

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA
OPTIMIZACIJA METODE IZOLACIJE IN
POMNOŽEVANJA DNA IZ TKIVNIH VZORCEV DIVJE
(*Felis silvestris*) IN DOMAČE MAČKE (*Felis catus*)

LAURA JESENIČNIK

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Optimizacija metode izolacije in pomnoževanja DNA iz tkivnih
vzorcev divje (*Felis silvestris*) in domače mačke (*Felis catus*)**

(Optimisation of method for DNA isolation and amplification from tissue
samples of wildcat (*Felis silvestris*) and domestic cat (*Felis catus*))

Ime in priimek: Laura Jeseničnik
Študijski program: Biodiverziteta
Mentor: prof. dr. Elena Bužan
Somentor: asist. Felicita Urzi

Koper, julij 2021

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Laura JESENIČNIK

Naslov zaključne naloge: Optimizacija metode izolacije in pomnoževanja DNA iz tkivnih vzorcev divje (*Felis silvestris*) in domače mačke (*Felis catus*)

Kraj: Koper

Leto: 2021

Število listov: 45

Število slik: 12

Število tabel: 10

Število referenc: 41

Mentor: prof. dr. Elena Bužan

Somentor: asist. Felicita Urzi

Ključne besede: izolacija DNA, verižna reakcija s polimerazo (PCR), optimizacija, temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov, genetski označevalci, mikrosateliti (STR), hibridizacija

Izvleček:

Evropsko divjo mačko (*Felis silvestris*) v Evropi ogrožata izguba in fragmentacija življenjskega okolja, kakor tudi hibridizacija z domačo mačko (*Felis catus*).

V zaključni nalogi smo se na primeru 144 tkivnih vzorcev divje mačke posvetili problematiki učinkovite izolacije in pomnoževanja DNA v verižni reakciji s polimerazo (PCR). V sklopu naloge smo izolirali DNA iz vzorcev tkiv in opravili analizo koncentracije DNA. Ugotovili smo, da imajo starejši vzorci statistično značilno nižje vrednosti koncentracij v primerjavi z mlajšimi vzorci, kar nakazuje na to, da je DNA odvisna od ohranjenosti in starosti tkiva, saj se s starostjo vzorcev zaradi vpliva časa shranjevanja degradacija DNA praviloma povečuje. Pri pomnoževanju lokusa FCA094 smo s teoretičnim izračunom našli optimalno temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov pri 55,2 °C in nato s preizkušanjem te našli optimalno temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov za lokus FCA094, ki znaša 55,4 °C. Uspešnost PCR reakcije smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo in genotipizacijo izvedli v sekvenatorju SeqStudio (Thermo Fisher Scientific). Pridobljene podatke smo nato analizirali v programu GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems). Ugotovili smo, da je optimizacija PCR reakcije v veliki meri odvisna od temperature prileganja začetnih oligonukleotidov.

Key document information

Name and SURNAME: Laura JESENIČNIK

Title of the final project paper: Optimisation of method for DNA isolation and amplification from tissue samples of wildcat (*Felis silvestris*) and domestic cat (*Felis catus*)

Place: Koper

Year: 2021

Number of pages: 45

Number of figures: 12

Number of tables: 10

Number of references: 41

Mentor: Prof. Elena Bužan, PhD

Co-Mentor: Assist. Felicita Urzi

Keywords: DNA isolation, polymerase chain reaction (PCR), optimization, primer annealing temperature, genetic markers, microsatellites (STR), hybridization

Abstract:

The European wildcat (*Felis silvestris*) in Europe is threatened by the loss and fragmentation of the living environment, as well as hybridization with the domestic cat (*Felis catus*). In this work, we focused on the problem of methods for DNA isolation and amplification in the polymerase chain reaction (PCR) of 144 wildcat tissue samples. In the research work DNA was isolated from the samples and DNA concentration analysis was performed. Based on our results, we conclude that older samples had statistically significant lower DNA concentration values than younger samples. This suggests that DNA is dependent on the type of tissue preservation and age, as DNA degradation in samples increases with age. By genotyping the FCA094 locus, we calculated the theoretical optimal annealing temperature which is 55.2°C, and then by testing it we reached the optimal annealing temperature for locus FCA094, which is 55.4°C. The success of the PCR was verified by agarose gel electrophoresis and genotyping was performed in sequencer SeqStudio (Thermo Fisher Scientific). The obtained data was analyzed in GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems). We came to the conclusion that the optimization of PCR largely depends on primer annealing temperature.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Eleni Bužan, da sem lahko pod njenim mentorstvom opravljala zaključno nalogo in za vso predano zlata vredno znanje in pomoč tako pri zaključni nalogi kot tudi na celotni študijski poti.

Izredno sem hvaležna somentorici asist. Feliciti Urzi za vso pomoč pri sestavljanju zaključne naloge in uvajanju v laboratorijsko delo ter za vse ob tem pridobljeno praktično znanje, ki ga bom potrebovala na nadaljni poti.

Poleg pomoči ob pisanju zaključne naloge se obema zahvaljujem za možnost opravljanja laboratorijskega dela v Laboratoriju molekularne ekologije v Izoli.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Opis vrste	1
1.2	Hibridizacija divje in domače mačke.....	2
1.3	Genetske analize DNA tkivnih vzorcev.....	2
1.3.1	Mikrosateliti.....	3
1.3.2	PCR in genotipizacija	3
1.4	Problematika optimizacije izolacije DNA in verižne reakcije s polimerazo (PCR).....	4
1.5	Namen in cilji zaključne naloge.....	5
2	METODE DELA.....	6
2.1	Postopki izolacije DNA	6
2.1.1	Protokol izolacije DNA	6
2.2	Merjenje koncentracije izolirane DNA	7
2.3	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	8
2.3.1	Optimizacija PCR reakcije	10
2.3.2	Protokol PCR reakcije	11
2.4	Agarozna gelska elektroforeza.....	14
2.4.1	Protokol agarozne gelske elektroforeze.....	15
2.5	Genotipizacija	15
3	REZULTATI Z DISKUSIJO.....	17
3.1	Analiza koncentracije DNA.....	17
3.1.1	Statistična analiza izmerjenih koncentracij DNA.....	19
3.2	Rezultati optimizacije PCR reakcije	20
3.3	Analiza mikrosatelitnih lokusov	20
3.4	Diskusija	28
3.5	Nadaljnje genetske analize.....	30
4	ZAKLJUČEK.....	31
5	LITERATURA IN VIRI.....	33

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Mešanice začetnih oligonukleotidov	12
Preglednica 2: Volumen prve mešanice začetnih oligonukleotidov.....	13
Preglednica 3: Volumen druge mešanice začetnih oligonukleotidov.....	13
Preglednica 4: Volumen tretje mešanice začetnih oligonukleotidov.....	13
Preglednica 5: Volumni PCR mešanice glede na volumen prve in tretje mešanice začetnih oligonukleotidov.....	14
Preglednica 6: Volumni PCR mešanice glede na volumen druge mešanice začetnih oligonukleotidov.....	14
Preglednica 7: Velikosti pomnoženih alelov pri 28 analiziranih vzorcih na treh mikrosatelitnih lokusih	17
Preglednica 8: Izmerjene koncentracije DNA starejših vzorcev tkiva (skupina 1).....	18
Preglednica 9: Izmerjene koncentracije DNA novejših vzorcev tkiva (skupina 2).....	18
Preglednica 10: Rezultati Mann-Whitney U testa	19

KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Temperaturni profil PCR reakcije: s sobne temperature je reakcija segreti na 95 °C za začetno denaturacijo, nato si v ciklih sledijo denaturacija (D) na 95 °C, prileganje začetnih oligonukleotidov (P) na 52–60 °C in sinteza novonastajajoče DNA verige (S) na 72 °C (povzeto po: McPherson in Møller 2006).....	9
Slika 2: Genotipizacijo opravimo z določanjem dolžine pomnoženih fragmentov s PCR reakcijo. Najverjetnejše pozicije alelov (angl. <i>bins</i>) so definirani z genotipizacijsko programsko opremo, s pomočjo informacij alelne lestvice (angl. <i>allele ladder</i>) za vsak komplet (angl. <i>multiplex</i>). Vsak vrh (angl. <i>peak</i>), označen s točno določeno barvno linijo, označimo kot alel za ta lokus. Vrhovi v alelni lestvici kot tudi v vzorcih, pomnoženih s PCR reakcijo, imajo enak interni velikostni standard, zato da se lahko med seboj primerjajo (povzeto po Butler 2011).....	16
Slika 3: Prikaz frekvenčne porazdelitve rangov v prvi in drugi skupini vzorcev.....	19
Slika 4: Rezultati izračuna optimalne temperature prileganja (Thermo Fisher Scientific) .	20
Slika 5: Vizualizacija alelov na lokusu FCA094 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 52,3 °C	21
Slika 6: Vizualizacija alelov na lokusu FCA094 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 53,4 °C.....	22
Slika 7: Vizualizacija alelov na lokusu FCA094 pri temperaturi prileganja 54,4 °C.....	23
Slika 8: Vizualizacija alelov na lokusu FCA094 pri temperaturi prileganja 55,4 °C.....	24
Slika 9: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa FCA094 pri temperaturi prileganja 56,6 °C.....	25
Slika 10: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa FCA094 pri temperaturi prileganja 57,7 °C.....	26
Slika 11: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa FCA094 pri temperaturi prileganja 58,7 °C.....	27
Slika 12: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa FCA094 pri temperaturi prileganja 59,4 °C.....	27

SEZNAM KRATIC

DNA – Deoksiribonukleinska kislina (angl. *deoxyribonucleic acid*)

PCR – Verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*)

STR – Kratka tandemska zaporedja, mikrosateliti (angl. *short tandem repeats*)

1 UVOD

Evropska divja mačka *Felis silvestris* (Schreber 1777) je na podlagi Uredbe o zavarovanih prostoživečih živalskih vrstah (2004) v Sloveniji zaščiten živalska vrsta. Populacije divje mačke v Evropi ogroža izguba in drobljenje življenjskega okolja in tudi hibridizacija z domačo mačko *Felis catus* (Linnaeus 1758). Analiza genetske strukture populacije omogoča določitev pretoka genov med obstoječimi populacijami s ciljem njihovega nadaljnjega ustreznega upravljanja. Z genetskimi označevalci obenem lahko tudi opredelimo stopnjo hibridizacije (introgresije) genov domače mačke v genom njene prostoživeče sorodnice. V zaključni nalogi se bom zato posvetila problematiki optimizacije izolacije DNA iz tkivnih vzorcev in pomnoževanja jedrnih označevalcev (mikrosatelitnih lokusov) v verižni reakciji s polimerazo (PCR, angl. *polymerase chain reaction*).

1.1 Opis vrste

Evropska divja mačka *Felis silvestris* naseljuje pretežno gozdove evropske celine. Wozencraft (2005) je prepoznal tri podvrste: *Felis silvestris silvestris* (Schreber 1777), ki je razširjena po celinski Evropi od Španije do vzhodne Evrope, vključno z Bolgarijo, Romunijo, južno Poljsko in zahodno Rusijo ter otoki: Velika Britanija, Korzika, Sardinija in Sicilija; *Felis silvestris caucasica* (Satunin 1905), podvrsta je razširjena v Turčiji in na Kavkazu; ter še *Felis silvestris grampia* (Miller 1907), podvrsta ki je razširjena po severni in osrednji Škotski, predhodno pa po vsej Britaniji. Glede na trenutno geografsko izolacijo in malo dokazov o morfologiji, biogeografiji in molekularnih analizah za razlikovanje podvrste *F. s. grampia*, ta ni bila vključena kot podvrsta (Kitchener in sod. 2017).

S človekom je divja mačka vzpostavila mutualističen odnos pred približno 8 do 10 tisoč leti na območju Egipta, vzporedno z razvojem kmetijstva in skladiščenja žit, s čimer so se posledično povečale populacije glodalcev, ki so pridelek uničevali. Za zaščito pridelka pred glodalci je človek udomačil divjo mačko in tako prispeval k razvoju nove podvrste domače mačke *Felis s. catus* (Linnaeus 1758). Podvrsti sta ozko sorodni in se zato lahko med seboj križata, kar lahko vodi v hibridizacijo in potencialno izgubo genetskega sklada divje mačke. Divjo mačko ogrožajo tudi fragmentiranost njenega areala v Evropi in izguba habitata zaradi izsekavanja gozdnih površin ter širjenje kmetijskih površin in gradnja prometne infrastrukture (Potočnik 2008; IUCN 2015).

Evropska divja mačka se zaradi svoje splošne razširjenosti uvršča na IUCN-ovem seznamu med »najmanj ogrožene« (LC, angl. *least concern*) (2015), vendar pa ji grozi hibridizacija z domačo mačko.

1.2 Hibridizacija divje in domače mačke

Hibridizacija je naraven proces, vendar lahko vodi v nasprotujoče si izide v evoluciji. Po eni strani lahko prispeva k biotski pestrosti z dvigom genetske variabilnosti in s sprožitvijo procesov speciacije. Po drugi strani pa lahko zmanjša pestrost in uspešnost vrst (angl. *fitness*) in tudi obstoj naravnih populacij. Hibridizacija lahko poteka med taksonoma, ki nista popolnoma reproduktivno izolirana (kot na primeru divje in domače mačke), kar vodi v outbridno depresijo in izgubo genetske integritete (Beugin in sod. 2019; Tiesmeyer in sod. 2020).

