

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA
IZOLACIJA DNA IN OPTIMIZACIJA
POMNOŽEVANJA MIKROSATELITNIH
OZNAČEVALCEV PRI KUNAH

AMANDA POPLAS

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Izolacija DNA in optimizacija pomnoževanja mikrosatelitnih
označevalcev pri kunah**

(DNA isolation and optimization of amplification of microsatellite markers in
Mustelids)

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

Koper, april 2022

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Amanda POPLAS

Naslov zaključne naloge: Izolacija DNA in optimizacija pomnoževanja mikrosatelitnih označevalcev pri kunah

Kraj: Koper

Leto: 2022

Število listov: 61

Število slik: 16

Število tabel: 14

Število referenc: 48

Mentor: prof. dr. Elena Bužan

Somentor: asist. Felicita Urzi

Ključne besede: izolacija DNA, verižna reakcija s polimerazo (PCR), mikrosateliti, začetni oligonukleotidi, genetski označevalci

Izvleček: Prostorska razširjenost genetskih vzorcev populacij je osnova populacijskih študij, ki danes veliko prispevajo k upravljanju in ohranjanju prostoživečih živali. Kuna zlatica (*Martes martes*) in kuna belica (*M. foina*) sta vrsti, ki naseljujeta večji del Evrazije ter si v listopadnih in iglastih gozdovih centralne Evrope lahko delita isti habitat.

Namen zaključnega dela je bila izolacija DNA ter opredelitev ustreznih pogojev za pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov kun. Deoksiribonukleinsko kislino (DNA) smo izolirali iz dveh tkivnih vzorcev kune zlatice in sedmih tkivnih vzorcev kune belice. Po izolaciji DNA smo določili mešanico za pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov na najoptimalnejši temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov. Zaradi neuspešne genotipizacije smo iz nadaljnje raziskave izključili mešanico SET3, ki so jo sestavljali lokusi Mf 3.2, Mf 3.7, Mf 4.10 in Mf 8.10.

Določene pogoje za genotipizacijo mikrosatelitnih lokusov lahko uporabimo za nadaljnje genetske raziskave določitve genotipa osebkov, zlasti za analize populacijske strukture oz. populacijske genetike.

Key document information

Name and SURNAME: Amanda POPLAS

Title of the final project paper: DNA isolation and optimization of amplification of microsatellite markers in Mustelids

Place: Koper

Year: 2022

Number of pages: 61 Number of figures: 16 Number of tables: 14

Number of references: 48

Mentor: prof. dr. Elena Bužan

Co-Mentor: asist. Felicita Urzi

Keywords: DNA isolation, polymerase chain reaction (PCR), microsatellites, primers, genetic markers

Abstract: The spatial distribution of genetic patterns of populations is the basis of population studies, which today contribute greatly to the management and conservation of wildlife. Pine marten (*Martes martes*) and stone marten (*M. foina*) are species that inhabit most of Eurasia and can share the same habitat in the deciduous and coniferous forests of Central Europe. The purpose of this work was the isolation of DNA and defining of appropriate conditions for and multiplication of microsatellite loci of martens. Deoxyribonucleic acid (DNA) was isolated from 2 tissue samples of pine marten and 7 tissue samples of stone marten, i.e. a total of 9 tissue samples. In the isolation process, it is extremely important that we are accurate and follow a given protocol. It is also important to properly prepare tissue samples for DNA extraction (cut into as small pieces as possible, etc.).

After DNA extraction, a multiplex was determined to amplify microsatellite loci at the most optimal annealing temperature of the primer. Due to failed genotyping, a SET3 mixture consisting of loci Mf 3.2, Mf 3.7, Mf 4.10 and Mf 8.10 was excluded from further study.

The optimised protocols for genotyping of microsatellite loci can be used for further estimation of individual genotype, especially for analyzes of population structure or population genetics.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici dr. Eleni Bužan za predlagano tematiko zaključne naloge ter njeno pripravljenost odgovoriti na vsa morebitna vprašanja, ki so se mi porajala tekom celotnega procesa izdelave zaključne naloge.

Iskrena hvala tudi somentorici asist. Feliciti Urzi za vso pomoč v laboratoriju in nesebično deljenje svojega znanja kot tudi za vse skodelice kave, ki smo jih skupaj popili tekom raziskovalnega dela naloge.

Najlepše se zahvaljujem gospe Poloni Krajnc, ki je kljub svojemu natrpanemu urniku poskrbela za strokovno končno oblikovanje in lektoriranje mojega zaključnega dela.

Iz srca se zahvaljujem svoji čudoviti družini, ki me je tekom celotnega študija podpirala, verjela vame in mi ni pustila obupati, ko sem naletela na ovire.

Najlepša hvala tudi vsem (družinskim) prijateljem, še zlasti pa Niki T. za konstanten vir pozitivizma tekom študija, Andražu G. za to, da si verjel vame in mi pomagal pri zagonetnih strokovnih prevodih, ter Lauri J. za vse nasvete in pomoč pri zaključnem delu.

Nazadnje pa gre zahvala tudi mojim kosmatim in pernatim živalskim prijateljem, ki so me ob stresnih trenutkih vedno znova razbremenili.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Opis vrst.....	1
1.1.1	Kuna zlatica (<i>Martes martes</i>)	2
1.1.2	Kuna belica (<i>Martes foina</i>).....	4
1.2	Problematika razlikovanja med vrstama	6
1.3	Molekularne tehnike za oceno genetske strukture populacij	7
1.3.1	Mikrosateliti	7
1.4	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	8
1.5	Začetni oligonukleotidi	10
1.5.1	Določanje ustrezne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov.....	10
1.5.2	Dolžina začetnih oligonukleotidov	11
1.5.3	Koncentracija začetnih oligonukleotidov	12
1.6	Agarozna gelska elektroforeza.....	13
1.7	Namen in cilji zaključne naloge.....	15
2	METODE DELA.....	16
2.1	Izolacija DNA	17
2.1.1	Protokol za izolacijo DNA	18
2.2	Merjenje koncentracije izolirane DNA.....	19
2.3	Uporabljeni mikrosatelitni označevalci	19
2.4	Določanje optimalne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov	21
2.5	Protokol reakcije PCR	24
2.6	Protokol agarozne gelske elektroforeze	27
2.7	Genotipizacija	28
3	REZULTATI Z DISKUSIJO.....	29
3.1	Velikosti pomnoženih alelov	29
3.2	Merjenje koncentracije DNA.....	30
3.3	Protokol agarozne gelske elektroforeze	31
3.4	Rezultati analize mikrosatelitnih lokusov	34
3.5	Težave in rešitve pri pomnoževanju mešanice začetnih oligonukleotidov; SET3	46
4	ZAKLJUČEK	48
5	LITERATURA	49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Smernice za oblikovanje in uporabo začetnih oligonukleotidov.....	13
Preglednica 2: V tabeli so podani podatki tkivnih vzorcev, ki smo jih analizirali v naši zaključni nalogi.	17
Preglednica 3: 13 polimorfnih mikrosatelitnih lokusov kune belice, ki smo jih uporabili v zaključni nalogi in katere so izolirali in karakterizirali Basto in sodelavci (2010)	20
Preglednica 4: Parametri, ocenjeni s pomočjo spletnega kalkulatorja Thermo Fisher Scientific Tm Calculator.....	23
Preglednica 5: Mešanice začetnih oligonukleotidov	24
Preglednica 6: Seznam in volumen začetnih oligonukleotidov v SET1.....	25
Preglednica 7: Seznam in volumen začetnih oligonukleotidov v SET2.....	25
Preglednica 8: Seznam in volumen začetnih oligonukleotidov v SET3.....	26
Preglednica 9: Količine posameznih reagentov v reakcijski mešanici PCR – SET1	26
Preglednica 10: Količine posameznih reagentov v reakcijski mešanici PCR – SET2	26
Preglednica 11: Količine posameznih reagentov v reakcijski mešanici PCR – SET3	27
Preglednica 12: Velikosti pomnoženih alelov pri 9 analiziranih vzorcih na štirih mikrosatelitnih lokusih iz SET1	29
Preglednica 13: Velikosti pomnoženih alelov pri 9 analiziranih vzorcih na petih mikrosatelitnih lokusih iz SET2	29
Preglednica 14: Vrednosti izmerjene koncentracije DNA v obravnavanih vzorcih. Volumen elucijskega pufra je znašal 100 µL.	30

KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Shema PCR reakcije.....	9
Slika 2: Shema agarozne gelske elektroforeze	14
Slika 3: Mikrotiterska plošča, zgrajena iz 96 vdolbinic oz. luknjic	22
Slika 4: Prikaz izračuna optimalne temperature prileganja s pomočjo spletnega kalkulatorja Thermo Fisher Scientific T _m Calculator za začetni oligonukleotid Mf 1.1	22
Slika 5: Pomnoženi fragmenti lokusov Mf 1.1, Mf. 1.11, Mf 2.13 in Mf 6.5 iz SET 1 na agarozni gelski elektroforezi.	32
Slika 6: Pomnoženi fragmenti lokusov Mf 8.8, Mf 1.18, Mf 1.3, Mf 4.17 in Mf 8.7 iz SET 2 na agarozni gelski elektroforezi.....	32
Slika 7: Pomnoženi fragmenti lokusov Mf 3.2, Mf 3.7, Mf 4.10 in Mf 8.10 iz SET 3 na agarozni gelski elektroforezi.	33
Slika 8: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 1.1 (SET1) v vzorcu LME1791 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 59,4 °C.....	34
Slika 9: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 1.11 (SET1) v vzorcu LME2322 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 59,4 °C	35
Slika 10: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 2.13 (SET1) v vzorcu LME2323 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 59,4 °C	36
Slika 11: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 6.5 (SET1) v vzorcu LME2616 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 59,4 °C.....	37
Slika 12: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 8.8 (SET2) v vzorcu LME1791 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 58,7 °C.....	38
Slika 13: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 1.18 (SET2) v vzorcu LME2322 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 58,7 °C.....	39
Slika 14: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 1.3 (SET2) v vzorcu LME2616 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 58,7 °C.....	40
Slika 15: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 4.17 (SET2) v vzorcu LME1833 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 58,7 °C.....	41
Slika 16: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 8.7 (SET2) v vzorcu LME1833 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 58,7 °C.....	42

SEZNAM KRATIC

DNA – deoksiribonukleinska kislina (*ang.* deoxyribonucleic acid)

dsDNA – dvojno vijačna DNA (*ang.* double-stranded DNA)

bp – bazni pari (*ang.* base pairs)

STR – kratke tandemske ponovitve ali mikrosateliti (*ang.* Short Tandem Repeats)

PCR – verižna reakcija s polimerazo (*ang.* polymerase chain reaction)

AP – abazično, apurinsko ali apirimidinsko mesto

8-oksoG – 8-oksogvanin

T_a – temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov

1 UVOD

Prostorska razširjenost genetskih vzorcev populacij je osnova populacijskih študij, ki danes veliko prispevajo k upravljanju in ohranjanju prostoživečih živali. Identifikacija prisotnosti zveri, ki so redke, kriptične ali aktivne ponoči, velikokrat temelji na indirektnih sledih, ki so posledica aktivnosti živali, kot so npr. stopinje, iztrebki ali dlake (Basto in sod. 2016; Pilot in sod. 2007). Obenem so zveri občutljive na habitatno razdrobljenost oz. fragmentacijo, kar povzroča tudi spremembe v njihovem fitnesu in genetski strukturi populacij (Basto in sod. 2016).

Za upravljanje in varstvo populacij je izjemega pomena določitev genetske strukture in variabilnosti, ki je pomemben pokazatelj prilagajanja na spremembe v okolju tako za redke in ogrožene vrste kot tudi za "pogoste", saj so številne izmed njih ogrožene zaradi spreminjanja njihovih življenjskih okolij (Basto in sod. 2016).

Žal še vedno ostaja veliko neznanega glede posledic habitatne razdrobljenosti in genetske heterogenosti pri pogostih vrstah. Za te vrste se v splošnem domneva, da imajo zanemarljivo populacijsko strukturiranost oziroma je le ta posledica izolacije z distanco. Vendar vse več študij kaže, da lahko tudi pri zelo mobilnih in splošno razširjenih habitatnih generalistih, tj. vrstah, ki imajo široko ekološko nišo in katere se lahko prilagajajo številnim okoljskim razmeram, opazimo nepričakovane vzorce genetske diferenciacije. Na te vzorce lahko vplivajo različni pretekli dogodki, krajina, recentna razdrobljenost pokrajine in/ali habitatne preference vrste (Basto in sod. 2016).

1.1 Opis vrst

Rod *Martes*, znotraj družine Mustelidae, vključuje 8 še živečih vrst. Pet izmed teh vrst (tj. *M. americana*, *M. foina*, *M. martes*, *M. melampus* in *M. zibellina*) si je morfološko zelo podobnih in dve izmed teh petih (*M. martes* in *M. foina*) sta simpatrični v večjem delu Evrazije, njun naravni življenjski prostor pa so listopadni gozdovi centralne Evrope in iglasti gozdovi. Tudi njuni iztrebki so si po videzu in vsebini zelo podobni in jih na območjih, kjer se njuni areali prekrivajo, ni mogoče razlikovati (Domingo-Roura 2002).

Kuna zlatica (*M. martes*) je razširjena v večjem delu Evrope, razen v osrednjem in na južnem delu Iberskega polotoka, v vzhodni Italiji, Grčiji in južni Britaniji. Kuna belica (*M. foina*) je razširjena v srednji in južni Evropi, ni pa prisotna na Britanskem otočju, Norveškem, Švedskem, Finskem ter v severni Rusiji. Vrsti sta simpatrični v večjem delu

osrednje Evrope. Kuni sta si po morfologiji, vedenju in prehrani med seboj zelo podobni (Pilot in sod. 2007).

V splošnem so glavne značilnosti, ki razlikujejo obe vrsti med sabo, njune habitatne preference: medtem ko so kune zlatice bolj povezane z gozdnimi habitatmi, kune belice živijo v bližini človeških naselij. Vendar pa obe vrsti lahko sobivata v razdrobljenih habitatih, ki jih sestavljajo zaplate gozda, njiv, travnikov in kmetijskih poslopij (Pilot in sod. 2007).

Obe vrsti sta vključeni v Dodatek III Bernske konvencije (Svet Evropske unije 1979), medtem ko Priloga V k Direktivi Sveta 92/43/EGS (Svet Evropske unije 2007) o ohranjanju naravnih habitatov ter prosto živečih živalskih in rastlinskih vrst vključuje le belico (Domingo-Roura 2002).

Splošno pomanjkanje starodavnih filogenetskih linij pri kunah nam nakazuje, da so njihovi današnji predstavniki, ki jih najdemo v srednji in severni Evropi, to območje kolonizirali po zadnji poledenitvi iz enotnega evropskega refugija (Kyle in sod. 2003). Kuna zlatica je v Sloveniji razširjena v celinskih predelih, medtem ko v submediteranu naj ne bi bila prisotna. Največ nahajališč kune zlatice v Sloveniji je v gričevnatem in gorskem svetu, manj pa v subpanonski nižini (Kryštufek 1991). Medtem je kuna belica v Sloveniji splošno razširjena ter v vseh delih Slovenije enakomerno prisotna (Kryštufek 1991).

1.1.1 Kuna zlatica (*Martes martes*)

Kuna zlatica je srednje velika zver iz družine Mustelidae. Razširjena je v Evropi, vključno z glavnimi sredozemskimi otoki, izjema pri tem pa je večji del Iberskega polotoka in Grčije ter deli Belgije in Nizozemske. V Veliki Britaniji je njena razširjenost omejena (Natali in sod. 2010).

Vrsta je habitatni specialist in običajno jo najdemo v zrelih iglastih in listopadnih gozdovih, v južnih predelih Evrope, razširjena pa je tudi v gozdovih hrasta plutovca (*Quercus suber*), sredozemskih grmiščih in na obdelovalnih površinah. Včasih jo zapazimo celo v bližini človeških naselij (Colli in sod. 2011; Pertoldi in sod. 2008). So solitarne živali, ki se z drugimi predstavniki svoje vrste srečujejo le v času pozne pomladi ali v zgodnjem poletju, ko se pariyo (Natali in sod. 2010).

Evropska kuna zlatica je bila včasih v Evropi veliko bolj razširjena kot danes. Ker pa imajo nizko reprodukcijsko stopnjo ter omejeno sposobnost distribucije v primerjavi z drugimi predstavniki iz družine Mustelidae, so kune zlatice še posebej občutljive na spremembe v

svojem habitatu. Tako je kombinacija dejavnikov, kot so preganjanje, lovljenje, plenjenje s strani naravnih predatorjev (npr. navadna lisica) ter uničenje in degradacija njihovega habitata, vodila do strmega upada v njeni številčnosti na celotnem območju razširjenosti. Posledično so lokalne populacije postale bolj ranljive za izumrtje (Kyle in sod. 2003; Pertoldi in sod. 2008).

Žal kuna zlatica ni edini predstavnik mustelidov, pri katerih so opazili opisan upad populacij. Na Danskem so od leta 1960 podoben upad populacije opazili tudi pri: dihurju (*M. putorius*), evrazijski vidri (*Lutra lutra*), navadnemu jazbecu (*Meles meles*) ter veliki (*M. erminea*) in mali podlasici (*M. nivalis*). Zdi se, da naj bi razlogi za ta splošen upad v številčnosti populacij tičali predvsem v intenzifikaciji kmetijskih praks (in posledični razdrobljenosti habitatov), saj se je od začetka šestdesetih let le-ta povečala (Pertoldi in sod. 2008).

