultate izmerjenih koncentracij izkazali za boljše.



Slika 3: Agarozni gel, ki prikazuje rezultate pomnoževanja DNA, izolirane s Fenol kloroformom.



Slika 4: Agarozni gel, ki prikazuje rezultate pomnoževanja DNA, izolirane s Rohlandovim postopkom in Micro kitom.



Slika 5: Agarozni gel, ki prikazuje rezultate pomnoževanja DNA, izolirane s Rohlandovim postopkom in Micro kitom.

Glede na uspešno pomnožene različne fragmente sta se tako Rohlandov postopek za izolacijo (postopek 2) kot tudi Micro kit (postopek 3) po 72-urni inkubaciji izkazala za

dovolj učinkovita za pomnoževanje kratkih produktov PCR. Zaradi nizkih koncentracij izolirane DNA s Fenol kloroformom (postopkom 1) ter zaradi neuspešnega pomnoževanja fragmenta 1 in 2 lahko sklepamo, da izolacija s Fenol kloroformom za starodavne vzorce ni primerna. Vzroke lahko iščemo v krajšem inkubacijskem času, kjer reagenti ne uspejo dovolj učinkovito prodreti do celic in jih razgraditi do te mere, da se izbori zadostna količina DNA. Glede na to, da smo koncentracijo DNA uspeli izmeriti, lahko predpostavljamo, da se s tem protokolom poleg DNA izolirajo tudi različni inhibitorji PCR, ki preprečujejo uspešno pomnoževanje fragmentov.

Pri treh vzorcih (1542, LZ03 in 1360) nismo imeli dovolj DNA za pomnoževanje v reakciji PCR zaradi izgube materiala pri izolaciji ali majhne količine začetnega vzorca.

Tabela 8: Uspešnost pomnoževanja DNA produktov različnih postopkov izolacije.

Vzorec	Postopek 1				Postopek 2				Postopek 3			
	24 h				72 h				72 h			
	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
LZ02	-	-	/	/	+	+	+	-	+	+	+	+
LZ03	-	+	/	/	#	#	#	#	+	+	+	-
1542	/	/	/	/	#	#	#	#	+	+	+	-
1360	/	/	/	/	+	+	+	+	#	#	#	#
533	/	/	/	/	+	+	+	-	+	+	+	+
Pozitivna kontrola	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*(-) uporabljeni par začetnih oligonukleotidov ni deloval *(+) uporabljeni par začetnih oligonukleotidov je deloval */) začetni oligonukleotidni par ni bil uporabljen *(#) DNA ni bila izolirana po tem postopku zaradi izgube materiala ali majhne količine materiala

5 ZAKLJUČEK

V skladu z zastavljenimi cilji zaključne naloge smo na podlagi laboratorijskih poskusov pokazali, da lahko uporaba primerne postopka za izolacijo starodavne DNA iz kosti in koproilitov ter vpeljava demineralizacijskega postopka povečata količino izolirane DNA.

Pri delu s starodavno DNA je največjo težavo predstavljala kontaminacija s sodobno DNA, zato je bilo treba posebno pozornost nameniti preprečevanju kontaminacije. Preprečevanje kontaminacije je potekalo na dveh nivojih, z delom v sterilnih pogojih, z rednim čiščenjem delovnih površin in steriliziranjem opreme, s čimer smo želeli preprečiti kontaminacijo iz delovnega okolja. Z uvedbo posebnih protokolov za predpripravo vzorcev pa smo želeli zmanjšati vpliv sodobne DNA, ki se nahaja na arheozooloških vzorcih.

Prva hipoteza je predvidevala, da je uspešnost izolacije DNA iz vzorcev kosti odvisna od uporabe demineralizacijskega ali pa dekontaminacijskega postopka in od izbire ustreznega izolacijskega protokola.

Iz rezultatov izvedenih poskusov lahko zaključimo, da je izbira načina predpriprave vzorca pomembna, saj lahko z uporabo pravilnih protokolov doprinesemo k boljšemu izolacijskemu postopku ter višji koncentraciji in kakovosti izolirane aDNA. Obsevanje vzorcev z UV-svetlobo se je izkazalo za boljše, saj se večina sodobne DNA na površini vzorca uniči, medtem ko se aDNA ohrani. Pri vzorcih, ki so bili tretirani z NaClO, pa predvidevamo, da lahko zaradi agresivnosti reagenta pride do poškodbe ali dodatne fragmentacije aDNA, kar pa lahko negativno vpliva na potek izolacije ter kakovost in količino izolirane DNA (Kemp in Smith 2005).