Zaradi pretiranega lova med 18. in 20. stoletjem in vse večjega obsega deforestacije imamo trenutno v Evropi manjše fragmentirane populacije divje mačke. Z urbanizacijo, izkoriščanjem naravnih virov in gradnjo različnih infrastruktur postajajo vse bolj izolirane, kar preprečuje genski pretok in vzdrževanje genetskega sklada. Domačih mačk je bistveno več, njihove populacije niso nadzorovane in zahajajo tudi v gozdove in se tam pariyo z divjo mačko, kar povzroča hibridizacijo in povečuje možnosti prenosa specifičnih mačjih boleznih (Potočnik 2008; Hartmann in sod. 2013).

Domače mačke so produkt umetne selekcije. Človek je selektivno izbiral tiste lastnosti mačk, ki so mu koristile in ustrezale njegovim potrebam. Introgresija genov domače mačke v genom njene divje sorodnice lahko zato vodi v genetski zdrs, tj. eliminacijo določenih alelov in prevlado »udomačenih« alelov oz. povečanje homozigotnih lokusov. Odraž tega je zmanjšana uspešnost prostoživečih populacij, torej je spremljanje razširjenosti kot tudi preučevanje stopnje hibridizacije med obema taksonoma ključnega pomena pri ohranjanju in varovanju vrste (Eckert in sod. 2009; Tiesmeyer in sod. 2020).

1.3 Genetske analize DNA tkivnih vzorcev

V razmeroma kratkem času od odkritja PCR (Kary Mullis 1985) so se v molekularni biologiji in genetiki zgodile revolucionarne spremembe, napredek v študijah genov in celotnih genomov je drastično narasel (McPherson in Møller 2006). V zadnjem dvajsetletju je genotipizacija visoko polimorfnih molekulskih označevalcev (angl. *genetic markers*) DNA (mikrosatelitov) omogočila boljši vpogled v gensko strukturo populacij divje mačke (Oliveira in sod. 2015), vendar so obsežne genetske raziskave opravili tudi na tisočih drugih vrstah rastlin in živali (Petit in sod. 1998). Na podlagi podatkov genske raznolikosti lahko v varstveni genetiki potem izvajamo politiko ohranjanja določene vrste ali populacije (Petit in sod. 1998).

1.3.1 Mikrosateliti

Stopnjo hibridizacije oziroma introgresije "domačih" genov v genom divje predstavnice lahko tako opredelimo z genetskimi označevalci. Večinoma so to mikrosateliti ali kratke tandemske ponovitve (STR, angl. *short tandem repeats*) ali enostavna zaporedja (SSR, angl. *short simple repeats*), ki so del nekodirajočih regij genoma; pojavljajo se lahko znotraj genov (kot eksoni) ali med geni (Kalia in sod. 2011; Dash in Das 2017). Sestavljeni so iz kratkih, tandemsko ponovljenih nukleotidnih zaporedij, osnovnega motiva dolžine od 1 do 6 nukleotidov, ki se ponavljajo v identičnih ali sorodnih kopijah. Število ponovitev na mikrosatelitnem lokusu se razlikuje, zato se lahko na posameznem lokusu pojavi veliko različnih dolžin alelov. Razlikujejo se lahko po številu nukleotidov v osnovnem motivu, tipu ponovitve osnovnega motiva in lokaciji v genomu. K njihovi popularnosti in uporabi v mnogih genetskih študijah so prispevale lastnosti, ki vključujejo hipervariabilnost, multialelnost, kodominantno dedovanje, obnovljivost, veliko številčnost in razširjenost v genomu, specifično lokacijo na kromosomu ter sposobnost avtomatizacije in visokozmogljivostne genotipizacije (angl. *high throughput genotyping*). Visoka stopnja polimorfizma je posledica spremembe v številu ponovitev osnovnega motiva, za kar sta odgovorna 2 mehanizma: nepravilno parjenje zdrsnenih verig (zdrs alelov) med podvojevanjem DNA in neenako prekrižanje kromosomov (angl. *crossing-over*) (Kalia in sod. 2011). Za analizo mikrosatelitnih markerjev je treba določiti nespremenljiva robna območja (angl. *flanking regions*) ter z uporabo fluorescentno označenih smernih in protismernih začetnih oligonukleotidov (angl. *forward and reverse primers*) lahko ločimo in nato pomnožimo zelene fragmente s PCR reakcijo (Butler 2012).

Poleg mikrosatelitov se pri genetskem mapiranju uporabljajo tudi drugi genetski označevalci, kot npr. polimorfizem posameznih nukleotidov (SNP, angl. *single nucleotide polymorphism*), naključno pomnoževanje polimorfne DNA (RAPD, angl. *random amplified polymorphic DNA*), polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP, angl. *restriction fragment length polymorphism*) in dolžinski polimorfizem pomnoženih fragmentov (AFLP, angl. *amplified fragment length polymorphism*) (Boopathi 2013).

1.3.2 PCR in genotipizacija

PCR reakcija je komponenta mnogih protokolov in ključna tehnika v molekularni biologiji. Po objavi prvotne metode leta 1985 je protokol PCR reakcije bil dodelan in specializiran za širok spekter aplikacij (Sint in sod. 2012; Rahman in sod. 2013; Garibyan in Avashia 2013; Waters in Shapter 2014).

V PCR reakciji se pomnožijo določeni segmenti DNA (lokusi) in tako se ustvari na milijone kopij, ki jih nato lahko analiziramo (Garibyan in Avashia 2013). Komponente PCR mešanice vključujejo: izhodno DNA (angl. *template DNA*), dNTP-je (deoksiribonukleotid trifosfate), *Taq* DNA polimerazo, začetne oligonukleotide, $MgCl_2$ in pufer (Waters in Shapter 2014). Z izolacijo termostabilnega encima *Taq* DNA polimeraze iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*, ki živi v vročih vrelih, je bila omogočena avtomatizacija postopka, kajti encim ni deaktiviran pri visokih temperaturah denaturacije v PCR reakciji (Saiki in sod. 1988; Waters in Shapter 2014; Porta in Enners 2020). Potek reakcije je verižen, kar pomeni, da poteka v ponavljajočih se ciklih, ki vključujejo 3 korake: denaturacijo, prileganje začetnih oligonukleotidov (angl. *primer annealing*) in sintezo DNA verige. Vsak korak poteka pod nadzorovanimi pogoji s točno določeno temperaturo in časovnim okvirjem (Waters in Shapter 2014; Porta in Enners 2020). Pred začetkom PCR reakcije je najprej treba identificirati tarčno DNA in določiti začetne oligonukleotide, nato pa lahko PCR reakcijo optimiziramo (Waters in Shapter 2014). To smo opravili s pomočjo agarozne gelske elektroforeze, pri kateri se pomnoženi odseki DNA, ki jim dodamo ustrezno fluorescentno barvilo, ločijo po velikosti, nato pa jih lahko vizualiziramo pod UV svetlobo in tako preverimo uspešnost pomnoževanja lokusov (Lee in sod. 2012).

Po opravljeni PCR analizi sledi še denaturacija in nato genotipizacija v sekvenatorju, kjer poteka kapilarna elektroforeza, pri kateri se fluorescentno označeni DNA fragmenti ločijo glede na njihovo dolžino oz. molekulsko maso. Na koncu kapilare pod lasersko svetlobo fluorescentno označeni oligonukleotidi oddajo svetlobo specifične valovne dolžine, ki jo senzor optično zazna in pretvori v podatke, ki smo jih nato analizirali v programu GeneMapper (Boopathi 2013). Z genotipizacijo primerjamo variabilnost lokusov in tako lahko identificiramo razlike v genotipih osebkov; iz podatkov lahko razberemo, ali so lokusi homozigotni ali heterozigotni in tako določimo genetsko varianco.

1.4 Problematika optimizacije izolacije DNA in verižne reakcije s polimerazo (PCR)

DNA je dedni material, ki je v jedru celice. Izjemnega pomena pri delu s tkivnimi vzorci, iz katerih želimo izolirati DNA, je pravilno ravnanje z njimi, da se dedni material ne kontaminira in da ne degradira. Pri degradaciji se DNA razgradi na vse manjše segmente, k temu pa prispevajo mehanizmi, ki vključujejo hidrolitično cepitev, kemično oksidacijo in encimsko ter bakterijsko razgradnjo. Vzorci, kjer je DNA degradirana, lahko predstavljajo problem, kot npr. izgubo alelov in neučinkovito pomnoževanje lokusov pri nadaljnji PCR reakciji (McCord in sod. 2011).

Za preprečevanje degradacije in kontaminacije tkiva je pomembno, da vzorce shranjujemo na nizkih temperaturah ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) in da pri rezanju tkiva oziroma sami izolaciji DNA in nadaljnji PCR analizi uporabljamo zaščitne rokavice in haljo, površina, na kateri delamo, mora biti sterilna, kot tudi pripomočki, ki jih uporabljamo. Pri samem postopku izolacije je izrednega pomena, da natančno pipetiramo in sledimo protokolu. Seveda je tudi od samega protokola odvisno, koliko izolirane DNA bomo dobili. Ugotoviti moramo optimalne količine kemikalij (npr. lizirnega in elucijskega pufra), ki bodo dale najvišjo koncentracijo DNA. Poleg pravilnega ravnanja z vzorci vpliva na količino izolirane DNA tudi ohranjenost in starost tkiva; s starostjo se povečuje degradacija dednega materiala. Zato so za nadaljnjo analizo PCR bistveni optimalni rezultati izolacije DNA z dovolj visoko koncentracijo in kakovostjo DNA.

Vse komponente v PCR mešanici imajo pomembno vlogo za pridobivanje dobrih PCR rezultatov. Poleg poznavanja optimalnih količin reagentov je potrebna optimizacija časovnega okvirja ciklov in temperature prileganja začetnih nukleotidov (angl. *annealing temperature*), kar nam omogoča agarozna gelska elektroforeza (Abu Bakar in sod. 2017).

1.5 Namen in cilji zaključne naloge

Namen zaključnega dela je bil optimizirati laboratorijske postopke, tj. izolacijo DNA in PCR reakcijo na primeru tkivnih vzorcev evropske divje mačke (*Felis silvestris*) in domače mačke (*Felis s. catus*) ter opraviti genotipizacijo mikrosatelitnih lokusov. Z izboljšanimi metodami analiz lahko pričakujemo boljše rezultate pri genotipizaciji in nadaljnjih genetskih analizah, ki so pomembne za detekcijo hibridizacije med domačo mačko in njeno prostoživečo sorodnico.

Cilji dela:

1. Izolacija DNA iz tkivnih vzorcev in analiza koncentracije izolirane DNA.
2. Optimizacija metode verižne reakcije s polimerazo PCR in pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov.

Hipoteze:

1. Koncentracija izolirane DNA je odvisna od ohranjenosti in starosti tkiva ter pravilnega shranjevanja vzorcev.
2. Optimizacija PCR reakcije je med drugim odvisna od temperature prileganja začetnih oligonukleotidov.

2 METODE DELA

Laboratorijsko delo, ki je potekalo med novembrom 2019 in julijem 2020, smo opravljali v Laboratoriju za molekularno ekologijo v Izoli. Analizirali smo 144 tkivnih vzorcev divje mačke, ki so bili zbrani v letih od 2003 do 2020 iz Slovenije, Hrvaške, Bosne in Hercegovine, Srbije in Severne Makedonije. Raziskavo smo začeli z izolacijo DNA, njeno uspešnost smo preverjali z merjenjem koncentracije izolirane DNA. Temu je sledilo pomnoževanje lokusov s PCR reakcijo. Optimizacijo temperature prileganja začetnih oligonukleotidov smo analizirali na lokusu FCA094, s temperaturnim gradientom od 52,3 do 59,4 °C. Uspešnost pomnoženih fragmentov pri različni temperaturi smo preverili z uporabo agarozne gelske elektroforeze. Sledila je genotipizacija v sekvenatorju SeqStudio (Thermo Fisher Scientific). Pridobljene podatke smo nato analizirali v programu GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems).

2.1 Postopki izolacije DNA

DNA smo izolirali z uporabo komercialnega kompleta peqGOLD Blood & Tissue DNA Mini Kit (VWR 2019) z upoštevanjem navodil proizvajalca. Pred začetkom dela smo za preprečevanje kontaminacije tkivnih vzorcev v laboratoriju upoštevali osnovna načela, tj. uporaba zaščitne halje in rokavic ter razkužili delovno površino s 96 % etanolom (EtOH) in natrijevim hipokloritom (NaOCI). Pred samim postopkom izolacije DNA smo vzorce tkiva narezali na majhne koščke, velikosti do 0,8 mm² oziroma težke do 30 mg. Za vsak vzorec smo uporabili nov del papirnate brisače, na kateri smo rezali tkivo in po vsakem vzorcu skalpel in pinceto namočili v etanol in obžgali nad gorilnikom ter počakali, da se pribor ohladi, da zaradi previsoke temperature ne bi prišlo do degradacije DNA. Pripravljeno tkivo smo nato prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirke in jih označili z ustreznimi številkami vzorcev.

2.1.1 Protokol izolacije DNA

Razgradnja tkiva

Pri lizi tkiva smo v mikrocentrifugirke z vzorci dodali 200 µL lizirnega TL pufra (angl. *TL Buffer*) in 25 µL proteinaze K, in jih nato dobro premešali na vorteksu. Vzorce smo zatem inkubirali 1 uro in 30 minut pri 55 °C.

Vezava DNA

Po inkubaciji smo vzorce 5 minut centrifugirali na maksimalni hitrosti. Supernatant smo pazljivo odlili v nove 1.5 mL mikrocentrifugirke, brez da bi prenesli usedlino. Nato smo dodali 220 μ L vezalnega BL pufra (angl. *BL Buffer*) in na vorteksu dobro premešali. Vzorce smo zatem inkubirali 10 minut pri 70 °C, vendar brez stresanja. V nadaljevanju smo dodali 220 μ L čistega etanola in na vorteksu premešali. Pripravili smo nove 2 mL zbiralne mikrocentrifugirke s kolonami (*PeqGOLD DNA Mini Column*) in celoten vzorec, vključno z nastalo oborino, prenesli na kolone. Nato smo jih centrifugirali 1 minuto pri maksimalni hitrosti, odlili filtrat in ponovno uporabili zbiralne centrifugirke.