V sredozemskem bazenu lahko najdemo tudi otoške populacije kune zlatice. Le te se pojavljajo na Siciliji, Sardiniji, Korziki, Menorki, Majorki in Elbi. Glede statusa nekaterih izmed teh populacij še vedno ostajajo taksonomske negotovosti. Takšen primer je na primer *Martes martes minorcensis*, podvrsta kune zlatice z Balearskih otokov. Gre za menorsko populacijo kun zlatic, ki izkazuje morfološke značilnosti - večje telo in večjo lobanjo - razločno drugačne od tistih, ki jih lahko opazimo pri celinskih populacijah *M. martes* (Colli in sod. 2011).

Predlagana je bila še ena podvrsta kun zlatic, in sicer *Martes martes latinorum*. Le ta vključuje kune zlatice iz centralne in severne Italije, Sardinije in v veliki verjetnosti tudi s Korzike, vendar je za potrditev podvrste bila priporočena temeljita taksonomska revizija. Novejši podatki in raziskave so pokazali, da variabilnost sardinske kune zlatice, kar zadeva barvo krzna in grla ter meritve telesa, večinoma spada v evropsko kontinentalno (oz. celinsko) populacijo ter da si sardinski osebki med seboj ne delijo značilnosti, ki jih lahko opazimo pri *M. m latinorum* (tj. temnejše obarvano krzno ter večja in rumeno-oranžna podvratna lisa) (Colli in sod. 2011).

V splošnem velja, da je sredozemske kune na otoke naselil človek, o odnosih med temi populacijami in njihovimi celinskimi ekvivalenti pa trenutno še ni podatkov (Colli in sod. 2011).

Obstajajo polemike glede izvora in statusa kune zlatice v Angliji in Walesu. Kljub dokazom o stalnosti populacij skozi 20. stoletje so avtorji nekaterih študij mnenja, da populacija ni viabilna, ter predlagajo ponovno naselitev vrste v Anglijo. Po drugi strani pa nekateri avtorji trdijo ravno nasprotno, in sicer da dokler kune (še) obstajajo na območju

Anglije, bi morali poskusiti razumeti, kje tiči razlog za njihov neuspeh pri razmnoževanju in širjenju (Kyle in sod. 2003).

Kombinirani rezultati mitohondrijskih genetskih markerjev mtDNA in jedrne DNA kažejo, da so nekatere izmed obstoječih kun zlatih v Angliji avtohtone, nekatere pa so lahko potomci *M. americana* ali hibridi med *M. americana* in *M. martes*. Najverjetnejši vir *M. americana* v severnem predelu Anglije so kune, ki so pobegnile ali bile namerno izpuščene s komercialnih farm minkov. To še povečuje možnost hibridizacije med kunjimi vrstami. Na žalost za to območje Anglije ne obstajajo uradni zapisi oz. evidence o omenjenih farmah v času pred Uredbo o vzreji minkov (*angl.* mink (keeping) regulations) (UK Parliament 1962), sprejeto leta 1962, čeprav so bile farme prisotne že od dvajsetih let prejšnjega stoletja (Kyle in sod. 2003).

1.1.2 Kuna belica (*Martes foina*)

Kuna belica je v srednji in zahodni Evropi znana kot sinantropna vrsta, kar pomeni, da si življenjski prostor pogosto poišče v antropogenih habitatih, tako na podeželju kot tudi v mestih: npr. na podstrešjih, skednjih in drugih kmetijskih poslopih, v parkih in drugih urbanih območjih. Kune belice so bistveno bolj kot druge zveri - celo bolj kot lisica - sposobne izkoriščati človekova bivališča. V mestih imajo prebivališča najpogosteje v stavbah, pogosto tudi v hišah, v katerih živijo ljudje. A kljub temu urbanizacija zelo neizrazito vpliva na socialne odnose in prostorsko organiziranost vrste, saj je zelo filogenetsko determinirana in je le pod zmernimi vplivi okolja (Bužan in sod. 2020).

Kuna belica je vsejed - njene prehranjevalne navade kažejo, da pri svoji izbire hrane izkazuje tako generalistične kot tudi oportunistične značilnosti. To bi lahko bil tudi razlog za njeno uspešno širjenje. Kuna belica je večinoma kopenska vrsta, a lahko zaradi svojih sposobnosti plezanja zlahka lovi in se giblje tudi med drevesnimi krošnjami. Njena prehrana se spreminja sezonsko in v odvisnosti od habitata, v katerem živi. Slednji so lahko urbana okolja, ruralna okolja (npr. vasi, kmetije), visokogorska, gozdna in kamnita območja ter mokrišča (Lanszki in sod. 2009).

V času jeseni in zime so glavna hrana kun belic mali sesalci, predvsem glodavci, medtem ko jih spomladi in zlasti poleti zaužijejo manj. Poleti in jeseni, ko dozorevajo plodovi, pomemben del kunje prehrane predstavlja rastlinski material. Rastline se v prehrani mesojedih vrst srednje in južne Evrope pogosto pojavljajo, medtem ko je njihova vloga v severnejših predelih Evrope manj pomembna. Predvsem rastlinski plodovi so namreč

pomemben vir ogljikovih hidratov, ki prispevajo k tvorbi podkožnega tkiva in tako pomagajo pri uspešnem prezimovanju (Lanszki in sod. 1999).

V raziskavah prehrane kun, ki živijo v naseljih, so pogosto zabeležili hrano antropogenega izvora (npr. perutnina, kunci, različno sadje, jajca). Le ta se sezonsko in v različnih okoljih pojavlja v različnih deležih (Lanszki in sod. 1999; Wierzbowska in sod. 2009, 2017; Bužan in sod. 2020). Ker so prehranski viri kun belic v kulturni krajini raznoliki in pogosto povezani s človeško dejavnostjo (npr. hrana s smetišč, gospodinjski odpadki), imajo kune v urbanem okolju tudi pomembno sanitarno vlogo (Bužan in sod. 2020).

Ker svoj življenjski prostor, poiščejo tudi v urbanih okoljih, lahko med njimi in človekom prihaja tudi do konfliktov, in sicer na več ravneh. Najpogostejši konflikti s kunami v urbanih okoljih so (Bužan in sod. 2020):

- i. plenjenje kokoši, prehranjevanje z jajci in plenjenje drugih domačih živali;
- ii. prehranjevanje z vrtninami oz. sadjem;
- iii. škoda na objektih, npr. hišah (pregriznjena izolacija, izločki, iztrebki itn.) in avtomobilih, kjer lahko pregrizejo cevi, kable in izolacijo oz. jih onesnažijo s smrdljivimi izločki; opisano povzročanje škode na avtomobilih je verjetno povezano s teritorialnim vedenjem kun, saj sodijo med teritorialne vrste živali;
- iv. motnje zaradi hrupa, ki ga povzročajo, kadar se naselijo v objektih;
- v. prenos bolezni, med katerimi so tudi zoonoze, saj so rezervoar tako zunanjih (klopov, garij) kot tudi notranjih zajedavcev (nematod, trakulj, enoceličarjev), bakterij in virusov (npr. virusa pasje kuge – *Canine morbillivirus*).

V kontekstu s trenutno zdravstveno situacijo po svetu velja omeniti, da so predstavniki družine kun (Mustelidae) ena izmed znanstveno potrjenih živalskih skupin, s katerih je mogoč prenos virusa SARS-CoV-2 (tudi mutiranega) na ljudi. Zaenkrat omenjen virus pri kunah belicah ali kateremkoli drugem prostoživečem predstavniku kun še ni bil potrjen.

V študiji Bastoja in sodelavcev (2016) so ugotovili, da reke in druge hidrološke posebnosti predstavljajo naravno oviro za razširjanje kun. Prav tako so k opaženi strukturiranosti populacije kune belice prispevali izguba preferiranega habitata, močno spremenjena pokrajina in antropogene značilnosti (Basto in sod. 2016).

1.2 Problematika razlikovanja med vrstama

Zanesljiva identifikacija populacij/vrst je osnova za njihovo učinkovito upravljanje in ohranjanje. A vendar je razlikovanje med vrstami pogosto težko, zlasti če se morfološko podobni, redki in težko opazni vrsti, pojavljata simpatrično. To velja tudi za kuno zlatico in kuno belico .

Kune je do ravni vrste možno prepoznati na podlagi naslednjih morfoloških značilnosti (Pilot in sod. 2007):

- oblike in barve zaplate svetlega krzna na grlu (le ta je pri kunah zlatih kremno rumena ter pri kunah belicah bela in podaljšana bolj ventralno)
- barve konice nosu (le ta je pri kunah zlatih skoraj črna, pri kunah belicah pa svetla)
- dlak na spodnji strani tac (le te so pri kunah zlatih debelejšje in pokrivajo blazinice)
- velikosti in oblike ušes (pri kunah zlatih so večja in bolj koničasta).

Ker so kune zlatice težko opazne in ulovljive, je njihovo spremljanje na podlagi iztrebkov ena izmed učinkovitih metod monitoringa. V številnih evropskih državah so redke in zakonsko zaščitene, zato je potreba po razvoju in uporabi neinvazivnih metod pridobivanja vzorcev bistvenega pomena. Tradicionalno zbiranje podatkov (npr. podatki o kunjih osebkih, ki so bili ustreljeni v zakonitem lovu), ni več možno, lovljenje živih osebkov pa je stroškovno neučinkovito. Zato je izjemno pomembno najti ustrezno metodo identifikacije vrst, ki bi omogočala razlikovanje med iztrebki kun zlatic in belic ter določanje prisotnosti in območja razširjenosti vsake izmed omenjenih dveh vrst kun (Pilot in sod. 2007).

Molekularne metode, ki temeljijo na izolaciji DNA iz iztrebkov, so se izkazale za zanesljivejše od tistih, ki temeljijo na morfoloških značilnosti vrste. A vendar omenjeno razlikovanje v morfoloških posebnostih iztrebkov v primeru kune zlatice in belice sploh ni mogoče, kar še bolj poudarja potrebo ter pomen molekularnih metod za prepoznavanje vrst (Pilot in sod. 2007).

Domingo-Roura je leta 2002 predlagal genetsko metodo za razlikovanje med kunami zlaticami in belicami, ki temelji na vrstno specifičnih in opazno različnih dolžinah alelov mikrosatelitnega lokusa Mel10 (Domingo-Roura 2002). Metoda za razločitev omenjenih dveh vrst kun zahteva le eno PCR amplifikacijo in elektroforezo na agaroznem gelu. Vendar pa je treba v primeru uporabe te metode na neinvazivno zbranih vzorcih oz. materialu, kot so npr. iztrebki ali dlake, upoštevati morebitne napake, povezane z analizo

takšnega materiala, vključno s kontaminacijo, izpadom alelov in lažno pozitivnimi variabilnimi mesti (Pilot in sod. 2007).

Pilot in sodelavci so v svoji študiji (Pilot in sod. 2007) opisali genetsko metodo, ki omogoča razlikovanje med neinvazivno pridobljenimi vzorci omenjenih dveh kunjih vrst. Na podlagi analize tkivnih vzorcev 32 kun zlatih in 26 kun belic so ugotovili, da se mikrosatelitni označevalec Ma18, ki je bil razvit za vrsto *Martes americana*, med danima dvema vrstama kun bistveno razlikuje po dolžini alelov, to pa omogoča razlikovanje med vrstama (Pilot in sod. 2007).

1.3 Molekularne tehnike za oceno genetske strukture populacij

1.3.1 Mikrosateliti

Mikrosateliti ali kratke tandemske ponovitve (*ang.* Short Tandem Repeats; STR) so med najbolj spremenljivimi regijami DNA, njihova uporaba pa je na področju upravljanja s prosto živečimi živalmi precej razširjena. Mikrosateliti se uporabljajo tudi v populacijski genetiki za merjenje ravni sorodnosti med podvrstami, skupinami in posamezniki. Ravni mutacij se na določenih lokusih razlikujejo glede na dolžino in sekvenco zaporedja tandemskih ponovitev, zaradi česar so primerni kandidati za vrstno specifične markerje (Domingo-Roura 2002). Gre torej za izjemno polimorfne regije DNA, široko razširjene po evkariontskih genomih. S pomočjo analize mikrosatelitnih označevalcev je pri prosto živečih živalskih vrstah možno preučiti njihovo populacijsko strukturiranost, raznovrstnost in sorodnost (Davis in Strobeck 1998).

Mikrosateliti so učinkoviti in cenovno ugodni genetski označevalci, s katerimi lahko proučujemo številna vprašanja iz molekularne ekologije. Še za zlasti pomembne so se izkazali v študijah, v katerih ocenjujejo genetsko strukturiranost splošno razširjenih in mobilnih vrst (Basto in sod. 2016). Poleg tega nam mikrosateliti lahko pridejo v pomoč pri načrtovanju varovanja in ohranjanja kun kot tudi drugih (ogroženih) vrst, saj z njimi lahko ocenimo ravni genetskih sprememb znotraj ter med živečimi populacijami (Davis in Strobeck 1998).

1.3.1.1 Vrstno specifični označevalci za kune

Glavni cilj razvijanja vrstno specifičnih genetskih označevalcev, ki bodo sposobni razlikovanja med kunami belice in zlatice, je možnost določanja strukture populacij na podlagi DNA, izolirane iz tkivnih vzorcev, iztrebkov ali drugega neinvazivno

pridobljenega vzorčnega materiala. Pri tem je potrebno upoštevati tudi morebitne napake, povezane z analizo takšnih vzorcev, kot so npr. izpad alelov, lažni aleli in kontaminacije.

1.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Reakcija PCR je metoda, ki omogoča pomnoževanje izbranih odsekov DNA oz. nukleotidnih zaporedij. Reakciji pravimo verižna zato, ker jo večkrat ponovimo, pri vsaki ponovitvi pa se število kopij pomnoževanega odseka podvoji. Metodo so uvedli leta 1985 (Kaunit 2015; Wages 2005) in od takrat je nepogrešljiva v znanstvenih raziskavah. Pomnoževanje nukleotidnih zaporedij poteka s pomočjo kratkih začetnih oligonukleotidov, ki se pripnejo na tarčno zaporedje. Ti oligonukleotidi delujejo kot substrat za termostabilen encim DNA-polimeraza, ki omogoča nastanek komplementarnega zaporedja z dodajanjem deoksinukleotidov. Kot DNA-polimerazo se navadno uporablja polimeraza Taq, pridobljena iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* (Zrim 2011; Kelc 2018).

Da je PCR reakcija uspešna, moramo zagotoviti optimalne količine vsakega od reagentov, saj le tako lahko dobimo specifične produkte.

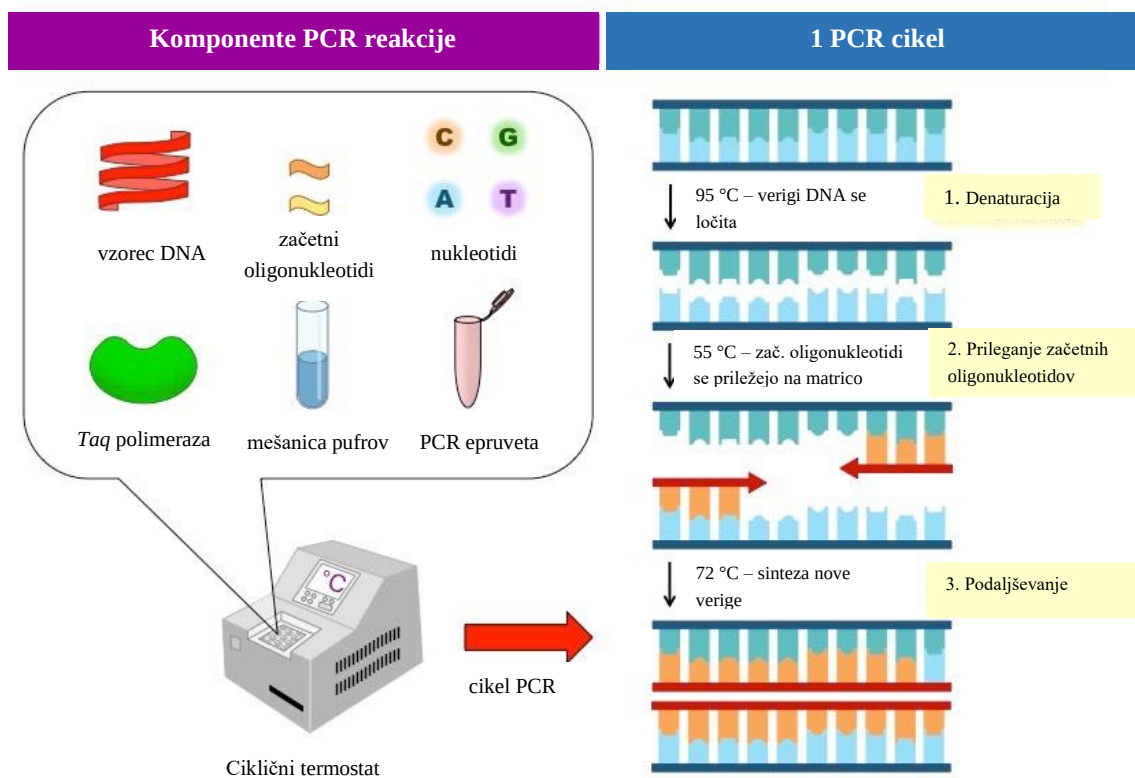
Reagenti so tako (Kelc 2018):

- matrična DNA, ki vsebuje tarčno zaporedje
- začetni oligonukleotidi, dolžine med 15-30 bp, ki so komplementarni znanemu odseku na DNA
- termično stabilen encim DNA-polimeraza
- mononukleotidi dNTP (tudi monomerni deoksiribonukleotidi), ki so potrebni za sintezo nove DNA
- pufer, ki vzdržuje pH raztopine med 8,0-8,3
- raztopina soli ($MgCl_2$), ki je potrebna za delovanje DNA-polimeraze ter tvorbo kompleksa z dNTP-ji
- deionizirana voda

Kot že omenjeno, je reakcija PCR verižna, ker poteka v več ciklih. Pri vsaki ponovitvi oz. ciklu se število kopij odseka, ki ga pomnožujemo, podvoji. Reakcija PCR je običajno sestavljena iz 20-40 ciklov, izvajamo pa jo v natančnih termostatih, ki jih je mogoče programirati. Določimo lahko temperaturo, trajanje posameznega cikla, število ponovitev ciklov ipd (Kelc 2018).

