



Sveučilište u Zagrebu

Agronomski fakultet



**PRIRUČNIK ZA MOLEKULARNU GENETIKU
DOMAĆIH ŽIVOTINJA**

Doc. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik

travanj, 2014.

Izdavač

Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zavod za opće stočarstvo

<http://www.agr.unizg.hr>

Recezeni

Prof. dr. sc. Igor Štoković

Prof. dr. sc. Snježana Bolarić

Urednik

Izv. prof. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik

Tehnički urednik

Izv. prof. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik

CIP – Katalogizacija u publikaciji

Centralna agronomska knjižnica – Zagreb

Priručnik za molekularnu genetiku domaćih životinja / Autor Vlatka Čubrić Čurik – Zagreb:
Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 2014.

ISBN 978-953-7878-76-4

Odlukom (klasa 602-09/14-02/05, ur.broj 251-71-01-14-5) odobren kao priručnik Sveučilišta u
Zagrebu Agronomskog fakulteta

Priručnik za studente I. semestra diplomskog studija Genetika i oplemenjivanje
životinja za modul Molekularna genetika životinja

Sadržaj:

1. Uvod	1
2. Općenito o raznolikosti	2
3. Rekombinirajući molekularni biljezi	6
3.1. Alocizmi	6
3.2. Mikrosateliti (oblik VNTR)	8
3.3. Minisateliti (oblik VNTR)	12
3.4. Restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR)	14
3.5. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	16
3.6. Amplified fragment length polymorphism (AFLP)	19
3.7. Single-strand conformation polymorphism (SSCP)	22
3.8. Single nucleotide polymorphism (SNP)	24
4. Ne-rekombinirajući molekularni biljezi	26
4.1. Mitohondrijska DNA (mtDNA)	26
4.2. Paternalno naslijeđeni nuklearni geni	30
5. DNA (PCR) – određivanje nukleotidnog slijeda Sangerovom metodom	35
6. Ekstrakcija genomske DNA animalnog podrijetla	39
7. Elektroforeza	43
8. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	48
9. Vježbe	52
10. Prilog – Struktura seminarskog rada	56
11. Literatura	6

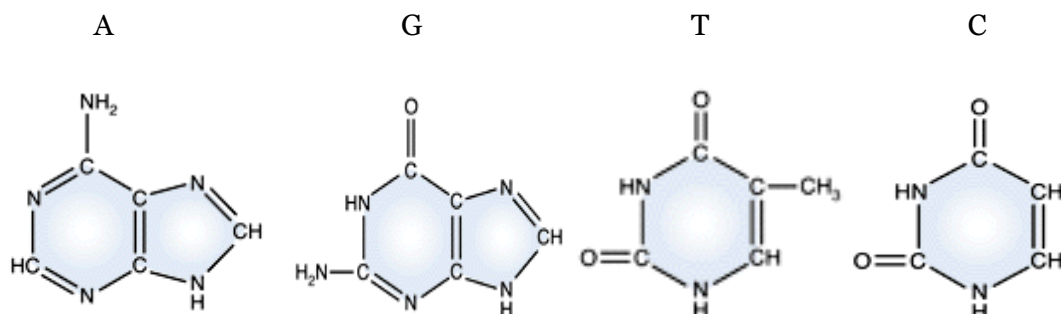
1. Uvod

Saznanja o tome što je to nasljedni materijal i čemu služi DNA (deoksiribonukleinska kiselina) studenti bi trebali dobiti na dodiplomskom studiju u sklopu modula Biokemije i Genetike. Ovdje ćemo ukratko ponoviti strukturu molekule DNA kao i osnovne pojmove vezano uz molekulu DNA u cilju daljnjeg praćenja nastave.

DNA je jedna od najvećih organskih molekula, smjestila se u stanicama svih živih bića gdje se nalazi na kromosomima. DNA je izvor informacija o jedinki koju proučavamo, ali daje nam i podatke o njezinoj prošlosti, podrijetlu vrste, srodnosti sa ostalim jedinkama te razvoju i bolestima. Dakle to je molekula koja sadrži nasljednu informaciju potrebnu za život svih organizama. Nasljedna informacija DNA molekule nalazi se u genima, a ostali njezini dijelovi imaju strukturnu i regulacijsku ulogu.

DNA je nasljedna tvar koja ima nekoliko obilježja:

1. dvostruka uzvojnica, helične strukture
2. negativno je nabijena, cijepa se pomoću restrikcijskih endonukleaza
3. DNA je dvolančana molekula od dva komplementarna lanca, koja se na visokoj temperaturi denaturira (razdvajaju se lanci), a na nižoj se ponovo može re-naturirati (spajaju se komplementarni lanci)
4. građena je od nukleotida: fosfata i šećera (deoksiriboze) i dušične baze (timin, adenin, gvanin, citozin)



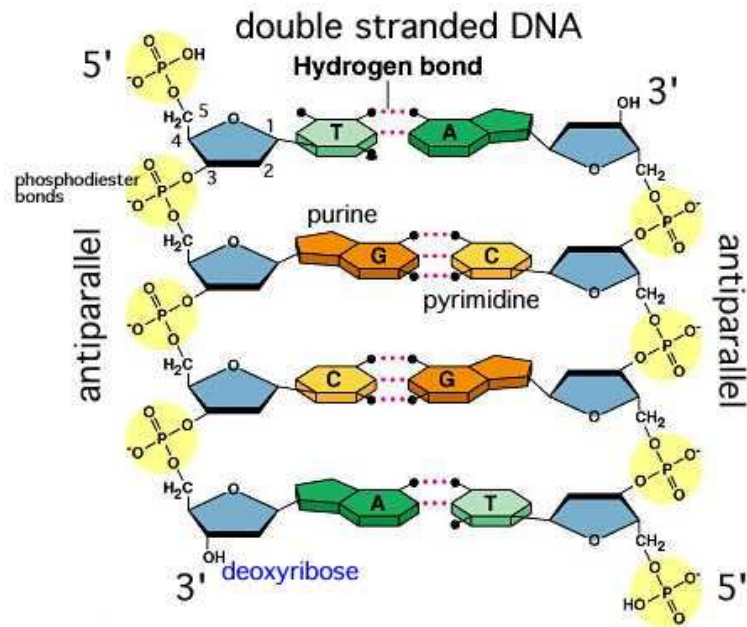
Slika 1. Nukleotidi: adenin, gvanin, timin, citozin

Nukleotidi (Slika 1) kao osnovna građevna jedinica DNA molekule tvore lanac, a dva takva lanca povezana su vodikovim vezama preko dušičnih baza i tvore dvostruku uzvojnica.

Nukleotidi se dijele na:

1. purine (adenin i gvanin)
2. pirimidine (citozin, timin i uracil kod RNA)

Također nukleotidne baze su vezane dvostrukim i trostrukim vodikovim vezama (Slika 2).

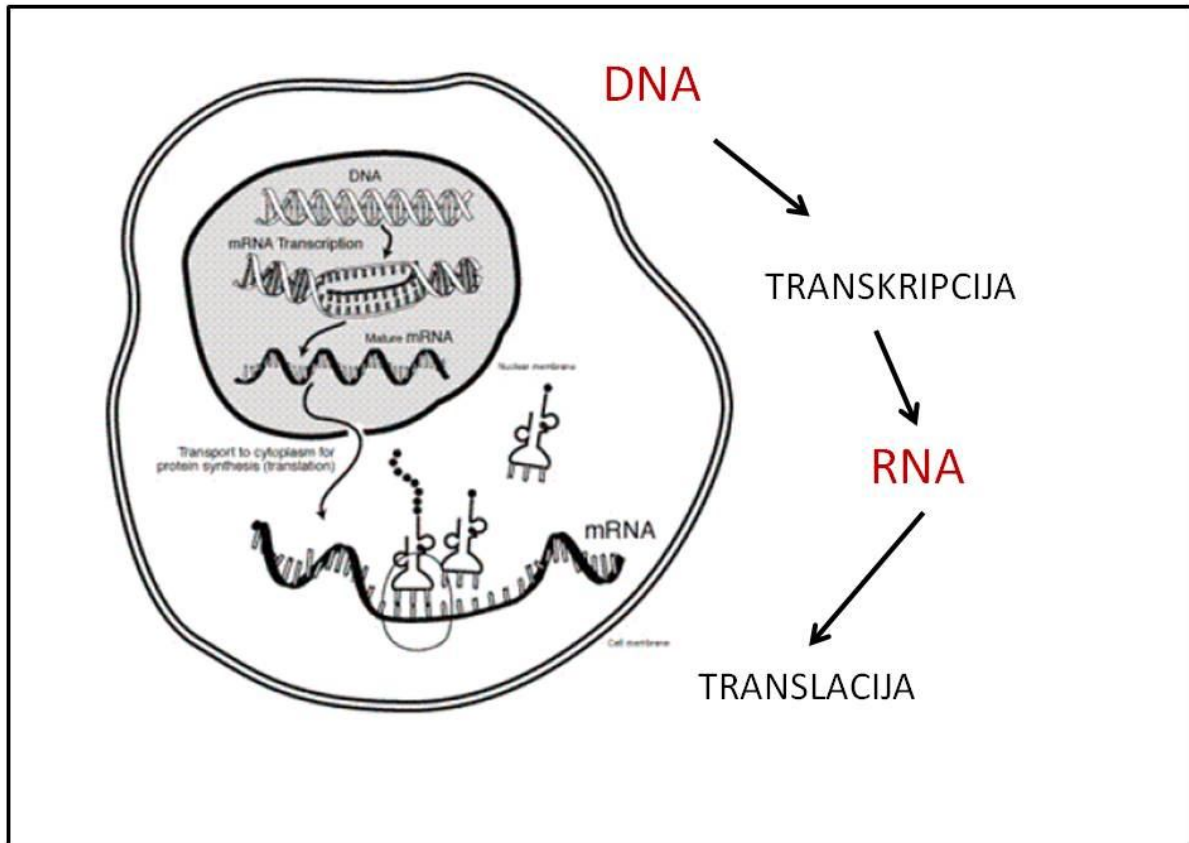


Slika 2. Nukleotidne baze vezane dvostrukim i trostrukim vodikovim vezama.

Izvor: <http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/molecular%20biology/dna-structure.html>

Također je važno napomenuti da postoji centralna dogma molekularne biologije (Slika 3) koja govori o tome da se reduplikacijom DNA stvara lanac mRNA, a to je proces transkripcije te da potom procesom translacije na ribosomima nastaju proteini.

Centralna dogma je princip za razumijevanje prijenosa informacija putem biopolimera kod svih živih organizama.



Slika 3. Centralna dogma molekularne biologije

Izvor: Chapter 1: The dynamic cell of molecular cell biology. *Illustration adapted from the National Human Genome Research Institute (NHGRI)*

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Modules/MolBioReview/central_dogma.htm

1

2. Općenito o raznolikosti

Bioraznolikost je raznolikost između živih organizama. Ona uključuje raznolikost unutar vrste, genetičku raznolikost, raznolikost između vrsta i raznolikost ekosustava.

Genetička raznolikost, kao dio bioraznolikosti, mjera je genetičke varijabilnosti prisutne u populaciji, kao posljedica evolucije.

Gubitak genetičke raznolikosti dovodi u pitanje adaptivni potencijal kao i opstanak vrste!

Genetička raznolikost (unutar populacije ili vrste) može se promatrati na tri razine:

- (a) unutar uzgajanih populacija,
- (b) između uzgajanih populacija i
- (c) unutar vrste.

Genetička varijabilnost (naš pristup) može biti dalje podijeljena na fenotipsku varijabilnost i varijabilnost molekularnih biljega.

Stoga, fenotipsku varijabilnost i varijabilnost molekularnih biljega (razlike) možemo smatrati mjernim jedinicama genetičke varijabilnosti (genetička bioraznolikost).

Fenotipska varijabilnost je razlika u karakteristikama jedinki vezano uz unutarnje i vanjske faktore.

Varijabilnost molekularnih biljega

Molekularni biljeg je dio DNA, fizički smješten na kromosomu čije se nasljeđe može pratiti.

Biljeg može biti gen, ili dio DNA sa nepoznatom funkcijom ili samo jedan bazni par.

Molekularni biljezi imaju jedinstvena genetička svojstva i metodološke prednosti koje ih čine korisnijim i pogodnijim za genetičke analize u odnosu na druge genetičke biljege.

U analizama genetičke varijabilnosti domaćih životinja koriste se mnogi rekombinirajući i nerekombinirajuću molekularni biljezi.

3. Rekombinirajući molekularni biljezi

3.1. Alozimi

Alozimi su kodominantne proteinske varijante (aleli), a kodiraju ih strukturalni geni (enzimi u užem smislu riječi). Alozime (Slika 4) kodiraju različiti aleli istog lokusa. Kao i drugi proteini, alozimi se sastoje od aminokiselina, a neke od njih su negativno nabijene.

Tako da alozimi imaju naboj, ovisno o aminokiselinskom sastavu proteina.

Ako dođe do mutacije, odnosno do promjene aminokiseline, naboj proteina se može promijeniti.

Promjena električnog naboja utječe na stopu migracije proteina u električnom polju.

Alelne varijante mogu biti identificirane pomoću gel-elektroforeze i adekvatnog bojanja.