Čiščenje DNA

V kolone smo odpipetirali 500 μ L čistilnega HBC pufra (angl. *HBC Buffer*) in jih centrifugirali 30 sekund pri maksimalni hitrosti, zatem pa odvrkli zbiralne mikrocentrifugirke in dali kolone v nove. V vzorce smo nato dodali 700 μ L čistilnega pufra, razredčenega z etanolom, in jih nato centrifugirali pri maksimalni hitrosti 30 sekund, filtrat smo nato odlili in postopek še enkrat ponovili. Po čiščenju DNA smo kolone centrifugirali 2 minuti pri maksimalni hitrosti, da se posušijo in da se odstrani celoten etanol v sledeh, ki bi se potencialno lahko vmešal v nadaljnje korake izolacije DNA, zbiralne mikrocentrifugirke pa zavrgli.

Ekstrakcija DNA

Kolone smo nato premestili v nove 1,5 mL mikrocentrifugirke, ki smo jim odrezali pokrovčke in jih ustrezno opremili z oznakami vzorcev. Vanje smo odpipetirali 100 μ L elucijskega pufra, ki smo ga pred tem inkubirali na 70 °C. Na sobni temperaturi smo vzorce pustili inkubirati 2 minuti in jih nato centrifugirali 1 minuto pri maksimalni hitrosti. Po potrebi smo korak elucije ponovili, nato pa kolone zavrgli in mikrocentrifugirke zaprli z ustrezno označenimi pokrovčki.

2.2 Merjenje koncentracije izolirane DNA

Po izolaciji DNA smo preverili koncentracijo DNA z uporabo fluorometra QubitTM (Life Technologies) in kompletom reagentov (Qubit® dsDNA BR Assay Kit). Metoda temelji na meritvah intenzitete fluorescence ob uporabi fluorescentnega barvila, ki se veže na nukleinske kisline. Korelacija med koncentracijo DNA v vzorcu in intenziteto fluorescence je mogoča, ker lahko fluorescentni reagent oddaja svetlobo le v primeru, ko je vezan na DNA. Kompleks fluorescentnega barvila in DNA (fluorofor) lahko absorbira svetlobo

vzbujevalne valovne dolžine (375–635 nm) in oddaja ali fluorescira svetlobo z zmanjšano energijo oziroma daljše valovne dolžine (435–740 nm).

V epruveti smo zmešali 199 μL dsDNA pufra (Qubit® dsDNA BR) in 1 μL barvila na en vzorec (količino barvila smo pomnožili s številom vzorcev), in to nato dobro premešali na vorteksu. V 0,5 mL mikrocentrifugirke smo nato odpipetirali 198 μL raztopine in zatem 2 μL vzorca izolirane DNA. Mikrocentrifugirke smo nato vstavili v fluorometer in odčitali izmerjeno koncentracijo DNA.

2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR reakcija je in vitro metoda, s katero pomnožimo kratke odseke (lokuse) molekule DNA, z namenom ustvariti na milijone kopij želenega odseka. Metodo je z odkritjem bakterije *Thermus aquaticus* razvil biokemik Kary Mullis leta 1983, iz nje je bil izoliran encim Taq DNA polimeraza, zaradi katerega je postopek sploh bilo mogoče avtomatizirati in poenostaviti (Saiki in sod. 1988; McPherson in Møller 2006). PCR poteka verižno v večkrat ponovljenih ciklih, ki vključujejo tri osnovne korake (slika 1 in 2):

1. Denaturacija matrične DNA

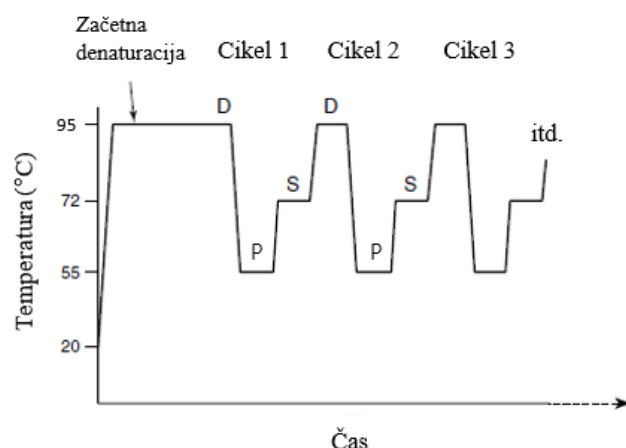
Proces poteka pri visoki temperaturi 93–95 °C, zato da se lahko dvojna vijačnica DNA (dsDNA) loči s prekinitvijo vodikovih vezi in tako nastane enojna vijačnica (ssDNA) (Porta in Enners 2020).

2. Prileganje začetnih oligonukleotidov

Po denaturaciji sledi prileganje začetnih oligonukleotidov (dve kratki molekuli DNA, ki sta komplementarni začetnemu in končnemu delu odseka DNA, ki ga želimo pomnoževati), kjer reakcijo ohladimo na specifično temperaturo 52–60 °C, pri kateri pride do hibridizacije oziroma prileganja začetnih oligonukleotidov na komplementarno mesto ene od ločenih verig DNA. Temperatura tega koraka je lahko različna in jo je glede na različne parametre reakcije treba optimizirati.

3. Sinteza ali podaljševanje novonastajajoče DNA verige

Pri zadnjem koraku povišamo temperaturo na 72 °C, da se aktivira termostabilna Taq DNA polimeraza, ki podaljša posamezno verigo v smeri 5' proti 3', tako da poteče sinteza novih verig DNA.



Slika 1: Temperaturni profil PCR reakcije: s sobne temperature je reakcija segreta na 95° C za začetno denaturacijo, nato si v ciklih sledijo denaturacija (D) na 95 °C , prilaganje začetnih oligonukleotidov (P) na 52–60 °C in sinteza novonastajajoče DNA verige (S) na 72 °C (povzeto po: McPherson in Møller 2006).

Ta proces se ponovi v več ciklih, ponavadi 25–35, količina DNA pa z vsakim ciklom narašča eksponentno (2^{25} – 2^{35}) (Waters and Shapter 2014). Poleg specifičnih pogojev reakcije je pomembno razumevanje funkcij komponent PCR reakcije, da lahko nato spreminjamo pogoje, ki bodo dali najboljši rezultat. Reakcijske komponente z vlogami so naslednje:

- Izhodna ali matrična DNA, ki je tisti del DNA, ki ga želimo pomnožiti.
- Deoksinukleotid trifosfati (nukleotidi, dNTP-ji), ki so gradniki DNA. To so adenzin trifosfat (ATP), timin trifosfat (TTP), gvanin trifosfat (GTP) in citozin trifosfat (CTP) (Waters in Shapter 2014).
- Termostabilen encim Taq DNA polimeraza, ki katalizira sintezo DNA verige tako, da dodaja dNTP-je od začetnih oligonukleotidov dalje, kar navadno poteka v smeri 5' proti 3' (McPherson in Møller 2006; Lorenz 2012).
- Začetna oligonukleotida, katerih sekvenca je komplementarna matrični DNA in optimalno dolga med 15 do 30 baznih parov, vsebnost gvanina in citozina pa med 40–60 % (angl. *G-C content*) (Lorenz 2012). Na 5' konec začetnih oligonukleotidov se veže fluorescentno barvilo, kar omogoča detekcijo pomnoženih fragmentov pri gelski in kapilarni elektroforezi (McCord in Buel 2013).
- Reakcijski pufer, ki vsebuje magnezijev klorid ($MgCl_2$). Magnezij je pri PCR reakciji ključnega pomena, kajti od njega je odvisna aktivnost Taq DNA polimeraze, tvori pa tudi kompleks z dNTP-ji (vežejo se ekvimolarno) (McPherson in Møller 2006; Lorenz 2012).
- Deionizirana voda (dH_2O) je tekoči medij, v katerem poteka reakcija, ne vsebuje ionov, soli in nukleaz ter ima nevtralen pH (Green in Sambrook 2018).

2.3.1 Optimizacija PCR reakcije

S PCR reakcijo smo hkrati pomnožili več DNA fragmentov v eni sami reakciji (angl. multiplex PCR), kar lahko povzroči napake (ang. *bias*) končnih produktov (Ishii in Fukui 2001; Sint in sod. 2012). Za donos optimalnih rezultatov je zato nujno potrebna tudi optimizacija parametrov PCR reakcije; količine reagentov, količina in kakovost izolirane DNA, koncentracije mešanic začetnih oligonukleotidov in temperaturnega profila PCR reakcije. V naši raziskavi smo uporabili KAPA Taq DNA polimerazo, ki ima 5' proti 3' polimerazno in 5' proti 3' eksonukleazno aktivnost, vendar pa nima 3' proti 5' eksonukleazne aktivnosti (angl. *proofreading activity*) za preverjanje napak prileganja začetnih oligonukleotidov, kar lahko povzroči napake pri pomnoževanju, ker nima encima, ki bi to preverjal. Napake se lahko zgodijo že v prvem ciklu PCR reakcije, kar nato vpliva na vse nadaljnje cikle, posledično pride do nespecifičnega pomnoževanja produktov, še posebej pri nižjih temperaturah prileganja (slika 5, 6 in 7). Za uspešnejše rezultate je pomembna uporaba "hot-start" DNA polimeraze, ki se ne aktivira na sobni temperaturi, ampak šele v koraku denaturacije na 95 °C, kar prepreči nespecifično prileganje začetnih oligonukleotidov pri nižjih temperaturah. Aktivnost Taq polimeraze je odvisna tudi od koncentracije magnezijevih ionov (Mg^{2+}), ki ne sme biti previsoka, ker pride do pomnoževanja nespecifičnih produktov. Sekvence z visoko vsebnostjo gvanina in citozina (nad 60 %) se težje pomnožijo, zato lahko v takih primerih dodamo več KAPA Taq DNA polimeraze oziroma podaljšamo korak začetne denaturacije pri 95 °C do 5 min. Delež vsebnosti gvanina in citozina vpliva tudi na temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov; višji kot je delež vsebnosti GC, višja bo tudi temperatura prileganja za določen lokus.

Začetni oligonukleotidi imajo tudi pomembno vlogo pri pomnoževanju segmentov, med drugim tudi njihova koncentracija, ki ne sme biti previsoka. V nasprotnem primeru lahko pride do medsebojne nespecifične vezave začetnih oligonukleotidov na 3' konec (angl. *primer-dimer*), kar nato povzroči tudi pomnoževanje nespecifičnih produktov (Kramer in Coen 2006). Njihova specifičnost prileganja na komplementarno mesto je odvisna tudi od temperature prileganja (Ishii in Fukui 2001; McPherson in Møller 2006; Sint in sod. 2012).

Izračun temperature prileganja začetnih oligonukleotidov

Temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov lahko optimiziramo z izračunom te oziroma talilne temperature začetnih oligonukleotidov (angl. *melting temperature* T_m). Za izračun lahko uporabimo spletno prosto dostopne kalkulatorje kot npr. Thermo Fisher Scientific T_m Calculator (<https://www.thermofisher.com/si/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>), kjer izberemo podatek o

vrsti Taq DNA polimeraze, vstavimo sekvence začetnih oligonukleotidov in vpišemo koncentracije začetnih oligonukleotidov. Pri vpisanih sekvencah začetnih oligonukleotidov lokusa FCA094 se nam izpiše tudi delež vsebnosti GC. Temperatura prileganja je odvisna tudi od Taq DNA polimeraze, dolžine sekvenc, deleža GC in koncentracije začetnih oligonukleotidov. Višja kot je koncentracija začetnih oligonukleotidov, višja bo tudi temperatura prileganja.

Po izračunu T_m , lahko to v laboratoriju optimiziramo s poskušanjem pomnoževanja v PCR reakciji tako, da začnemo pri temperaturi prileganja, ki je za 5 °C nižja od talilne temperature začetnih oligonukleotidov, in nato napredujemo za približno 1 °C višje, da pridemo do temperature prileganja, ki je za 5 °C višja od izračunane T_m . Rezultate nato analiziramo, da določimo optimalno temperaturo prileganja za lokus.

2.3.2 Protokol PCR reakcije

S PCR reakcijo smo pomnožili mikrosatelitne lokuse, ki so prepoznani kot delujoči za divjo mačko (FCA008, FCA026, FCA043, FCA058, FCA005, FCA077, FCA088, FCA075, FCA094, FCA096, FCA105, FCA126, FCA132, FCA149, FCA220, FCA229, FCA262, FCA310, FCA441). Začetne oligonukleotide smo izbrali na podlagi uporabe in njihove potrditve v predhodnih študijah (Beaumont in sod. 2001; Lecis in sod. 2006; Oliveira in sod. 2008; Eckert in sod. 2009; Hertwig in sod. 2009; Driscoll in sod. 2011; Say in sod. 2011; Mattucci in sod. 2013; Steyer in sod. 2017; Beugin in sod. 2019).

PCR reakcijo smo poskušali optimizirati s spreminjanjem temperature prileganja začetnih oligonukleotidov, ki so bile naslednje: 52,3 °C, 53,4 °C, 54,4 °C, 55,4 °C, 56,6 °C, 57,7 °C, 58,7 °C in 59,4 °C. Uspešnost pomnoževanja lokusa FCA094 v vzorcu LME2027 smo preverili z agarozno elektroforezo in genotipizacijo v sekvenatorju SeqStudio (Thermo Fisher Scientific).