PCR stopnje oz. koraki so (Repnik in Potočnik 2013; Kelc 2018):

1. denaturacija DNA: poteka 15–30 s pri temperaturi 95 °C in povzroči, da matrična DNA postane enoverižna (ang. *single-strand*), s tem pa je omogočena vezava začetnih oligonukleotidov na matrico,
2. pripenjanje oz. prileganje začetnih oligonukleotidov na matrico: temperatura se v tem koraku hitro zniža na optimalno temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov, ki znaša običajno 50–65 °C. Korak traja 15–30 s,
3. podaljševanje novo nastajajoče DNA verige: poteka 15–30 s ali dlje (odvisno od dolžine odseka, ki ga pomnožujemo) pri temperaturi 72 °C. Z dvigom temperature na dano vrednost se ustvarijo optimalni pogoji za delovanje DNA-polimeraze, ki podaljša začetne oligonukleotide in s tem se tvori novo nastajajočo verigo DNA.



Slika 1: Shema PCR reakcije

(Vir: <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/pcr.html>;
dostopano dne 03.09.2021)

1.5 Začetni oligonukleotidi

1.5.1 Določanje ustrezne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov

Temperatura prileganja je temperatura, pri kateri se začetni oligonukleotidi vežejo na komplementarno regijo ciljne DNA. Ta proces se dogaja v 2. koraku reakcije PCR, torej med prileganjem začetnih oligonukleotidov. Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je odvisna od dolžine in nukleotidnega zaporedja začetnega oligonukleotida (Chauhan 2021).

Dober par začetnih oligonukleotidov, uporabljen v reakciji PCR, mora ustrezati določenim merilom, kot npr. (Chauhan 2021):

- njegova dolžina mora znašati med 18–22 baznimi pari, delež GC naj bi se gibal med 40–60 %
- majhna lasnična zanka (Chauhan 2021)
- nizka tendenca za tvorbo primerskih dimerov (*ang.* primer-dimer) (Chauhan 2021)
- visoka specifičnost (Chauhan 2021)

Temperatura prileganja se nahaja pod talilno temperaturo, ki omogoča vezanje začetnega oligonukleotida. V kolikor temperaturo prileganja izračunamo oz. določimo teoretično, moramo njeno ustreznost potrditi tudi eksperimentalno. V idealnem primeru bi morala biti temperatura prileganja za 5 °C nižja oz. višja od talilne temperature začetnega oligonukleotida. Na temperaturo prileganja vpliva tudi delež GC, in sicer višji kot je delež GC, višja bo temperatura prileganja (Chauhan 2021).

Kadar je temperatura prileganja previsoka in torej presega temperaturo, pri kateri se začetni oligonukleotidi vežejo na matrično DNA, se le ti nanjo ne bodo mogli vezati in posledično bomo dobili manj amplikonov oz. produktov PCR. V večini primerov je rezultat višje temperature prileganja ta, da ne pride do pomnoževanja amplikonov ali pa so le ti nedokončani. Kadar pa je temperatura prileganja prenizka, bo rezultat reakcije PCR nespecifično pomnoževanje ali pa nastanek primerskih dimerov (Chauhan 2021).

Temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov lahko optimiziramo z izračunom talilne temperature začetnih oligonukleotidov (T_m ; *ang.* *melting temperature*). Enačba za izračun slednje je: $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$. Do izračuna lahko pridemo tudi s pomočjo spletnih T_m kalkulatorjev, kakršen je npr. Thermo Fisher Scientific T_m Calculator (dostopen na <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>), ki nam izračuna tako talilno temperaturo kakor temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov. Pri tem je dobro vedeti, da se optimalna

temperatura prileganja velikokrat razlikuje od teoretično izračunane. Zato lahko kot izhodiščno točko uporabimo temperaturo prileganja, ki je za 5 °C nižja od talilne temperature začetnih oligonukleotidov. Po izračunu T_m lahko to v laboratoriju optimiziramo s poskušanjem pomnoževanja v reakciji PCR 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 (Löffert in sod. 1997).

Poleg temperature prileganja je za vezanje začetnih oligonukleotidov na matrično DNA pomemben tudi čas trajanja 3. koraka PCR reakcije. Čas trajanja tega koraka je odvisen od dolžine ciljnega zaporedja oz. tarčnega produkta in v kolikor tega ne upoštevamo lahko kot končni produkt dobimo primerske dimerje (Chauhan 2021).

1.5.2 Dolžina začetnih oligonukleotidov

Za večino PCR reakcij je običajno optimalna dolžina začetnih oligonukleotidov od 18 do 30 baznih parov (bp) (Löffert in sod. 1997). Ta dolžina je dovolj dolga za zadostno specifičnost in dovolj kratka, da se začetni oligonukleotidi pri zanje specifični temperaturi prileganja zlahka vežejo na matrično DNA (PREMIER Biosoft). V kolikor je temperatura prileganja reakcije PCR določena nekaj stopinj nad oz. pod talilno temperaturo začetnega oligonukleotida, so oligonukleotidi dolžine med 18 in 24 baznimi pari navadno precej sekvenčno specifični. Specifičnost je frekvenca pojavnosti nezaželene pritrditve začetnega oligonukleotida. Začetni oligonukleotidi s povprečno do slabo specifičnostjo navadno proizvedejo PCR produkte z dodatnimi nesorodnimi in nezaželenimi amplikoni (Dieffenbach in sod. 1993).

Zgoraj omenjene dolžine začetnih oligonukleotidov delujejo zelo dobro za standardne reakcije PCR z določenim ciljem, pri katerih se ne pojavljajo nobena odstopanja v zaporedjih. Pri eksponentnem pomnoževanju bo že majhna neučinkovitost na vsakem koraku prileganja kot posledico imela znatno manj pomnoženega produkta (Dieffenbach in sod. 1993).

Glede na velikost genoma organizma obstaja minimalna dolžina začetnega oligonukleotida. Najbolj »varno« je, da gradimo začetne nukleotide znotraj meje specifičnosti. Za vsak dodatni nukleotid postane začetni oligonukleotid 4-krat bolj specifičen; zato tudi najmanjša dolžina zač. oligonukleotida, uporabljenega v večini aplikacij, znaša 18 nukleotidov. V splošnem je dobra ideja, da izdelamo takšne začetne

oligonukleotide, da se sintetizirani oligonukleotidi lahko uporabljajo v različnih eksperimentalnih pogojih (Dieffenbach in sod. 1993).

Zgornja meja dolžine začetnega oligonukleotida je nekoliko manj odločilna in ima več opraviti z učinkovitostjo reakcije. Zaradi entropičnih vzrokov velja, da krajši kot bo začetni oligonukleotid, hitreje se bo prilegel na tarčno DNA in tvoril stabilno dvoverižno matrico, na katero se nato lahko veže DNA-polimeraza. V splošnem so začetni oligonukleotidi, dolžin 28–35 baznih parov, potrebni pri pomnoževanju zaporedij, pri katerih se pričakuje določena stopnja heterogenosti (Dieffenbach in sod. 1993).

1.5.3 Koncentracija začetnih oligonukleotidov

Končna koncentracija posameznega začetnega oligonukleotida v reakcijski mešanici naj bi znašala med 0,1 in 1 μM . Za večino PCR reakcij ter pomnoževanje daljših PCR produktov je zelo uspešna uporaba takšnega volumna vsakega izmed začetnih oligonukleotidov, da je njihova koncentracija v končnem volumnu enaka 0,2 μM . Previsoke koncentracije začetnih oligonukleotidov povečajo možnost za napačno prileganje začetnih oligonukleotidov (*ang. mispriming*), kar pomeni, da se začetni oligonukleotidi vežejo na napačno mesto DNA. Zaradi tega lahko DNA-polimeraza znotraj vzorca tvori napačne kopije DNA. Kasnejše ekstenzije tako grajenih molekul nam dajo nespecifične PCR produkte (Löffert in sod. 1997).

Zgradba in uporaba začetnih oligonukleotidov lahko torej močno vplivata na specifičnost in učinkovitost PCR reakcije. Smernice za oblikovanje in uporabo začetnih oligonukleotidov so povzete v Preglednici 1 spodaj. Tudi če so začetni oligonukleotidi zasnovani tako, da imajo ustrezno komplementarno zaporedje, lahko PCR reakcija rezultira v nespecifičnih produktih, majhnih količinah specifičnega produkta ali pa popolnoma spodleti.

Preglednica 1: Smernice za oblikovanje in uporabo začetnih oligonukleotidov (povzeto po Löffert in sod. 1997)

Sekvenca začetnih oligonukleotidov	• Na 3'-koncih primerjev ne sme vsebovati več kot tri baze G ali C, da se čim bolj zmanjša nespecifično prileganje. Izognemo se nukleotidu T na 3`koncu.</li> <li>• Izognemo se neujemanjem na 3` koncu. • Izognemo se komplementarnim sekvencam z drugimi zaporedji matrične DNA znotraj začetnih oligonukleotidov in med njimi.
Dolžina zaporedja:	18 – 30 nukleotidov
Delež vsebnosti nukleotidov GC	40 – 60 %
Talilna temperatura začetnih oligonukleotidov (T_m)	$T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (A+T) + 4^{\circ}\text{C} \times (C+G)$
Koncentracija začetnih oligonukleotidov v končnem volumnu reakcijske mešanice	0,1 – 0,5 μM (0,2 μM)

1.6 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza je metoda, ki se uporablja za ločevanje DNA fragmentov različnih velikosti. Agaroz je izolirana iz rodov morskih alg *Gelidium* in *Gracilaria* ter je zgrajena iz ponavljajočih agarobioznih podenot – L- in D-galaktoze. Med gelacijo se agarozni polimeri nekovalentno povežejo in tvorijo mrežo snopov, katerih velikosti por določajo lastnosti gela in s tem molekularnega presejanja (Lee in sod. 2012).

Uporaba agarozne gelske elektroforeze je povsem spremenila način ločevanja DNA. Pred njeno uporabo so DNA ločevali predvsem z uporabo (ultra)centrifugiranja v saharoznem gostotnem gradientu (*ang.* sucrose density gradient centrifugation), ki pa je podala le približke velikosti (Lee in sod. 2012).

Z uporabo agarozne gelske elektroforeze DNA ločimo tako, da z njo napolnimo luknjice, ki smo jih v gelu predhodno naredili s pomočjo posebnega glavnička ter apliciramo električni tok oz. ustvarimo električno polje. Ker je fosfatno skupina v strukturi DNA (in RNA) molekule negativno nabita, bodo ob postavitvi v električno polje DNA fragmenti pričeli z migracijo proti pozitivno nabiti anodi (Lee in sod. 2012).

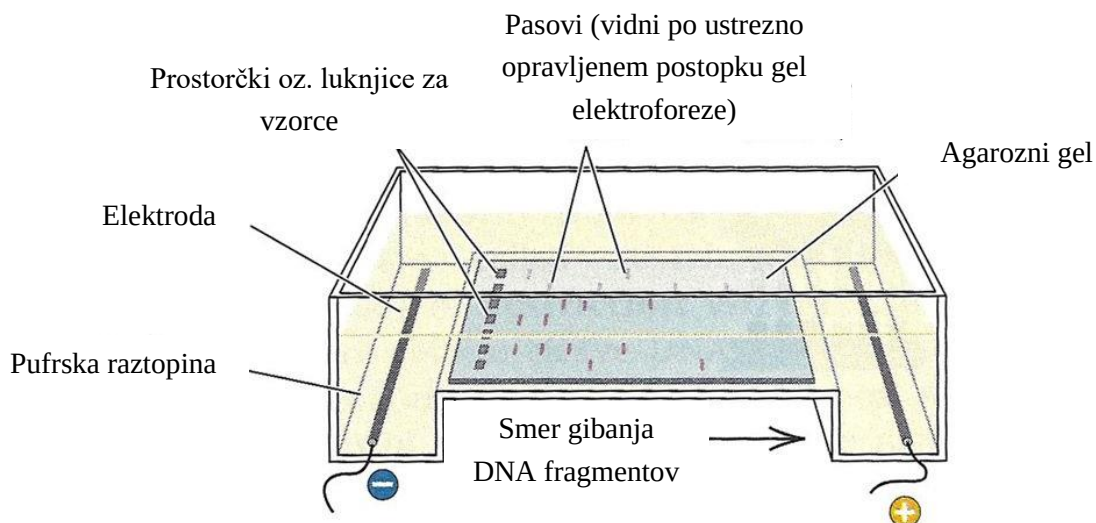
Ker ima DNA uniformno oz. enotno razmerje med maso in nabojem, se med potovanjem na agaroznem gelu DNA molekule ločijo po velikosti, in sicer po takšnem vzorcu, da je prepotovana razdalja DNA fragmenta sorazmerna z logaritmom njegove molekularne mase. Vodilni model gibanja DNA skozi agarozni gel je "pristranska reptacija" (*ang.*

»biased reptation«), pri čemer se vodilni rob pomakne naprej in za seboj potegne preostanek DNA molekule (Lee in sod. 2012).

Hitrost pomikanja molekule DNA skozi gel je determiniran z naslednjimi faktorji (Lee in sod. 2012):

- velikost DNA molekule
- koncentracija agaroze
- vrsta agaroze
- konformacija DNA
- uporabljena napetost
- prisotnost etidijevega bromida, tj. interkalarnega sredstva, ki se običajno uporablja kot fluorescenčno barvilo za vizualizacijo DNA fragmentov
- pufer za elektroforezo

Da omogočimo vizualizacijo ločenih fragmentov DNA, uporabimo fluorescentna barvila, ki se vrinejo med bazne pare (npr. Midori Green) in pod UV svetlobo fluorescirajo.



Slika 2: Shema agarozne gelske elektroforeze

(Vir: <http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/images/gelbox.jpg>; dostopano dne 04. 09. 2021)

1.7 Namen in cilji zaključne naloge

Namen zaključnega dela je bila izolacija DNA ter opredelitev ustreznih pogojev za pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov v multipleksu, kar zagotavlja prihranek časa in denarja pri laboratorijski analizi.

Cilji dela:

1. Izolacija molekule DNA iz tkivnih vzorcev kune belice in zlatice.
2. Optimizacija pogojev pomnoževanja mikrosatelitnih lokusov iz tkivnih vzorcev kun.

2 METODE DELA

Laboratorijsko delo smo opravljali v Laboratoriju za molekularno ekologijo Izola. Tekom dela smo analizirali 9 tkivnih vzorcev, in sicer 2 tkivna vzorca kune zlatice in 7 tkivnih vzorcev kune belice, zbranih v letih od 2019 do 2020. Pridobljeni so bili v sklopu ciljnega raziskovalnega projekta Divjad v naseljih, na cestah in drugih nelovnih površinah: težave, izzivi, rešitve (V4-1825), pri katerem je Univerza na Primorskem sodelovala kot projektna partnerica. Podatki o tkivnih vzorcih so podani v Preglednici 2 spodaj.

Tkivni vzorci v označenih vialah z etanolom so bili shranjeni na temperaturi -80°C . Uspešnost izolacije smo preverjali z merjenjem koncentracije izolirane DNA. Izolaciji DNA je sledilo pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov na različnih temperaturah prileganja začetnih oligonukleotidov oz. primerjev. Uspešnost pomnoževanja fragmentov pri različnih temperaturah smo preverili z uporabo agarozne gelske elektroforeze. Tej je sledila genotipizacija s sekvenatorjem SeqStudio (proizvajalec Thermo Fisher Scientific). Na koncu smo pridobljene podatke analizirali v programu GeneMapper v.5.0 (proizvajalec Applied Biosystems).

Preglednica 2: V tabeli so podani podatki tkivnih vzorcev, ki smo jih analizirali v naši zaključni nalogi. Vzorci, pri katerih je kot razlog poginule živali zapisan odstrel, so bili odvzeti v času rednega odstrela navedenih lovskih družin.