Analitička procedura:

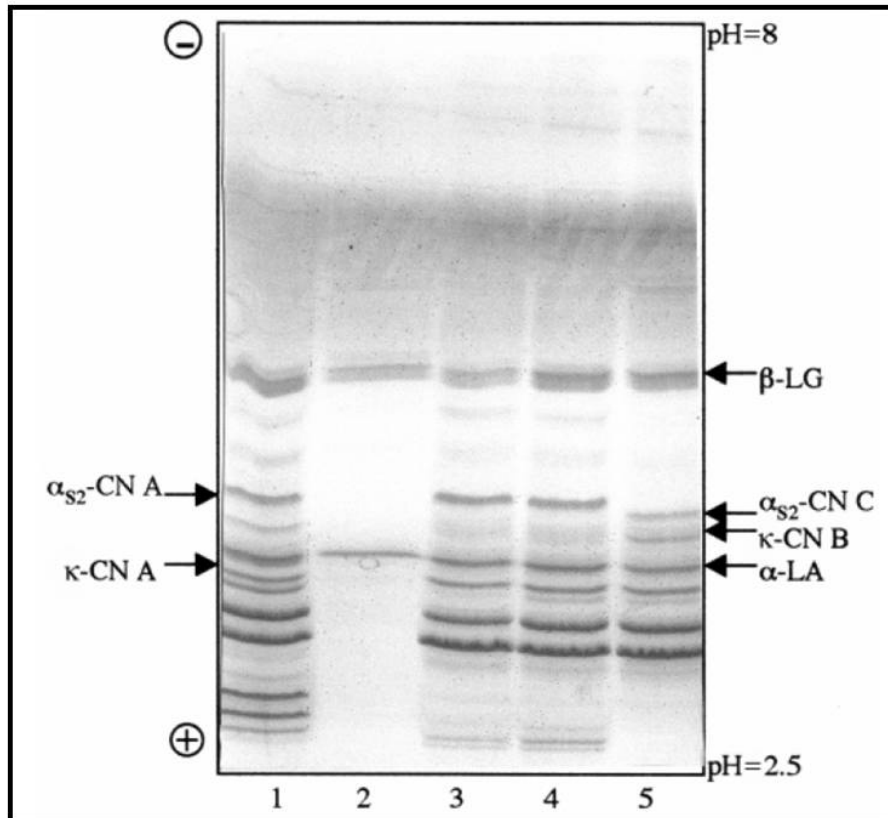
- priprema tkivnog homogenata
- razdvajanje polimorfizama putem poliakrilamidne gel elektroforeze
- vizualizacija polimorfizama putem specifičnih enzimatskih bojanja

Prednosti:

- nije potrebna ekstrakcija DNA
- nisu potrebne početnice ili probe
- brza i lako izvediva metoda
- niski troškovi
- zimogrami se mogu interpretirati na razini lokusa i alela

- kodominatni aleli

- visoka obnovljivost



Slika 4. Izoelektrično fokusiranje, IEF (pH gradijent 2.5–8) 4 individualna uzorka mlijeka od Verzaschese koza. Linije 1 i 5: κ -CN AB; linije 3 i 4 κ -CN AA. Linija 2: sirutka iz kozjeg mlijeka.

Nedostatci:

- niska zastupljenost

- niska razina polimorfizama

- zimogrami ponekad teški za interpretiranje zbog kompleksnih fragmenata kod poliploidije ili dupliciranih gena pa se stvaraju heterodimeri između gena.

- proteini s identičnom elektroforetskom pokretljivošću (ko-migracije)

- selektivna neutralnost upitna

3.2. Mikrosateliti

Mikrosateliti su kratka uzastopna ponavljanja (Tablica 1), obično imaju različiti broj ponavljanja od 2-5 nukleotida (npr. AC_n).

Različiti broj ponavljanja rezultira različitom duljinom alela (npr. dinukleotidi, tetranukleotidi).

Polimorfizam mikrosatelita uzrokovan je pojavom replikacijskog proklizavanja (engl. replication slippage) gdje dolaze do izrezivanja ili dodavanja ponavljanja. To je posljedica toga što polimeraza pri prepisivanju griješi.

Budući je replikacijsko proklizavanje učestalije od točkastih mutacija, mikrosatelitni lokusi su hipervarijabilni.

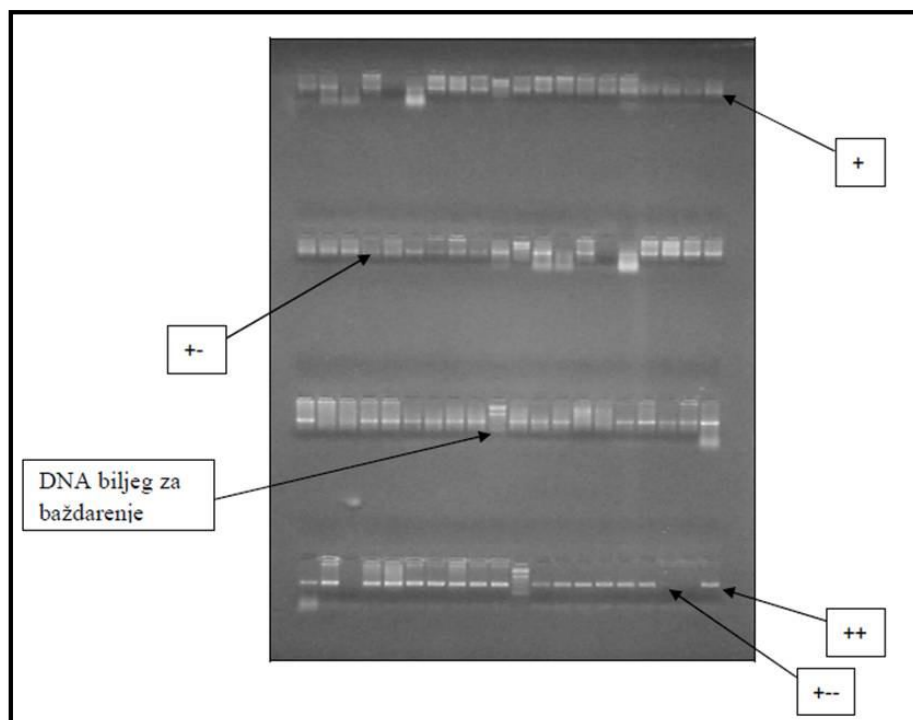
Mikrosatelite su prvotno proučavali i opisali njihovo naslijeđivanje Tautz (1989). te Weber (1989).

Analitička procedura:

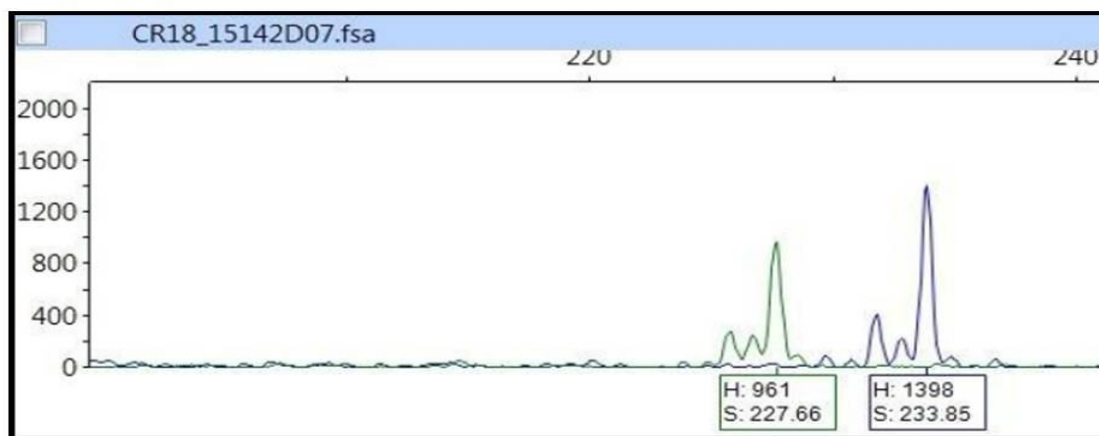
- ekstrakcija DNA
- amplifikacija DNA fragmenata pomoću lančane reakcije polimerazom
- odvajanje polimorfizama putem poliakrilamidne ili agarozne gel elektroforeze (Slika 5)
- vizualizacija polimorfizama putem autoradiografije, srebrnog bojanja ili fluorescencije (poliakrilamidni gel), bojanjem etidij-bromidom i UV lampom (agarozni gel)

Tablica 1. Prikaz alela različitog broja ponavljanja u dinukleotidnom (alel 23 sa četiri *CT* ponavljanja i alel 27 sa šest *CT* ponavljanja) i trinukleotidnom (alel 30 sa pet *CTT* ponavljanja i alel 33 sa šest *CTT* ponavljanja) mikrosatelitnom lokusu. Uočite da duljinu mikrosatelita određuje ukupan broj nukleotida, kako iz početnica tako i iz ponavljanja.

Nukleotidni slijed	Duljina alela	Motiv ponavljanja
-CCAAGTAACTCTCTCTATGAACT-	23 bp (15 bp+8 bp)	-(<i>CT</i>) ₄
-CCAAGTAACTCTCTCTCTCTATGAACT-	27 bp (15 bp+12 bp)	-(<i>CT</i>) ₆
-CCAAGTAACTTCTTCTTCTTATGAACT-	30 bp (15 bp+15 bp)	-(<i>CTT</i>) ₅
-CCAAGTAACTTCTTCTTCTTCTTATGAACT-	33 bp (15 bp+18 bp)	-(<i>CTT</i>) ₆



Slika 5. DNA na agaroznom gelu gledana UV svijetlom.



Slika 6. Duljine alela na lokusima prezentirana elektroferogramom, nizom pikova koji predstavljaju različite alele: desni pik predstavlja alel lokusa YLI1 duljine 234, a lijevi pik predstavlja alel lokusa YLI2 duljine 228. Visine alela na elektroferogramu proporcionalne su količini PCR produkta.

Prednosti:

- potrebna mala količina DNA (10-100 ng /PCR)
- veliki broj mikrosatelita na genomu
- slučajna distribucija na genomu
- visoka razina polimorfizma
- fragmenti se interpretiraju na razini lokusa i alela
- kodominantni aleli

- duljina alela se determinira s visokom točnošću (1pb)
- visoka obnovljivost
- različiti mikrosateliti mogu se analizirati u višestrukim reakcijama
- široka primjena
- pogodni za automatsko određivanje putem sekvencera (Slika 6)

Nedostaci:

- visoki troškovi za dizajniranje početnica (ako se prvi put razvijaju)
- heterozigoti mogu biti proglašeni homozigotima ako se pojave nul-aleli (mutacija na početnici koja se hibridizira)
- određivanje polimorfizama može biti otežano zbog "stutter" (pratećih) pikova ili fragmenata (kao na slici 6)
- mutacijski model još nepoznat (infinitivni alelni model ili "stepwise" mutacijski model)
- zbog "forward" i "backward" mutacija te posljedično pojave homoplazije može se podcijeniti genetska varijabilnost

3.3. Minisateliti

Minisateliti su duži nukleotidni sljedovi (tipično 10 do 100 bp, ali obično oko 15 bp. npr. TAAGGGCCAATTTGG) što se onda uzastopno ponavlja puno puta.

Vremenom se ponavljanja smanjuju ili povećavaju.

Minisateliti su locirani na krajevima kromosoma i u regijama s visokim postotkom rekombinacija.

Hipervarijabilne minisatelitne regije proučavao je Thein (1985).

Analitička procedura:

- ekstrakcija DNA
- cijepanje DNA pomoću restrikcijskih endonukleaza
- razdvajanje fragmenata pomoću agarozne gel elektroforeze
- prijenos fragmenata na najlonski filter pomoću 'Southern blotting' metode
- hibridizacija fragmenata na radioaktivno označene minisatelitne probe
- vizualizacija polimorfizama pomoću autoradiografije

Prednosti:

- visoka razina polimorfizma
- puno informativnih fragmenata po reakciji (u slučaju multilokusnih proba)
- visoka obnovljivost
- filteri se mogu isprati i ponovno koristiti

Nedostaci:

- potrebna velika količina pročišćene DNA (5-10 µg)
- tehnička izvedivost zahtjevna
- visoki troškovi
- distribucija u genomu ponekad nije slučajna
- fragmenti se ne mogu interpretirati na razini lokusa i alela (u slučaju multilokusnih probi)
- dominantnost alela (u slučaju multilokusnih proba)
- fragmenti iste duljine ne moraju biti homologni
- teško usporedivi polimorfizmi različitih alela
- nisu baš pogodni za automatsko određivanje putem sekvencera

3.4. Restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR)

RFLP – je metoda gdje se koriste restrikcijske endonukleaze (Slika 7) u reakciji cijepanja odsječka DNA s ciljem otkrivanja točkastih mutacija, odnosno polimorfizama koji uključuju promjenu slijeda DNA u jednom nukleotidu.

DNA odsječki se razdvajaju agaroznom elektroforezom te se usporedbom veličine odsječaka DNA u reakciji restrikcije s i bez restrikcijske endonukleaze analizira postojanje ili nepostojanje određene točkaste mutacije ili polimorfizma.