Vso delo pri pripravi mešanic potrebnih za PCR reakcijo je potekalo v laminariju, ki ustvarja aseptične pogoje dela, da se mešanice in vzorci ne kontaminirajo in inhibirajo PCR reakcije. Najprej smo pripravili 6 mešanic začetnih oligonukleotidov (angl. *primer sets, multiplex*), ki so imeli koncentracijo 10 µM, vsako v svojo mikrocentrifugirko in jih ustrezno označili. Podatki prvotnih mešanic začetnih nukleotidov so prikazani v preglednici 1.

Preglednica 1: Mešanice začetnih oligonukleotidov

Mešanica	Lokus	Primer	Sekvenca	Velikost alelov
M1	FCA058	FCA058-F	CATCCCTGACTAGCCTGAGC	118–234
		FCA058-R	GTGAAGAAAGCTGGTGTGCA	
	FCA077	FCA077-F	GGCACCTATAACTACCAGTGTGA	132–162
		FCA077-R	ATCTCTGGGAAATAAATTTTGG	
	FCA088	FCA088-F	AGGAAAATGAAGTCAAGAAAATGG	99–125
		FCA088-R	TTTTTCTTTTTCCCGTAATACACA	
M2	FCA008	FCA008-F	ACTGTAAATTTCTGAGCTGGCC	144–160
		FCA008-R	TGACAGACTGTTCTGGGTATGG	
	FCA149	FCA149-F	CCTATCAAAGTTCTCACCAAATCA	116–134
		FCA149-R	GTCTCACCATGTGTGGGATG	
	FCA026	FCA026-F	GGAGCCCTTAGAGTCATGCA	126–162
		FCA026-R	TGTACACGCACCAAAAACAA	
	FCA096	FCA096-F	CACGCCAAACTCTATGCTGA	96–235
		FCA096-R	CAATGTGCCGTCCAAGAAC	
M3	FCA126	FCA126-F	GCCCCTGATACCCTGAATG	103–157
		FCA126-R	CTATCCTTGCTGGCTGAAGG	
	FCA043	FCA043-F	GAGCCACCCTAGCACATATACC	106–146
		FCA043-R	AGACGGGATTGCATGAAAAG	
	FCA132	FCA132-F	ATCAAGGCCAACTGTCCG	127–161
		FCA132-R	GATGCCTCATTAGAAAAATGGC	
M4	FCA005	FCA005-F	CCTAAGGAAACAGTAATCCTGGC	124–152
		FCA005-R	TGGCAGGCATACCAGGAT	
	FCA090	FCA090-F FCA090-R	ATCAAAAGTCTTGAAGAGCATGG	82–118
			TGTTAGCTCATGTTTCATGTGTCC	
			TCCTGATGTGGCAGTTAAACCG	
			CATGCCTTGAACCTTTCAT	
FCA262	FCA262-F	ATCTCTTCCATGGTGTGTGATG	163–195	
	FCA262-R	TACAGAATACTCCCCCGC		
M5	FCA075	FCA075-F	ATGCTAATCAGTGGCATTG	104–142
		FCA075-R	GAACAAAAATTCCAGACGTGC	
	FCA220	FCA220-F	CGATGGAAATTGTATCCATGG	202–224
		FCA220-R	GAATGAAGGCAGTCACAACTG	
	FCA229	FCA229-F	CAAAGTACAAGCTTAGAGGGC	142–176
		FCA229-R	GCAGAAGTCCAATCTCAAAGTC	
FCA441	FCA441-F	ATCGGTAGGTAGGTAGATATAG	127–173	
	FCA441-R	GCTTGCTTCAAATTTTCAC		
M6	FCA094	FAM094-F	TCAAGCCCCATTTTACCTTC	207–249
		FAM094-R	CACGCCAAACTCTATGCTGA	
	FCA105	FAM105-F	TTGACCCTCATACCTTCTTTGG	169–209
		FAM105-R	TGGGAGAATAAATTTGCAAAGC	
	FCA310	FAM310-F	TTAATTGTATCCCAAGTGGTCA	106–140
		FAM310-R	TAATGCTGCAATGTAGGGCA	

Volumen reakcijskih mešanic je znašal 10 μL . Mešanice so se razlikovale po volumnih deionizirane vode in mešanic začetnih oligonukleotidov, njihovi volumni so bili odvisni od njihovega števila. Vsakega smernega (F) in protismernega (R) začetnega oligonukleotida smo odpipetirali 0,3 μL v svojo mešanico (v primeru FCA096 0,5 μL) in sešteli za končni volumen mešanice začetnih oligonukleotidov, kot je prikazano na primeru v preglednicah 2, 3 in 4.

Preglednica 2: Volumen prve mešanice začetnih oligonukleotidov

Začetni oligonukleotid	Volumen na reakcijo (μL)	
FCA058	F	0.3
	R	0.3
FCA077	F	0.3
	R	0.3
FCA088	F	0.3
	R	0.3
Volumen za PCR (μL)		1.8

Preglednica 3: Volumen druge mešanice začetnih oligonukleotidov

Začetni oligonukleotid	Volumen na reakcijo (μL)	
FCA008	F	0.3
	R	0.3
FCA149	F	0.3
	R	0.3
FCA026	F	0.3
	R	0.3
FCA096	F	0.5
	R	0.5
Volumen za PCR (μL)		2.8

Preglednica 4: Volumen tretje mešanice začetnih oligonukleotidov

Začetni oligonukleotid	Volumen na reakcijo (μL)	
FCA129	F	0.3
	R	0.3
FCA043	F	0.3
	R	0.3
FCA132	F	0.3
	R	0.3
Volumen za PCR (μL)		1.8

Po pripravi mešanic začetnih oligonukleotidov smo glede na njihov volumen dodali ustrezne količine deionizirane vode (angl. *PCR-grade water*) in KAPA pufra 1.5x, ki vsebuje 3 mM MgCl_2 , 1 U/ μL *Taq* DNA polimeraze in 0,2 mM vsakega dNTP-ja do skupnega volumna 13 μL . Podatki volumnov PCR reakcijskih mešanic so prikazani v preglednicah 5 in 6.

Preglednica 5: Volumni PCR mešanice glede na volumen prve in tretje mešanice začetnih oligonukleotidov

Reagent	Volumen na reakcijo (μL)
Nuklearna voda (dH_2O)	1.95
KAPA pufer	6.25
Mešanica začetnih oligonukleotidov	1.8
Volumen na reakcijo (μL)	10
DNA (μL)	3
Končni volumen za PCR (μL)	13

Preglednica 6: Volumni PCR mešanice glede na volumen druge mešanice začetnih oligonukleotidov

Reagent	Volumen (μL) na reakcijo
Nuklearna voda (dH_2O)	0.95
KAPA pufer	6.25
Mešanica začetnih oligonukleotidov	2.8
Volumen na reakcijo (μL)	10
DNA (μL)	3
Končni volumen za PCR (μL)	13

Mešanice reagentov in DNA smo odpipetirali v 0,2 ml epruvice za pripravo PCR mešanic (angl. *PCR tube strips*). Ko so bile mešanice z vzorci pripravljene, smo jih vstavili v ciklični termostat (angl. *Thermo-cycler*), kjer je potekala PCR reakcija po naslednjem temperaturnem profilu: začetna denaturacija na 95 °C za 3 min, denaturacija na 95 °C za 15 sek, prileganje nukleotidov na 58 °C za 30 sek, podaljševanje verige na 72 °C za 30 sek in končno pomnoževanje na 72 °C za 10 min. PCR reakcija se je ponovila v 35 ciklih.

2.4 Agarozna gelska elektroforeza

Z metodo agarozne gelske elektroforeze lahko analiziramo pomnožene DNA odseke, ki se ločijo po velikosti, in tako preverimo uspešnost pomnoževanja fragmentov (PCR produktov). Fosfatna skupina DNA verige je negativno nabita, zato se ob vzpostavitvi električnega polja DNA fragmenti premikajo po gelu proti pozitivno nabiti elektrodi (Lee in sod. 2012). Krajši oziroma manjši produkti PCR reakcije potujejo hitreje kot daljši in na podlagi tega lahko nato določimo dolžino DNA fragmentov v primerjavi s standardno lestvico DNA, ki potuje istočasno po gelu. Vizualizacija ločenih fragmentov DNA je mogoča zaradi barvila, vezanega na DNA verigo, ki pod UV svetlobo fluorescira.

2.4.1 Protokol agarozne gelske elektroforeze

Po končani PCR reakciji smo pripravili gel in PCR produkte za agarozno gelsko elektroforezo. Gel smo naredili v čaši iz 3,3 g agaroze in 130 mL TBE pufru 0.5x. Raztopino smo počasi segrevali v mikrovalovki, dokler se ni popolnoma raztopila. Tekoči del smo nato delno ohladili pod vodo, dodali 10 μ L barvila Midori Green in dobro premešali. Nato smo raztopino vlili v kalup, dali plastičen glavniček na gel in zaradi fotosenzibilnosti barvila pokrili s folijo.

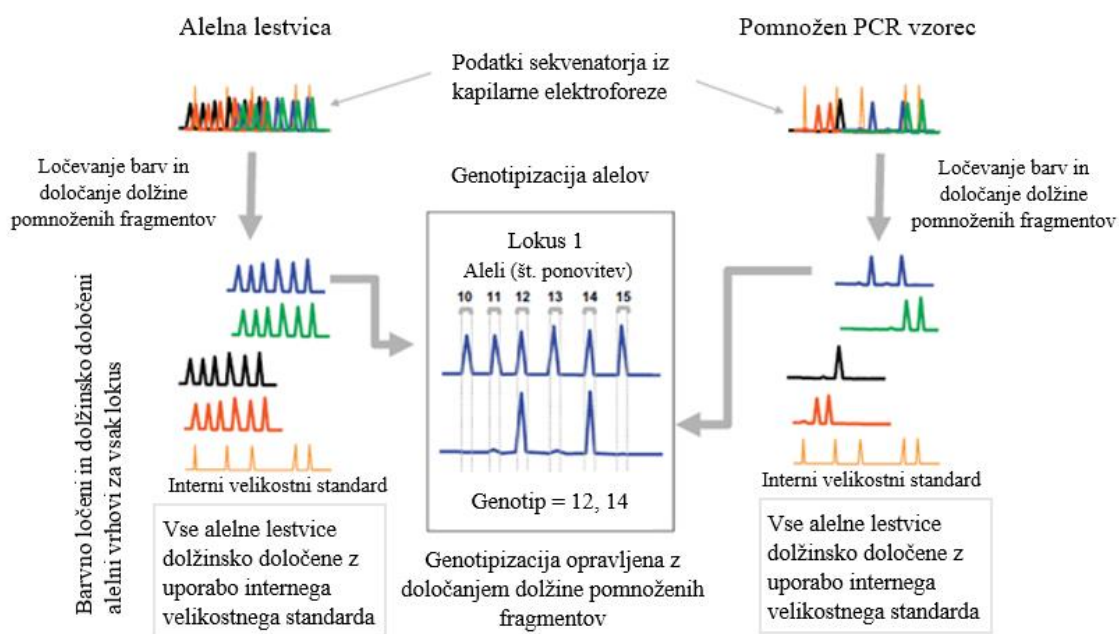
Sledila je priprava vzorcev, oziroma v našem primeru vzorca LME2027. V prvo jamico na parafilmu smo dodali standardno lestvico DNA, ki je za primerjavo velikosti fragmentov PCR produktov. Nato smo na strjen gel nanesti vzorce in standardno lestvico. Gelska elektroforeza je potekla na 120 V 35 min. Nato smo vzorce prenesli v UV transluminator, kjer smo PCR produkte vizualizirali. Uspešno pomnožen PCR produkt je viden kot DNA fragment pričakovane velikosti (bp) za ta lokus.

2.5 Genotipizacija

Po PCR reakciji smo opravili še genotipizacijo mikrosatelitnih lokusov. Pomemben je korak denaturacije pred analizo, kajti enoverižna DNA je veliko bolj prilagodljiva in se boljše loči v kapilarni elektroforezi kot pa dvoverižna (McCord in Buel 2013).

Pripravili smo ploščo, nato pa še 0,2 μ L velikostnega dolžinskega standarda (Lys), 10,7 μ L formamida in 2 μ L PCR produktov. Vzorce smo nato pokrili in postavili v ciklični termostat na 95 °C za 5 min. Po procesu denaturacije smo vzorce ohladili in centrifugirali na vorteksu. Sledila je genotipizacija v sekvenatorju SeqStudio (Thermo Fisher Scientific).

Pridobljene podatke smo analizirali s programom GeneMapper; tj. programska oprema, ki nam omogoča genotipizacijsko analizo multialelnih lokusov z vizualizacijo, kot je predstavljeno na sliki 2, z detekcijo fluorescenčnih barvil, ki nam da informacije o ustrezni barvi in velikosti fragmentov. S pomočjo vizualnega pregleda smo preverili uspeh pomnoževanja lokusov glede na različne temperature prileganja in variabilnost lokusov. Določili smo dolžine pomnoženih fragmentov in iz podatkov razbrali, če so lokusi homozigotni ali heterozigotni.



Slika 2: Genotipizacijo opravimo z določanjem dolžine pomnoženih fragmentov s PCR reakcijo. Najverjetnejše pozicije alelov (angl. bins) so definirane z genotipizacijsko programsko opremo, s pomočjo informacij alelne lestvice (angl. allele ladder) za vsak komplet (angl. multiplex). Vsak vrh (angl. peak), označen s točno določeno barvno linijo, označimo kot alel za ta lokus. Vrhovi v alelni lestvici kot tudi v vzorcih, pomnoženih s PCR reakcijo, imajo enak interni velikostni standard, zato da se lahko med seboj primerjajo (povzeto po Butler 2011).