Vrsta	Oznaka	LME koda	Datum	Lovišče	Kraj	Vzrok za pogin	Koordinate (GPS)
<i>M. martes</i>	Kuna zlatica 4.7.2019	LME 1791	16/07/2019	OLJKA	Slatina (soteska)	odstrel	N:46,326827 E:15,033117
<i>M. foina</i>	KUNA1	LME 1833	01/12/2019	ŠKALE	Jezero, Ahtik	povoz	N:46,377428 E:15,112879
<i>M. foina</i>	KUNA2	LME 1834	01/12/2019	SMREKOVEC	Lokovica, Vrh	povoz	N:46,362728 E:15,062432
<i>M. foina</i>	KUNA3	LME 1835	17/12/2019	BRASLOVČE	Topovlje	povoz	N:46,275104 E:15,062294
<i>M. foina</i>	K-7/2020	LME 2322	20/02/2020	OLJKA	Ljubija, Benek	povoz	N:46,338929 E:14,995234
<i>M. foina</i>	KUNA; Velenje, 22.2.2020	LME 2323	22/02/2020	VELENJE	Pesje, Hladin	povoz	N:46,368016 E:15,080183
<i>M. foina</i>	Kortine	LME 2614	11/07/2019	-	Kortine	-	N:45,536800 E:13,865200
<i>M. martes</i>	LD Oljka	LME 2615	18/07/2020	OLJKA	Podgorje pri Letušu	-	N:46,320540 E:15,003470
<i>M. foina</i>	Kampel	LME 2616	06/04/2020	-	Kampel	-	N:45,507764 E:13,741585

2.1 Izolacija DNA

DNA smo izolirali z uporabo komercialnega kompleta peqGOLD Blood & Tissue DNA Mini Kit (VWR 2019), in sicer po priloženih navodilih proizvajalca. Da smo že pred samim začetkom dela preprečili kontaminacije tkivnih vzorcev, smo uporabljali zaščitne halje in rokavice ter pred začetkom in po koncu vsakega dela razkužili in očistili delovno površino s 96 % etanolom (EtOH) ter natrijevim hipokloritom (NaClO). Pred začetkom postopka izolacije DNA smo vzorce tkiva narezali na drobne koščke, manjše od 1 mm². Vsakega izmed posameznih vzorcev tkiva smo narezali na novem delu papirnate brisače ter pred vsakim rezanjem in po njem skalpel in pinceto razkužili z uporabo etanola in plinskega gorilnika. Pred ponovnim rezanjem naslednjega vzorca tkiva smo počakali, da se laboratorijski pribor ohladi, saj bi previsoke temperature lahko povzročile degradacijo DNA. Narezano tkivo smo prenesli v 1,5 mL centrifugirke ter jih označili z skladno s laboratorijsko številko vzorca.

2.1.1 Protokol za izolacijo DNA

1.korak: Razgradnja tkiva

Za namen razgradnje tkiva smo v mikrocentrifugirke z vzorci dodali 200 μ L lizirnega TL pufra (*ang.* Tissue Lyse Puffer oz. TL Buffer) ter 25 μ L proteinaze K. Vse skupaj smo nato dobro premešali na vorteksu. Po mešanju smo vzorce dali v inkubator, kjer je proces inkubacije potekal 90 min pri temperaturi 55 °C.

2.korak: Proces vezave DNA

Ko se je postopek inkubacije zaključil, smo vzorce prestavili v centrifugirke, ki smo jih 5 minut centrifugirali pri maksimalni hitrosti. Pri tem smo dobili supernatant, ki smo ga pazljivo odlili v nove 1,5 mL mikrocentrifugirke ter pri tem pazili, da nismo prenesli tudi usedline. V mikrocentrifugirke s supernatantom smo dodali 220 μ L vezalnega BL pufra (*angl.* BL Buffer) in na vorteksu dobro premešali. Zatem smo vzorce 10 minut inkubirali pri temperaturi 70 °C. Po inkubaciji smo dodali 220 μ L čistega etanola in vse skupaj hitro premešali na vorteksu. Pripravili smo si 2 mL zbiralne mikrocentrifugirke s kolono (PeqGOLD DNA Mini Column) ter celoten vzorec prenesli vanjo. Zbiralne mikrocentrifugirke s kolono smo nato 1 min centrifugirali pri maksimalni hitrosti, pri čemer je nastal filtrat. Le tega smo odlili, zbiralne centrifugirke pa ponovno uporabili.

3.korak Proces čiščenja DNA

V zbiralne mikrocentrifugirke s kolono smo odpipetirali 500 μ L čistilnega HBC pufra (*anlg.* High Salt Wash Buffer ali HBC Buffer) ter jih 30 s centrifugirali pri maksimalni hitrosti. Po centrifugiranju smo zbiralne mikrocentrifugirke zavrgli ter dali kolone v nove. Vzorcem smo nato dodali 700 μ L prej omenjenega čistilnega pufra, ki smo ga predhodno razredčili z etanolom. Vse skupaj smo zatem 30 s centrifugirali pri maksimalni hitrosti, dobljen filtrat odlili in postopek nato še enkrat ponovili. Po postopku čiščenja DNA smo kolone 2 min centrifugirali pri maksimalni hitrosti. S tem smo poskrbeli za to, da so se posušile ter da se odstrani ves etanol, ki bi lahko bil še prisoten v sledih, saj bi se sicer lahko interferiral z nadaljnjimi koraki izolacije DNA.

4.korak: Proces ekstrakcije DNA

Kolone smo po končanem procesu čiščenja DNA premestili v nove, 1,5 mL zbiralne mikrocentrifugirke, ki smo jim odrezali pokrovčke ter jih opremili skladno z oznakami naših vzorcev. Pokrovčke smo shranili za konec tega koraka izolacije DNA. Zatem smo v zbiralne mikrocentrifugirke z našimi vzorci odpipetirali 100 μ L elucijskega pufra (*angl.* Elution Buffer ali Buffer EB), ki smo ga pred tem inkubirali na temperaturi 70 °C. Vzorce smo nato za 2 min pustili inkubirati na sobni temperaturi, čemur je sledilo njihovo 1-

minutno centrifugiranje pri maksimalni hitrosti. Po potrebi smo korak elucije ponovili, nato pa kolone zavrgli in zbiralne mikrocentrifugirke zaprli s prej ustrezno označenimi in hranjenimi pokrovčki.

2.2 Merjenje koncentracije izolirane DNA

Ko smo uspešno opravili proces izolacije DNA, smo dobljeno koncentracijo preverili z uporabo fluorometra Qubit™ (Life Technologies) ter kompleta reagentov (Qubit® dsDNA BR Assay Kit). Metoda je osnovana na merjenju intenzitete fluorescence fluorescentnega barvila, ki se veže na nukleinske kisline. Fluorescentni reagent oddaja svetlobo le v primeru vezanosti na molekulo DNA. Qubit nato na podlagi umeritvene krivulje izračuna koncentracijo DNA v ng/μL.

Za namen merjenja koncentracije s pomočjo fluorometra smo v epruveti zmešali 199 μL dsDNA pufra (*angl.* double-stranded DNA Buffer ali dsDNA Buffer; Qubit® dsDNA BR) ter 1 μL barvila/vzorec (količino potrebnega barvila smo pomnožili s številom vzorcev). Vse skupaj smo premestili v vorteks in dobro premešali. Sledilo je pipetiranje 198 μL dobljene raztopine v 0,5 mL mikrocentrifugirke, ki smo ji nato dodali 2 μL vzorca izolirane DNA. Kot zadnji korak smo mikrocentrifugirke vstavili v fluorometer in odčitali koncentracijo DNA.

2.3 Uporabljeni mikrosatelitni označevalci

V naši nalogi smo uporabili naslednje pare mikrosatelitnih označevalcev: Mf 1.1, Mf. 1.11, Mf 2.13, Mf 6.5, Mf 8.8, Mf 1.18, Mf 1.3, Mf 4.17, Mf 8.7, Mf 3.2, Mf 3.7, Mf 4.10 in Mf 8.10. Našteti 13 polimorfni tetranukleotidni mikrosatelitni lokusi kune belice (*M. foina*) so izolirali in karakterizirali Basto in sodelavci (2010), in sicer z metodo sekvenciranja (SMRT, *angl.* »single molecule real-time sequencing«). Vse genotipske frekvence so bile v Hardy-Weinbergovem ravnovesju, med pari lokusov pa niso zaznali vezanega neravnovesja (*ang.* linkage disequilibrium; LD) (Basto in sod. 2010). V Preglednici 3 spodaj so podana zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili v naši zaključni nalogi. Omenjeni začetni oligonukleotidi so imeli dolžino 18 nukleotidov.

Preglednica 3: 13 polimorfnih mikrosatelitnih lokusov kune belice, ki smo jih uporabili v zaključni nalogi in katere so izolirali in karakterizirali Basto in sodelavci (2010).

Ime lokusa	Zaporedja zač. oligonukleotidov (5'–3') (F, "forward"; R, "reverse")	Ponovitev	RA (bp)
Mf 1.1	F: CTGTGTCAGAAAATGTGC R: AGGGCTGGTAATACCATG	(ATTC) ₁₁	174–182
Mf 1.11	F: TTGCTGGCCCACATTGCA R: CACAGGATATCCTGGAAC	(TATC) ₈	226–234
Mf 1.18	F: CTTGAATTAGCTGTGTCA R: AGTCCCTATGATTGCATG	(ATCT) ₈	169–173
Mf 1.3	F: TTGCTGGAGGTGACCTTG R: CTGGGATTGAGCCTTGCA	(TTTC) ₈	221–237
Mf 2.13	F: TTTTGCCAAGTCTTCTAG R: GTAGAAAACAGGGACGGT	(TATC) ₉	309–313
Mf 3.2	F: TGTTAGCTTGCCCTATGC R: GGACCCATGAAAAACAGT	(TTTC) ₁₂	165–177
Mf 3.7	F: AAGATTTTAACCACCATG R: GCCTGTTATCAGCCAGCT	(TAGA) ₄ (TGGG)(TGGA)(TAGA) ₉	203–211
Mf 4.10	F: TCCAGGGTCCTGGGACTG R: GAGAACTGTGGTTTTTCAC	(GAAA) ₄ GAA(GAAA) ₁₄	332–352
Mf 4.17	F: GAGGCGACAAATTCGGT R: CCAAGCTTCAGAATCTAG	(TTTC) ₆ (TTCC)(TTTC) ₆ (TTCC)(TTTC) ₄	215–243
Mf 6.5	F: TCTTTTGGCTTTATCAGT R: CTCACATGGGAAATAGTC	(TTTC) ₁₃	249–265
Mf 8.7	F: AGTCACTATCTCATAGCT R: GCATAGGACATTGGACTG	(TCTA) ₁₁	167–179
Mf 8.8	F: GGAAGAGGTGATTTCTGA R: TCAGCTGGCGATCAGAGT	(CTTT) ₁₃	241–273
Mf 8.10	F: ATCTGTATTATCTGCATA R: CCAAAGTGTGATGTTTGC	(GAAA) ₁₃	151–167

Opombe. Oznaka (F) označuje smerni začetni oligonukleotid; (R) protismerni začetni oligonukleotid; (RA) razpon velikosti alelov v baznih parih (povzeto po Basto in sod. 2010)

2.4 Določanje optimalne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov

Da smo določili optimalno temperaturo prileganja posameznih začetnih oligonukleotidov kot tudi celotne mešanice, v katero smo ga razvrstili, smo se poslužili spletnega kalkulatorja Thermo Fisher Scientific T_m Calculator (ThermoFisher Scientific).

Potem ko smo v okenca spletnega kalkulatorja vpisali sekvence začetnih oligonukleotidov, so se nam izpisali naslednji podatki:

- delež GC
- izračunana talilna temperatura (T_m) za smerni začetni oligonukleotid ter izračunana talilna temperatura za protismerni začetni oligonukleotid
- optimalna temperatura prileganja

Dobljene vrednosti za vsakega izmed v nalogi uporabljenih začetnih oligonukleotidov so prikazane v Preglednici 4 spodaj.

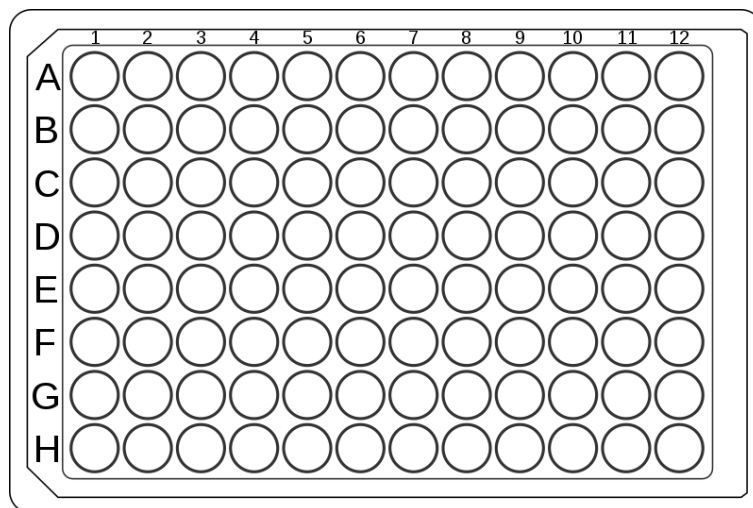
S teoretičnim izračunom z uporabo spletnega kalkulatorja Thermo Fisher Scientific T_m Calculator (ThermoFisher Scientific) smo prišli do optimalne temperature prileganja, le to pa smo nato optimizirali s poskušanjem pomnoževanja v reakciji PCR. Vzeli smo vzorec LME2323 in mešanice SET1 z lokusi Mf 1.1; Mf1.11; Mf 2.13; Mf 6.5, SET2 z lokusi Mf 8.8; Mf 1.18; Mf 1.3; Mf 4.17; Mf 8.7 in SET3 z lokusi Mf 3.2; Mf 3.7; Mf 4.10; Mf 8.10. V tri epice smo pripravili mešanice z naslednjimi količinami reagentov:

- 0,3 μ l vsakega začetnega oligonukleotida (smerne in protismerne) danega SET-a, pri čemer je volumen začetnih oligonukleotidov v končni reakcijski mešanici za SET1 in SET 3 znašala 2,4 μ l, za SET3 pa 3 μ l
- 20 μ l deionizirane H₂O
- 56, 25 μ l KAPA mešanice reagentov
- 16 μ l vzorca LME2323 (za eno reakcijo PCR smo uporabili 2 μ l DNA)

Te tri mešanice, pri čemer je ena mešanica zadostovala za 20 reakcij, smo potem dali na mikrotitersko ploščo PCR gradienta. Mikrotiterska plošča je zgrajena iz 96 vdolbinic oz. luknjic - 12 kolon, označenih s številkami od 1 do 12 ter 8 vrstic, označenih s črkami angleške abecede od A do H. Vsaka luknjica v vrstici ima svojo temperaturo. Gradient PCR pa je tehnika, ki omogoča empirično določitev optimalne temperature prileganja z najmanjšim številom potrebnih korakov. Optimizacijo je velikokrat možno doseči že v enem poskusu (Prezioso in Jahns 2000).

Gradient smo nastavili tako, da je obsegal temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov, ki je znašala 5 °C nad izračunano talilno temperaturo začetnih

oligonukleotidov. Nato smo mešanice nakapali v vdolbinice bloka, tako da je v vsaki vdolbinici izbranega temperaturnega območju bil del pripravljene mešanice. Vsaka mešanica je tako bila v svoji vrstici z osmimi vdolbinicami, v vsako izmed teh vdolbinic pa smo dali 11 μl dane mešanice. Za vsako izmed treh mešanic smo prileganje začeli pri temperaturi 52,3 °C. Zadnja temperatura prileganja pa je bila 59,4 °C.



Slika 3: Mikrotiterska plošča, zgrajena iz 96 vdolbinic oz. luknjic (Vir:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/07/96-Well_plate.svg; dostopano dne 05. 04. 2022)

3. Type or paste your sequence

Primer#1: 5'- 18 nt: A=5.0 T=5.0 C=3.0 G=5.0 CG=44.44%

Primer#2: 5'- 18 nt: A=5.0 T=4.0 C=3.0 G=6.0 CG=50.00%

Clear

4. PCR conditions

Primer conc. μM

Results

Export table data into Excel

ID #1	Sequence #1	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	T _m °C	ID #2	Sequence #2	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	T _m °C	Annealing Temperature °C
Primer#1	CTGTGTCAGAAA TGTGC	5538.7	176000.0	57.1	Primer#2	AGGGCTGGTAATA CCATG	5563.7	181300.0	59.1	57.1

Slika 4: Prikaz izračuna optimalne temperature prileganja s pomočjo spletnega kalkulatorja Thermo Fisher Scientific T_m Calculator za začetni oligonukleotid Mf 1.1 (povzeto po: <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>; dostopano dne 04. 09. 2021)

Preglednica 4: Parametri, ocenjeni s pomočjo spletnega kalkulatorja Thermo Fisher Scientific Tm Calculator (povzeto po: <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>; dostopano dne 04. 09. 2021)

Mešanica	Lokus	Začetni oligonukleotid	Delež CG (%)	Talilna temperatura (T _m) smernega (F) in povratnega (R) začetnega oligonukleotida	Optimalna temperatura prileganja lokusa (°C)
SET 1	Mf 1.1	Mf 1.1-F Mf 1.1-R	44 – 50	F: 57.1 °C R: 59.1 °C	57.1
	Mf 1.11	Mf 1.11-F Mf 1.11-R	50 – 56	F: 66.1 °C R: 57.0 °C	57.0
	Mf 2.13	Mf 2.13-F Mf 2.13-R	39 – 50	F: 55.1 °C R: 59.4 °C	55.1
	Mf 6.5	Mf 6.5-F Mf 6.5-R	33 – 44	F: 54.4 °C R: 55.0 °C	54.4
SET2	Mf 8.8	Mf 8.8-F Mf 8.8-R	44 – 56	F: 56.5 °C R: 63.6 °C	56.6
	Mf 1.18	Mf 1.18-F Mf 1.18-R	39 – 44	F: 55.2 °C R: 57.1 °C	55.2
	Mf 1.3	Mf 1.3-F Mf 1.3-R	56	F: 62.4 °C R: 62.9 °C	62.4
	Mf 4.17	Mf 4.17-F Mf 4.17-R	44 – 56	F: 63.1 °C R: 55.0 °C	55.0
	Mf 8.7	Mf 8.7-F Mf 8.7-R	39 – 50	F: 54.3 °C R: 58.0 °C	54.3
SET3	Mf 3.2	Mf 3.2-F Mf 3.2-R	44 – 50	F: 60.3 °C R: 58.1 °C	58.1
	Mf 3.7	Mf 3.7-F Mf 3.7-R	33 – 56	F: 53.2 °C R: 62.6 °C	53.2
	Mf 4.10	Mf 4.10-F Mf 4.10-R	44 – 67	F: 65.7 °C R: 56.3 °C	56.3
	Mf 8.10	Mf 8.10-F Mf 8.10-R	28 – 44	F: 50.0 °C R: 57.7 °C	50.0

2.5 Protokol reakcije PCR

Celotna priprava mešanic za reakcijo PCR je potekala v laminariju, s čimer smo zagotovili aseptične pogoje dela in preprečili, da pride do kontaminacije mešanic in vzorcev kot tudi do inhibicije reakcije PCR. Najprej smo pripravili 3 sete oz. mešanice začetnih oligonukleotidov (ang. *primer sets, multiplex*) s koncentracijo 10 μ M. Pri določanju začetnih oligonukleotidov v mešanice oz. sete smo se nanašali na (Basto in sod. 2010). Vsako izmed mešanic smo dali v svojo mikrocentrifugirko ter le te ustrezno označili.