Kot pomemben faktor za boljšo izolacijo se je izkazala dolžina inkubiranja vzorca v demineralizacijskem pufu. V vseh primerih je 72-urna inkubacija doprinesla k boljšim rezultatom. Razlog za to je lahko boljša demineralizacija mineralne matrice kosti. Z daljšo inkubacijo se namreč raztopi več mineralne matrice, kar omogoča reagentom v nadaljnjih postopkih boljšo razgradnjo celic in večji izbor molekul DNA.

Ugotovili smo, da je izbira ustreznega izolacijskega postopka zelo pomembna. V zaključni nalogi smo testirali tri različne postopke za izolacijo, za najuspešnejšega se je izkazal Rohlandov postopek (izolacijski postopek 2). Z njim smo dobili bistveno višje koncentracije DNA, prav tako pa smo s to DNA uspešno pomnožili iskane fragmente za cytb. Ne glede na to, da smo pri postopku za izolacijo z Micro kitom (postopku 3) pridobili sicer nekoliko nižje koncentracije, je bila izolirana DNA dovolj visoke kvalitete za nadaljnje pomnoževanje v reakciji PCR. Fenol kloroform (postopek 1) se je za arheozoološke vzorce izkazal kot neučinkovit, saj so bile izmerjene koncentracije nizke,

DNA pa se ni uspešno pomnoževala. Glede na dobljene rezultate lahko prvo hipotezo potrdimo.

Testirali smo tudi vpliv reagenta Tween 20 na količino izolirane DNA. Izkazalo se je, da ima ta reagent pozitiven učinek na zvišanje koncentracije izolirane (in shranjene) DNA oz. da uspešno preprečuje vezavo DNA na stene centrifugirkih ter s tem povzroči, da več DNA ostane v elucijskem mediju.

Podobno se je izkazalo tudi pri vzorcu koproilita. Ugotovili smo namreč, da ima na vzorec velik vpliv stopnja ohranjenosti in izbira ustrezne izolacijske metode. V zaključni nalogi smo testirali dva postopka za izolacijo, za bolj učinkovitega se je izkazal DNeasy PowerSoil Kit (postopek 1), saj smo z njim pridobili višje koncentracije DNA. Razlogi za to so lahko naslednji:

- 1) DNeasy PowerSoil Kit res bolje veže fragmentno DNA na kolono ter s tem zviša koncentracijo DNA, ker je optimiziran za težavne vzorce prsti, ki vsebujejo nizko količino DNA lahko tudi različnih vrst, ali
- 2) gre za kit, ki je optimiziran za vezavo vseh nukleinskih kislin in vzorcev prsti, zato poleg aDNA izolira tudi druge vrste DNA, ki se nahajajo v vzorcu prsti, ki je obdajala koproilit (koprolit, se je namreč nahajal v prsti na arheološkem nahajališču).

Zaradi slabe ohranjenosti vzorca nismo mogli opraviti predizolacijskega postopka, zato hipoteze, ki pravi, da na izolacijo DNA iz koproilitov vplivajo stopnja ohranjenosti vzorca, predpriprava vzorca in izbira ustrezne izolacijske metode, ne moremo v celoti potrditi.

Od pojava tehnik, ki omogočajo hitro in uspešno pomnoževanje in določanje nukleotidnega zaporedja DNA, so evlucijske študije, ki temeljijo na primerjavi zaporedja DNA iz živih organizmov, postale običajne. Vendar pa sodobne sekvence DNA zagotavljajo le posredne dokaze o zgodovinskih procesih, ki so se oblikovali čez dolga obdobja. Razvoj novih metod in uporaba molekularne genetike na področju arheozoologije je pripomogla k reševanju marsikaterih še odprtih vprašanj naše preteklosti (Hofreiter in sod. 2001).

Posebej zanimiv je razvoj tehnik za analizo DNA iz starodavnih koproilitov, kar nam daje informacije in vpogled o prehrani in s tem o obnašanju organizmov iz preteklosti. Vendar pa tehnične pasti povzročajo dvomljive rezultate, če se ne izvajajo številni previdnostni ukrepi in eksperimentalni nadzor (Hofreiter in sod. 2001).