Analitička procedura:

- ekstrakcija DNA
- cijepanje DNA restrikcijskim endonukleazama
- odvajanje fragmenata agaroznom gel elektroforezom
- prijenos fragmenata na najlonski filter putem 'Southern blotting' metode
- hibridizacija fragmenata na lokus specifične radioaktivno označene DNA probe
- vizualizacija polimorfizma putem autoradiografije

Prednosti:

- velika genomska zastupljenost
- slučajna distribucija na genomu
- fragmenti se mogu interpretirati na razini lokusa i alela
- kodominantnost alela
- visoka obnovljivost

- filteri se mogu isprati i ponovno koristiti

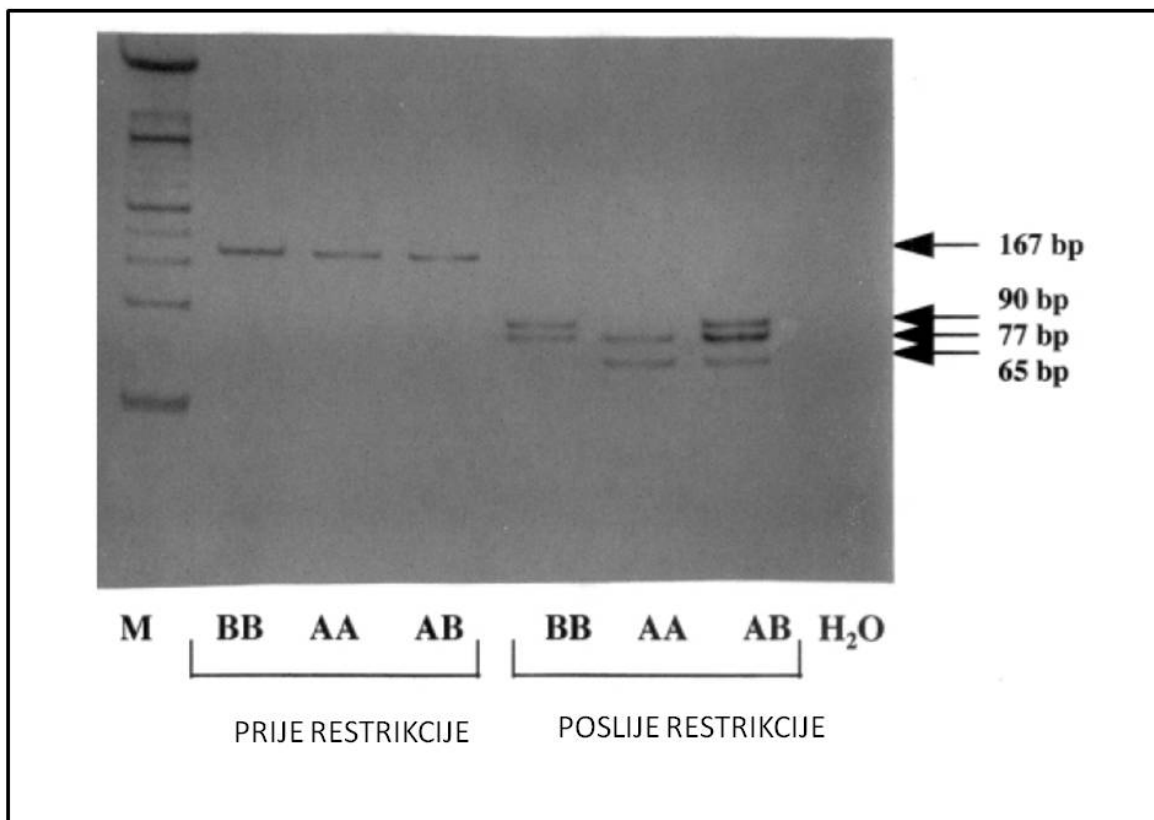
Nedostaci:

- za analize potrebna velika količina pročišćene DNA (5-10 μ g)

- zahtjevna tehnička izvedivost

- visoki troškovi

- nisu pogodni za automatsko određivanje



Slika 7. Poliakrilamidni gel (8 %-tni razdvajajući gel)) umnoženog DNA fragmenta duljine 167 pb nukleotidnog mutacijskog odsječka (G u A). Genotipovi genetičkih biljega κ -CN AA (77, 65 i 25 pb), BB (90 i 77 pb), AB (90, 77, 65 i 25 pb) prije (PCR bez dodanog enzima) i nakon restrikcijske analize. Fragment od 25 pb koji je identičan duljini početnica nije vidljiv na gelu. M: MWM 50 pb dug biljeg za baždarenje (Boehringer Mannheim).

3.5. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD su nasumično umnoženi DNA odsječci lančanom reakcijom polimerazom upotrebom kratkih početnica (obično dugih 10 pb).

To su oligonukleotidne početnice koje su i nizvodne (forward) i uzvodne (reverse) ujedno, i umnažaju odsječke DNA na 3-10 genomskih mjesta istovremeno.

Williams i sur. (1990) među prvima su proučavali RAPD-ove kao genetičke biljege te objasnili njihovu primjenu.

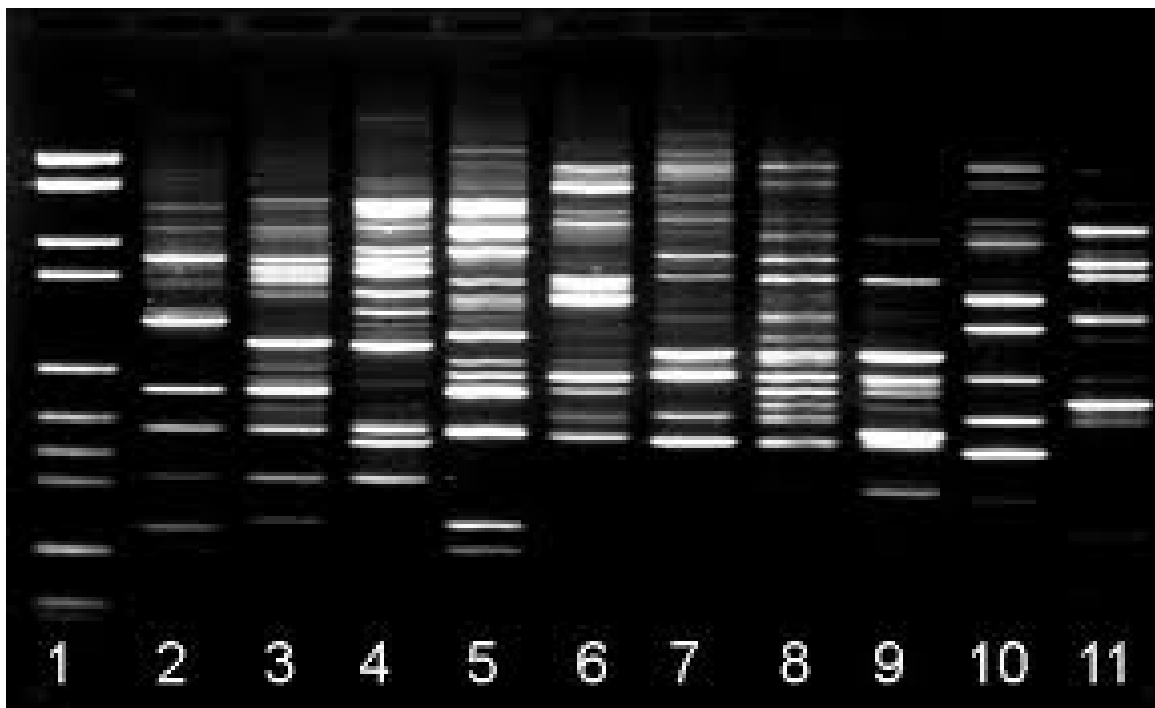
Analitička procedura:

- ekstrakcija DNA
- umnažanje DNA fragmenata putem lančane reakcije polimerazom
- odvajanje polimorfizma putem agarozne gel elektroforeze (AP-PCR i DAF-fragmenti se razdvajaju putem poliakrilamidne gel elektroforeze), (Slika 8)
- vizualizacija polimorfizma putem bojanja etidij-bromidom i UV lampom (AP-PCR i DAF fragmenti se obično vizualiziraju putem bojanja srebrnim nitratom ili autoradiografije)

Prednosti:

- potrebna mala količina DNA (5-30ng)
- nije potreban nukleotidni slijed za dizajniranje početnica
- lagana i brza metoda
- niski troškovi
- velika zastupljenost u genomu

- slučajna distribucija u genomu
- generiranje višestrukih fragmenata po reakciji
- pogodni za automatsko određivanje



Slika 8. Prikaz RAPD biljega na gelu. Izvor: www.invitek.de

Nedostaci:

- potrebna visoko pročišćena DNA
- potreban oprez zbog kontaminacije DNA zbog kratkih slučajno distribuiranih početnica koje mogu umnožiti DNA fragmente velikog broja organizama

- potrebna visoko standardizirana procedura zbog osjetljivosti reakcije
- fragmenti se ne mogu interpretirati na razini specifičnih lokusa ili alela jer su početnice nasumične
- dominantnost alela
- niska obnovljivost
- fragmenti slične duljine ne moraju biti homologni

3.6. Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

AFLP su molekularni biljezi dobiveni selektivnom lančanom reakcijom polimerazom restrikcijskih odsječaka.

AFLP metoda je kombinacija RFLP i RAPD metode čiji su nedostaci ovdje umanjeni.

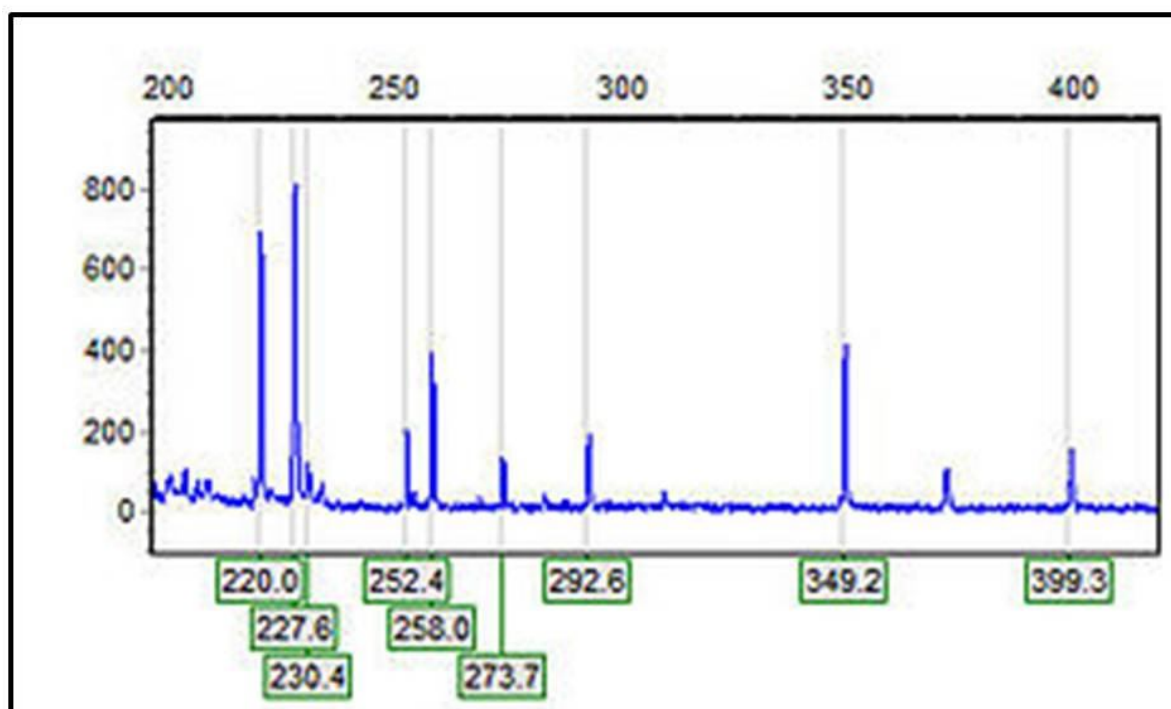
Metoda uključuje tri koraka:

1. Cijepanje restrikcijskim enzimom
2. Ligacija adaptera na odsječene krajeve DNA
3. Selektivno umnažanje odsječenih fragmenata DNA

Vos i sur. (1995) su među prvima opisali AFLP kao metodu DNA koja se može koristiti kao metoda identificiranja otisaka (engl. fingerprinting).

Analitička procedura:

- ekstrakcija DNA
- cijepanje DNA restrikcijskim endonukleazama i ligacija oligonukleotidnih adaptera na DNA fragmente
- selektivno umnažanje dijela DNA fragmenata
- razdvajanje fragmenata poliakrilamidnom gel elektorforezom
- vizualizacija polimorfizama autoradiografijom, srebrnim bojanjem ili fluorescencijom



Slika 9. Automatsko određivanje AFLP biljega

Izvor: http://en.wikipedia.org/wiki/Amplified_fragment_length_polymorphism

Prednosti:

- nije potrebno poznavanje slijeda nukleotida za dizajniranje početnica
- visoka zastupljenost u genomu
- slučajno distribuirani u genomu iako je identificirano klasteriranje oko cetromera
- generiranje puno informativnih fragmenata po reakciji
- visoka obnovljivost
- široka primjena

- pogodni za automatsko određivanje (Slika 9)

Nedostaci:

- fragmenti se ne mogu interpretirati na razini lokusa i alela

- dominantnost alela

- fragmenti iste duljine ne moraju biti homologni

3.7. Single-strand conformation polymorphism (SSCP)

SSCP su odsječci DNA (200-800 bp) umnoženi lančanom reakcijom polimerazom (PCR) upotrebom specifičnih 20-25 pb dugih početnica, jedno-lančane DNA se puštaju na gel-elektroforezu da bi se ustanovile nukleotidne razlike u sljedovima.

Hayashi (1992) je PCR-SSCP metodu opisao među prvima kao metodu za identificiranje mutacija.