Preglednica 5: Mešanice začetnih oligonukleotidov

Mešanica	Lokus	Začetni oligonukleotid	Zaporedje začetnih oligonukleotidov	Dolžina alelov (bp)	Temperatura prileganja zač. oligonukleotidov (°C)
SET1	Mf 1.1	Mf 1.1-F Mf 1.1-R	F: CTGTGTCAGAAAATGTGC R: AGGGCTGGTAATACCATG	173–186	57.1
	Mf 1.11	Mf 1.11-F Mf 1.11-R	F: TTGCTGGCCCACATTGCA R: CACAGGATATCCTGGAAC	223–247	57.0
	Mf 2.13	Mf 2.13-F Mf 2.13-R	F: TTTTGCCAAGTCTTCTAG R: GTAGAAAACAGGGACGGT	307–323	55.1
	Mf 6.5	Mf 6.5-F Mf 6.5-R	F: TCTTTTGGCTTTATCAGT R: CTCACATGGGAAATAGTC	250–267	54.4
SET2	Mf 8.8	Mf 8.8-F Mf 8.8-R	F: GGAAGAGGTGATTTCTGA R: TCAGCTGGCGATCAGAGT	240–280	56.6
	Mf 1.18	Mf 1.18-F Mf 1.18-R	F: CTTGAATTAGCTGTGTCA R: AGTCCCTATGATTGCATG	170–177	55.2
	Mf 1.3	Mf 1.3-F Mf 1.3-R	F: TTGCTGGAGGTGACCTTG R: CTGGGATTGAGCCTTGCA	217–237	62.4
	Mf 4.17	Mf 4.17-F Mf 4.17-R	F: GAGGCGACAAATTCGGT R: CCAAGCTTCAGAATCTAG	206–240	55.0
	Mf 8.7	Mf 8.7-F Mf 8.7-R	F: AGTCACTATCTCATAGCT R: GCATAGGACATTGGACTG	157–183	54.3
SET3	Mf 3.2	Mf 3.2-F Mf 3.2-R	F: TGTTAGCTTGCCCTATGC R: GGACCCATGAAAAACAGT	164–179	58.1
	Mf 3.7	Mf 3.7-F Mf 3.7-R	F: AAGATTTTAACCACCATG R: GCCTGTTATCAGCCAGCT	202–217	53.2
	Mf 4.10	Mf 4.10-F Mf 4.10-R	F: TCCAGGGTCCTGGGACTG R: GAGAAGTGTGGTTTTTAC	317–346	56.3
	Mf 8.10	Mf 8.10-F Mf 8.10-R	F: ATCTGTATTATCTGCATA R: CCAAAGTGTGATGTTTGC	147–167	50.0

Volumen vsake izmed reakcijskih mešanic je znašal 10 μL . Mešanice so se med seboj razlikovale po volumnih deionizirane vode in mešanici začetnih oligonukleotidov. V vsako izmed mešanic oz. setov smo odpipetirali 0,3 μL smerne (F; *ang.* forward) ter 0,3 μL protismerne (R; *ang.* reverse) začetnega oligonukleotida. Omenjene volumne smo sešteli, da smo dobili končne volumne mešanic začetnih oligonukleotidov.

V spodnjih preglednicah (Preglednica 6, 7 in 8) so prikazane vrednosti sešteti končnih volumnov vsake izmed treh mešanic začetnih oligonukleotidov.

Preglednica 6: Seznam in volumen začetnih oligonukleotidov v SET1

Začetni oligonukleotid	Volumen na reakcijo (μL)
Mf 1.1-F	0,3
Mf 1.1-R	0,3
Mf1.11-F	0,3
Mf1.11-R	0,3
Mf 2.13-F	0,3
Mf 2.13-R	0,3
Mf 6.5-F	0,3
Mf 6.5-R	0,3
Volumen za reakcijo PCR (μL)	2,4

Preglednica 7: Seznam in volumen začetnih oligonukleotidov v SET2

Začetni oligonukleotid	Volumen na reakcijo (μL)
Mf 8.8-F	0,3
Mf 8.8-R	0,3
Mf 1.18-F	0,3
Mf 1.18-R	0,3
Mf 1.3-F	0,3
Mf 1.3-R	0,3
Mf 4.17-F	0,3
Mf 4.17-R	0,3
Mf 8.7-F	0,3
Mf 8.7-R	0,3
Volumen za reakcijo PCR (μL)	3

Preglednica 8: Seznam in volumen začetnih oligonukleotidov v SET3

Začetni oligonukleotid	Volumen na reakcijo (μL)
Mf 3.2-F	0,3
Mf 3.2-R	0,3
Mf 3.7-F	0,3
Mf 3.7-R	0,3
Mf 4.10-F	0,3
Mf 4.10-R	0,3
Mf 8.10-F	0,3
Mf 8.10-R	0,3
Volumen za reakcijo PCR (μL)	2,4

Potem ko smo pripravili mešanice začetnih oligonukleotidov, smo glede na njihov volumen dodali ustrezne količine deionizirane vode (*ang.* PCR-grade water) ter KAPA Taq DNA Polymerase 1.5x. Slednji vsebuje 2,35 mM MgCl₂, 1 U/μL Taq DNA polimeraze in 0,2 mM vsakega izmed deoksiribonukleotid trifosfatov (dNTP). Končni volumen reakcijske mešanice, ki jo sestavljajo deionizirana voda, KAPA in mešanica začetnih oligonukleotidov, znaša 13 μL. Podrobnejši podatki glede količine posameznih reagentov v reakcijski mešanici PCR so predstavljeni v Preglednicah 9, 10 in 11.

Preglednica 9: Količine posameznih reagentov v reakcijski mešanici PCR – SET1

Reagent	Volumen na reakcijo (μL)
Deionizirana voda (dH ₂ O)	2,35
KAPA	6,25
Mešanica začetnih oligonukleotidov	2,4
Volumen na reakcijo (μL)	11
DNA (μL)	2
Končni volumen za PCR reakcijo (μL)	13

Preglednica 10: Količine posameznih reagentov v reakcijski mešanici PCR – SET2

Reagent	Volumen na reakcijo (μL)
Deionizirana voda (dH ₂ O)	1,75
KAPA	6,25
Mešanica začetnih oligonukleotidov	3
Volumen na reakcijo (μL)	11
DNA (μL)	2
Končni volumen za PCR reakcijo (μL)	13

Preglednica 11: Količine posameznih reagentov v reakcijski mešanici PCR – SET3

Reagent	Volumen na reakcijo (μL)
Deionizirana voda (dH ₂ O)	2,35
KAPA	6,25
Mešanica začetnih oligonukleotidov	2,4
Volumen na reakcijo (μL)	11
DNA (μL)	2
Končni volumen za PCR reakcijo (μL)	13

Pripravljene mešanice reagentov smo odpipetirali v 0,2 ml epruvetke, namenjene pripravi PCR (*ang.* PCR tube strips). Nato smo jim dodali 2 μL DNA in vstavili v ciklični termostat (*ang.* Thermo-cycler), kjer smo pričeli s potekom reakcije PCR po naslednjem temperaturnem profilu:

1. Začetna denaturacija pri temperaturi 95 °C za čas 3 min,
2. denaturacija pri temperaturi 95 °C za čas 15 sek,
3. prileganje začetnih nukleotidov pri različnih temperaturah za različne sete za čas 30 sek,
4. podaljševanje verige pri temperaturi 72 °C za čas 30 sek
5. končno pomnoževanje pri temperaturi 72 °C za čas 10 min.

Opisana reakcija PCR se je v cikličnem termostatu ponovila 35-krat oz. v 35 ciklih.

2.6 Protokol agarozne gelske elektroforeze

Potem ko je bila PCR reakcija končana, smo pripravili agarozni gel ter produkte PCR za agarozno gelsko elektroforezo. Gel smo pripravili v čaši in pri tem uporabili 3,3 g 0,5 % agaroze in 130 mL TBE pufra 0.5x. Reagente smo premešali, nato pa raztopino počasi segrevali v mikrovalovki, dokler se ni popolnoma raztopila in postala tekoča. Da raztopina ni bila prevroča, smo jo ob konstantnem mešanju delno ohladili pod curkom hladne vode. Ko je bila ohlajena na primerno temperaturo, smo raztopini dodali 10 μL barvila Midori Green, vse skupaj dobro premešali ter raztopino vlili v kalup. Ko se je raztopina lepo porazdelila po kalupu, smo na gel dali plastičen glavniček ter celoten kalup zaradi fotosenzibilnosti barvila pokrili z folijo.

V prvo in zadnjo jamico na parafilmu smo dodali standardni lestvici DNA velikosti 100 bp, imenovani Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder, proizvajalca Thermo Scientific™. Omenjeni standardni lestvici sta bili namenjeni primerjavi velikosti fragmentov PCR produktov, med njiju pa smo dali naše vzorce. Gelska elektroforeza je nato potekala na 110 V, 35 min. Po končani elektroforezi smo vzorce prenesli v UV

transluminator, kjer smo produkte PCR vizualizirali. Produkt PCR, ki je bil uspešno pomnožen, je na prikazu UV transluminatorja bil viden kot fragment DNA, in sicer z velikostjo (bp), pričakovano za ta lokus.

2.7 Genotipizacija

Za genotipizacijo smo pripravili mikrotitrno ploščo, kjer smo v vsako vdolbinico na plošči dodali 0,2 μL velikostnega standarda (Lys), 10,7 μL formamida ter 2 μL PCR produktov. Ploščo smo pokrili ter jih za 5 min dali v ciklični termostat na temperaturo 95 °C. Stekel je proces denaturacije. Po denaturaciji smo ploščo ohladili in pričeli z genotipizacijo vzorcev na sekvenatorju SeqStudio (Thermo Fisher Scientific).

Dobljene podatke smo analizirali s pomočjo programa GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems). Gre za poseben program oz. programsko opremo, ki nam z vizualizacijo omogoča genotipizacijsko analizo multialelnih lokusov. Z vizualnim pregledom smo preverili naš uspeh pomnoževanja lokusov glede na različne temperature prileganja in genotipskih variacij (oz. variabilnosti mikrosatelitnih lokusov). V pregledu smo določili dolžine posameznih fragmentov (bp), poleg tega razbrali tudi, ali so lokusi homozigotni ali pa heterozigotni.

Vse dobljene velikosti alelov smo vnesli v preglednico Excel (Microsoft Corporation). V kolikor so lokusi bili homozigotni oz. smo imeli homozigote, smo v preglednico zapisali dve enaki števili, v primeru heterozigotov, ko sta se pomnožila alela različnih dolžin, pa smo zabeležili obe vrednosti. Omenjeni vrednosti sta bili vedno obe sodi ali pa obe lihi števili. Dobljeni podatki so predstavljeni v Preglednicah 12 in 13. Vidimo lahko, da podatki mešanice SET3 niso predstavljeni, razlog za to pa je, da genotipizacija lokusov pri njej ni bila uspešna. Omenjeno mešanico smo zato ponovno pripravili za reakcijo PCR, pri čemer smo na račun 1 ml deionizirane vode dodali 1 ml reagenta Q-solution. Volumni vseh ostalih reagentov so ostali isti. Kljub omenjenim spremembam genotipizacija ni bila uspešna. Glede na to, da so se fragmenti SET3 pomnožili (prikazano na Sliki 6), sklepamo, da bi bila za uspešno genotipizacijo potrebna dodatna optimizacija pogojev.

3 REZULTATI Z DISKUSIJO

3.1 Velikosti pomnoženih alelov

V preglednicah 12 in 13 so predstavljene velikosti alelov pri 9 analiziranih vzorcih na štirih oz. petih mikrosatelitnih lokusih iz mešanic SET1 in SET2.

Preglednica 12: Velikosti pomnoženih alelov pri 9 analiziranih vzorcih na štirih mikrosatelitnih lokusih iz SET1

	Vzorec	Mf 1.1	Mf 1.1	Mf 1.11	Mf 1.11	Mf 2.13	Mf 2.13	Mf 6.5	Mf 6.5
SET1	LME1791	153	157	209	209	286	286	288	288
	LME1833	157	157	209	213	286	298	220	230
	LME1834	-	-	-	-	-	-	-	-
	LME1835	157	157	209	209	286	290	228	244
	LME2322	153	157	209	213	286	294	288	288
	LME2323	153	153	213	213	286	290	228	228
	LME2614	153	157	209	209	286	286	234	234
	LME2615	-	-	-	-	-	-	-	-
	LME2616	157	157	205	209	286	286	224	224

Preglednica 13: Velikosti pomnoženih alelov pri 9 analiziranih vzorcih na petih mikrosatelitnih lokusih iz SET2

	Vzorec	Mf 8.8	Mf 8.8	Mf 1.18	Mf 1.18	Mf 1.3	Mf 1.3	Mf 4.17	Mf 4.17	Mf 8.7	Mf 8.7
SET2	LME1791	240	248	152	152	192	200	198	206	140	154
	LME1833	248	248	148	152	200	200	198	218	140	150
	LME1834	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LME1835	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LME2322	240	248	148	152	192	216	206	210	140	140
	LME2323	240	240	152	152	200	212	210	210	150	150
	LME2614	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LME2615	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LME2616	236	252	152	152	200	200	198	206	150	154

3.2 Merjenje koncentracije DNA

V Preglednici 14 so predstavljene vrednosti koncentracij za vzorce, ki smo jih obravnavali v našem zaključnem delu.

Preglednica 14: Vrednosti izmerjene koncentracije DNA v obravnavanih vzorcih. Volumen elucijskega pufra je znašal 100 μL .

Vzorec	Leto vzorčenja	Izmerjena koncentracija DNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$)
LME1791	2019	520
LME1833	2019	232
LME1834	2019	155
LME1835	2019	112
LME2322	2020	417
LME2323	2020	379
LME2614	2020	144
LME2615	2020	217
LME2616	2020	238

Zadostne koncentracije DNA za pomnoževanje in genotipizacijo so nad 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Najnižja izmerjena vrednost koncentracije DNA je znašala 112, najvišja pa 520 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Povprečna vrednost izmerjene koncentracije je znašala 268,22 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

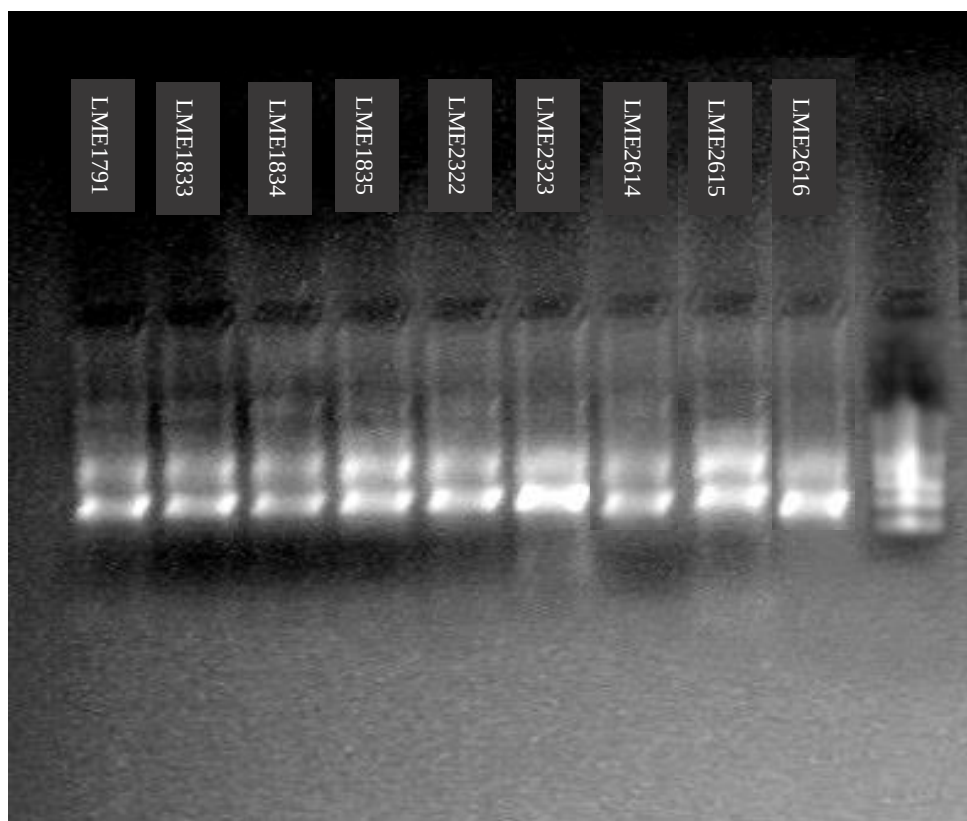
3.3 Protokol agarozne gelske elektroforeze

Po opravljenem poskusu na PCR gradientu, smo rezultate vizualizirali na agaroznem gelu s pomočjo gelske elektroforeze, s pomočjo katerega smo dobljene rezultate ocenili oz. videli, katera temperatura je bila najbolj primerna za prileganje zač. oligonukleotidov dane mešanice. V kolikor je bila kombinacija temperature prileganja in začetnega oligonukleotida optimalna, smo dobili pas z visoko intenziteto oz. donosom in (skoraj) nič nespecifičnih produktov. Ker smo ugotovili, da določeni začetni oligonukleotidi delujejo v precejšnjem temperaturnem območju, smo za temperaturo prileganja izbrali najvišjo temperaturo, saj smo s tem zagotovili najstrožje reakcijske pogoje.