Možnost uspešne izolacije aDNA iz kosti in koproilitov nam bo v prihodnosti lahko zagotovila vedno več koristnih informacij tudi na področju varstvene biologije oziroma varstvene arheozoologije, predvsem o razmerjih med vrstami ter obsegom genske raznolikosti teh vrst. Z analizo DNA starodavnih primerkov bomo lahko imeli dober

vpogled v preteklo gensko raznolikost in implicitno oceno izgube genetske raznolikosti skozi stoletja (Rollo in sod. 1994).

6 LITERATURA IN VIRI

Alonso A., Martín P., Albarrán C., García P. G., García P., García O., Fernández-Piqueras J. 2004. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. Article in *Forensic Science International* 139: 141–149.

Antonites A. R., Scott K., Grody E. 2016. New Directions in South African Archaeozoology of the Last 2,000 Years. *African Archaeological Review* 33(4): 345–351.

Arnold E. R., Greenfield H. J., Creaser R. A. 2013. Domestic cattle mobility in early farming villages in southern Africa: harvest profiles and strontium ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) isotope analyses from Early Iron Age sites in the lower Thukela River Valley of South Africa. *Archaeol Anthropol Sci* 5: 129–144.

Badenhorst S. 2009. The central cattle pattern during the Iron age of Southern Africa: A critique of its spatial features. *South African Archaeological Bulletin* 64 (190): 148–155.

Ballantyne K. N., Salemi R., Guarino F., Pearson J. R., Garlepp D., Fowler S., Oorschot R. A. H. 2015. DNA contamination minimisation – finding an effective cleaning method. *Australian Journal of Forensic Sciences* 47(4): 428–439.

Beck R. 2009. The Molecular Genetics of Prey Choice. *California Archaeology* 1(2): 253–268.

Bon C., Berthonaud V., Maksud F., Labadie K., Poulain J., Artiguenave F., Elalouf J. M. 2012. Coprolites as a source of information on the genome and diet of the cave hyena. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 2825–2830.

Bouwman A. S., Arnott R., Prag A., Chilvers E. R., Brown K. A., Arnott R. G., Brown T. A. 2008. Ancient DNA in human bones from Neolithic and Bronze Age sites in Greece and Crete The iconographic and narrative tradition of the „Oresteia“ View project Ancient DNA in human bones from Neolithic and Bronze Age sites in Greece and Crete. Article in *Journal of Archaeological Science* 35: 2707–2714.

Briggs A. W., Stenzel U., Johnson P. L. F., Green R. E., Kelso J., Prufer K., Paabo S. 2007. Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(37): 14616–14621.

Briggs Adrian W., Stenzel U., Meyer M., Krause J., Kircher M., Pääbo S. 2010. Removal of deaminated cytosines and detection of in vivo methylation in ancient DNA. *Nucleic Acids Research* 38(6): e87–e87.

Brown T.A. 2007. *Genomes 3*. Garland Science Publishing. New York.

Buckley M., Wadsworth C. 2014. Proteome degradation in ancient bone: Diagenesis and phylogenetic potential. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 416: 69–79.

Burger J., Hummel S., Herrmann B., Henke W. 1999. DNA preservation: A microsatellite-

DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis* 20: 1722-1728.

Castresana J. 2001. Cytochrome *b* Phylogeny and the Taxonomy of Great Apes and Mammals. *Mol. Biol. Evol* 18(4): 465–471.

Cleveland D. W., Fischer S. G., Kirschner M. W., Laemmli U. K. 1971. Peptide Mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* 252(3): 1102-1106.

Cooper A., Lalueza-Fox C., Anderson S., Rambaut A., Austin J., Ward R. 2001. Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. *Nature* 409: 704-707.

Cooper A., Mourer-Chauvirp C., Chamberst G. K., Von Haeseler A., Wilson A. C., Paabo S. 1992. Independent origins of New Zealand moas and kiwis (ancient DNA/mitochondrial DNA/ratites). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8741-8744.

Dabney J., Knapp M., Glocke I., Gansauge M. T., Weihmann A., Nickel B., Meyer M. 2013. Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

Dayton L. 2003. On the trail of first Dingo. *Science* 302: 555-556.