Pridobljene velikosti alelov smo zabeležili v tabelo excel. V primeru homozigotov smo v excelovo preglednico vpisali dve enaki števili (npr. 210, 210), če sta alela bila heterozigotna, smo pa vpisali obe vrednosti (npr. 210, 220), ki sta vedno bili obe lihi ali obe sodi števili. Primer zapisa podatkov je prikazan v preglednici 7.

Preglednica 7: Velikosti pomnoženih alelov pri 28 analiziranih vzorcih na treh mikrosatelitnih lokusih

Mešanica začetnih nukleotidov 6						
Skupina	Vzorec	FCA094	FCA094	FCA105	FCA105	FCA310 FCA310
1	LME1734	210	210	192	192	137 137
1	LME1729	/	/	188	194	137 137
1	LME1969	210	220	194	196	137 137
1	LME1958	210	210	194	200	137 137
1	LME1728	210	210	186	192	137 137
1	LME1735	210	210	192	192	137 137
1	LME1966	210	210	194	198	137 137
1	LME1972	210	210	192	192	137 137
1	LME1953	210	210	192	192	137 137
1	LME1954	210	210	194	194	137 137
1	LME1965	210	210	200	206	125 137
1	LME1962	210	210	190	200	137 137
1	LME1975	210	210	172	200	125 137
1	LME1740	210	210	190	192	137 137
1	LME1742	210	210	190	192	137 137
1	LME1754	210	220	192	198	137 137
2	LME1977	/	/	/	/	/
2	LME1979	/	/	196	204	137 137
2	LME1980	/	/	162	198	137 137
2	LME2591	/	/	194	200	137 137
2	LME2592	/	/	192	200	137 137
2	LME2587	/	/	186	194	137 137
2	LME2588	/	/	194	196	137 137
2	LME2589	/	/	190	192	137 137
2	LME2590	/	/	188	188	125 135
2	LME1620	210	210	194	198	137 137
2	LME2593	/	/	190	192	137 137

3 REZULTATI Z DISKUSIJO

3.1 Analiza koncentracije DNA

Koncentracije izolirane DNA so se razlikovale glede na starost vzorcev oziroma čas shranjevanja tkivnega vzorca v etanolu. Zaradi vključitve večjega števila vzorcev bom predstavila primere koncentracij DNA starejših vzorcev – skupina 1 (od leta 2000 do leta 2006), prikazanih v preglednici 7 (ki so bili zajeti v sorodni študiji), in novejših vzorcev – skupina 2 (od leta 2019 do leta 2020), prikazanih v preglednici 8 (zajeti v moji študiji).

Preglednica 8: Izmerjene koncentracije DNA starejših vzorcev tkiva (skupina 1)

Vzorec	Leto vzorčenja	Izmerjena koncentracija DNA (ng/ μ L)
LME1734	2000	14.3
LME1729	2002	75.8
LME1969	2003	45.6
LME1958	2003	22.8
LME1728	2003	6.3
LME1735	2005	9.58
LME1966	2005	20.7
LME1972	2005	6.78
LME1953	2005	31.7
LME1954	2005	88.7
LME1965	2005	16.5
LME1962	2005	77.8
LME1975	2005	6.57
LME1740	2006	68.8
LME1742	2006	5.96
LME1754	2006	2.86

Preglednica 9: Izmerjene koncentracije DNA novejših vzorcev tkiva (skupina 2)

Vzorec	Leto vzorčenja	Izmerjena koncentracija DNA (ng/ μ L)
LME1977	2019	269
LME1979	2019	349
LME1980	2019	331
LME2591	2020	138
LME2592	2020	139
LME2587	2020	160
LME2588	2020	269
LME2589	2020	196
LME2590	2020	359
LME1620	2020	144
LME2593	2019	251

Vrednosti optimalne koncentracije DNA znašajo nad 5 ng/ μ L. V prvi skupini je bila najnižja vrednost izmerjene koncentracije DNA 2,86 in najvišja 88,7 ng/ μ L. Povprečna vrednost izmerjene koncentracije je bila $31,3 \pm 30,0$ ng/ μ L. V drugi skupini je bila najnižja vrednost izmerjene koncentracije DNA 138 ng/ μ L in najvišja 359 ng/ μ L. Povprečna vrednost izmerjene koncentracije je bila $236,82 \pm 86,12$ ng/ μ L.

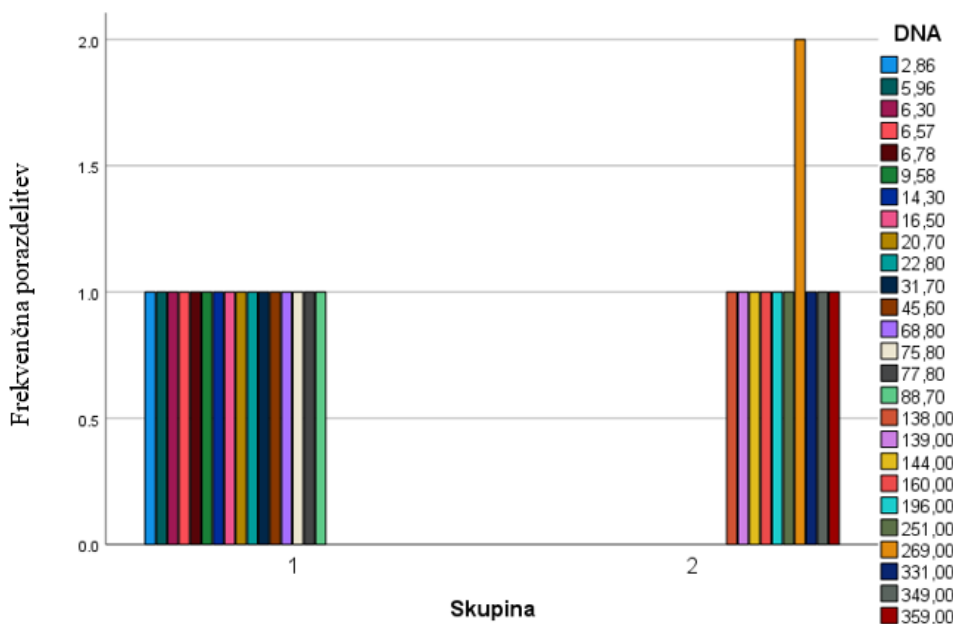
3.1.1 Statistična analiza izmerjenih koncentracij DNA

Normalno porazdelitev podatkov smo preverili s testom Shapiro-Wilk. Glede na majhno število vzorcev in nenormalno porazdelitev vrednosti koncentracij DNA smo za statistično analizo uporabili neparametrični Mann-Whitney U test. Rezultati statistične analize so prikazani v preglednici 10 in na grafu slike 3.

Preglednica 10: Rezultati Mann-Whitney U testa

Rangi			
Skupina	Število vzorcev	Povprečen rang	Vsota rangov
1	16	8.50	136.00
2	11	22.00	242.00
Skupno število vzorcev		27	

Povprečni rang vrednosti koncentracije DNA je v prvi skupini 8,5 in v drugi skupini 22,0. Povprečna ranga vrednosti koncentracij DNA v prvi in drugi skupini se statistično značilno razlikujeta. Iz naših podatkov je mogoče sklepati, da je bila koncentracija DNA v drugi skupini (mlajši vzorci) statistično značilno višja kot pri prvi skupini ($z = -4,343$, $p < 0,001$).



Slika 3: Prikaz frekvenčne porazdelitve rangov v prvi in drugi skupini vzorcev

Na sliki 3 je prikazana frekvenčna porazdelitev vrednosti izmerjenih koncentracij DNA v naših vzorcih. V dveh vzorcih je bila vrednost izmerjene koncentracije enaka, znašala je 269 ng/ μ L.

3.2 Rezultati optimizacije PCR reakcije

Rezultati optimizacije PCR reakcije so prikazani na sliki 4. Po vpisu sekvenc začetnih oligonukleotidov v okence spletnega kalkulatorja (ThermoFisher Scientific) se nam izpiše tudi delež GC, ki je med 45–50 %, kar je v rangu optimalnih vrednosti (40–60 %). Izračunana je talilna temperatura (T_m), ki znaša za smerni začetni oligonukleotid 55,2 °C in za protismerni 56,6 °C. Optimalna temperatura prileganja je označena z rdečo in znaša 55,2 °C, ki smo jo nato optimizirali s spreminjanjem.

3. Type or paste your sequence

Primer#1: 5'- TCAAGCCCCATTTACCTTC 20 nt: A=4.0 T=7.0 C=8.0 G=1.0 CG=45.00%

Primer#2: 5'- CACGCCAAACTCTATGCTGA 20 nt: A=6.0 T=4.0 C=7.0 G=3.0 CG=50.00%

4. PCR conditions

Primer conc. 0.23 μ M

Results

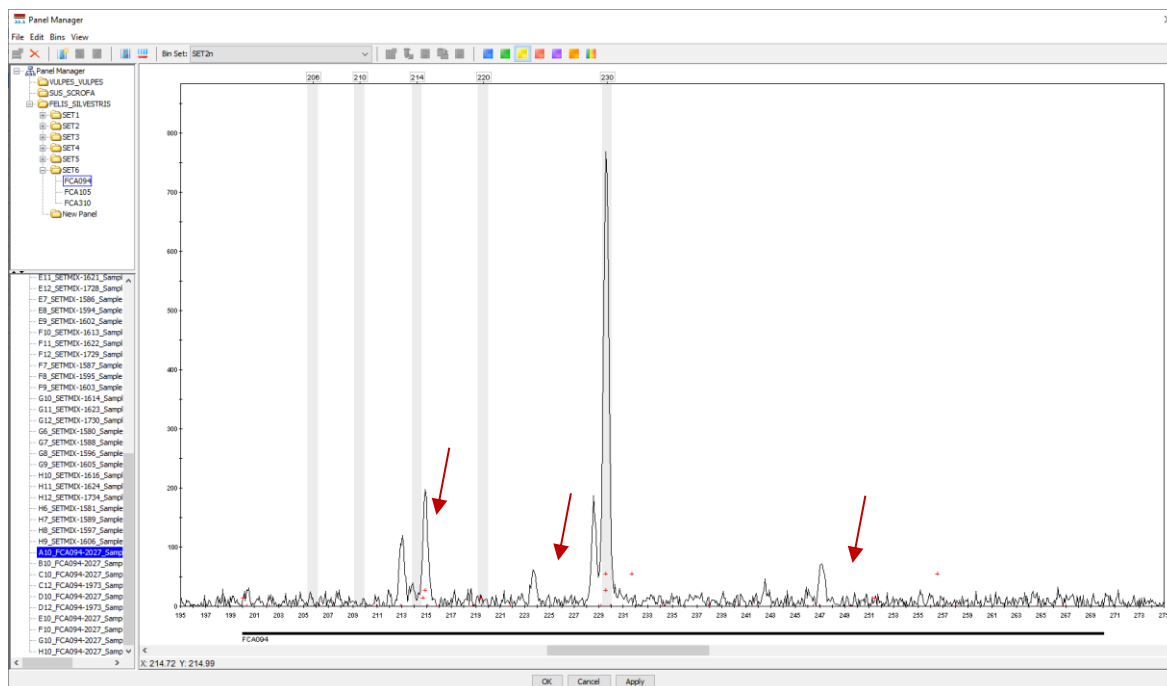
ID #1	Sequence #1	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	Tm °C	ID #2	Sequence #2	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	Tm °C	Annealing Temperature °C
Primer#1	TCAAGCCCCATTTACCTTC	5962.9	175900.0	55.2	Primer#2	CACGCCAAACTCTATGCTGA	6046.0	187900.0	56.6	55.2

Export table data into Excel

Slika 4: Rezultati izračune optimalne temperature prileganja (Thermo Fisher Scientific)

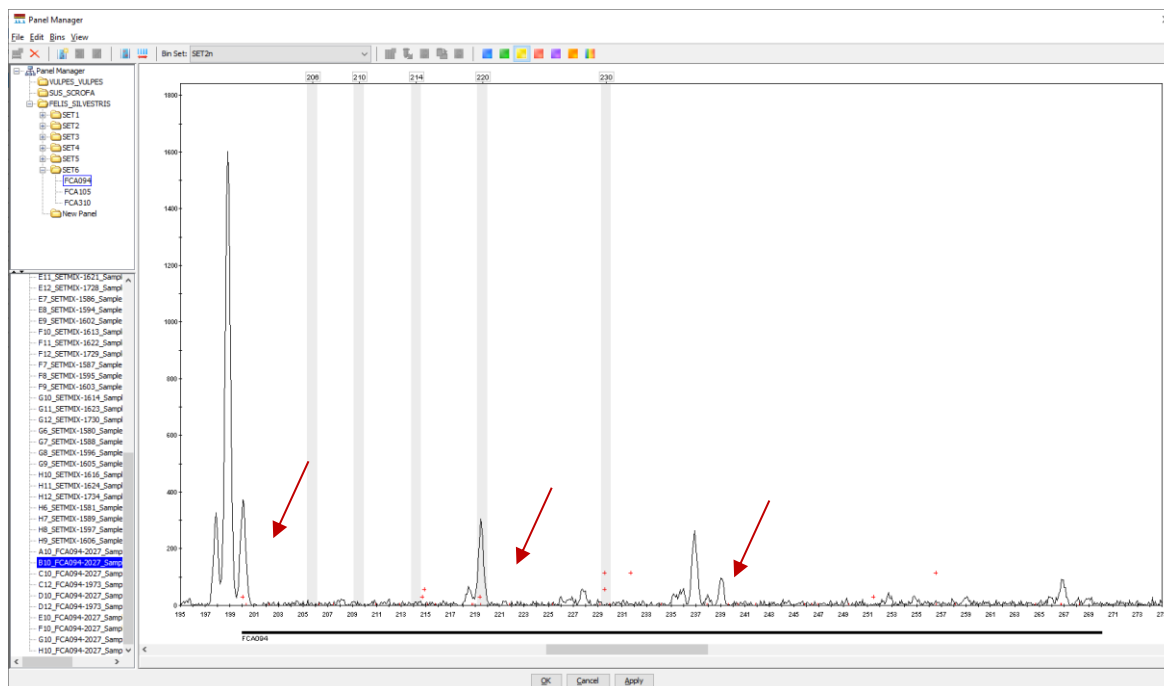
3.3 Analiza mikrosatelitnih lokusov

Rezultati pomnoževanja lokusa FCA094 v vzorcu LME2027 pri specifičnih temperaturah prileganja začetnih oligonukleotidov so predstavljeni na slikah 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 in 12.