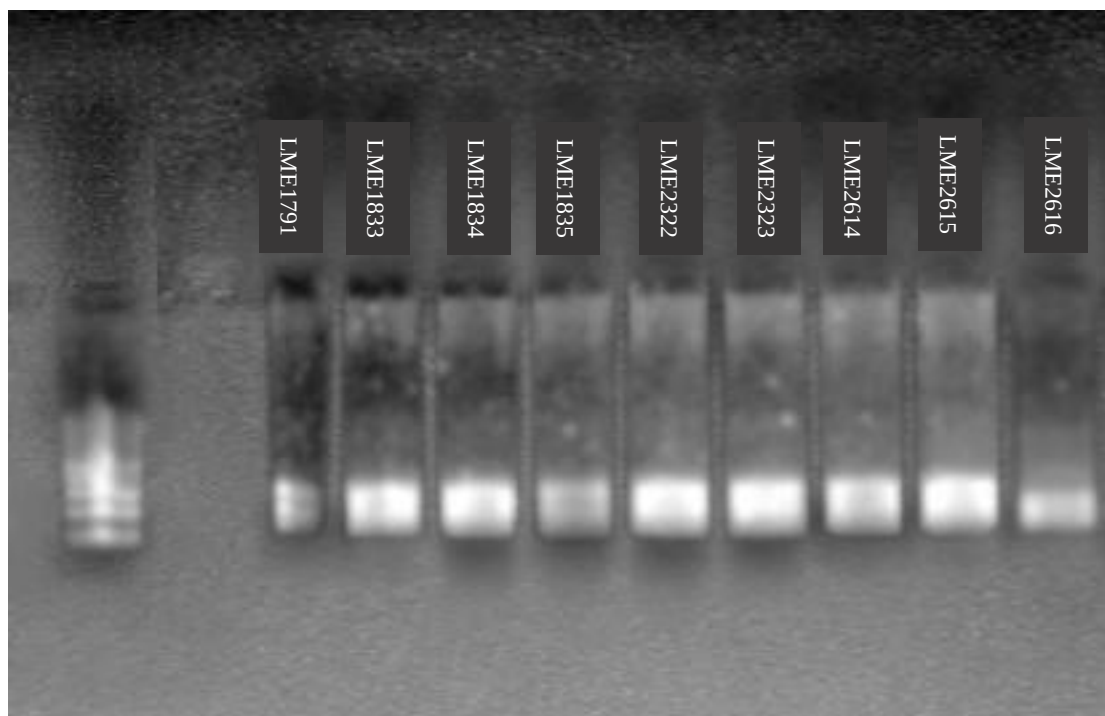
Za SET1 je kot najbolj optimalna temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov bila določena temperatura 59,4 °C, za SET2 pa 58,7 °C.

Za SET 3 v prvem poskusu nismo uspeli določiti optimalne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov, saj smo z vizualiziranjem na agaroznem gelu ugotovili, da je bilo pomnoženo veliko število nespecifičnih produktov. Zato smo poskus za dano mešanico ponovili ter na račun 1 µl deionizirane H₂O v vsako izmed 8 luknjic vrstice z mešanico SET3 dodali 1 µl reagenta Q-solution. Le ta namreč zmanjša pomnoževanje nespecifičnih regij. Žal tudi po ponovljenem poskusu nismo uspeli določiti optimalne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov dane mešanice.

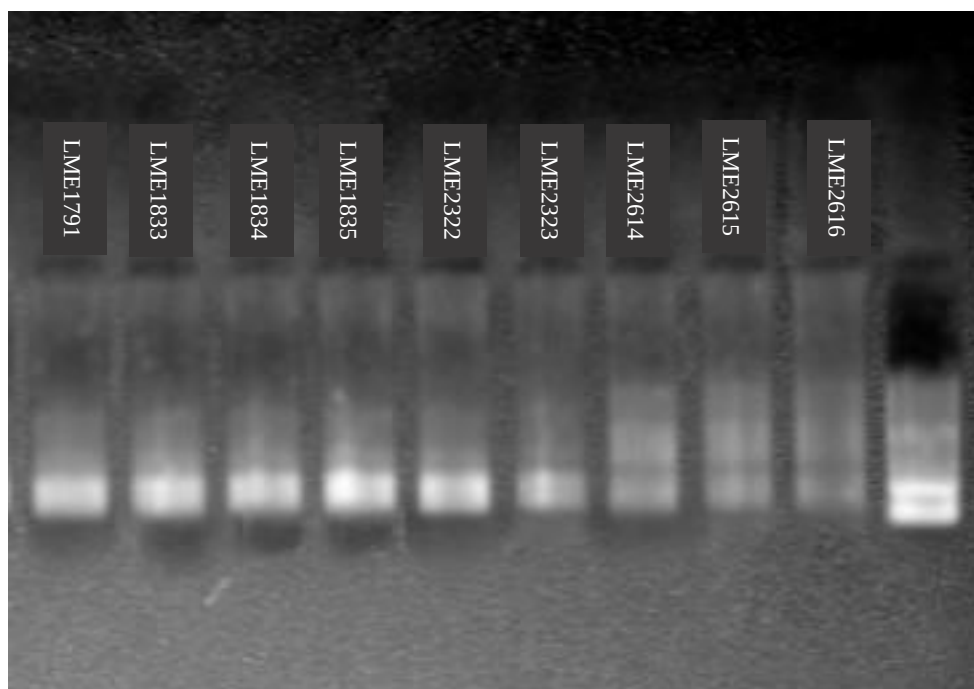
Na slikah 5, 6 in 7 so prikazani rezultati gelske elektroforeze za SET1, SET2 in SET3.



Slika 5: Pomnoženi fragmenti lokusov Mf 1.1, Mf. 1.11, Mf 2.13 in Mf 6.5 iz SET 1 na agarozni gelski elektroforezi.



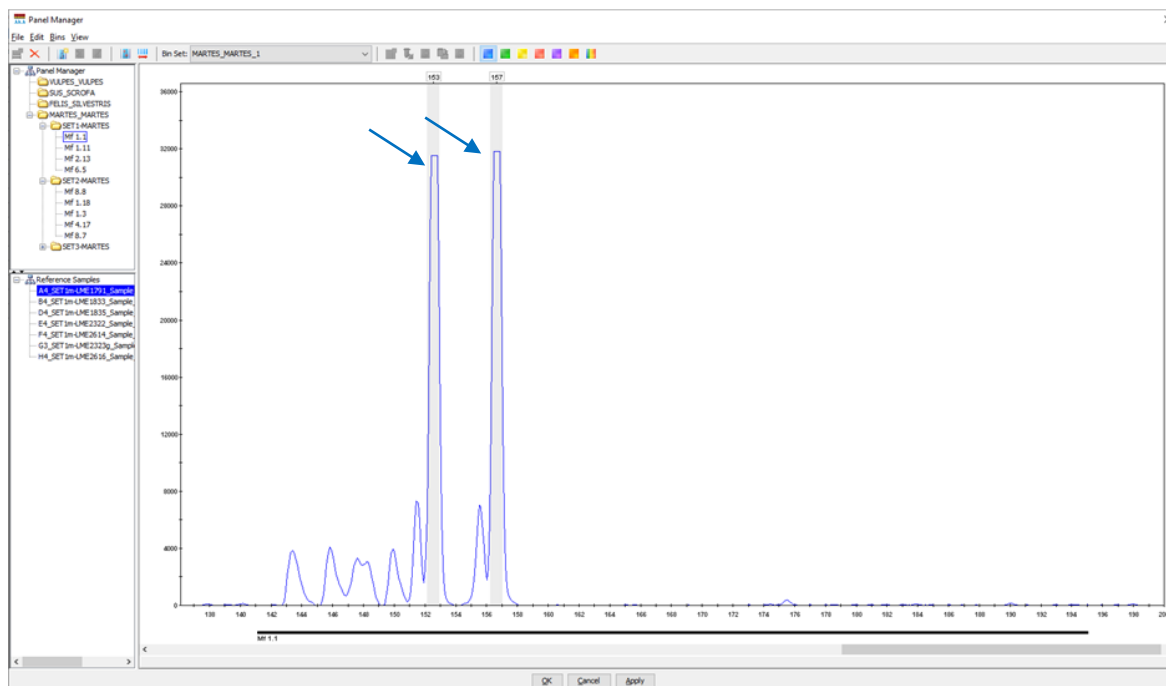
Slika 6: Pomnoženi fragmenti lokusov Mf 8.8, Mf 1.18, Mf 1.3, Mf 4.17 in Mf 8.7 iz SET 2 na agarozni gelski elektroforezi.



Slika 7: Pomnoženi fragmenti lokusov Mf 3.2, Mf 3.7, Mf 4.10 in Mf 8.10 iz SET 3 na agarozni gelski elektroforezi.

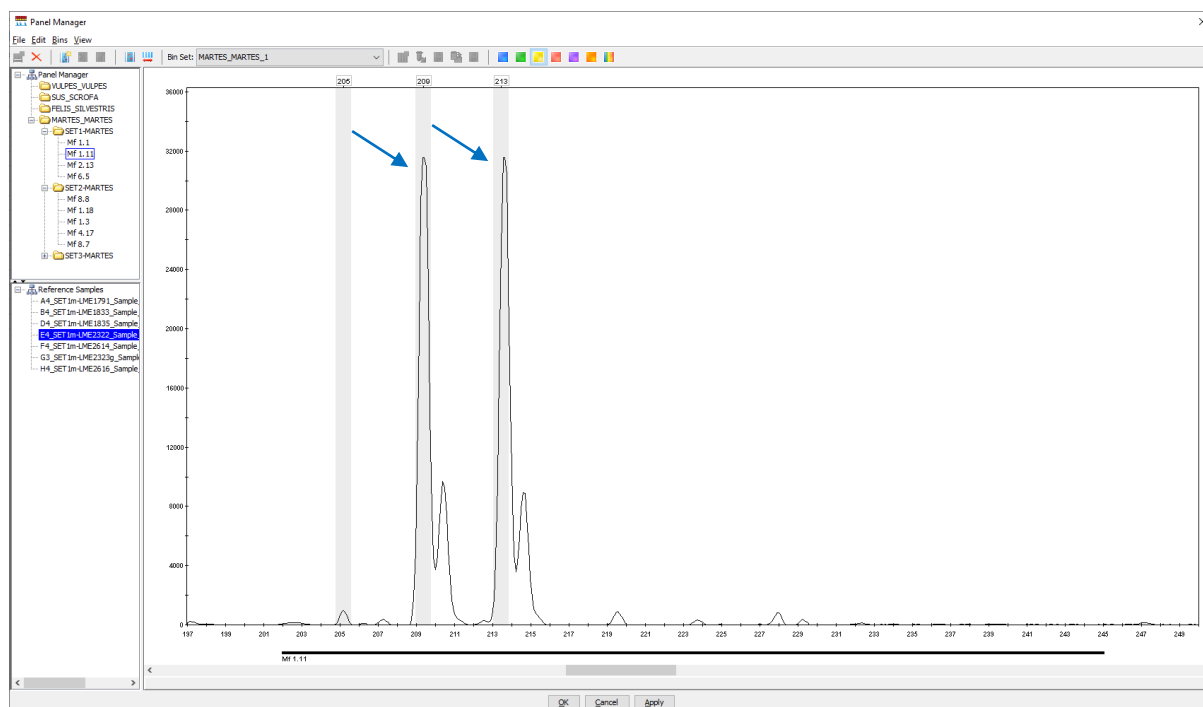
3.4 Rezultati analize mikrosatelitnih lokusov

Na spodnjih slikah, oštevilčenih od 8 do 16, so vizualizirani uspešno pomnoženi lokusi Mf 1.1, Mf 1.11, Mf 2.13 in Mf 6.5 iz SET-a 1 ter Mf 8.8, Mf 1.18, Mf 1.3, Mf 4.17 in Mf 8.7 iz SET-a 2. Rezultati prikazujejo alele na naštetih lokusih v izbranih vzorcih pri določeni temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov, specifični za mešanici SET1 in SET2. Izbrani vzorci so LME1791, LME2322, LME2323, LME2616 ter LME1833.



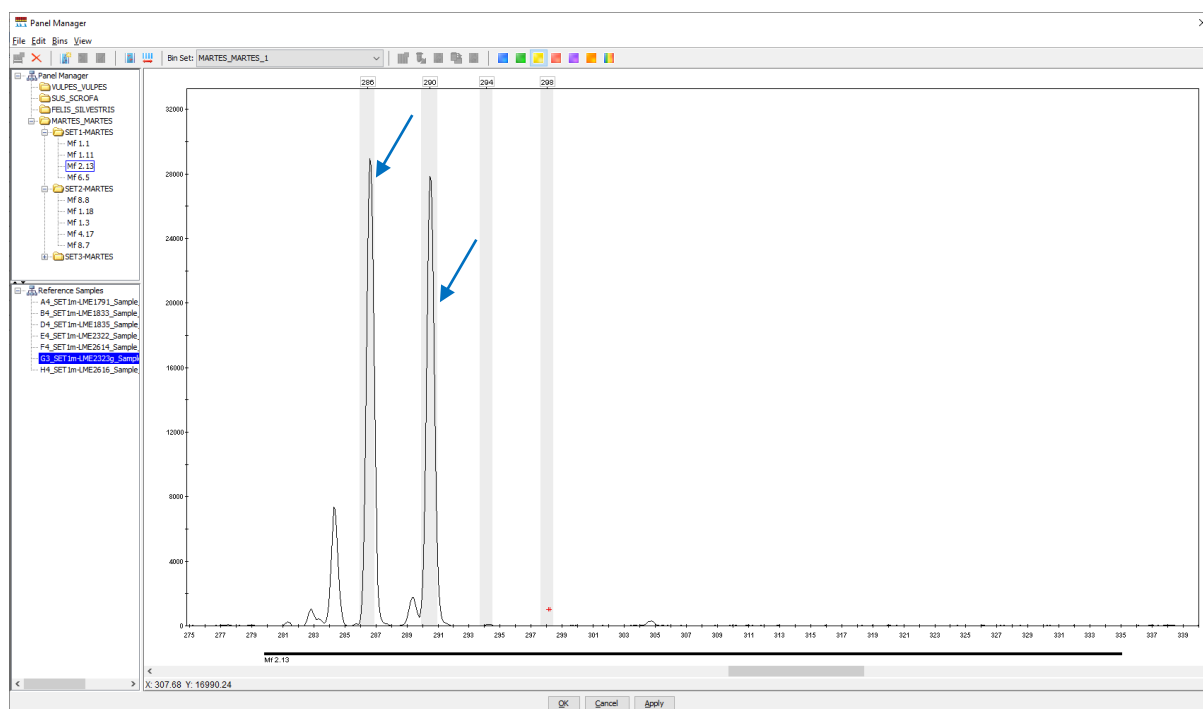
Slika 8: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 1.1 (SET1) v vzorcu LME1791 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 59,4 °C.

Na sliki 8 lahko razberemo pomnožen lokus Mf 1.1, na katerem sta bila detektirana dva alela (označena z modrimi puščicami), zato je testiran vzorec LME1791 na tem lokusu heterozigoten.. Temperatura prileganja je znašala 59,4 °C.