Analitička procedura:

- ekstrakcija DNA
- umnažanje DNA fragmenata putem lančane reakcije polimerazom
- razgradnja umnoženih fragmenata na jednolančane oblike
- razdvajanje polimorfizama putem poliakrilamidne gel elektroforeze
- vizualizacija polimorfizama putem srebrnog bojanja ili autoradiografijom

Prednosti:

- potrebna mala količina DNA (10-100 ng po reakciji)
- fragmenti mogu biti interpretirani na razini lokusa i alela
- kodominantnost alela

Nedostaci:

- potreban nukleotidni slijed za dizajniranje početnica

- potrebni visoko standardizirani uvjeti elektroforeze kako bi metoda bila primjenjiva za veći broj uzoraka

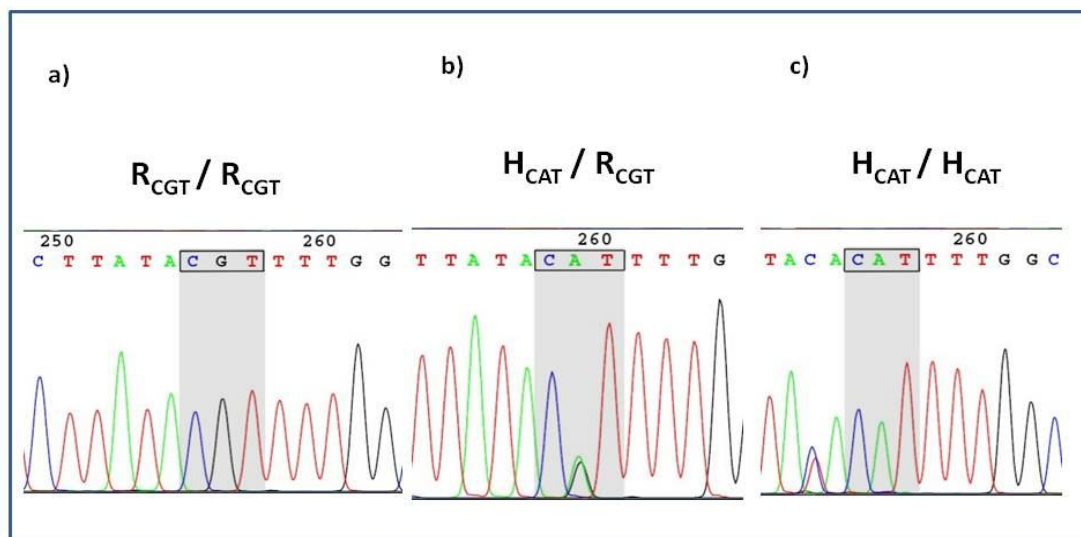
- ne može se dokazati izostanak mutacije jer jednostavno neke mutacije ne mogu biti detektirane

3.8. Single nucleotide polymorphism (SNP)

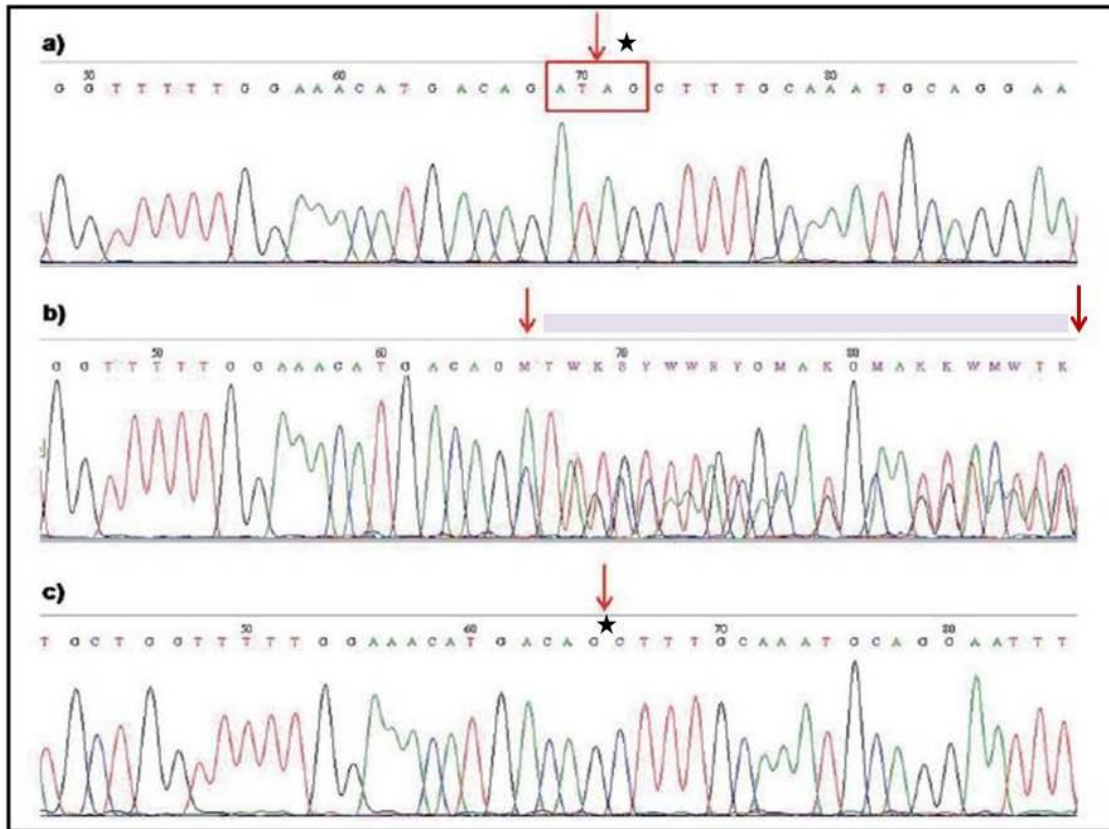
SNP su pozicije pojedinačnih baznih parova u genomskoj DNA u kojima postoje alternative (aleli) gdje je učestalost alela najmanje 1% ili više (Slika 10 i 11).

Stoga, varijacije koje se javljaju u populaciji u manje od 1% su točkaste mutacije, a one u više od 1% su SNP.

Cho i sur. (1999) su opisali SNP kao bialelni biljeg te ga identificirali u cijelom genomu vrste *Arabidopsisthaliana*.



Slika 10. Prikaz elektroferograma tri različita genotipa za kodon 143 (egzon III) kod PrP gena prisutnih u populaciji koza; a) homozigotni genotip R_{CGT}/R_{CGT} , b) heterozigotni genotip H_{CAT}/R_{CGT} i c) homozigotni genotip H_{CAT}/H_{CAT} . Različito genotipova uzrokovana točkastom mutacijom kod koje je baza G zamijenjena s bazom A. Prikazana je nesinonimna mutacija koja je uzrokovala promjenu aminokiseline arginin (R) u histidin (H).



Slika 11. Prikaz elektroferograma tri različita genotipa za gen višestruke otpornosti na lijekove (MDR1 ili još i ABCB1); a) divlji tip genotipa MDR1/ MDR1, b) heterozigotni genotip MDR1/mdr1-1 Δ (nakon delecije u heterozigotnom genotipu prisutna je distorzija pa su sva mjesta na elektroferogramu nakon distorzije heterozigotna) i c) homozigot "intolerantnog genotipa" mdr1-1 Δ /mdr1-1 Δ svojstvenog po deleciji četiri nukleotida (ATAG).

Pojedinačne insercije/delecije (indels) se ne smatraju SNP.

U praksi, SNP se koristi nesavjesno češće nego što to je prema definiciji jer svaka točkasta mutacija nije SNP biljeg.

4. Ne-rekombinirajući molekularni biljezi

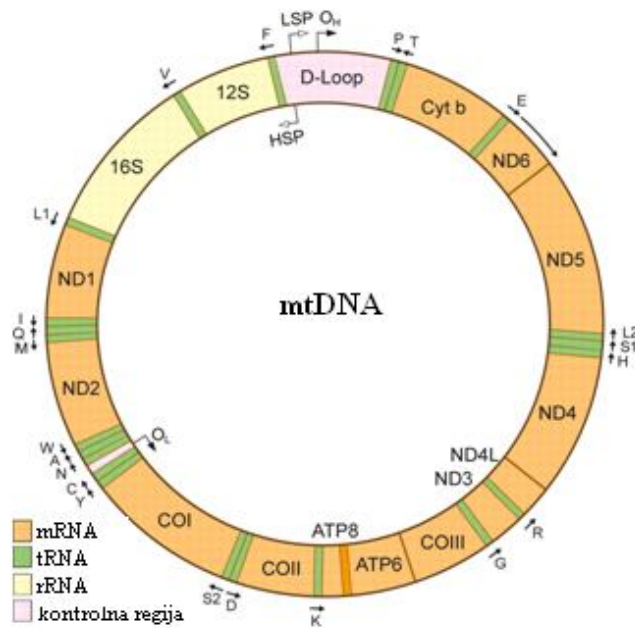
4.1. Mitohondrijska DNA (mtDNA)

Mitohondriji se nalaze u gotovo svim stanicama u dovoljnom broju pa se mitohondrijska DNA može izolirati iz svih tkiva, iako s različitim prinosom (White i sur. 1998.).

Mitohondrijska DNA (Slika 12) je koristan genetski biljeg jer je prisutna u svim životinjskim tkivima, ima mali genom jednostavne strukture, haploidna je, naslijeđuje se od majke (uz neke iznimke), nema nekodirajućih dijelova (introna) i ima različitu stopu evolucije u svojim pojedinim dijelovima, što omogućava rješavanje filogenetskih pitanja na različitim taksonomskim razinama (Zhang i Hewitt, 1996).

Upravo majčinsko naslijeđivanje i haploidnost dvije su glavne razlike mitohondrijskog i nuklearnog genoma (Ballard i Whitlock, 2004). Mitohondrijska DNA je vrlo značajan dio genoma i nalazimo je usvakoj stanici sa 0.0006% ili 1% ukupne mase stanične DNA.

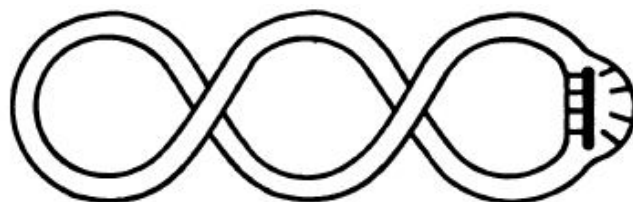
Mitohondrijska DNA je kružna, dvolančana DNA molekula veličine između 15 000 i 20 000 parova baza (pb). Sadrži 37 gena, od čega 22 tRNA gena, 2 rRNA gena, 13 gena koji kodiraju za proteine uključene u transport elektrona i oksidativnu fosforilaciju te kontrolnu regiju.



Slika 12. Mitohondrijska DNA (mtDNA).

Kasamatsu i sur. (1971.) ustanovili su u istraživanju da polovica molekula kovalentno vezanih eksponencijalnog rasta stanica sadrže kratki treći odvojeni dio DNA regije, koju su nazvali kontrolnom regijom (*displacement loop*) (slika 2.).

Kontrolna regija sadrži dvostruki segment i izbočeni dio jednolančane DNA (Slika 13). Jednolančani dio je tanji i ima nepravilniji oblik nego dvostruka regija. Dužine jednolančanog ulomka i dvostrukog dijela kontrolne regije su otprilike jednake dužine (Kasamatsu i sur., 1971.)



Slika 13. Zatvorena kružna mtDNA sa kontrolnom regijom, Kontrolni lanac je prikazan kao zakrivljena linija sa crticama (Kasamatsu i sur., 1971.)

Kontrolna regija je nekodirajući dio mtDNA dužine oko 1000 pb sa nukleotidnim slijedovima koji djeluju u začetku replikacije i transkripcije mitohondrijskog genoma (Harrison, 1989).

U kontrolnoj regiji svih kralješnjaka nalazi se D – petlja (D – loop), trolančana struktura koja nastaje tijekom replikacije, a često se taj naziv upotrebljava i kao sinonim za kontrolnu regiju (White i sur., 1998.).

Kontrolna regija ne kodira za sintezu proteina i zbog toga ne podliježe prirodnoj selekciji, još jedan od razloga zbog kojeg je pogodna za filogenetska istraživanja.

Mitohondrijska DNA podložna je brzom evoluciji i izuzetno je vrijedan genetski marker u populacijskoj i evolucijskoj biologiji.

U sisavaca je brzina evolucije mtDNA veća i do 10 puta od jezgrinih gena, a dijelovi kontrolne regije evoluiraju 4-5 puta brže od ostatka molekule mtDNA (Taberlet 1996., Page i Holmes 1998).

Razlog tome je nedostatak nekih enzima u mitohondriju koji služe za popravak oštećenja, a koji postoje u jezgri.

Velika varijabilnost u brzini evolucije objašnjava se time što jedan od dva lanca zavojnice biva premješten sintezom novog lanca tijekom replikacije.

Za istraživanja srodnih vrsta ili populacija jedne vrste koriste se varijabilniji dijelovi molekule koji daju veću moć razlučivanja, a to su gen za citokrom *b* i kontrolna regija (Palumbi, 1996). Poznato je da je kontrolna regija jedan od najvarijabilnijih dijelova mtDNA.

Važna osobina mtDNA je da se naslijeđuje majčinom linijom (premda su poznate i neke iznimke), bez rekombinacije. Upravo to svojstvo materinjskog naslijeđivanja i brzina evolucije čini mtDNA važnim genetskim biljegom u molekularno-genetskim istraživanjima populacija, u sistematici vrsta i evoluciji.

Počevši od 1980-ih, mnoga su istraživanja populacijske genetike, sistematike vrsta, filogenije i evolucije usredotočena na mitohondrijski genom.

Kontrolna regija mtDNA svinja sadrži ponavljajući motiv GTACACGTGC, a počinje na 5' kraju prvog ponavljanja na poziciji 16,146 pb. Motiv sadrži purin/pirimidin promjene koje su karakteristične i za druge ponavljajuće motive mtDNA sisavaca (Ursing i Arnason, 1998.).

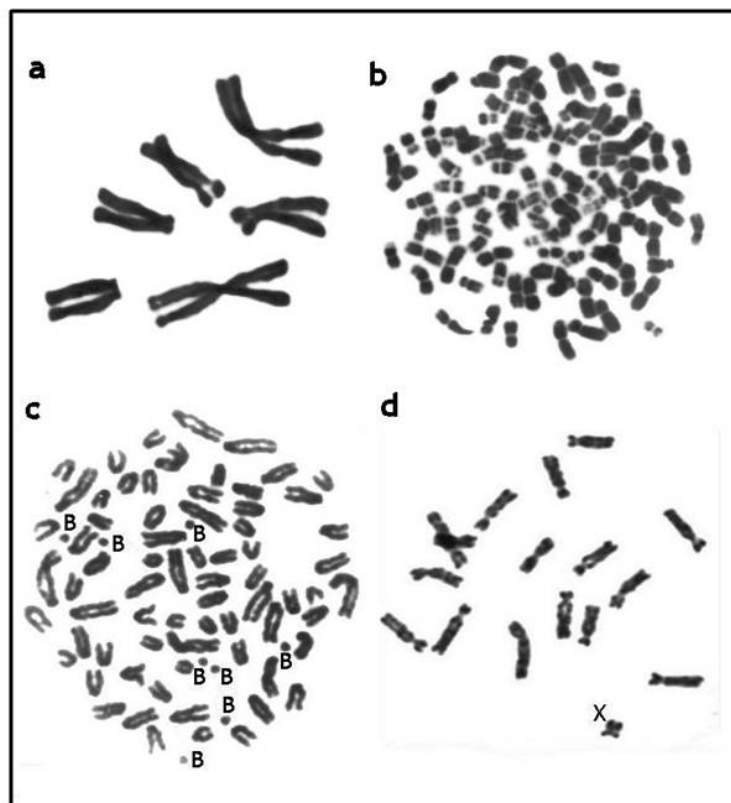
Većina razlika između mtDNA nukleotidnih sljedova predstavljaju točkaste mutacije, i to više tranzicije od transverzija.