Degh Espostl M., De Vries S., Criml M., Ghelh A., Patarnell T., Meyer A. 1993. Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143: 243-271.

Doran G. H., Dickel D. N., Ballinger W. E., Agee O. F., Laipis P. J., Hauswirth W. W. 1986. Anatomical, cellular and molecular analysis of 8,000-yr-old human brain tissue from the Windover archaeological site. *Nature* 323(6091): 803–806.

Évora A. M. 2015. *Use-Wear Methodology on the Analysis of Osseous Industries*. Springer International Publishing Switzerland: 159-170.

Foote A. D., Hofreite M., Morin P. A. 2012. Ancient DNA from marine mammals: Studying long-lived species over ecological and evolutionary timescales. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 194(1): 112–120.

Frantz A. F. Laurent, Mullin E. Victoria, Pionnier-Capitan Maud, Lebrasseur Ophélie, Ollivier Morgane, Perri Angela, Linderholm Anna, Mattiangeli Valeria, Teasdale D. Matthew, Dimopoulos A. Evangelos, Tresset Anne, Duffraisse Marilyne, McCormick Finbar, Bartosiewicz László, Gál Erika, Nyerges A. Éva, Sablin V. Mikhail, Bréhard Stéphanie, Mashkour Marjan, Balasescu Adrian, Gillet Benjamin, Hughes Sandrine, Chassaing Olivier, Hitte Christophe, Vigne Jean-Denis, Dobney Keith, Hänni Catherine, Bradley G. Daniel, Larson Greger. 2016. Genomic and archaeological evidence suggests a dual origin of domestic dog. *Science* 352(6290): 1228–1231.

Graham E. A. M. 2007. DNA reviews: Ancient DNA. *Forensic Science, Medicine, and Pathology* 3(3): 221–225.

Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Lewontin R.C., Carroll S. B. 2008. *Introduction to genetic analysis*. W. H. Freeman and Company. New York.

Haak W., Balanovsky O., Sanchez J. J., Koshel S., Zaporozhchenko V., Adler C. J., Cooper A. 2010. Ancient DNA from European Early Neolithic Farmers Reveals Their Near Eastern Affinities. *PLoS Biology* 8(11): e1000536.

Haddrat O., Baker A. J. 2001. Complete mitochondrial DNA genome sequences of extinct birds: ratite phylogenetics and the vicariance biogeography hypothesis. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268: 939-945.

Handt O., Höss M., Krings M., Pääbo S. 1994. Ancient DNA: Methodological challenges. *Experientia* 50(6): 524–529.

Handt O., Krings M., Ward R. H., Paabo S. 1996. The Retrieval of Ancient Human DNA Sequences. *Am. J. Hum. Genet* 59: 368-376.

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(5991): 282–284.

Hofman C. A., Rick T. C., Fleischer R. C., Maldonado J. E. 2015. Conservation archaeogenomics: ancient DNA and biodiversity in the Anthropocene. *Trends in Ecology & Evolution* 30: 540–549.

Hofreiter M., Poinar H. N., Spaulding W. G., Bauer K., Martin P. S., Possnert G., Paabo S. 2000. A molecular analysis of ground sloth diet through the last glaciation. *Molecular Ecology* 9: 1975-1984.

Hofreiter M., Serre D., Poinar N. H., Kuch M., Paabo S. 2001. Ancient DNA. *Nature Reviews* 2: 353-359.

Hofreiter M., Spelle C., Van Den Hurk Y., Charpentier A., Rodrigues A., Gardeisen A., Collins M. 2016. Barcoding the largest animals on Earth: ongoing challenges and molecular solutions in the taxonomic identification of ancient cetaceans. *Phil. Trans. R. Soc. B* 371: 20150332.

Hoss M., Jaruga P., Zastawny T. H., Dizdaroglu M., Paabo S. 1996. DNA Damage and DNA Sequence Retrieval from Ancient Tissues. *Nucleic Acids Research* 24(7): 1304–1307.

Höss M., Kohn M., Pääbo S., Knauer F., Schröder W. 1992. Excrement analysis by PCR. *Nature* 359(6392): 199–199.

Irwin D. M., Kocher T. D., Wilson A. C. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32(2): 128–144.