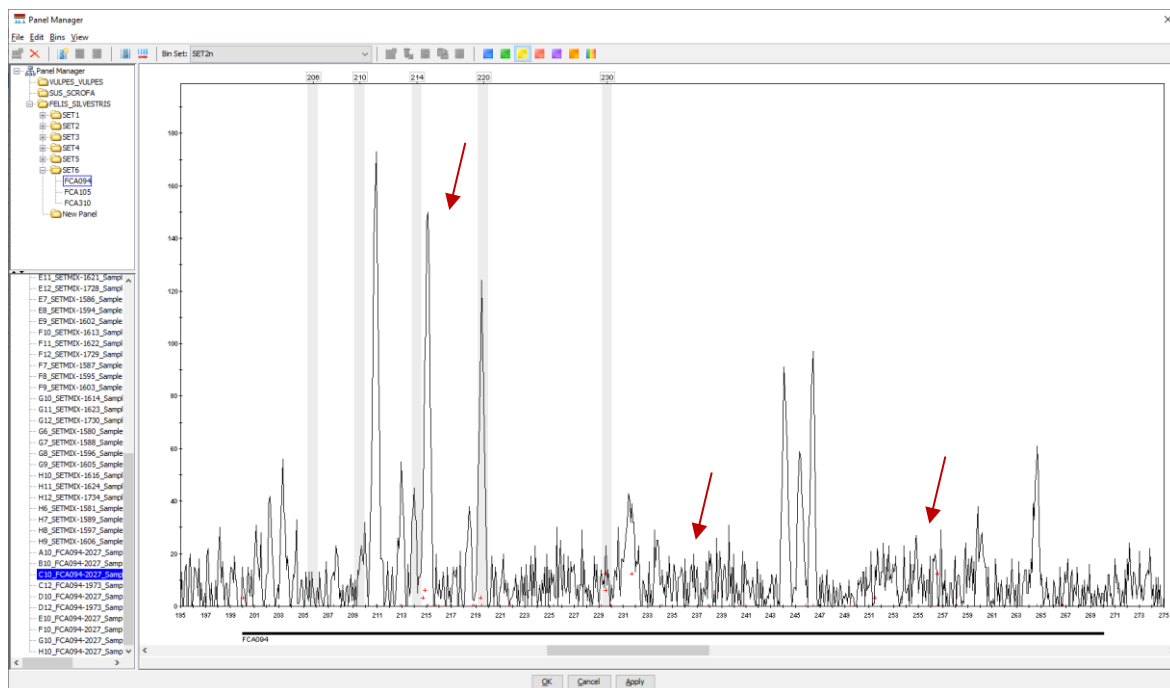
Slika 5: Vizualizacija alelov na lokusu FCA094 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 52,3 °C

Na sliki 5 je prikazana velikost pomnoženega alela na lokusu FCA094. Poleg pomnoženega alela lahko na sliki vidimo nespecifično pomnožene fragmente DNA (označeni so z rdečimi puščicami), katerih dolžina je variirala okrog dolžine mikrosatelitnega lokusa FCA094. Iz tega lahko sklepamo, da je temperatura prileganja 52,3 °C prenizka za pomnoževanje lokusa.



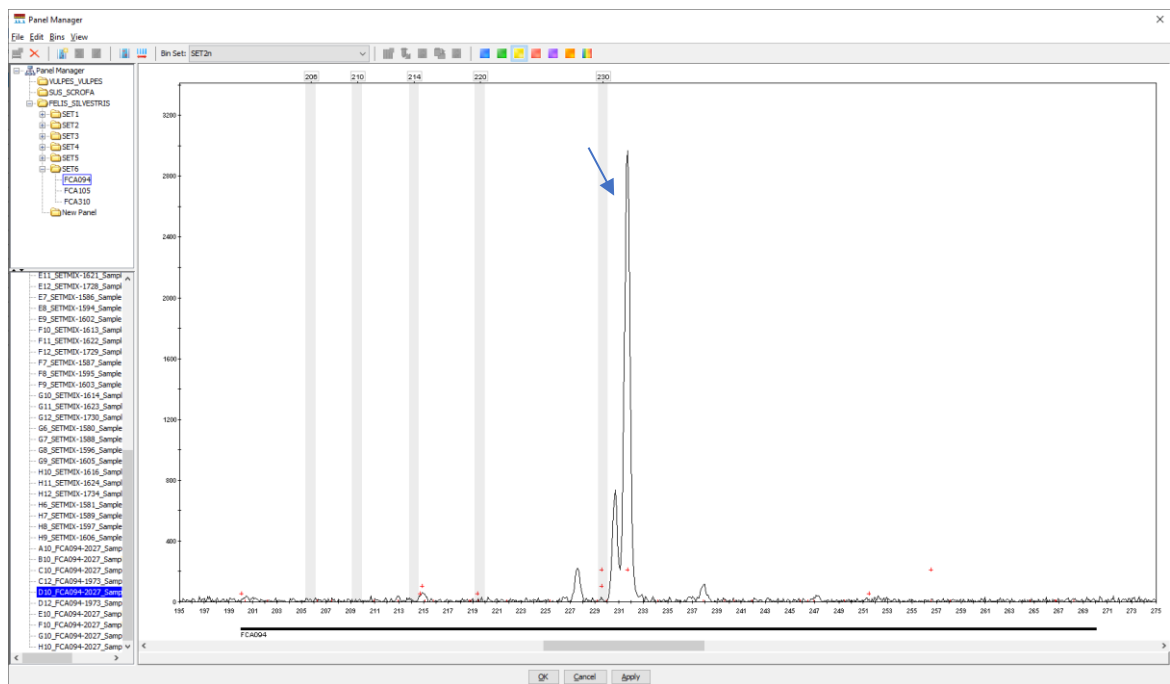
Slika 6: Vizualizacija alelov na lokusu FCA094 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 53,4 °C

Enako kot pri sliki 5, kjer smo vizualizirali PCR produkte pri temperaturi prileganja 52,3 °C, lahko tudi pri temperaturi prileganja 53,4 °C na sliki 6 vidimo pomnožene neželene produkte, ki se kažejo kot nespecifično pomnoženi fragmenti DNA, označeni z rdečimi puščicami. Iz tega lahko sklepamo tudi za temperaturo prileganja 53,4 °C, da je prenizka za pomnoževanje lokusa FCA094.



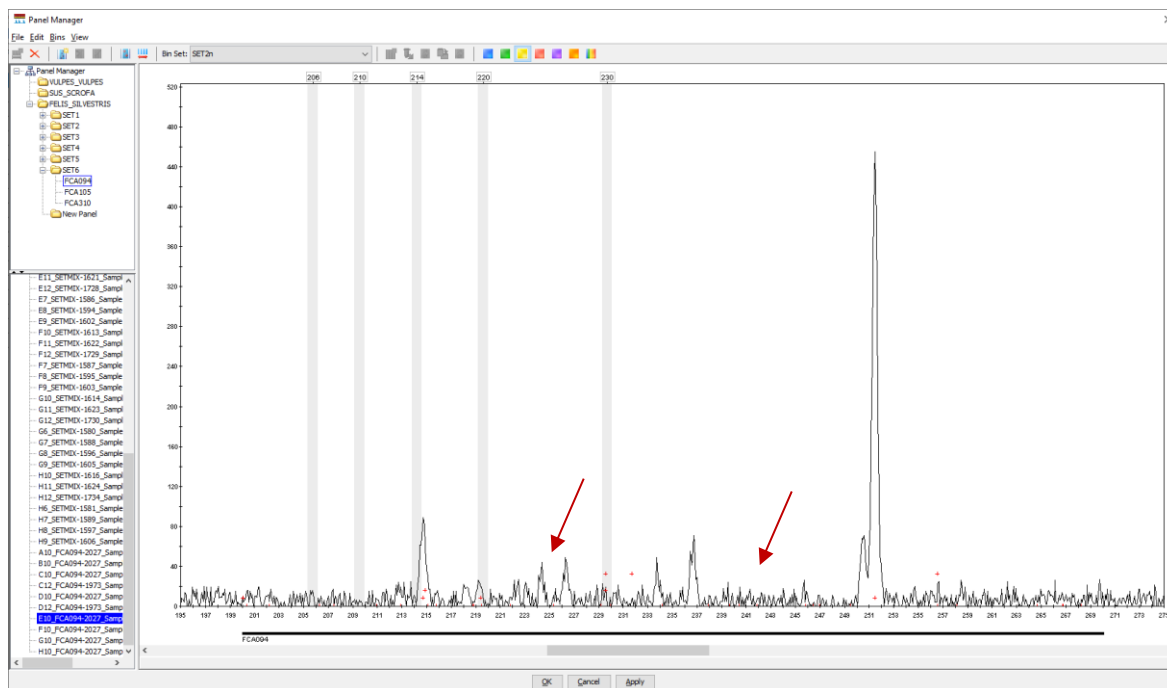
Slika 7: Vizualizacija alelov na lokusu FCA094 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 54,4 °C

S slike 7 lahko razberemo, da je temperatura prileganja 54,4 °C za lokus FCA094, enako kot pri temperaturah 52,3 °C in 53,4 °C, prenizka. Na sliki vidimo, da so prevladovali nespecifično pomnoženi fragmenti DNA, produkta mikrosatelitnega lokusa pa ni bilo.



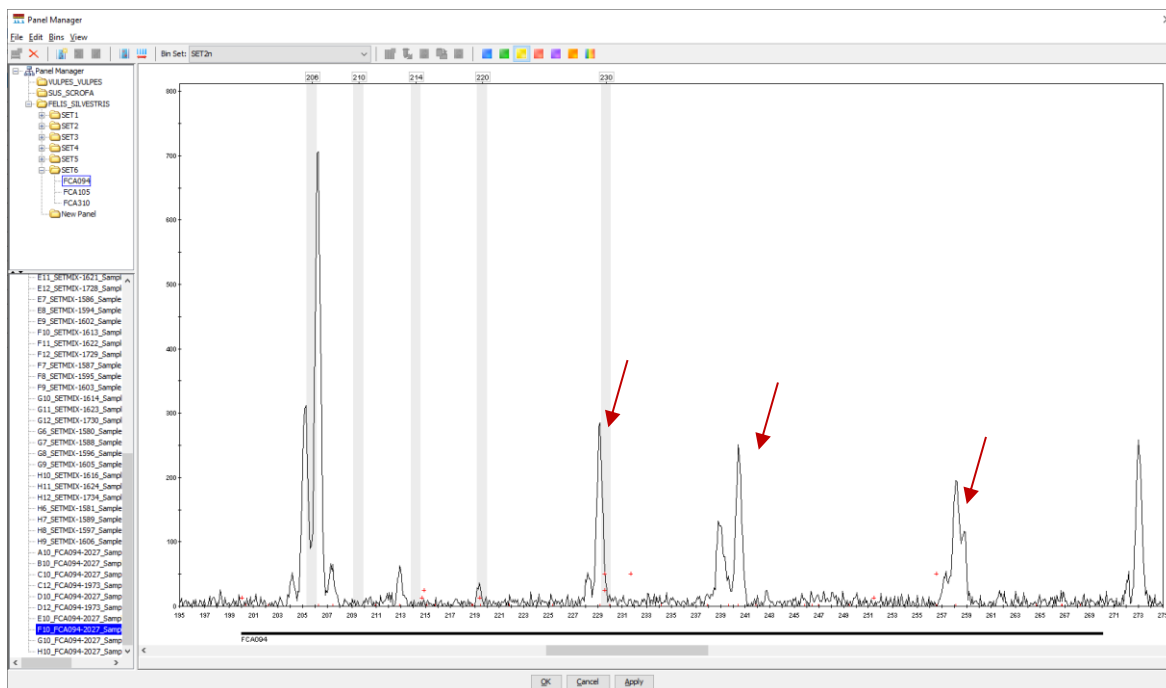
Slika 8: Vizualizacija alelov na lokusu FCA094 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 55,4 °C

Slika prikazuje alele pomnoženega lokusa FCA094 pri temperaturi prileganja 55,4 °C. Vidimo, da je pri tej temperaturi zmanjšano nespecifično pomnoževanje fragmentov DNA. Razberemo lahko pozicijo alela (označen je z modro puščico). Lahko določimo, da je homozigoten, ker ima samo en vrh. V nasprotnem primeru, če bi bil heterozigoten, bi se pojavila na grafu dva taka vrhova na različnih pozicijah lokusa.