Usporedbom diploidnih nuklearnih autosomalnih gena (nasljeđenih od oba roditelja, biparentalnih), ustanovljeno je da efektivna veličina populacije mtDNA je $\frac{1}{4}$ od one za nuklearne autosomalne gene.

4.2. Paternalno naslijeđeni nuklearni geni

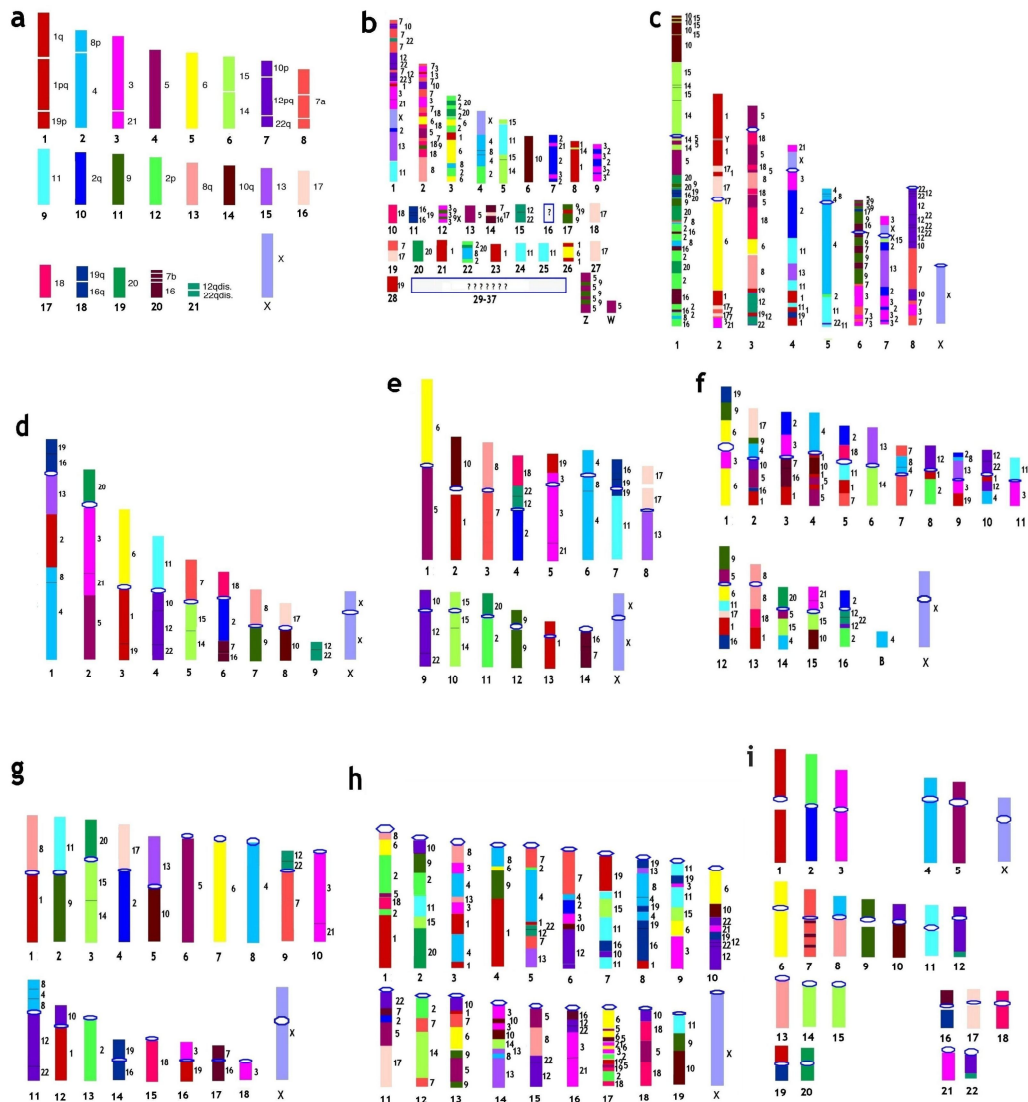
U gametogenezi (proizvodnja spermija i jajnih stanica) homologni kromosomi se razdvajaju tako da gamete imaju haploidni broj kromosoma (svaki kromosomski par se razdvaja). Slika 14. prikazuje metafazne kromosome različitih vrsta, a slika 15 komparativne kromosomske mape.

Prije gametogeneze se na kromosomima događa crossing-over. Kod ženskih jedinki to se događa i između dva X kromosoma. Međutim, kod muških jedinki nespareni X i Y kromosom ne izmjenjuju DNA, osim na krajevima kromosoma u području tzv. pseudoautosomalnih regija.



Slika 14. Prikaz kromosoma sisavaca; a. Metafazni kromosomi vrste indijskog jelena muntjac (*Muntiacus muntjak vaginalis*, $2n = 6, 7$), vrste sa najmanjim brojem kromosoma b. Metafazni kromosomi vrste viscacha rat (*Tympanoctomys barrerae*, $2n = 102$), vrste sa najvećim brojem kromosoma c. Metafazni kromosomi vrste sibirskog srndaća (*Capreolus pygargus*, $2n = 70 + 1-14 B's$). Vrste s dodatnim ili B kromosomom. d. Metafazni kromosomi vrste ženke transkavkaskog voluharice (*Ellobius lutescens*, $2n = 17, X0$ kod oba spola).

Izvor: Graphodatsky i sur. Molecular Cytogenetics 2011 4:22.



Slika 15. Komparativna kromosomska mapa ptica i sisavaca uspoređene sa humanom (desni brojevi) na ideogramima. a. Rekonstruiran kariotip izvornog genoma Eutherian. Svaki kromosom ima svoju boju. Te su boje korištene za obilježavanje homolognih regija na ideogramima kromosoma različitih vrsta (slike 5b-5i) b. Ideogram kromosoma pileta (*Gallus gallus domesticus*, $2n = 78$), a poravnavanje je bazirano na humanom genomu. c. Ideogram kromosoma kratkorepog oposuma (*Monodelphis domestica*, $2n = 18$), a poravnavanje je bazirano na humanom genomu d. Ideogram kromosoma mravojeda (*Orycteropus afer*, $2n = 20$), a rekonstrukcija je bazirana na bojanju e. Ideogram kromosoma vidrice (*Mustela vison*, $2n = 30$), a rekonstrukcija je bazirana na bojanju. f. Ideogram kromosoma crvene lisice

(*Vulpes vulpes vison*, $2n = 34 + 0-8 B's$), a rekonstrukcija je bazirana na bojanju. g. Rekonstruirani kariotip predaka Sciuridae (Rodentia) baziranom na bojanju. h Ideogram kromosoma kućnog miša (*Mus musculus*, $2n = 40$), a), a poravnavanje je bazirano na humanom genomu. i. Ideogram humanih (*Homo sapiens*, $2n = 46$) kromosoma. Izvor: Graphodatsky i sur. Molecular Cytogenetics 2011 4:22.

Budući svaka muška jedinka posjeduje Y kromosom koji može biti naslijeđen samo s očinske strane, muški Y kromosom predstavlja jedinstveni zapis paternalnog naslijeđa.

Smatra se da 98% Y kromosoma nema funkciju tako da sve promjene na tom dijelu nemaju nekog utjecaja.

DNA biljezi na Y kromosomu

STR (mikrosateliti):

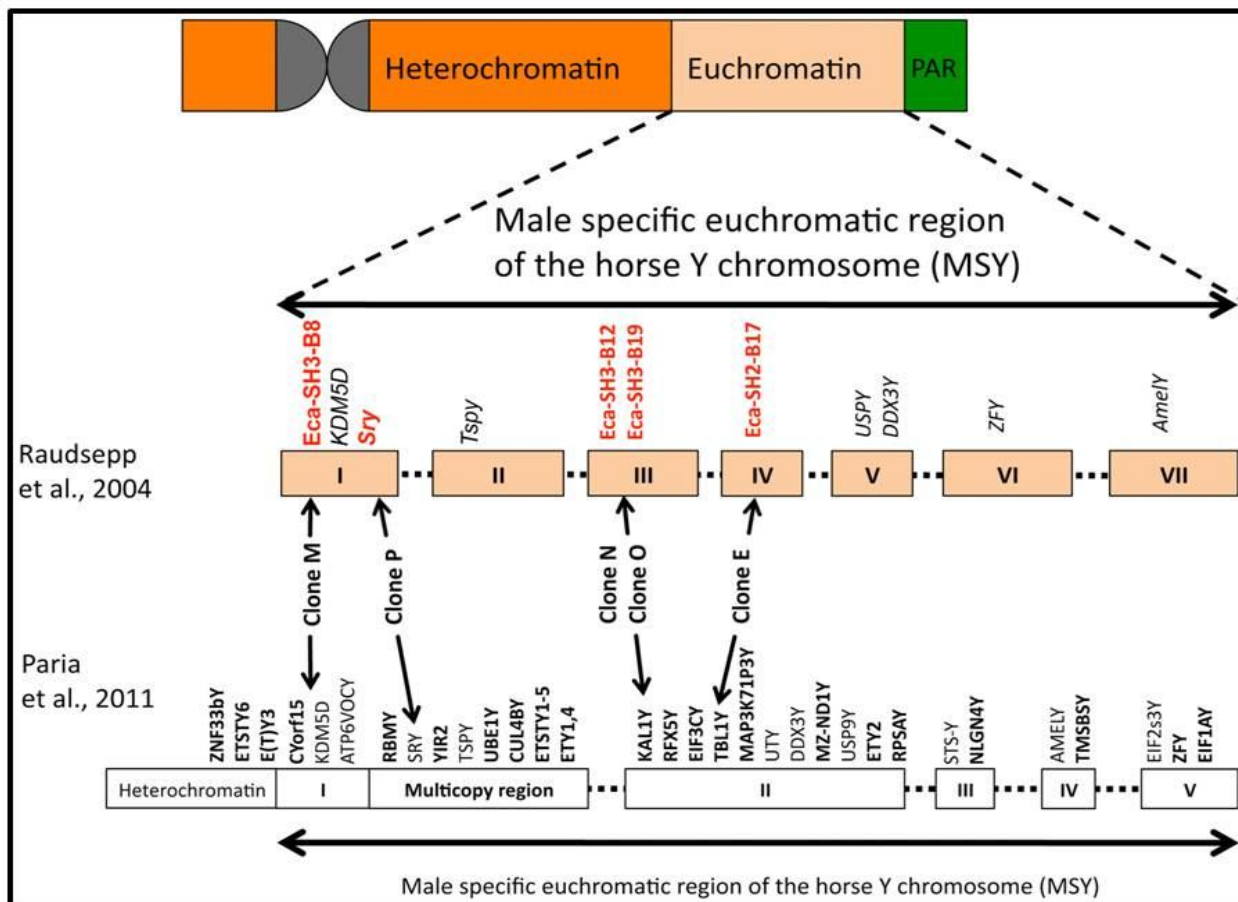
- DYS19, DYS385, itd.
- većinom tetranukleotidna ponavljanja

Bialelni biljezi (engl. unique event polymorphisms, UEP):

- SNP (engl. single nucleotide polymorphisms)
- Y *Alu* polimorfizam (YAP) ili druge insercije/delecije ('*indels*')

Minisateliti:

- MSY1 (DYF155S1) sastavljen od 48-114 kopija od 23 bp
- MVR-PCR (minisatelitno varijantno ponavljanje)
- Ideogram Y kromosoma. Pokazuje lokaciju pseudoautosomalnih regija (PAR), testis determinirajućih gena, *SRY* i dugu heterokromatinsku ruku (Slika 16).



- Slika 16. Mjesto BAC klona na Y kromosomu konja (ECA Y) te opis pojedinih regija Y. Izvor: Wallner i sur. (2013) PLoS ONE 8(4).

Analize Y-kromosoma su od velike važnosti jer posebno prate gene s očeve strane, čime nadopunjuje studije gena s majčine strane temeljene na mtDNA.

Nekoliko značajki čini Y-kromosom prikladnim za genetičku analizu populacije. Iako nema visoku mutacijsku stopu kao mtDNA, Y-kromosom pruža neiscrpan izvor polimorfizama jer je njegova veličina za nekoliko redova veća od mtDNA i veći dio kromosoma se, za razliku od mtDNA, sastoji od ne kodirajućih regija.

Štoviše, predstavlja jednu segregacijsku jedinicu, ne rekombinirajući kromosom (izuzetak je vrlo mala pseudoautosomalna regija), i haplotipovi (minijturni genotipovi) sastavljeni od velikog broja segregirajućih dijelova mogu biti konstruirani.

Mužjaci i ženke ne igraju simetričnu ulogu u strukturiranju populacija, na primjer, jaka asimetrija između spolova može utjecati na raširenost i uzgojne strategije. Markeri Y kromosoma se naširoko koriste u ljudi i ostalih primata.

Korištenje markera naslijeđenih s očeve strane se povećalo u zadnjih 10 godina i najčešće su upotrebljavani u proučavanjima rekolonizacija i filogeografije.

Sve ove studije se temelje na polimorfizmu jednog nukleotida ili na jednostavnim ponavljajućim nukleotidnim sljedovima.

5. DNA (PCR) – određivanje nukleotidnog slijeda Sangerovom metodom

DNA (PCR) – određivanje slijeda nukleotida u DNA odsječku umnoženom lančanom reakcijom polimerazom putem početnica (15-35pb) specifičnih za određeno mjesto na genomu

Metoda se zasniva na određivanju nukleotidnih slijedova terminacijom *in vitro* DNA replikacije.

Sangerova metoda sekvenciranja podrazumijeva terminaciju *in vitro* sinteze jednolančanih DNA molekula korištenjem 2',3' - dideoksi - nukleotid trifosfata (ddNTP).

Korištenjem četiri različita ddNTP-a u četiri odvojene reakcije za *in vitro* sintezu DNA sintetiziraju se četiri familije jednolančanih DNA fragmenata na čijim se krajevima nalazi po jedan ddNTP. U svakoj reakciji DNA polimeraza počinje stvarati početak drugog lanca sa komplementarnim bazama (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) na mjestu gdje se početnica ugradila. Prethodno je potrebno visokom temperaturom odvojiti lance DNA. Kada dođe do baze čiji je ddNTP prisutan, lanac će se zaustaviti. Tako dobivamo skup lanaca različito dugih nukleotida.