James Collins M., Harker D., Haile J., Oskam C., Soc B Scofield P. R., Holdaway R. N., Bunce M. 2012. The half-life of DNA in bone: Measuring decay kinetics in 158 dated fossils. Article in Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.

Jansen T., Forster P., Levine M. A., Oelke H., Hurles M., Renfrew C., Olek K. 2002. Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. Proc Natl Acad Sci USA 99: 10905–10910.

Kefi R. 2011. Ancient DNA investigations: A review on their significance in different research fields. International Journal of Modern Anthropology 1(4): 61-76.

Kefi Rym, Mafart B., Spadoni J. L., Stevanovitch A., Béraud-Colomb É. 2003. Paléontologie générale / General Palaeontology Application de la technique de PCR en temps réel à l'étude de l'ADN ancien. C. R. Palevol 2: 125–132.

Kéfi Rym, Stevanovitch Alain, Bouzaid Eric, Béraud-Colomb Eliane. 2005. Diversité mitochondriale de la population de Taforalt (12.000 ans, Maroc): une approche génétique à l'étude du peuplement de l'Afrique du Nord. Anthropologie 1: 55–64.

Kemp M. Brian, Smith Glenn David. 2005. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. Forensic Science International 154: 53-61.

Kim N. Y., Lee H. Y., Park M. J., Yang W. I., Shin, K. J. 2011. A genetic investigation of Korean mummies from the Joseon Dynasty. Molecular Biology Reports 38(1): 115–121.

Kohn M. H., York E. C., Kamradt D. A., Haught G., Sauvajot R. M., Wayne R. K. 1999. Estimating population size by genotyping faeces. Proc. R. Soc. Lond. B 266: 657-663.

Kohn M., Knauer F., Stoffella A., Schroder W., Paabo S. 1995. Conservation genetics of the European brown bear - a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. Molecular Ecology 4(1): 95–104.

Krause J., Briggs A. W., Kirche M., Maricic T., Zwyns N., Derevianko A., Pääbo S. 2010. A Complete mtDNA Genome of an Early Modern Human from Kostenki, Russia. Current Biology 20(3): 231–236.

Krings M., Capelli C T. F., Geisert H., Meyer S. 2000. A view of Neandertal genetic diversity. Nat. Genet 26: 144–146.

Kumar G., Narayan B. 2014. Morbidity at Bone Graft Donor Sites. V Classic Papers in Orthopaedics: 503–505.

Larson G., Albarella U., Dobney K., Rowley-Conwy P., Rg Schibler J., Tresset A., Cooper A. 2007. Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. PNAS 104(39): 15276-15281.

Leonard J. A. 2008. Ancient DNA applications for wildlife conservation. Molecular Ecology 17: 4186–4196.

Lindahl T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709–715.

Loreille O. M., Diegoli T. M., Irwin J. A., Coble M. D., Parsons T. J. 2007. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Science International: Genetics* 1: 191–195.

Martini F., Bartholomew E. F. 2010. *Essentials of anatomy & physiology*. Benjamin Cummings

Murray M. S. 2008. Zooarchaeology and arctic marine mammal biogeography, conservation, and management. *Ecological Applications* 18(2): S41–S55.

Orlando Ludovic, Ginolhac Aure'lien, Zhang Guojie, Froese Duane, Albrechtsen Anders, Stiller Mathias, Schubert Mikkel, Cappellini Enrico, Petersen Bent, Moltke Ida, Johnson L. F. Philip, Fumagalli Matteo, Vilstrup T. Julia, Raghavan Maanasa, Korneliussen Thorfinn, Malaspinas Anna-Sapfo, Vogt Josef, Szklarczyk Damian. 2013. Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature* 499: 74–78.

Paabo S. 1989. Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1939-1943.

Pääbo S. 1985. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314(6012): 644–645.

Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Després V., Hebler J., Rohland N., Hofreiter M. 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet* 38: 645–79.

Paabo Svante, Irwin David M., Wilson Allan C. 1990. DNA Damage Promotes Jumping between Templates during Enzymatic Amplification. *The Journal of Biological Chemistry* 265(8): 4718-4721.

Poinar H. N., Hess M., Bada J. L., Paabo S. 1996. Amino Acid Racemization and the Preservation of Ancient DNA. *Reprint Series* 272: 864-866.