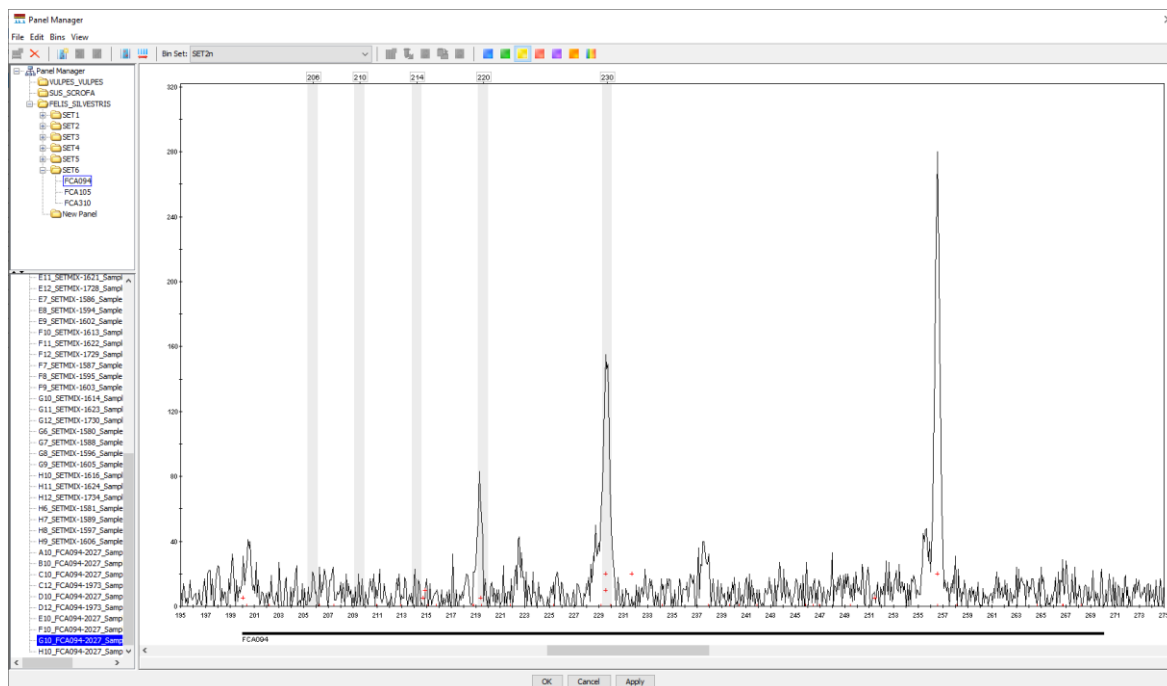
Slika 9: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa FCA094 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 56,6 °C

Na sliki 9 lahko vidimo pomnožen lokus FCA094 pri temperaturi prileganja 56,6 °C, kjer lahko opazimo veliko nespecifičnih pomnoženih fragmentov (označeni so z rdečimi puščicami) zaradi pomnoževanja neželenih produktov v PCR reakciji, kot tudi močno zamaknjen lokus. Sklepamo lahko, da je temperatura prileganja previsoka za pomnoževanje lokusa, ker pride do nespecifične vezave začetnih oligonukleotidov.



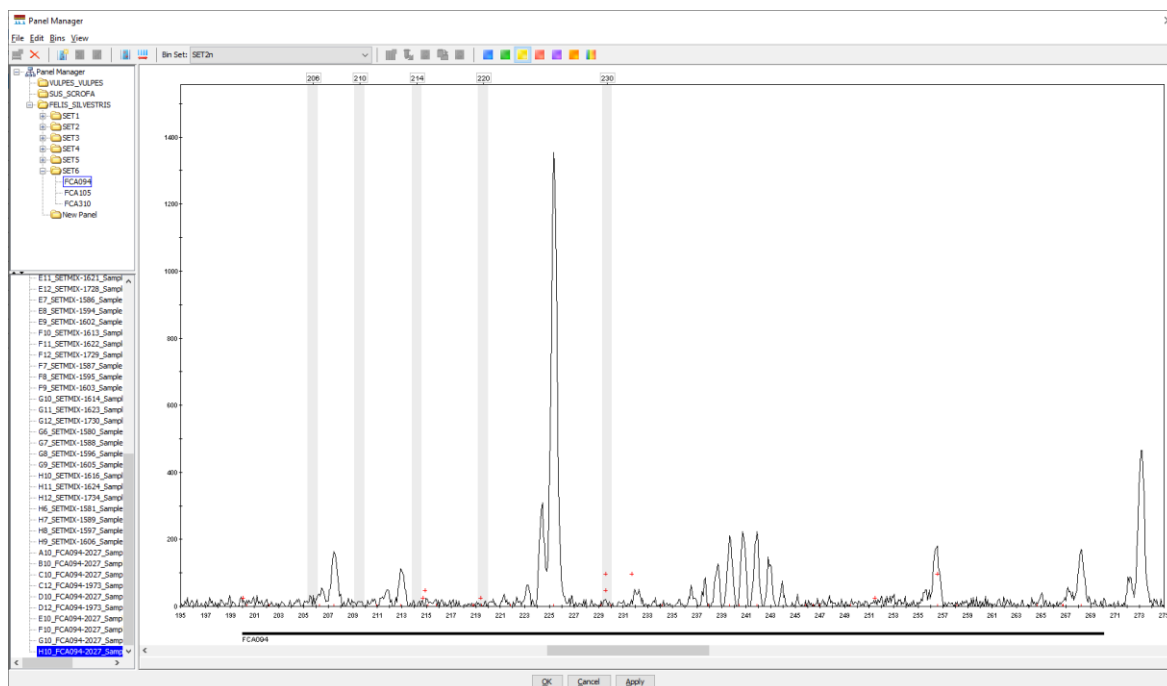
Slika 10: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa FCA094 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 57,7 °C

S slike 10 lahko razberemo pomnožen lokus FCA094 pri temperaturi prileganja 57,7 °C. Vidimo lahko enako kot pri sliki 9 veliko nespecifičnih pomnoženih fragmentov (označeni so z rdečo) in nekoliko zamaknjen lokus, zato lahko potrdimo, da niti ta temperatura prileganja ni ustrezna za pomnoževanje lokusa.



Slika 11: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa FCA094 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 58,7 °C

Pri temperaturi prileganja 58,7 °C za pomnoževanje lokusa FCA094 lahko tudi vizualiziramo veliko nespecifičnih produktov in zamaknjeno pozicijo lokusa, zato niti ta temperatura prileganja ni primerna.



Slika 12: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa FCA094 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 59,4 °C

Pri zadnjem poskusu temperature prileganja začetnih oligonukleotidov 59,4 °C smo prav tako ugotovili, da pomnoževanje lokusa FCA094 ni bilo uspešno, in to zaradi nespecifičnih fragmentov in zamaknjenege lokusa iz najverjetnejše pozicije.

Na podlagi rezultatov vizualizacije s programom GeneMapper in izračuna temperature prileganja smo ugotovili, da visoke temperature prileganja nad 56 °C niso dale dobrih rezultatov pri pomnoževanju lokusa FCA094, kot tudi nižje od 55 °C. Za lokus FCA094 smo določili optimalno temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov pri 55,4 °C.

3.4 Diskusija

Iz tkivnih vzorcev divje in domače mačke smo z metodo izolacije DNA to izolirali in analizirali koncentracijo DNA. Ugotovili smo, da so v rezultatih med starejšimi in novejšimi vzorci nastale razlike, razlogov za to pa je lahko več. Tkivni vzorci so biološki material, bogat s snovmi (npr. proteini, lipidi, ogljikovi hidrati, elementi v sledih, voda), ki izpolnjujejo vse pogoje za rast mikroorganizmov, njihova rast in sekundarni metaboliti pa izjemno pospešijo proces degradacije (Dash in Das 2017). Poleg encimske in bakterijske razgradnje dednega materiala lahko pride do kemične oksidacije, posledično nato do poškodb nukleotidnih baz, kar vodi v degradacijo DNA. Oksidacija najbolj prizadene vodikove dvojne in trojne vezi med C atomi purinov in pirimidinov, kar vodi v fragmentacijo obročev in modifikacijo baz. Baze gvanina (G) najbolj prizadenejo oksidanti, ker imajo najnižji oksidacijski (redoks) potencial od vseh štirih baz (McCord 2011).

Vsi vzorci iz preglednice 7 so bistveno starejši od vzorcev iz preglednice 8, na vpliv časa shranjevanja na ohranjenost DNA nam nakazujejo rezultati izmerjenih koncentracij in statistične analize. Tkiva treh vzorcev iz prve skupine (LME1728, LME1742, LME1754) so bila izjemno razgrajena (predvidevamo, da je bilo tkivo odvzeto na kadavru), kar je najverjetneje vplivalo tudi na degradacijo DNA in posledično na nižjo koncentracijo DNA. Naši rezultati nakazujejo, da se degradacija DNA lahko povečuje s starostjo vzorcev; višja kot je starost, večja je tudi količina degradirane DNA, vendar je pri tem izrednega pomena omeniti, da pravilno shranjevanje vzorcev, kot navajajo tudi avtorji Butler (2011), Dash in Das (2017), lahko prepreči hitro razgrajevanje molekule DNA. Saj pravilno shranjevanje zagotavlja manjše možnosti za bakterijsko kontaminacijo in nasploh degradacijo DNA zaradi bakterijske razgradnje, oksidativnih faktorjev okolja ali hidrolitične cepitve baz, če vzorci pridejo v stik z vodo. Praviloma je treba vzorce shranjevati na mrzlem in suhem (v epruvetah na -80 °C) in z njimi rokovati le v zaščitni opremi s sterilnimi pripomočki na sterilnih površinah.

Z dobljenimi rezultati smo potrdili domnevo, da je koncentracija izolirane DNA odvisna od ohranjenosti in starosti tkiva. Izjemno pomembno je, da pri izolaciji zagotovimo zadostno visoko koncentracijo kakovostne DNA, kajti ta vpliva na vse nadaljnje genetske analize, med drugim tudi na PCR reakcijo (Cankar in sod. 2006).

Pri PCR reakciji smo prvotno uporabili 6 mešanic začetnih oligonukleotidov, kot je prikazano v preglednici 1. Čeprav smo poskušali optimizirati PCR reakcijo z določanjem optimalne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov, se je pri lokusu FCA094 še vedno pomnožilo veliko število nespecifičnih produktov. Zato smo lokus kasneje iz raziskave izključili.

Napak pri PCR metodi je lahko več. Lahko so to individualne napake pri samem delu protokola, vendar je to bolj redko. Zaradi nenatančnosti pri delu, enako kot pri sami izolaciji DNA, lahko posledično pride do kontaminacije vzorcev s tujo DNA, kar povzroči pomnoževanje neželenih produktov in ne prinese dobrih rezultatov pomnoževanja lokusa. Pri nekaterih vzorcih je bilo pomnoževanje uspešno v prvem poskusu, za nekatere vzorce smo pa morali pomnoževanje s PCR metodo ponoviti, kar pa ni vedno dalo rezultatov, zato lahko možnost napak pri delu izključimo. Poleg lastnih napak lahko na specifičnost PCR reakcije vplivajo tudi inhibitorji, tj. različne anorganske in organske kemijske spojine. Največ znanih inhibitorjev so organske snovi, kot npr. različne organske kisline, proteini, fenoli, polisaharidi in nukleaze, najbolj znan anorganski inhibitor pa so kalcijevi ioni. V stik z vzorcem lahko pridejo že pri sami metodi izolacije DNA. Prileganje začetnih oligonukleotidov lahko motijo inhibitorji, zato se določeni fragmenti neuspešno pomnožijo (Schrader in sod. 2012). To se lahko kaže tudi kot nespecifični produkti, kot primer na sliki 9, tu so označeni z rdečimi puščicami. Enako kot inhibitorji tudi degradirana DNA vpliva na uspešnost pomnoževanja in se zaradi nespecifične vezave začetnih oligonukleotidov lahko v programu kaže kot krajši ali manjkajoči fragmenti.

Specifičnost prileganja začetnih oligonukleotidov na komplementarno mesto pa je odvisna predvsem od temperature prileganja (Ishii in Fukui 2001; McPherson in Møller 2006; Sint in sod. 2012). Poleg pomnoževanja nespecifičnih produktov je lokus FCA094 pri temperaturah prileganja, nižjih od 55 °C, tudi zamaknjen (slika 5, 6 in 7), zato lahko na podlagi tega sklepamo, da je temperatura prileganja prenizka. Nižja kot je temperatura prileganja, več možnosti je za neujemanje začetnih nukleotidov s komplementarno matrico DNA (angl. *primer mismatch*) in za pomnoževanje nespecifičnih produktov (McPherson in Møller 2006). Vzrok nespecifičnih produktov pri prenizkih temperaturah prileganja je lahko tudi nepopolna denaturacija fragmentov. Nespecifično pomnoževanje fragmentov je lahko odvisno tudi od koncentracije začetnih oligonukleotidov, tarčne in netarčne DNA.

Nespecifično pomnoženi fragmenti so lahko krajši, če pride do medsebojne nespecifične vezave dveh začetnih oligonukleotidov na 3' konec, ali daljši v primeru netarčnih sekvenc, ki jih sestavljajo dodatne sekvence, ki se ne ujemajo oziroma le delno (Ruiz-Villalba in sod. 2017).

Pri temperaturah prileganja nad 56 °C lahko tudi vidimo nespecifično pomnožene fragmente in zamaknjenost lokusa FCA094 (slika 9, 10, 11, 12). Iz tega lahko sklepamo, da so temperature prileganja nad 56 °C previsoke za pomnoževanje lokusa FCA094. Pri previsokih temperaturah prileganja lahko nastanejo hibridne DNA molekule, ki so posledica rekombinacije homolognih smernih in protismernih sekvenc začetnih oligonukleotidov med prvimi cikli PCR reakcije, ki se nato pomnožijo in kažejo kot nespecifični produkti (Ruiz-Villalba in sod. 2017). Pri previsokih temperaturah prileganja se začetni oligonukleotidi prav tako nespecifično vežejo na napačno mesto na matrični DNA in se nato pri previsoki temperaturi deloma ali v celoti denaturirajo, posledično se pomnožijo nespecifični produkti ali pa produkta celo ni (McPherson in Møller 2006).