Upotrebom poliakrilamidnog gela obavlja se razdvajanje familije jednolančanih DNA fragmenata različitih duljina. Tako dobijemo potpunu informaciju o slijedu nukleotida u analiziranoj molekuli DNA. Analogni nukleotidi, dideoksinukleotidi, su na početku označeni tako da svaka baza dobije svoju boju i olakša praćenje složene sekvence na kraju postupka.

Tako su pomoću kapilarne poliakrilamidne gel-elektroforeze te fluorescentnim označavanjem početnica te automatskim razvrstavanjem nukleotida pomoću CCD kamere nastali prvi automatizirani aparati za određivanje slijeda nukleotida (Slika 17 i 18).

Sanger i sur. (1977) opisali su među prvima određivanje slijeda nukleotida.

Analitička procedura:

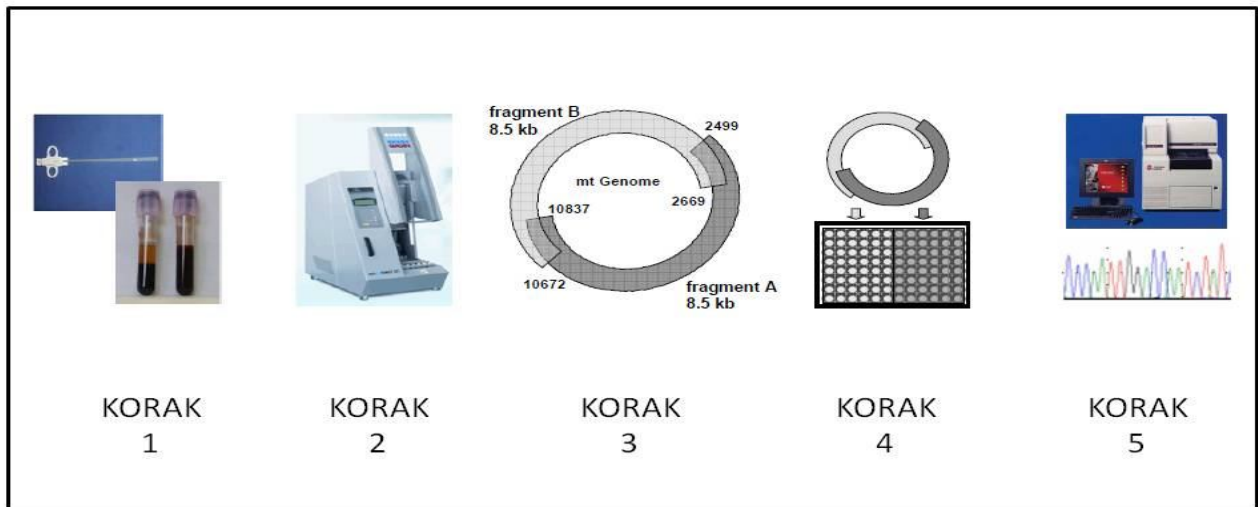
- ekstrakcija DNA
- umnažanje DNA fragmenata putem lančane reakcije polimerazom
- selektivno završavanje udvostručavanja DNA u četiri odvojene reakcije
- razdvajanje fragmenata putem poliakrilamidne gel elektroforeze
- vizualizacija fragmenata putem autoradiografije ili fluorescencije

Prednosti:

- potrebna mala količina DNA (10-100 ng po reakciji)
- visoka obnovljivost
- proučavani fragmenti su poznatog identiteta
- pogodni za automatsko određivanje

Nedostaci:

- tehnička izvedivost zahtjevna
- visoki troškovi
- visoki troškovi za razvoj početnica specifičnih regija
- mala pokrivenost genoma
- na razinama vrste smanjena varijabilnost



Slika 17. Pregled laboratorijskih analiza. Korak 1 i 2 - (automatizirane ekstrakcije DNA)
 Korak 3 - Mitohondrijski genom umnožen je kao dva preklapajuća fragmenta A i B, Korak 4 -
 potom su dodane početnice te Korak 5 - slijedovi su analiziran i kapilarnom elektroforezom
 (3100 Applied Biosystems).

Izvor: Fendt i sur. BMC Genomics (2009).



Slika 18. Aparat kapilarne elektroforeze za određivanje slijeda nukleotida

Osnovne metode u analizama molekularne genetike su:

- ekstrakcija DNA
- elektroforeza
- lančana reakcija polimerazom

Osnovni principi navedenih metoda biti će prikazani ukratko na stranicama koje slijede.

6. Ekstrakcija genomske DNA kod životinja

Ekstrakcija i pročišćavanje genomske DNA iz uzoraka animalnog podrijetla početni je korak za daljnje analize genetičke varijabilnosti populacija domaćih životinja i njihovih divljih srodnika. Danas postoje mnoge različite metode i tehnologije za ekstrakciju genomske DNA. Sve metode uključuju lizu (razgradnju) početnog materijala, uklanjanje proteina i ostataka kemikalija za uspješnu ekstrakciju DNA.

Danas postoje mnoge metode ekstrakcija DNA.

Izbor metode ovisi o mnogim faktorima; početni materijal iz kojeg se DNA izolira, potrebna količina i molekularna težina DNA, čistoća, vrijeme i trošak izolacije.

DNA izdvajamo iz stanice jer je želimo odvojiti od RNA, ukloniti proteine i proučavati neke dijelove (gene).

Podjela DNA u stanicama životinja:

1. nuklearna DNA (u jezgri)
2. organelna DNA (u mitohondrijima)

Izvor DNA animalnog podrijetla može biti raznolik. Tako je moguće ekstrahirati DNA iz sjemena, urina, stolice, folikula dlake, nokta, perja, tkiva, leukocita, kostiju, arheoloških uzoraka.

Praktično DNA može biti ekstrahirana iz svih dijelova tijela, a najčešće se ekstrahira iz krvi i mekih tkiva.

Postoje mnoge metode ekstrakcije DNA, a sve metode uključuju:

- razgradnju početnog materijala,
- zatim uklanjanje proteina pomoću proteinaze K,
- uklanjanje RNA molekula
- uklanjanje kontaminanata i

- otapanje DNA.

Ovo su osnovni koraci koji su baza za sve moderne analize DNA putem komercijalnih kitova kao i za automatizirane ekstrakcije DNA. Također postoje i druge metode u vlastitim izradama protokola mnogih laboratorija, ali mnoge od tih metoda imaju svoje nedostatke ili u količini dobivene DNA ili u čistoći dobivene DNA.

Priprema sirovih lizata

Ovo je lagana metoda izdvajanja genomske DNA. Lizat se priprema tako da se stanice inkubiraju na visokoj temperaturi (90 °C, 20 min) ili se priprema razgradnja pomoću proteinaze K i lizat se može direktno upotrebljavati. Takav lizat sadrži i enzim-inhibirajuće kontaminante kao sol. Može se dogoditi i nepotpuna inaktivacija proteinaze K te dovesti do lažnih negativnih rezultata.

Nedostatak metode

Nije dobro skladištiti DNA dobivenu ovom metodom jer visoka kontaminacija rezultira razgradnjom DNA.

Metode isoljavanja

Ovo je jedna od uobičajenih metoda gdje su proteini i drugi kontaminanti precipitirani (istaloženi) iz staničnog lizata upotrebom visokih koncentracija soli (kalijev acetat, amonijev acetat). Precipitati se uklanjaju centrifugiranjem, a DNA se obnavlja precipitacijom pomoću alkohola. Ponekad uklanjanje proteina i drugih kontaminanata može biti nedovoljno pa se mora ponavljati precipitacija pomoću alkohola.

Nedostatak metode

Čistoća i količina DNA dobivene ovom metodom može prilično varirati.

Metode organske ekstrakcije

Pomoću organskih otapala uklanjaju se kontaminanti iz lizata. Koriste se detergent, fenol, kloroform i izoamilni alkohol. Potrebno je imati točnu koncentraciju soli kao i pH kako bi se

kontaminati odvojili u organsku fazu, a da DNA ostane u vodenoj fazi. DNA se izdvaja iz vodene faze alkoholnom precipitacijom.

Nedostaci

Ova metoda je vremenski zahtjevna, koriste se toksične otopine, česti su rezidui kao fenol i kloroform u tako ekstrahiranoj DNA. Također metoda nije pogodna za automatske ekstrakcije.

Metode izdvajanja u gradijentima CsCl

Genomska DNA može biti pročišćena centrifugiranjem kroz gradijent gustoće cezij klorida. Stanice se liziraju detergentom i potom precipitiraju alkoholom. Resuspendirana DNA se miješa sa CsCl i etidij bromidom i centrifugira nekoliko sati. DNA se pokupi iz tubice, ekstrahira s izopropanolom kako bi se uklonio etidij bromid i precipitira sa etanolom kako bi se DNA obnovila. Ovom metodom se dobije vrlo kvalitetna DNA.

Nedostaci

Vremenski zahtjevna metoda i skupa tako da nije moguća kao rutinska metoda, a nije pogodna niti za automatsko ekstrahiranje.

Metode temeljene na anionskoj izmjeni

Anionska kromatografija se temelji na negativno nabijenim fosfatima nukleinske kiseline i pozitivno nabijenoj površini molekule ili supstratu. U blago slanim uvjetima DNA se veže na supstrat, a RNA, proteini i metaboliti se ispiru pomoću srednje slanog pufera i vrlo kvalitetna DNA se eluira pomoću visoko slanog pufera. DNA se obnavlja alkoholnom precipitacijom.

U ovoj metodi nema upotrebe toksičnih otopina, izdvojena DNA je vrlo kvalitetna.

Silico metode – DNeasy Tissue Kits

Pomoću 'DNeasy Tissue Kit-a' ekstrahiramo DNA brzo, jednostavno i visoke kvalitete. To je tehnologija koja se zasniva na silico-gel membranama koje imaju svojstvo selektivne

adsorpcije ovisno o koncentraciji kaotropnih soli. Pomoću otopina koje se koriste za lizu stanica omogućava se da samo DNA bude adsorbirana dok se proteini, metaboliti ispiru. DNA se na kraju eluira iz silico-gel membrane pomoću pufera niske koncentracije soli. Resuspenzija DNA nije potrebna.

Dobivena DNA ovim putem obično je veličine do 50 kb i pogodna je za daljnje analize putem lančane reakcije polimerazom. Ekstrakcije DNA ovom tehnologijom jednako su uspješne iz male i velike količine uzorka, a da bi se dobila optimalna količina i kvaliteta DNA potrebno je analizirati optimalnu količinu uzorka, nije dobro imati previše početnog uzorka. U tom slučaju može doći do nečistog uzorka, odnosno konačno ekstrahirane DNA. Ukoliko je premala količina uzorka, manja od 5 mg, može se dodati otopina koja će nadomjestiti tu razliku za potrebe daljnjih analiza.

7. Elektroforeza

Elektroforeza (electro = protok struje, phoresis, od grčkog = nositi kroz) je metoda za analizu DNA molekule u cilju identifikacije, razdvajanja, pročišćavanja te određivanja količine DNA. Nukleotidi u molekuli DNA su negativno nabijeni jer posjeduju fosfatnu skupinu. Zahvaljujući njima i DNA je negativno nabijena te stoga putuje u električnom polju prema suprotno nabijenoj elektrodi (katodi). Ona putuje kroz trodimenzionalnu mrežu pora određenih veličina gdje joj otpor pruža okolni medij-gel. Iz tog razloga veće molekule putuju sporije, a manje molekule putuju brže. Na elektroforezu DNA i njezino razdvajanje utječu:

- koncentracija agaroze
- molekularna veličina DNA
- konformacija DNA
- jakost i smjer električnog polja
- prisutnost etidij bromida (koji interkalira u baze)
- sastav pufera za elektroforezu.

Gel je koloidna otopina, suspenzija sitnih čestica u mediju koja ima konzistenciju želatine. Agarosa je polisaharid proizveden od morskih algi, ima svojstva da se otapa u puferu, zagrijava do vrenja te hladi pa se tada stvara čvrsta mreža molekula.

Elektroforeza u agaraznom gelu je adekvatna za razdvajanje molekula između 100 i 30000 pb.

Agarozni gel se prije razlijevanja u kalup mora ohladiti te se dodaje etidij bromid koji interkalira u baze te zbog toga DNA možemo vizualizirati pod UV svjetlom.

Pufer u elektroforezi (TBE, TAE) osigurava ione koji omogućavaju vođenje struje

TAE, pH 8.0, ~50 mM - Tris, Acetate, EDTA

TBE, pH 8.0, ~50 mM - Tris, Borate, EDTA

Praćenje elektroforeze je moguće zbog pufera za nanošenje uzoraka sa kojim se miješa DNA, a u puferu se nalazi 30% glicerola (dodaje se u omjeru uzorak : pufer = 1:5). U puferu za nanošenje uzoraka najčešće se nalaze slijedeće boje:

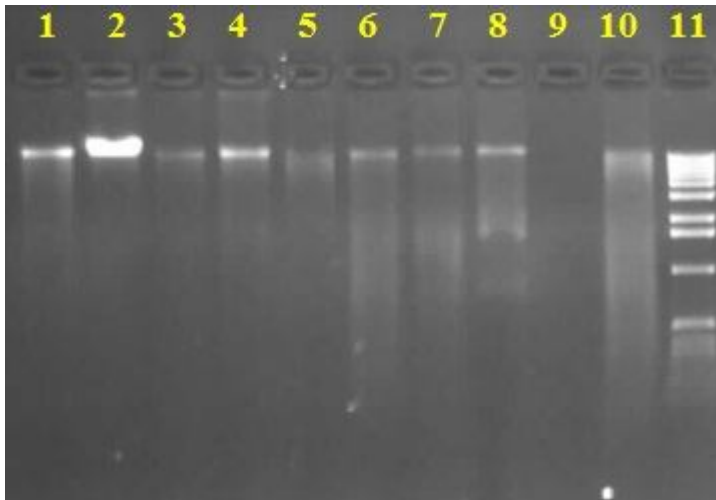
- 'xylene cyanol' (kreće se kao fragment od oko 5.0 kb fragments)
- 'bromphenol blue' (kreće se kao fragment od nekoliko stotina pb)
- 'orange G' (kreće se kao fragment od oko 50 pb).