Rohland N., Glocke I., Aximu-Petri A., Meyer M. 2018. Extraction of highly degraded DNA from ancient bones, teeth and sediments for high-throughput sequencing. *Nature Protocols* 2: 1756–1762.

Rohland N., Hofreiter M. 2007. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques* 42(3): 343–352.

Rollo F., Ascì W., Antonini S., Marota I., Ubaldi M. 1994. Molecular ecology of a Neolithic meadow: The DNA of the grass remains from the archaeological site of the Tyrolean Iceman. *Experientia* 50(6): 576–584.

Sadr K. 2008. Invisible herders? The archaeology of Khoekhoe pastoralists. *Southern African Humanities* 20: 179–203.

Speller C. F., Kemp B. M., Wyatt S. D., Monroe C., Lipe W. D. 2010. Ancient mitochondrial DNA analysis reveals complexity of indigenous North American turkey domestication. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 2807-12.

Steele E. T. 2015. The contributions of animal bones from archaeological sites: the past and future of zooarchaeology. *Journal of Archaeological Science* 56: 168-176.

Vasan S., Zhang X., Kapurniotu A., Bernhagen J., Teichberg S., Ulrich P. 1996. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature* 382(6588): 275–278.

Watson J. D., Crick F. H. C. 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171: 737–738.

PRILOGA

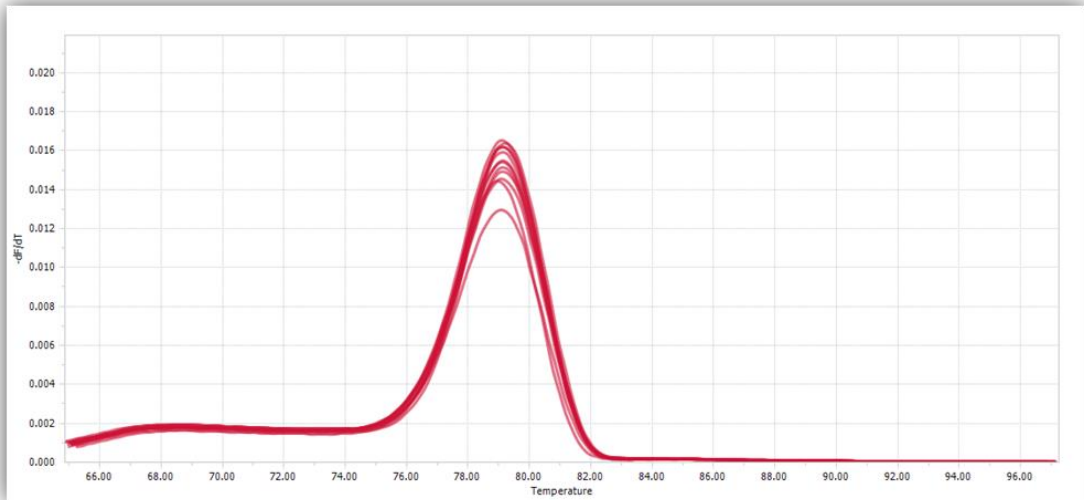
Priloga A: Pogoji testiranja uspešnosti prileganja začetnih oligonukleotidov s qPCR

Uspešnost prileganja začetnih oligonukleotidov smo ocenili z uporabo barvila SYBR Green v verižni reakciji s polimerazo v realnem času (qPCR). Za vsako reakcijo je bila potrebna mešanica reagentov s končnim volumnom 10 μ l, ki smo jo pripravili z mešanjem 5 μ l Master mix reagenta, 1,5 μ l vode, primerne za molekularno analizo, ter 2 x 0,5 μ l 10 mM raztopine oligonukleotidnih začetnikov. Reakcijski mešanici smo dodali še 2,5 μ l DNA normalizirane koncentracije na 1 ng/ μ l. Vse reakcije qPCR so bile opravljene na sistemu Roche LightCycler® 96 (Roche Diagnostic GmbH, Nemčija) pod pogoji, kot so prikazani v tabeli 1.