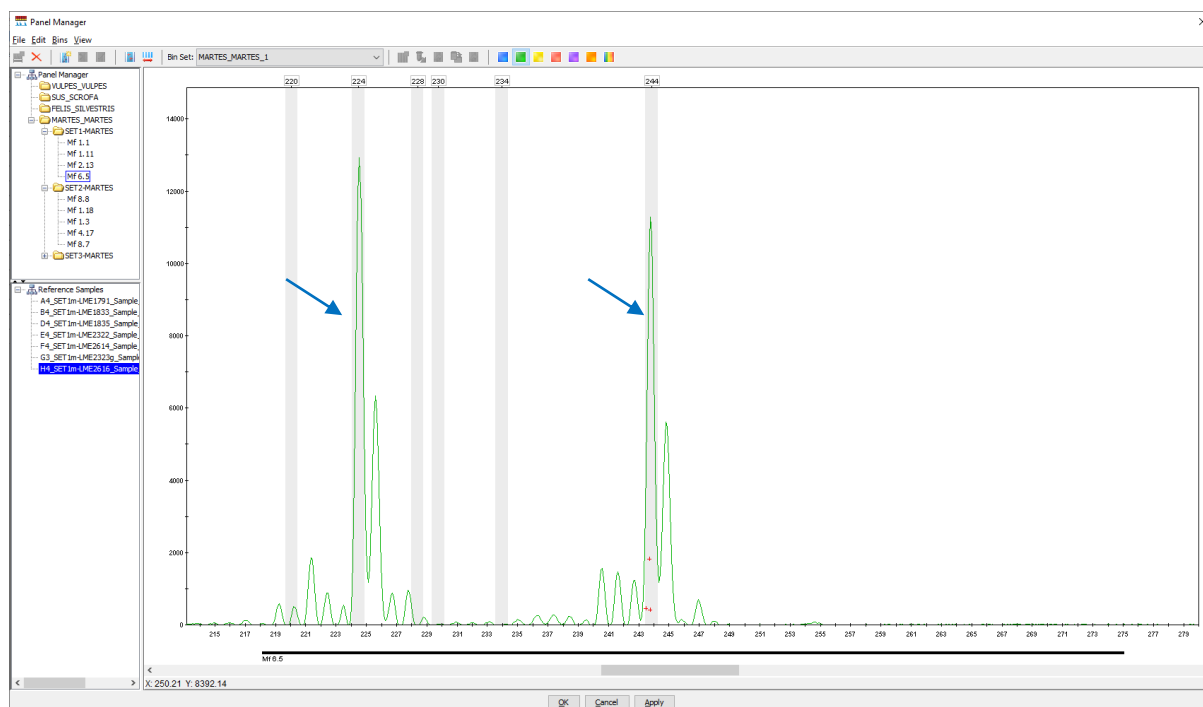
Slika 9: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 1.11 (SET1) v vzorcu LME2322 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 59,4 °C .

Iz slike 9 lahko razberemo dva alela (označena z modrimi puščicami) detektirana po pomnoževanju lokusa Mf 1.11 pri temperaturi prileganja 59,4 °C, zato je testiran vzorec LME2322 na tem lokusu heterozigoten..



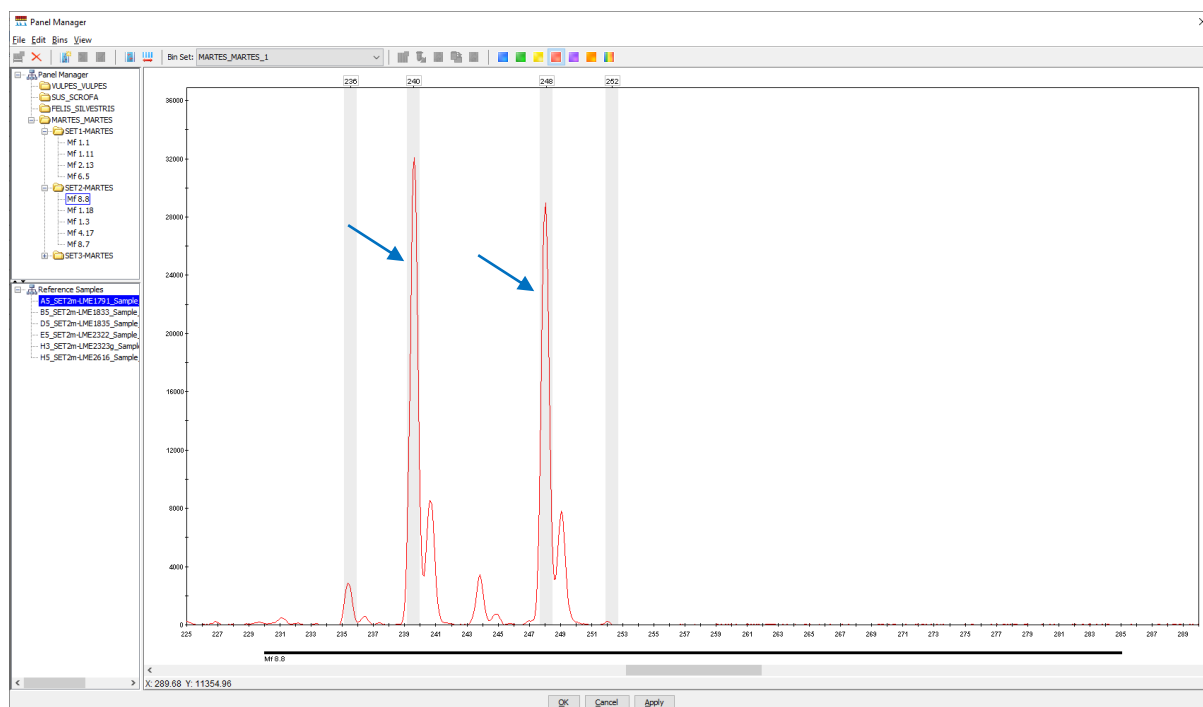
Slika 10: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 2.13 (SET1) v vzorcu LME2323 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 59,4 °C .

S slike 10 lahko razberemo pomnožen lokus Mf 2.13, na katerem sta bila detektirana dva alela (označena z modrimi puščicami), zato je testiran vzorec LME2323 na tem lokusu heterozigoten. Temperatura prileganja je znašala 59,4 °C.



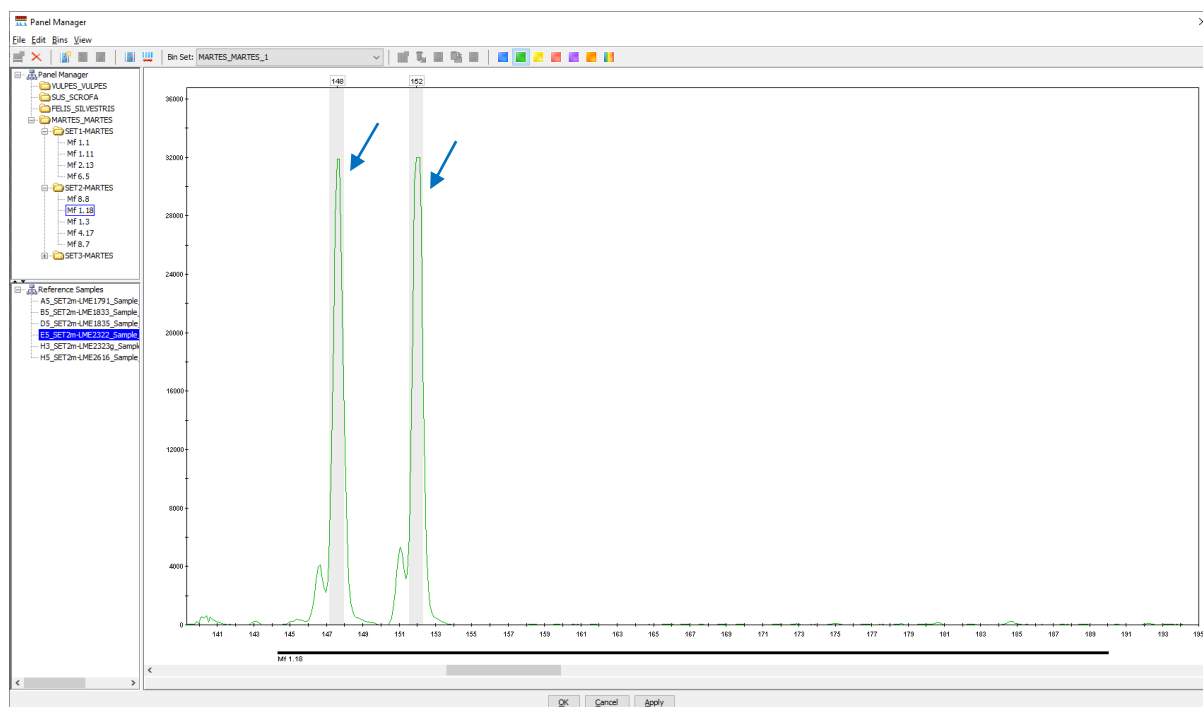
Slika 11: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 6.5 (SET1) v vzorcu LME2616 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 59,4 °C.

Slika 11 prikazuje dva alela (označena z modrimi puščicami) detektirana po pomnoževanju lokusa Mf 6.5 pri temperaturi prileganja 59,4 °C, zato je testiran vzorec LME2616 na tem lokusu heterozigoten.



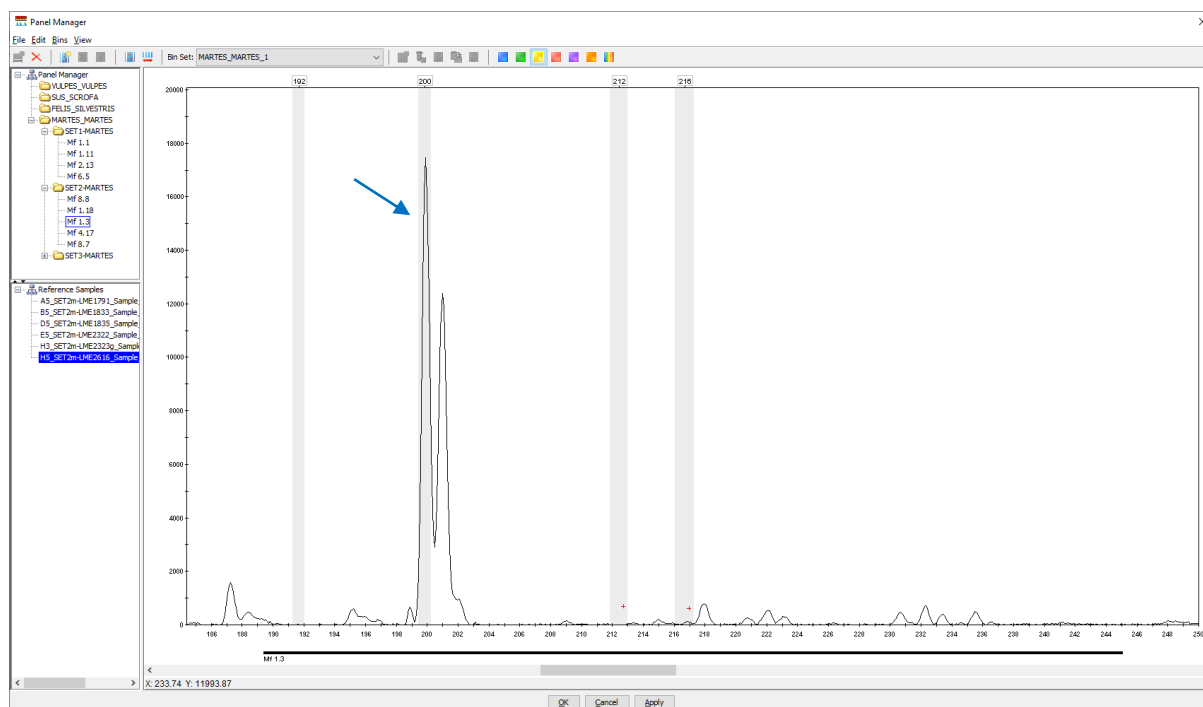
Slika 12: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 8.8 (SET2) v vzorcu LME1791 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 58,7 °C.

Na sliki 12 lahko vidimo pomnožen lokus Mf 8.8 pri temperaturi prileganja 58,7 °C. Po pomnoževanju omenjenega lokusa sta bila detektirana dva alela (označena z modrimi puščicami), zato je testiran vzorec LME1791 na tem lokusu heterozigoten.



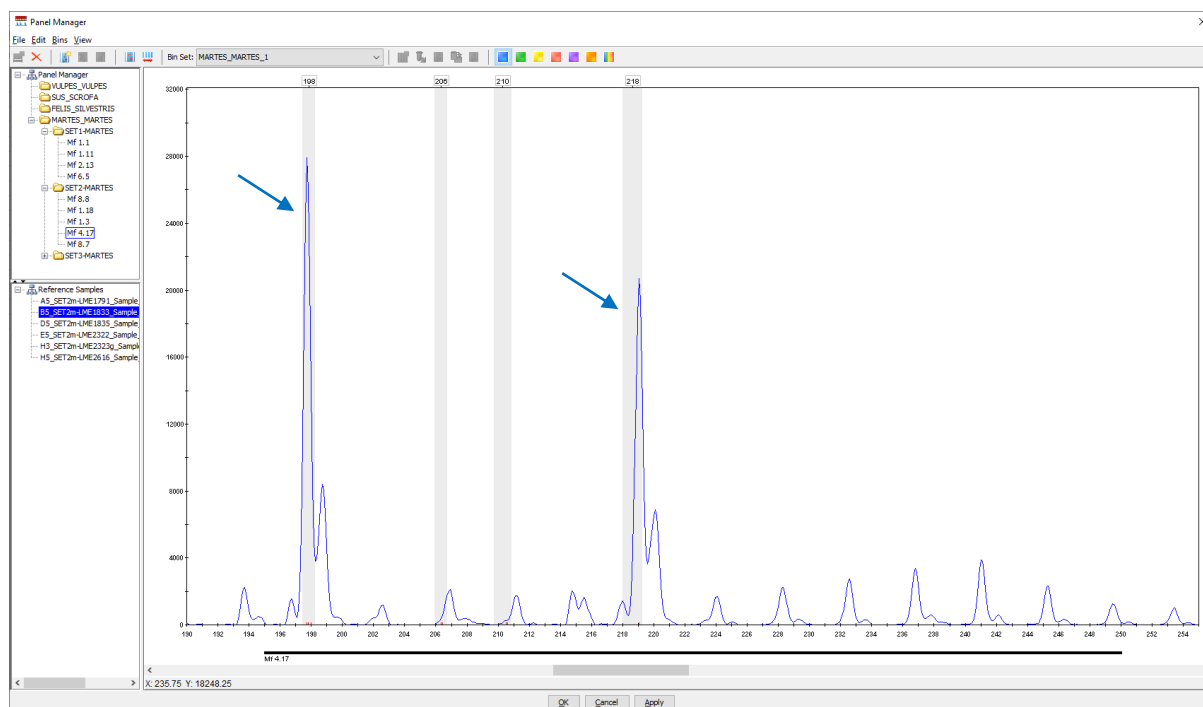
Slika 13: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 1.18 (SET2) v vzorcu LME2322 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 58,7 °C.

Na sliki 13 lahko vidimo pomnožen lokus Mf 1.18 pri temperaturi prileganja 58,7 °C. Po pomnoževanju omenjenega lokusa sta bila detektirana dva alela (označena z modrimi puščicami), zato je testiran vzorec LME2322 na tem lokusu heterozigoten.



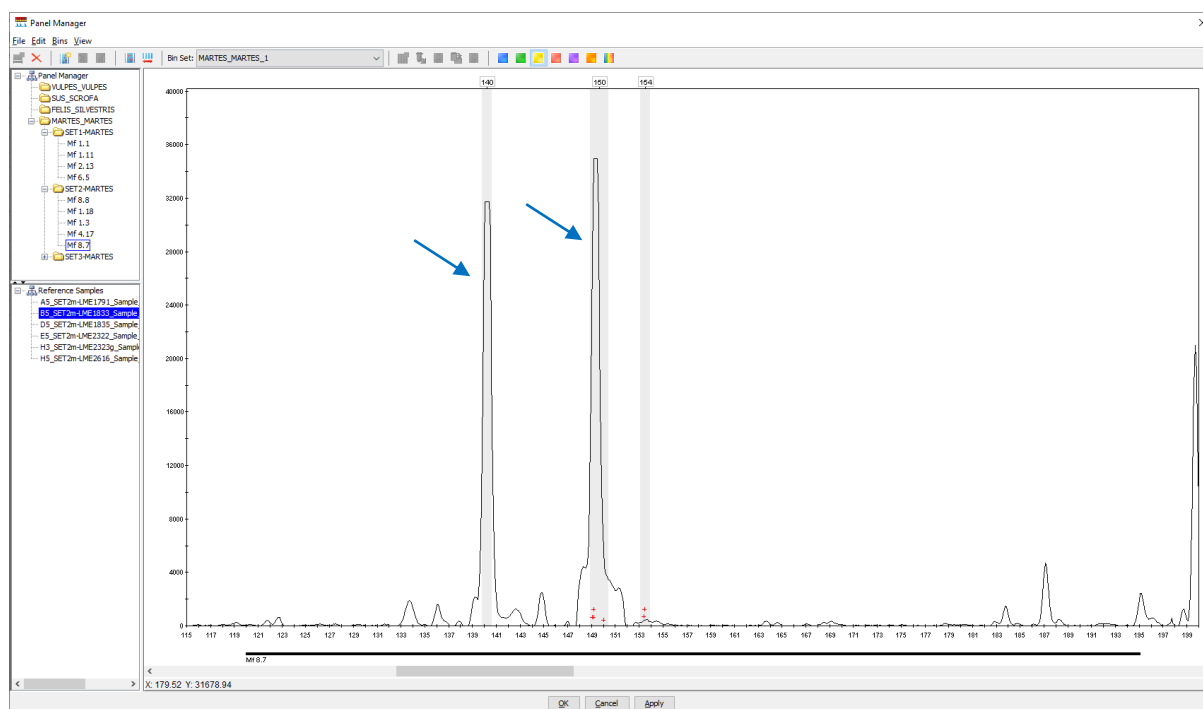
Slika 14: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 1.3 (SET2) v vzorcu LME2616 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 58,7 °C.

Na sliki 14 je vizualizirano pomnoževanje lokusa Mf 1.3 pri temperaturi prileganja 58,7 °C. Po pomnoževanju omenjenega lokusa je bil detektiran en alel (označen z modrimi puščicami), zato je testiran vzorec LME2616 na tem lokusu homozigoten.



Slika 15: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 4.17 (SET2) v vzorcu LME1833 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 58,7 °C.

Na sliki 15 je vizualizirano pomnoževanje lokusa Mf 4.17 v vzorcu LME1833 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 58,7 °C. Po pomnoževanju omenjenega lokusa sta bila detektirana dva alela (označena z modrimi puščicami), zato je testiran vzorec na tem lokusu heterozigoten.