U analizama DNA putem elektroforeze treba voditi računa o postotku agaroznog gela koji se koristi, a to je ovisno o veličini uzorka koji se proučava (Tablica 2).

Tablica 2. Postoci gela i veličina fragmenata.

Agaroz % (w/v)	Veličina fragmenta za optim. razdvajanje (kb)
0.5	2-30
0.75	0.7-20
1.0	0.5-10
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2
3.0	0.07-1.5
4.0	0.04-0.9

Putem agaroznog gela i elektroforeze kvalitativno proučavamo ekstrahiranu DNA ili fragment (Slika 19).



Slika 19. DNA na agaroznom gelu gledana UV svjetlom.

Krv: 1. Ovca, 2. Konj, 3. Divlja svinja

Tkivo: 4. Zec, 5. Divlja svinja, 6. Divlja svinja

Dlaka: 7. Tornjak, 8. Maltezer, 9. Koza, 10. Divlja svinja

Referentna DNA: 11. Kalibracijski biljeg

Određivanje koncentracije DNA pomoću spektrofotometra

Za kvantitativno proučavanje molekule DNA postoji metoda spektrofotometrijskog određivanja koncentracije DNA. Apsorpcijski spektar molekule DNA određuje se spektrofotometrom pri čemu se bilježi stupanj apsorpcije (apsorbancija) pri svakoj valnoj duljini. DNA ima maksimalnu apsorbanciju pri valnoj duljini od ~260 nm, a tipični proteini pri ~280 nm. Ova razlika u apsorbanciji, točnije njihov omjer, služi kao mjera uspješnosti ekstrakcije DNA.

Uzorak DNA je dobre čistoće ako pri apsorbanciji od A₂₆₀ nm/A₂₈₀ nm dobivena vrijednost iznosi 1,8-1,9. Ako su vrijednosti gornjeg omjera manje od 1,8 znači da je zaostalo dosta proteina koji apsorbiraju UV zračenje pri 280 nm (Tablica 3).

Tablica 3. Koncentracija i čistoća DNA

Nukleinska kiselina	Apsorbancija (λ nm)	Vrijednost
DNA	A ₂₆₀	1.0 \approx 50 μ g/ml
	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1.6 – 1.8

Tablica 4. Koncentracija DNA različitih uzoraka mjerena spektrofotometrom.

UZORAK	KONCENTRACIJA DNA (ng/μl)
KRV	
Ovca (svježa)	21
Konj (1-2 god. na -20°C)	41
Divlja svinja (45 min. nakon smrti)	27
TKIVO	
Zec (etanol)	34
Divlja svinja (etanol)	35
Divlja svinja (-20°C)	22
DLAKA	
Tornjak (10 mjeseci na sobnoj temp.)	37
Maltezer (svježa)	38
Koza (3 god. na sobnoj temperaturi)	0
Divlja svinja (3 god. na -20°C)	48

8. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR) je metoda umnažanja određenog odsječka DNA u uvjetima *in vitro*. Dr. Kary Mullis je za rad objavljen 1985. dobio Nobelovu nagradu 1993. godine.

Da bi se molekula DNA (ili samo njezin odsječak) umnožila ovom metodom potrebno je poznavati njezin (barem djelomičan) slijed nukleotida na osnovu kojega će se odabrati početnice. Početnice su dva kraća oligonukleotida koji predstavljaju granice odsječka DNA koji umnažamo; jedna je komplementarna 3' kraju jednog lanca DNA, a druga 3' kraju drugog lanca.

PCR reakcija se sastoji od tri dijela:

1. denaturacija dvolančane DNA (Slika 20)
2. sparivanje početnica s komplementarnom jednolančanom DNA (Slika 21)
3. produljenje lanca DNA (Slika 22)

Uzastopnim ponavljanjem (obično 20 - 40 puta) denaturacije, sparivanja i produljenja lanca količina umnožene DNA eksponencijalno raste. Ovom reakcijom od jedne molekule dobije se nekoliko milijardi kopija (2^n kopija, gdje je „n“ broj ciklusa reakcije).

U reakciju PCR se dodaje (Slika 23)

- DNA
- DNA polimeraza
- Početnice
- 4 deoksinukleotida
- Kofaktor $MgCl_2$

Program PCR aparata:

- 1 - 10 minuta inicijalne denaturacije 94-96°C
- 1 do nekoliko minuta pri 50-65°C tijekom kojih se početnice hibridiziraju na denaturirane lance

- 1 do nekoliko minuta pri 72°C tijekom koje DNA polimeraza nastavlja lanac DNA, svaki ciklus ima duplo više molekula, nakon 30 ciklusa 2^{30}

Dizajniranje početnica

Početnice trebaju biti dovoljno specifične (komplementarne) za određeni gen i ona je ključan kriterij za uspješnost lančane reakcije polimerazom.

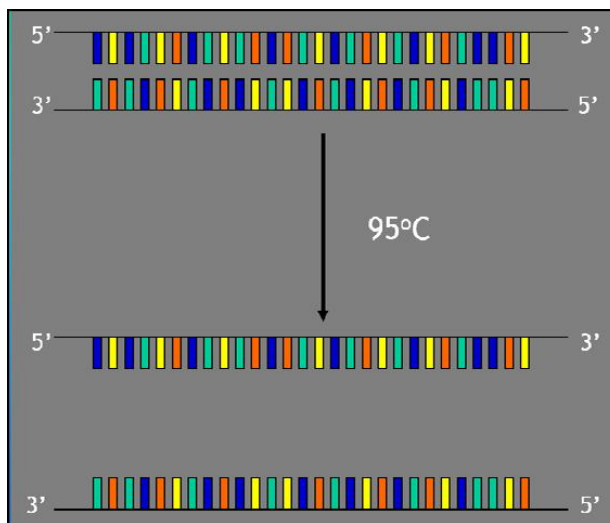
Kako je odabir početnica ključan kriterij za uspješnost PCR reakcije, potrebno je bilo slijediti određena pravila pri njihovom dizajniranju (Ambriović Ristov, 2007):

- 1. Duljina početnica obično iznosi između 18-24 pb. Preduge početnice će umanjiti djelotvornost sparivanja, dok će prekratke dovesti do umnažanja nespecifičnog produkta.
- 2. Temperatura sparivanja (T_a , eng. annealing temperature) treba iznositi između 50-65 °C. Temperatura sparivanja početnica iznosi 5 °C manje od temperature taljenja (T_m , engl. melting temperature) i izračunava se prema jednadžbi:

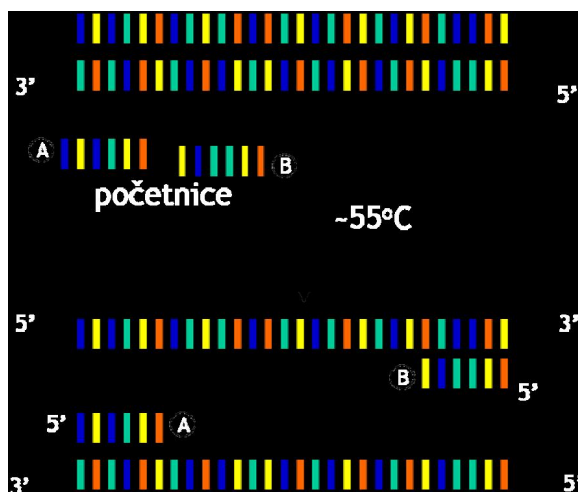
$$T_a = T_m - 5 \text{ °C} = 2(A+T) + 4(G+C) - 5$$

- 3. Početnice trebaju sadržavati oko 45-55% G i C nukleotida.
- 4. Preporuča se da 5' i 3' krajevi početnica počinju, odnosno završavaju s G ili C nukleotidom ili GC, odnosno CG dinukleotidom. Time se osigurava snažnije sparivanje početnica.
- 5. Treba izbjeći ponavljanje purinskih ili pirimidinskih sljedova nukleotida. Time se izbjegava moguće sparivanje sljedova nukleotida unutar same početnice ili između para početnica.
- 6. Treba izbjeći komplementarne sljedove dulje od 3 pb unutar samih početnica i između parova početnica, a posebno na njihovim 3' krajevima. Time se sprječava stvaranje sekundarnih struktura, ometanje sparivanja te stvaranja 'dimera' početnica (engl. primer-dimer).

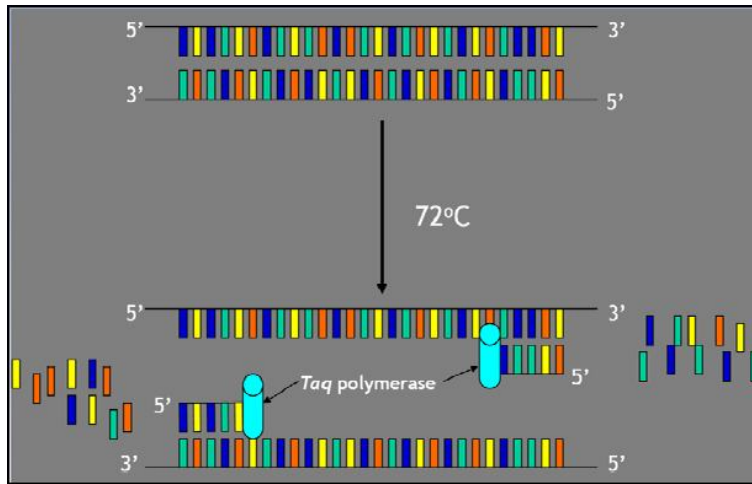
PCR reakcija provodi se u uređaju za PCR koji se programira za svaki ciklus. Temperature na kojem se pojedini dio ciklusa odvija, kao i trajanje svake faze potrebno je prilagoditi za svaku reakciju. Rezultat reakcije provjerava se elektroforezom u agaroznom gelu.



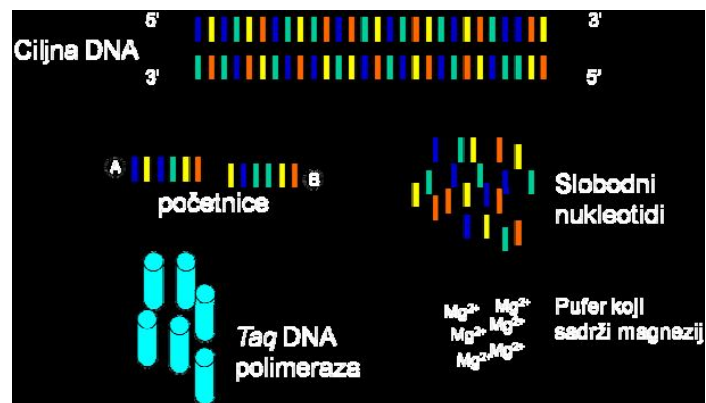
Slika 20. Denaturacija DNA lanca



Slika 21. Vezanje specifičnih početnica na DNA lanac



Slika 22. Produljivanje PCR produkta



Slika 23. Sadržaj smjese za PCR reakciju

9. Vježbe

Za ekstrakcije DNA iz tkiva i dlake potrebno je slijedeće:

- rukavice
- aluminijska folija
- skalpel
- škare
- epice od 1.5 i 2 ml
- marker
- pipete
- filter tips
- proteinaza K
- puferi (ATL, AW1, AW2, AE, TBE)
- 96% etanol
- termo shaker ili vodena kupelj
- kolone (DNeasy Mini spin column)
- centrifuga

Za elektroforezu DNA i PCR produkta:

- erlenmayerova tikvica
- ultračista voda
- laboratorijska vaga
- agarozna
- mikrovalna pećnica
- etidij bromid
- agarozni gel
- pufer za nanošenje uzoraka
- uređaj za vodoravnu elektroforezu
- UV transiluminator

Za mjerenje koncentracije DNA:

- ekstrahirana DNA
- ultračista voda
- pipeta
- filter tips
- kiveta
- spektrofotometar

Za lančanu reakciju polimerazom:

- ekstrahirana DNA
- ultračista voda
- pipeta
- filter tips
- početnice
- master mix s polimerazom
- aparat za lančanu reakciju polimerazom

Slike opreme Laboratorija za konzervacijsku genetiku Zavoda za opće stočarstvo potrebne za izvođenje eksperimentalnog dijela nastave modula Molekularna genetika. Slike iz Stručnog projekta (2014): V. Brajković, M. Badurina, voditelj: V. Čubrić Čurik



Slika 24. DNeasy Blood & Tissue komplet



Slika 25. Filter tips, pipeta,



Slika 26. Miješalica (vortex)

kolone



Slika 27. Termo miješalica



Slika 28. Vodena kupelj



Slika 29. Referentna DNA



Slika 30. Polaroid kamera za snimanje gela



Slika 31. Spektrofotometar



Slika 32. Kiveta



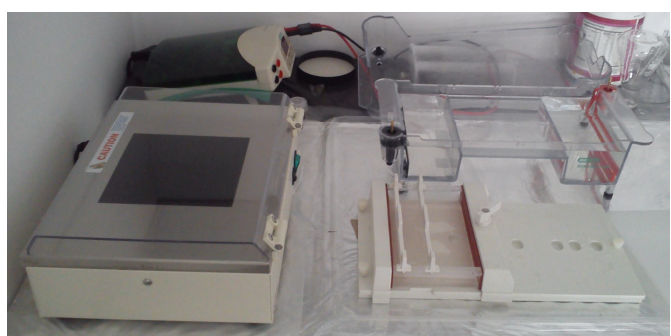
Slika 33. Centrifuga



Slika 34. Vaga



Slika 35. Mikrovalna pećnica



Slika 36. UV transiluminator i uređaj za vodoravnu elektroforezu

10. Prilog (preuzeto <http://web.ffos.hr/infoznanosti/?id=88>)

STRUKTURA SEMINARSKOG RADA

1. Naslovna stranica

Nepaginirana naslovna stranica treba sadržavati sljedeće informacije:

- U gornjem lijevom uglu navodi se naziv sveučilišta, fakulteta, odsjeka, kolegija, titula, ime i prezime nastavnika te ime i prezime studenta, slovima veličine 14 točaka. - Naslov rada treba biti ispisan masnim slovima (bold), centrirano, slovima veličine 16 točaka. - Naziv vrste rada (npr. seminarski rad) navodi se ispod naslova rada, centrirano, slovima veličine 14 točaka.
- Na dnu naslovne stranice navodi se mjesto te mjesec i godina nastanka rada, centrirano, slovima veličine 14 točaka.