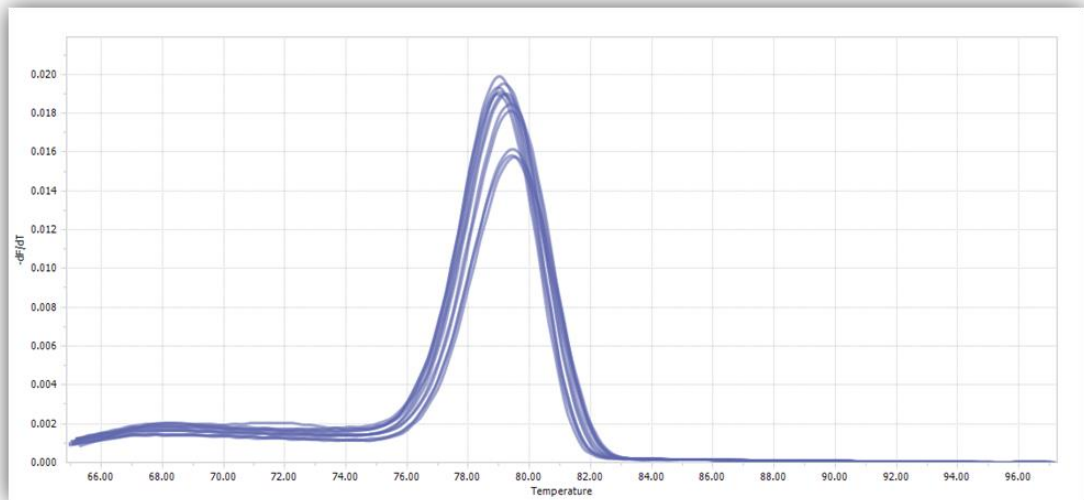
Tabela 1: Temperaturni pogoji za qPCR.

		<i>Št. ciklov</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Čas (s)</i>	<i>Ramp (°C/s)</i>
amplifikacija	Tristopenjska				
	Predinkubacija	1	95	600	4,4
	Denaturacija	45	95	10	2,2
	Prileganje		46-58	10	2,2
	Elongacija		72	10	4,4
reakcija	talina				
	Denaturacija		95	10	4,4
	Prileganje		65	60	2,2
	Elongacija		97	1	0,2

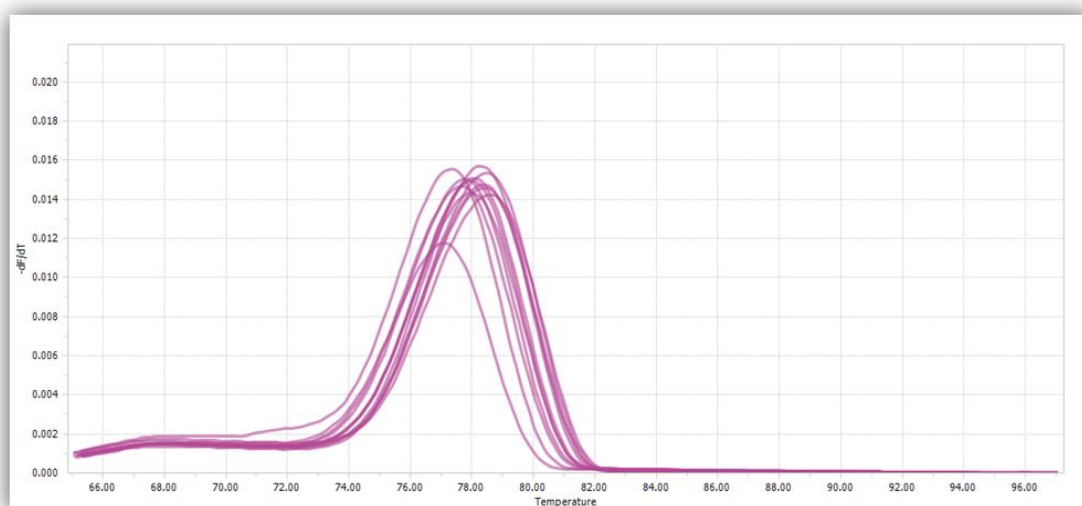
Analiza temperaturnega prileganja:



Slika 1: Grafični prikaz analize temperaturnega prileganja za fragment 1. Lepo je opazen samostojen PCR produkt brez dodatnih nespecifik



Slika 2: Grafični prikaz analize temperaturnega prileganja za fragment 2. Lepo je opazen samostojen PCR produkt brez dodatnih nespecifik



Slika 3: Grafični prikaz analize temperaturnega prileganja za fragment 3. Lepo je opazen samostojen PCR produkt brez dodatnih nespecifik