Z dobljenimi rezultati lahko potrdimo tudi drugo zastavljeno hipotezo, ki trdi, da je optimizacija PCR reakcije med drugim odvisna od temperature prileganja začetnih oligonukleotidov. To je pomemben parameter pri PCR reakciji za molekularne in genetske raziskave.

3.5 Nadaljnje genetske analize

Podatke, ki smo jih pridobili z genotipizacijo mikrosatelitnih lokusov, lahko uporabimo za nadaljnje analize pri metodah F-statistike, ki vključuje izračune opažene (H_o) in pričakovane (H_e) heterozigotnosti, Hardy-Weinbergovega ravnotežja, števila oziroma bogastva alelov (A) in treh fiksacijskih indeksov, med katere spadajo koeficient "inbreedinga" oziroma križanja v ožjem sorodstvu (F_{IS}), koeficient sorodstva med posamezniki glede na celotno populacijo (F_{IT}), ki je razmerje med individualnim in populacijskim koeficientom parjenja v sorodstvu, in koeficient sorodstva med subpopulacijami glede na celotno populacijo (F_{ST}), ki nam pokaže genetsko razdaljo med populacijami. S tem lahko določimo genetsko variabilnost in populacijsko strukturo. Genetska razdalja je prav tako pomembna za primerjavo med vrstami ali populacijami, je mera genetske diferenciacije v frekvencah alelov med populacijama in se izračuna na podlagi števila alelnih mutacij na preučevanem odseku DNA, ki so se zgodile po ločitvi primerjalnih vrst ali populacij. Nižja kot je genetska razdalja, večja je genetska povezanost vrst, in obratno. Analizo podatkov se lahko opravi v programih Genepop, Genetix in Structure.

V nadaljevanju lahko rezultate mikrosatelitskih lokusov uporabimo za analizo stopnje hibridizacije med vrstami. Hibridizacija na primeru divje in domače mačke je velik problem z vidika ohranjanja vrst. V prejšnjih študijah o hibridizaciji (Hertwig in sod. 2009; Eckert in sod. 2009; Steyer in sod. 2017) so z analizo na SNP-je v večini primerov prišli do podobnih ugotovitev (nizke stopnje hibridizacije v centralni Evropi) kot pri predhodnih analizah z mikrosatelitskimi označevalci. Izjema je bila študija Hertwig in sod. (2009), ki poroča o visoki stopnji hibridizacije v Nemčiji (Eckert in sod. 2009; Steyer in sod. 2017). Steyer in sod. (2017) so sklepali, da je razlika v rezultatih problem zaradi zanašanja na podatke analiz mikrosatelitov. Tiesmeyer in sod. (2020) so z analizo SNP označevalcev (angl. *single nucleotide polymorphism*, polimorfizmi enojnega nukleotida) odkrili nove hibride v alpski regiji. Navajajo, da je večina prejšnjih študij bila omejena na manjša območja in premajhno število mikrosatelitskih markerjev, zato je prišlo pri primerjanju stopnje hibridizacije do različnih ugotovitev, tudi zaradi metodoloških omejitev in uporabe različnih genetskih označevalcev. Aplikacija SNP označevalcev bi lahko bila primernejša, kot navajajo Tiesmeyer in sod. (2020), ker so številčni in pogosti v genomu, kompatibilni z visoko zmogljivimi tehnologijami in statistično močni za razlikovanje domače in divje mačke ter hibridov. Ugotovili so, da se je za mikrosatelite izkazalo, da niso tako učinkovito razlikovali hibridnih razredov (Steyer in sod. 2017; Tiesmeyer in sod. 2020). Izrednega pomena je tudi aplikacija enotnih genetskih označevalcev za globlji vpogled v stopnjo hibridizacije po Evropi, za boljše spremljanje in varovanje evropske divje mačke, ki ji grozi izguba genetske integritete (Tiesmeyer in sod. 2020).

4 ZAKLJUČEK

V zaključni nalogi smo izolirali DNA iz 144 tkivnih vzorcev divje mačke in pomnožili določene lokuse s PCR reakcijo. Opravili smo analizo koncentracije izolirane DNA in ugotovili, da so statistično značilne razlike v koncentraciji DNA med starejšimi vzorci prve skupine, ki imajo nižje vrednosti, in novejšimi iz druge skupine, katerih vrednosti koncentracij so višje. Z dobljenimi rezultati analize koncentracije DNA smo potrdili, da je koncentracija izolirane DNA odvisna od ohranjenosti in starosti vzorca, ker se z nepravilnim rokovanjem in starostjo degradacija DNA povečuje.

Pri pomnoževanju DNA smo se osredotočili na optimizacijo PCR reakcije s spreminjanjem temperature prileganja začetnih oligonukleotidov za lokus FCA094. Uspeh PCR reakcije je v veliki meri odvisen od temperature prileganja začetnih oligonukleotidov. Na samo temperaturo prileganja vplivajo uporabljena Taq polimeraza, delež GC, dolžina sekvenc in koncentracija začetnih oligonukleotidov, kar je treba upoštevati pri teoretičnem izračunu talilne temperature. S teoretičnim izračunom smo prišli do optimalne temperature prileganja 55,2 °C, ki pa smo jo nato optimizirali s preizkušanjem od 5 °C nižje do 5 °C višje glede na

teoretično izračunano temperaturo (52,3–59,4 °C), in dosegli optimalno temperaturo prileganja za lokus FCA094, ki znaša 55,4 °C. Kljub temu pa smo zaradi veliko nespecifično pomnoženih produktov lokus zatem izključili iz raziskave.

5 LITERATURA IN VIRI

- [1] Abu Bakar M. A., Rovie-Ryan J. J., Ampeng A., Yaakop S., MD Nor S., MD Zain B. M. 2017. Optimisation of polymerase chain reaction conditions to amplify D-Loop region in the Malasyan mousedeer genomic DNA. *Malays. Appl. Biol.* 46(4): 63–71.
- [2] Beaumont M., Barratt E. M., Gottelli D., Kitchener A. C., Daniels M. J., Pritchard J. K., Bruford M. W. 2001. Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. *Molecular Ecology* 10: 319–336.
- [3] Beugin M.-P., Salvador O., Leblanc G., Queney G., Natoli E., Pontier D. 2019. *Ecology and Evolution* 00: 1–14.
- [4] Boopathi N. M. 2013. *Genetic Mapping and Marker Assisted selection*. New Delhi, Springer.
- [5] Butler J. M. 2011. *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. London, Academic Press, Elsevier Inc.
- [6] Butler J. M. 2012. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. London, Academic press, Elsevier Inc.
- [7] Cankar K., Štebih D., Dreo T., Žel J., Gruden K. 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology* 6: 37.
- [8] Dash H. R., Das S. 2017. Microbial Degradation of Forensic Samples of Biological Origin: Potential Threat to Human DNA Typing. *Molecular Biotechnology* (60): 141–153.
- [9] Driscoll C., Yamaguchi N., O'Brien S. J., Macdonald D.W. 2011. A Suite of Genetic Markers Useful in Assessing Wildcat (*Felis silvestris* ssp.) – Domestic Cat (*Felis silvestris catus*) Admixture. *Journal of Heredity* 102(S1): S87–S90.
- [10] Eckert I., Suchentrunk F., Markov G., Hartl G.B. 2009. Genetic diversity and integrity of German wildcat (*Felis silvestris*) populations as revealed by microsatellites, allozymes, and mitochondrial DNA sequences. *Mammalian biology* 75: 160–174.

- [11] Garibya L., Avashia N. 2013. Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology* (133).
- [12] Green M. R., Sambrook J. 2018. *The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Cold Spring Harbor Protocol (10).
- [13] Hartmann S. A., Steyer K., Kraus R. H. S., Segelbacher G., Nowak C. 2013. Potential barriers to gene flow in the endangered European wildcat (*Felis silvestris*). *Conservation Genetics* 14: 413–426.
- [14] Hertwig S. T., Schweizer M., Stepanow S., Jungnickel A., Böhle U.-R., Fischer M. S. 2009. Regionally high rates of hybridization and introgression in German wildcat populations (*Felis silvestris*, Carnivora, Felidae). *Zoological Systematics and Evolutionary Research* 47(3): 283–297.
- [15] Ishii K. in Fukui M. 2001. Optimization of Annealing Temperature To Reduce Bias v Caused by a Primer Mismatch in Multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67(8): 3753–3755.
- [16] Kalia R. K., Rai M. K., Kalia S., Singh R., Dhawan A.K. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309–334.
- [17] Kitchener A. C., Breitenmoser-Würsten Ch., Eizirik E., Gentry A., Werdelin L., Wilting A., Yamaguchi N., Abramov A. V., Christiansen P., Driscoll C., Duckworth J. W., Johnson W., Luo S.-J., Meijaard E., O'Donoghue P., Sanderson J., Seymour K., Bruford M., Groves C., Hoffman M., Noewll K., Timmons Z., Tobe S. 2017. A revised taxonomy of the Felidae. The final report of the Cat Classification Task force of the IUCN/SSC Cat Specialist group. *Cat News Special Issue* 11.
- [18] Kramer M. F. in Coen D. M. 2006. Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. *Current Protocols in Cytometry*: 1–15.
- [19] Lecis R., Pierpaoli M., Birò Z. S., Szemethy L., Ragni B., Vercillo F., Randi E. 2006. *Molecular Ecology* 15: 119–131.
- [20] Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu C.-Y., Kim Y. H. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* (62).

- [21] Lorenz T. C. 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments* 22 (63).
- [22] Mattucci F., Oliveira R., Bizzarri L., Vercillo F., Anile S., Ragni B., Lapini L., Sforzi A., Alves P. C., Lyons L. A., Randi E. 2013. Genetic structure of wildcat (*Felis silvestris*) populations in Italy. *Ecology and evolution* 3(8): 2443–2458.
- [23] McCord B R. in Buel E. 2013. Capillary Electrophoresis in Forensic Genetics. *Encyclopedia of Forensic Sciences* 2: 394–401.
- [24] McCord B., Opel K., Funes M., Zoppis S., Jantz L. M. 2011. An Investigation of the Effect of DNA Degradation and Inhibition on PCR Amplification of Single Source and Mixed Forensic samples. National Institute of Justice.
- [25] McPherson in Møller. 2006. PCR. Second Edition. Abingdon, Taylor & Francis Group.
- [26] Oliveira R., Godinho R., Randi E., Ferrand N., Alves P. C. 2008. Molecular analysis of hybridisation between wild and domestic cats (*Felis silvestris*) in Portugal: implications for conservation. *Conservation Genetics* 9: 1–11.
- [27] Oliviera R., Randi E., Mattucci F., Kurushima J. D., Lyons L. A., Alves P.C. 2015. Toward a genome-wide approach for detecting hybrids: informative SNPs to detect introgression between domestic cats and European wildcats (*Felis silvestris*). *Heredity*: 1–11.
- [28] Petit R. J., El Mousadik A., Pons O. 1998. Identifying Populations for Conservation on the Basis of Genetic Markers. *Conservation Biology* 12(4): 844–855.
- [29] Porta A. R., Enners E. 2020. Determining Annealing Temperatures for Polymerase Chain Reaction. *The American Biology Teacher* 74(4): 256–260.
- [30] Potočnik H. 2008. Ekološke značilnosti in ogroženost divje mačke (*Felis silvestris*) v Sloveniji. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani.
- [31] Rahman MT, Uddin MS, Sultana R., Moue A., Setu M. 2013. Polymerase Chain Reaction (PCR): A short review. *AKMMC J* 4(1): 30–36.

[32] Ruiz-Villalba A., van Pelt-Verkuil E., Gunst Q. D., Ruijter J. M., van den Hoff M. JB. 2017. Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reaction (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification* 14: 7–18.

[33] Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239(4839): 487–491.

[34] Say L., Devillard S., Léger F., Pontier D., Ruetten S. 2011. Distribution and spatial genetic structure of European wildcat in France. *Animal Conservation* 15: 18–27.

[35] Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R. 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* 113: 1014–1026.

[36] Sint D., Raso L., Traugott M. 2012. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution* (3): 898–905.

[37] Steyer K., Tiesmeyer A., Muñoz-Fuentes V., Nowak C. 2017. Low rates of hybridization between European wildcats and domestic cats in a human-dominated landscape. *Ecology and Evolution* 8: 2290–2304.

[38] Tiesmeyer A., Ramos L., Lucas J.M., Steyer K., Alves P. C., Astaras C., Brix M., Cragnolini M., Domokos C., Hegyeli Z., Janssen R., Kitchener A.C., Lambinet C., Mestdagh X., Migli D., Monterosso D., Mulder J. L., Schockert V., Youlatos D., Pfenninger M., Nowak C. 2020. Range-wide patterns of human-mediated hybridisation in European wildcats. *Conservation genetics* 21: 247–260.

[39] Uredba o zavarovanih prostoživečih vrstah (neuradno prečiščeno besedilo št. 10). 2004. (Uradni list RS, št. 46/04, 109/04, 84/05, 115/07, 32/08 – odl. US, 96/08, 36/09, 102/11, 15/14, 64/16 in 62/19).

[40] Waters D. L. E., Shapter F. M. 2014. *The Polymerase Chain Reaction (PCR): General Methods*. V: Henry R. J., Furtado A. *Cereal Genomics, Methods and Protocols, Methods in Molecular biology* (1099).

[41] Yamaguchi N., Kitchener A., Driscoll C., Nussberger B. 2015. *Felis silvestris*, wild cat. The IUCN Red List of Threatened Species.