2. Sadržaj

Na posebnoj stranici naslovljenoj 'Sadržaj' potrebno je navesti popis naslova svih poglavlja i potpoglavlja u radu, kao i brojeve početnih stranica svakog poglavlja, slovima veličine 12 točaka.

3. Sažetak i ključne riječi

Sažetak i ključne riječi navode se na posebnoj stranici i ne numeriraju se. Sažetak treba imati 200 do 250 riječi i piše se u jednom odlomku, u trećem licu i pasivu. U njemu se ne citira. Sažetak je jezgroviti prikaz cijelog rada te u njemu trebaju biti sadržane najvažnije informacije o radu. Na prvom mjestu navode se cilj i svrha rada, zatim se objašnjava teorijski i metodološki pristup opisu problematike. Ukoliko se radi o istraživanju, navode se odabrane metode i uzorak istraživanja. Na kraju se navodi glavni rezultat i doprinos rada.

Ispod sažetka potrebno je navesti 3 do 5 ključnih riječi. Ključne riječi su pojmovi koji najbolje opisuju sadržaj rada. Ključne riječi obično se izvode iz naslova i sažetka rada.

4. Tekst seminarskog rada

- *opseg*

5-6 kartica teksta- prva godina preddiplomskog studija

7-12 kartica teksta - druga godina preddiplomskog studija

12-20 kartica teksta – treća godina preddiplomskog studija

15-20 kartica teksta – prva i druga godina diplomskog studija

ili prema uputama predmetnog nastavnika.

- uređivanje teksta

Tekst seminarskog rada treba biti paginiran. Za tekst se preporuča koristiti font Times New Roman, veličine 12 točaka, prored 1,5 i obostrano poravnanje. Za naslove dijelova seminara i poglavlja preporuča se koristiti velika slova veličine 14 točaka. Svaki odlomak teksta, osim početnog u poglavlju, treba uvući pomoću tabulatora.

- uređivanje tablica i slika unutar teksta

Tablice i slike unutar teksta trebaju biti numerirane redosljedom pojavljivanja. Svaka tablica i slika trebaju biti opisane na način da budu čitljive i izvan konteksta. Opisi tablica trebaju se nalaziti iznad tablice, a opisi slika trebaju biti ispod slike. Valja izbjegavati nazive graf, grafikon, fotografija, shema, dijagram i sl. te umjesto njih koristiti izraz 'slika', a vrstu istaknuti u opisu.

Dobar primjer:

Slika 1. Fotografija knjižnice Filozofskog fakulteta u Osijeku.

Loš primjer:

Fotografija 1. Knjižnica Filozofskog fakulteta u Osijeku

Unutar dijela teksta koji se odnosi na pojedinu tablicu ili sliku potrebno je u zagradi navesti o kojoj se tablici ili slici radi. Npr. (Slika 1) ili (vidi Tablicu 2).

- stil i način pisanja

Rad mora biti napisan standardnim hrvatskim jezikom, bez pravopisnih, gramatičkih i tiskarskih pogrešaka. U njemu se koristi stručna terminologija usvojena tijekom studija. Rad je potrebno pisati u trećem licu i pasivu, izbjegavajući osobni stil pisanja, posebice 1. lice jednine i množine, te žargonizam. Svi citati navode se na hrvatskom jeziku bez obzira na izvor, osim ako nastavnik izričito ne traži drugačije.

- struktura teksta

Rad mora sadržavati sve elemente znanstvenog i stručnog rada:

Predgovor – nije obavezan dio rada, koristi se ako je iz nekog razloga bitno pojasniti strukturu rada, pristup problematici ili ograničenja pri izradi rada.

Uvod – svrha je uvoda 'uvesti' u problematiku rada. Potrebno je ukratko opisati područje istraživanja, odnosno tematiku rada, te njegovu važnost. Uvod mora biti jasno povezan s dijelovima rada koji slijede. Numerira se.

Razrada teme po poglavljima i potpoglavljima – poglavlja i potpoglavljia moraju biti numerirana i podijeljena na logičan i jasan način te se sadržajno međusobno nadovezivati. Da bi se dio rada mogao označiti kao zasebno poglavlje, mora imati najmanje dvije kartice teksta. Ukoliko se radi o istraživanju, rad mora sadržavati i sljedeća poglavlja ili potpoglavljia:

Cilj i svrha istraživanja – opisuje se što se istraživanjem željelo saznati, navode se istraživačka pitanja i polazne pretpostavke (hipoteze).

Metode – opisuju se odabrane metode istraživanja, način provedbe i uzorak.

Rezultati – navode se dobiveni rezultati istraživanja.

Rasprava – objašnjavaju se dobiveni rezultati i njihova važnost.

Zaključak – u zaključku se iznose temeljne spoznaje i rezultati do kojih se došlo u radu te se naznačuju mogućnosti daljnjeg istraživanja problematike. U zaključku treba izbjegavati citiranje. Zaključak mora biti dovoljno opsežan, najmanje karticu teksta. Zaključak treba napisati jasno i razumljivo neovisno o čitanju ostatka teksta.

Popis literature – nakon zaključka slijedi popis korištenih jedinica literature. Detaljne upute o navođenju literature daju se u dijelu 5. *Popis korištene literature*.

Prilozi – ukoliko je potrebno, na kraju rada prilažu se slike, dodatne tablice, anketni upitnici, transkripti intervjua i sl. i to na posebnoj stranici naslovljenoj Prilozi.

Seminarski rad koji se šalje elektroničkom poštom ne smije prelaziti 500 kB.

5. Popis korištene literature

Broj jedinica literature koje je potrebno citirati u radu (izravno ili neizravno):

3 citata iz različitih izvora - prva godina preddiplomskog studija

5 citata iz različitih izvora – druga godina preddiplomskog studija

10 citata iz različitih izvora – treća godina preddiplomskog studija i diplomski studij

ili prema uputama predmetnog nastavnika.

Pri pisanju seminara koristi se i citira prije svega objavljena literatura. Predavanja ili ppt prezentacije treba izbjegavati.

Na posljednjoj paginiranoj stranici navodi se korištena literatura. U popisu literature ne razdvajaju se mrežni i tiskani izvori. Literatura se navodi po dolje navedenim pravilima za citiranje literature. Popis literature treba biti posložen abecednim redom. Sva literatura citirana u tekstu treba biti navedena u popisu literature. Isto tako, sva literatura navedena u popisu literature, mora biti citirana u tekstu.

UPUTE ZA CITIRANJE

Bilješke (fusnote)

Bilješke (objasnidbene i bibliografske) navode se na dnu stranice (putem umetanja fusnota). U objasnidbenim bilješkama se pobliže označava određeni dio teksta ili daju dodatni podaci. U bibliografskim bilješkama se daju podaci o izvoru iz kojeg je preuzet citat/navod. **Primjer bilješke ispod teksta za knjigu:**

¹ Plevnik, Danko. Fortuna čitanja. Osijek: Hrvatsko čitateljsko društvo, 2006. Str. 20. **Primjer bilješke ispod teksta za časopis:**

¹ Verona, Eva. Restauracija novina u Hrvatskoj. // Vjesnik bibliotekara Hrvatske 7, 3/4(1961), str. 242.

Za posredno citiranje koristi se izraz « Citirano prema: ». Posredno citirati znači citirati određenog autora/djelo koje je već citirano unutar druge knjige/ članka koje koristimo.

Primjer citiranja u bilješci ispod teksta:

Aitchinson, Jean; Gilchrist, Alan. Thesaurus construction. 2nd ed. London : Aslib, 1987. Citirano prema: Rowley, Jennifer. The controlled versus natural indexing languages debate revisited : a perspective on information retrieval practice and research. // Journal of Information Science 20, 2(1994), str. 112.

U popisu literature ovako se posredno citirano djelo može navesti na dva načina:

- Oba izvora zasebno ako su korištena oba djela. Npr.

Aitchinson, Jean; Gilchrist, Alan. Thesaurus construction. 2nd ed. London : Aslib, 1987. Rowley, Jennifer. The controlled versus natural indexing languages debate revisited : a perspective on information retrieval practice and research. // Journal of Information Science 20, 2(1994), str. 108-119.

- Samo djelo čije su ideje citirane. Npr.

Aitchinson, Jean; Gilchrist, Alan. Thesaurus construction. 2nd ed. London : Aslib, 1987.

Sva literatura navedena u bilješkama treba biti navedeni i u popisu literature na kraju rada. U popisu literature navodi se samo korišteni literatura koja je citirana u radu.

Citati Citirati se može izravno, koristeći navodnike, i neizravno, prepričavanjem (parafraziranjem). Preporuča se neizravno citiranje. Izravno citiranje preporuča se koristiti kada se radi o sadržajno i stilski posebno značajnom citatu. Citat koji se izravno prenosi iz

teksta drugog autora stavlja se u navodne znakove iza čega dolazi broj fus note. Ako se izravno citira veći dio teksta, a jedan dio se želi ispustiti, ispušteni dio označava se znakom [...]. Nakon parafraziranog dijela teksta također dolazi oznaka fus note. Za neizravno citiranje u bilješkama se koristi izraz Usp. (usporedi) ili Vidi.

Primjer: ¹ Usp. Mišić, Jelka. Bibliografija rasprava, članaka i književnih radova I. Zagreb: Izdanje i naklada Leksikografskog zavoda FNRJ, 1956. // Vjesnik bibliotekara Hrvatske 4, 1-4(1955-1957), str. 104-106.

Upute za citiranje različitih vrsta izvora:

Knjiga

Prezime, Ime autora. Naslov: podnaslov. Podatak o izdanju ako postoji. Mjesto izdavanja: Nakladnik, godina izdavanja.

- kod knjiga koje imaju dva ili tri autora navodi se: Prezime, Ime prvog autora; Prezime, Ime drugog autora; Prezime, Ime trećeg autora.
- kod knjiga koje imaju četiri i više autora navodi se: Prezime, Ime prvog autora...[et al.].
- kod knjiga koje nemaju podatak o autoru navodi se: Naslov / podatak o uredniku.

Članak u časopisu:

Prezime, Ime autora. Naslov rada: podnaslov. // Naslov časopisa oznaka sveska/godišta, broj(godina), početna-završna stranica.

Primjer: Aparac-Jelušić, Tatjana. Knjižnična znanost u posljednjem desetljeću dvadesetog stoljeća. // Vjesnik bibliotekara Hrvatske 40, 1/2(1997), str. 139-152.

11. Literatura

Ambriović Ristov A. (2007) Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković.

Zagreb.

Ballard, J.W.O., Whitlock, M.C. (2004): The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13, 729-744.

Bielen Ana. Skripta za vježbe iz biologije 1. Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Cho, R.J., Mindrinos, M., Richards, D.R., Sapolsky, R.J., Anderson, M., Drenkard, E., Dewdney, J., Reuber, T.L., Stammers, M., Federspiel, N., Theologis, A., Yang, W.H., Hubbel, E., Au, M., Chung, E.Y., Lashkari, D., Lemieux, B., Dean, C., Lipshutz, R.J., Ausubel, F.M., Davis, R.W. & Oefner, P.J. (1999): Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, 23: 203-207.

Fendt, L., Zimmermann, B., Daniaux, M., Walther Parson, W. (2009): Sequencing strategy for the whole mitochondrial genome resulting in high quality sequences. *BMC Genomics*, 10:139.

Graphodatsky, A.S., Trifonov V.A., Stanyon R. (2011): The genome diversity and karyotype evolution of mammals. *Molecular Cytogenetics* 4: 22.

Harrison, R.G. (1989): Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population biology and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution* 3, 535-46.

Hayashi, K. (1992): PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genetic Analysis: Techniques and Applications*, 9: 73-79.

Jeffreys, J, Wilson, V, Thein, S.L. (1985): Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 314: 67-73, 1985.

Kasamatsu, H., Robberson, D. L., Vinograd, J., (1971): A Novel Closed-Circular Mitochondrial DNA with Properties of a Replicating Intermediate. *Proc Natl Acad Sci*, 68: 2252–2257.

Moritz C., Hillis D., Mable B. (ed.) *Molecular Systematics*, 2nd ed (1996). Sunderland, Sinauer Associates, Inc., 205-247.

QIAGEN, Sample & Assay Technologies (<http://www.qiagen.com/>)

DNeasy® Blood & Tissue Handbook

Page, R. D. M., Holmes, E.C. (1998): *Molecular Evolution – A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science. Oxford.

Palumbi, S.R. (1996): *Nucleic acids II: the polymerase chain reaction*. Hillis DM

Sanger F, Nicklen S., Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74: 5463-5467.

Taberlet, P. (1996.): The use mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. In: *Molecular genetics approaches in conservation* (T. B. Smith, R. K. Wayne, urednici). Oxford University press. New York, Oxford. pp.125–142.

Tautz D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17, 6463-6471.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau. M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids. Res.* 23:4407-4414.

White, P. S., Tatum, O.L., Tegelstrom, H., Densmore, L. (1998): Mitochondrial DNA isolation, separation, and detection of fragments. U: *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach*. 2nd ed. (Hoelzel, A. R., urednik). Oxford University Press. Oxford. str. 65-101.

Ursing, B. M., Arnason, U. (1998): The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (*Sus scrofa*). *Journal of Molecular Evolution* 47, 302-306.

Wallner B., Vogl, C., Shukla, P., Burgstaller, J.P., Druml, T., Brem, G. (2013): Identification of Genetic Variation on the Horse Y Chromosome and the Tracing of Male Founder Lineages in Modern Breeds. *PLoS ONE* 8(4).

Weber, J. L. and May, P. Abundant, M. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44:388-396, 1989.

Williams, A, Kubelik A.R, Livak K.J., Rafalski J.A. & Tingey S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 18: 6531-6535.

Zhang, D. X., Hewitt, G.M. (1996): Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol Evol* 11, 247-251.