Slika 16: Vizualizacija alelov pomnoženega lokusa Mf 8.7 (SET2) v vzorcu LME1833 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 58,7 °C.

Na sliki 16 je vizualizirano pomnoževanje lokusa Mf 8.7 v vzorcu LME1833 pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 58,7 °C. Po pomnoževanju omenjenega lokusa sta bila detektirana dva alela (označena z modrimi puščicami), zato je testiran vzorec na tem lokusu heterozigoten..

Na podlagi zgoraj predstavljenih rezultatov vizualizacije s programom GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems) ter predhodno določene optimalne temperature prileganja za vsako izmed mešanic smo ugotovili, da so dane temperature prileganja mešanic bile primerno določene, saj smo v vseh primerih dobili uspešno pomnožene lokuse. Za lokuse iz SET-a 1 smo optimalno temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov določili pri 59,4 °C, za tiste iz SET-a 2 pa pri 58,7 °C.

V naši nalogi smo iz tkivnih vzorcev kune zlatice in kune belice, pridobljenih v sklopu ciljnega raziskovalnega projekta Divjad v naseljih, na cestah in drugih nelovnih površinah: težave, izzivi, rešitve (V4–1825), ki je potekal na območju Slovenije, izolirali DNA in optimizirali temperaturo prileganja začetnih oliginukleotidov. Ugotovili smo, da so tkivni vzorci primeren vir za izolacijo DNA in za nadaljnje pomnoževanje mikrosatelitnih markerjev.

Vzorci, uporabljeni v naši zaključni nalogi, so bili LME1791, LME1833, LME1834 in LME1835, zbrani v letu 2019, ter vzorci LME2322, LME2323, LME2614, LME2615 in LME2616, zbrani v letu 2020. Vzorce je bilo potrebno shraniti na suhem in hladnem (tj. v epruvetah in na -80°C), ob rokovanju z njimi pa smo morali tudi nujno uporabljati zaščitno opremo in sterilne pripomočke, kakor tudi zagotoviti sterilne delovne površine (Dash in Das 2018). Seveda smo od začetka pa do zaključka našega raziskovalnega dela morali tudi pravilno izvajati postopke dela, saj smo le na takšen način lahko prišli do realnih rezultatov. Po izolaciji DNA in meritvi njene koncentracije smo nadaljevali z reakcijo PCR. Pri reakciji PCR smo uporabili 3 mešanice začetnih oligonukleotidov (prikazanih v Preglednici 5).

Reakcija PCR je izjemno hitra in občutljiva metoda, v kateri s pomočjo DNA polimeraze in uporabo specifičnih molekul začetnih oligonukleotidov eksponentno pomnožimo genomsko DNA. Ker je reakcija PCR encimska reakcija, je občutljiva na inhibitorje. Ta pojav t.i. inhibitorjev PCR, ki obsegajo vse snovi, ki negativno vplivajo na reakcijo PCR, je precejšnja pomanjkljivost omenjene reakcije. Gre za zelo heterogeno skupino kemičnih snovi, bodisi organskih bodisi anorganskih, nahajajo pa se v raztopljenem ali trdnem stanju. Večina znanih inhibitorjev PCR reakcije sodi med organske spojine. Primeri teh so: sečnina, etanol, polisaharidi, huminske kisline, melanin, različne beljakovine (npr. kolagen, hemoglobin), proteinaze itd. Primer anorganskih snovi z inhibitornim učinkom na reakcijo PCR pa so kalcijevi ioni. Poleg skupine, v katero sodi inhibitorna snov, pa je za inhibitorni učinek seveda pomembna tudi koncentracija spojine (Schrader in sod. 2012).

Inhibitorje reakcije PCR lahko najdemo v različnih bioloških materialih (npr. telesnih tekočinah, organih itd.), okolju (vodi, tleh, zraku itd.) in hrani (mleko, meso, sadje, zelenjava itd.). Izvirajo lahko iz vzorca ali pa do njihovega (nenamerne) vnosa pride tekom transporta, obdelave vzorcev (npr. postopki pred merjenjem koncentracije) ali med izolacijo nukleinske kisline (Schrader in sod. 2012). Inhibitorji PCR reakcije lahko ovirajo različne korake reakcije PCR. Prisotnost teh spojin lahko na primer moti proces pomnoževanja, kar ima za posledico preferenčno pomnoževanje enega lokusa, izpad alela ali pa do pomnoževanja sploh ne pride (Chung 2004; Schrader in sod. 2012). Glavna

posledica delne ali popolne inhibicije reakcije PCR je zmanjšana občutljivost oz. lažno negativni rezultati (Schrader in sod. 2012).

V splošnem je mogoče vpliv inhibitorjev zmanjšati z izbiro ustrezne metode za obdelavo vzorcev in izolacijo nukleinske kisline, z izbiro močnejše DNA polimeraze, tj. takšne DNA polimeraze, ki ima še večjo termostabilnost kot predhodno uporabljena, ali pa z uporabo specifičnih dodatkov za PCR. Takšna splošna in razširjena metoda je redčenje vzorca DNA, kar samodejno povzroči tudi redčenje inhibitorjev PCR reakcije. Vendar pa je dobro vedeti, da omenjeno redčenje spremlja zmanjšanje občutljivosti reakcije PCR. Nasprotje opisani metodi oz. strategiji je strategija dodajanja snovi v mešanico PCR, kar lahko vključuje dodajanje betaina, govejega serumskega albumina (BSA), glicerola, inhibitorjev proteinaze itd. Izbira DNA polimeraze in ustreznega sistema obratne transkripcije je zelo pomembna za preprečevanje inhibitornih vplivov na PCR reakcijo (Schrader in sod. 2012). Dandanes proizvajalci komercialno dostopnih kompletov za očiščenje DNA in reakcije PCR uporabljajo različne (zgoraj navedene) strategije za odstranjevanje PCR inhibitorjev in za povečanje robustnosti PCR encimov (Schrader in sod. 2012). Omeniti je potrebno tudi to, da lahko imajo inhibitorji različne vplive na različne vrste PCR reakcij, omenjeni vplivi pa so lahko odvisni od koncentracije inhibitorjev (Huggett in sod. 2008).

Medtem ko so bile razvite številne metode za izboljšanje pomnoževanja PCR v prisotnosti inhibitorjev kot tudi upoštevanje faktorjev dovzetnosti za inhibicijo (tj. amplikon, delež GC in talilna temperatura začetnega oligonukleotida), pa je le malo znanega o osnovnih vzrokih za inhibicijo v PCR reakciji (Huggett in sod. 2008; Opel in sod. 2010). Trije možni vzroki so lahko (Opel in sod. 2010):

1. vezava inhibitorja na polimerazo;
2. interakcija inhibitorja z DNA in
3. interakcija inhibitorja s polimerazo v procesu podaljševanja začetnih oligonukleotidov.

Določeni začetni oligonukleotidi z višjo talilno temperaturo so pod manjšim vplivom inhibicije, prav tako pa vsi inhibitorji nimajo enakega učinka na različne mikrosatelitne lokuse. To nakazuje, da bi zaporedje amplikona ali začetnega oligonukleotida lahko imelo vpliv na inhibicijo PCR reakcije (Opel in sod. 2010). Pomembno je omeniti, da so začetni oligonukleotidi z višjo talilno temperaturo močneje vezani na DNA, s čimer inhibitorjem lahko onemogočajo vezavo na DNA. Velja pa tudi nasprotno - v kolikor se na DNA veže inhibitor, le ta onemogoča oz. moti podaljševanje začetnega oligonukleotida (Opel in sod. 2010).

Pri iskanju optimalne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov smo si pomagali s spletnim T_m kalkulatorjem Thermo Fisher Scientific T_m Calculator (dostopen na <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>), s katerim smo za vsak lokus iz naših mešanic (SET1, SET2 in SET3) izračunali temperaturo taljenja ter na podlagi le teh za vsako izmed naših mešanic določili optimalno temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov. Previsoka ali prenizka temperatura prileganja (T_a) namreč lahko povzroči tvorbo večjega števila nespecifičnih produktov, sam donos končnih produktov pa se zmanjša. V primeru, da je T_a prenizka, se pomnožijo nespecifični produkti, kar se na agaroznem gelu pokaže kot večje število pasov, medtem ko v primeru, da je T_a previsoka, se donos (in včasih tudi čistost) željenih produktov zaradi slabega prileganja začetnih oligonukleotidov zmanjša. Optimizacija temperature prileganja je še zlasti pomembna pri sintezi dolgih produktov ali ko je celotna genomska DNA podlaga za PCR reakcijo (Rychlik in sod. 1990).

Kot lahko vidimo na slikah 8 do 16, kjer so predstavljeni rezultati našega dela, smo za SET1 in SET2 izbrali oz. določili optimalno temperaturo prileganja, saj nespecifični produkti, nastali pri pomnoževanju lokusov, skoraj niso prisotni.

Z zgoraj predstavljenimi rezultati lahko potrdimo tudi našo hipotezo, ki govori o tem, da bomo glede na izbrane pogoje reakcije PCR pri izbranih setih oz. mešanicah dobili uspešno pomnožene in genotipizirane mikrosatelitne lokuse.

3.5 Težave in rešitve pri pomnoževanju mešanice začetnih oligonukleotidov; SET3

Tekom našega dela smo imeli nekaj težav z mešanico SET3, ki smo jo nato posledično tudi izključili iz nadaljnjega dela. Genotipizacija lokusov omenjene mešanice namereč ni bila uspešna, kljub temu da je do pomnoževanja njenih fragmentov prišlo. Sklepali smo, da je za uspešnost genotipizacije potrebna dodatna optimizacija pogojev, zato smo dano mešanico ponovno pripravili za reakcijo PCR, pri čemer smo na račun 1 ml deionizirane vode dodali 1 ml reagenta Q-solution. Q-Solution je pripravek, ki vsebuje nukleotide, pufer, Taq polimerazo in mono- ter divalentne katione (Jelenčič 2008). Opisan pripravek namreč spremeni talilno »vedenje« DNA in velikokrat izboljša neoptimalno PCR reakcijo, vzrok za katero so DNA matrice, ki imajo visok nivo sekundarnih struktur ali visok delež GC (QIAGEN 2021). Volumni vseh ostalih reagentov so ostali isti. Kljub omenjenim spremembam genotipizacija ni bila uspešna.

Iz tega lahko sklepamo, da je za neuspelo genotipizacijo lahko odgovoren eden ali več izmed naslednjih faktorjev:

- prenizka temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov oz. napačno izračunana temperatura tališča T_m začetnih oligonukleotidov (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2021)
- neustrezna koncentracija začetnih oligonukleotidov (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2021)
- nepravilno določeno zaporedje začetnih oligonukleotidov (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2021)
- DNA slabše kakovosti (The Jackson Laboratory 2021)
- neustrezna koncentracija DNA (le te namreč ne sme biti niti preveč niti premalo) (The Jackson Laboratory 2021)
- prisotnost morebitnih inhibitorjev, ki bi lahko motili pomnoževanje DNA (The Jackson Laboratory 2021)

Možne rešitve, ki bi morda lahko odpravile dane težave oz. probleme, so npr.

- optimizacija temperature prileganja začetnih oligonukleotidov oz. ponoven izračun temperature tališča in/ali prileganja začetnih oligonukleotidov (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2021)
- optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2021)
- popravek zaporedja začetnih oligonukleotidov (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2021)
- uporaba DNA boljše kakovosti (The Jackson Laboratory 2021), pri čemer upoštevamo DNA razmerje 260:280, tj. razmerje absorbanca pri 260 nm in 280 nm, ki se uporablja za oceno čistosti DNA (in RNA)

- uporaba pravilne koncentracija DNA, (The Jackson Laboratory 2021)
- zmanjšamo vsebnost morebitnih inhibitorjev, ki bi lahko motili pomnoževanje, in sicer tako, da DNA razredčimo (The Jackson Laboratory 2021)
- ponovno izoliramo DNA, vendar z uporabo novih reagentov (The Jackson Laboratory 2021)

Rezultate genotipizacije mikrosatelitnih lokusov lahko uporabimo za nadaljnje raziskave, zlasti za analize populacijske strukture oz. populacijske genetike. Parametri le te so:

- število alelov in bogastvo alelov (Leberg 2002)
- opažena heterozigotnost (H_o ; *ang.* observed heterozygosity) (Allendorf 2007)
- pričakovana heterozigotnost (H_e ; *ang.* expected heterozygosity) (Allendorf 2007)
- Hardy-Weinbergovo ravnotežje (*ang.* Hardy-Weinberg equilibrium) (Allendorf 2007)
- fiksacijske indekse F-statistike (Wright 1950):
 - F_{IS} (individualni fiksacijski indeks oz. koeficient parjenja v ožjem sorodstvu; *ang.* inbreeding coefficient)
 - F_{IT} (populacijski fiksacijski indeks) in
 - F_{ST} (povprečni oz. subpopulacijski fiksacijski indeks ali fiksacijski indeks)

Z naštetimi parametri lahko določimo genetsko diverziteto in populacijsko strukturo kune belice oz. zlatice.

4 ZAKLJUČEK

V zaključni nalogi smo testirali in analizirali pogoje za uspešno genotipizacijo vzorcev kune belice in kune zlatice. Pokazali smo, da se lahko nastali protokol za reakcijo PCR in izbor mešanic parov začetnih oligonukleotidov uspešno uporablja za analizo mikrosatelitnih lokusov na teh vrstah. *Martes martes* in *Martes foina* namreč v zadnjih desetletjih postajata vse bolj ogroženi zaradi človeških dejavnosti ter (posledičnega) krčenja in fragmentacije njihovih naravnih habitatov.

V nalogi smo izolirali genomsko DNA iz 2 tkivnih vzorcev kune zlatice (*Martes martes*) in 7 tkivnih vzorcev kune belice (*Martes foina*), torej skupno 9 tkivnih vzorcev, zbranih v letih od 2019 do 2020, pridobljenih v sklopu ciljnega raziskovalnega projekta Divjad v naseljih, na cestah in drugih nelovnih površinah: težave, izzivi, rešitve (V4-1825), ki je potekal na območju Slovenije. Po izolaciji in analizi koncentracije DNA smo opravili reakcijo PCR ter gelsko elektroforezo, nato pa nadaljevali z genotipizacijo.

Mikrosatelite smo razdelili v tri sete oz. mešanice (SET1, SET2 in SET3) ter vsakega izmed teh setov testirali pri različnih temperaturah prileganja začetnih oligonukleotidov, da smo ugotovili, ali so izbrane mešanice in pogoji ustrezni za uspešno genotipizacijo oz. ali pride do pomnoževanja lokusov. Vključili smo 13 mikrosatelitnih lokusov. Po teoretičnem izračunu talilne temperature in temperature prileganja začetnih oligonukleotidov s spletnim T_m kalkulatorjem Thermo Fisher Scientific T_m Calculator (dostopen na <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>) za SET1 in SET2, smo reakcije PCR testirali pri različnih temperaturah in nato določili optimalno temperaturo prileganja obeh mešanic. Za SET1 je ta temperatura znašala 59,4 °C, za SET2 pa 58,7 °C. Za SET3 smo ugotovili, da so se fragmenti pomnožili, a bi za uspešno genotipizacijo bila potrebna dodatna optimizacija pogojev.

Poznavanje optimalne temperatura prileganja je ključno za uspešno PCR reakcijo. Na samo temperaturo prileganja vplivajo uporabljena DNA-polimeraza (v našem primeru Taq polimeraza), delež GC, koncentracija začetnih oligonukleotidov ter dolžina zaporedja začetnih oligonukleotidov.

5 LITERATURA

- [1.] Aguiar P. H. N., Furtado C., Repolês B. M., Ribeiro G. A., Mendes I. C., Peloso E. F., ... Machado C. R. 2013. Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7(6): 13.
- [2.] Alaeddini R., Walsh S. J., Abbas A. 2010 Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA - a review. *Forensic Sci Int Genet.* 4(3):148–157.
- [3.] Allendorf F. W., Luikhart G. H. 2007. *Conservation and the Genetics of Populations.* Oxford, Blackwell Publishing.
- [4.] Basto M. P., Rodrigues M., Santos-Reis M., Bruford M. W. in Fernandes C. A. 2010. Isolation and characterization of 13 tetranucleotide microsatellite loci in the Stone marten (*Martes foina*). *Conservation Genetics Resources* 2: 317–319.
- [5.] Basto M. P., Santos-Reis M., Simoes L., Grilo C., Cardoso L., Cortes H.,... Fernandes C. 2016. Assessing genetic structure in common but ecologically distinct carnivores: The stone marten and red fox. *PLoS ONE* 11(1): 1–26.
- [6.] Bio-Rad Laboratories, Inc. PCR Troubleshooting. <https://www.bio-rad.com/en-si/applications-technologies/pcr-troubleshooting?ID=LUSO3HC4S> (datum dostopa: 21.12.2021)
- [7.] Bužan E., Lužnik M., Alagić A., Flajšman K., Adamič M., Pokorny B. 2020. Divjad v naseljih: težave, izzivi in rešitve. *Zlatorogov zbornik* 7: 3-51.
- [8.] Chapuis M. P. in A. Estoup 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution.* 24(3):621–63.
- [9.] Chauhan T. 2021. What is Annealing Temperature in PCR? How to Calculate and Set It? <https://geneticeducation.co.in/what-is-annealing-temperature-in-pcr-how-to-calculate-and-set-it/> (datum dostopa: 27.11.2021)
- [10.] Chung D. T. 2004. The development of novel STR miniplex primer sets for the analysis of degraded and compromised DNA samples. Dissertation, Ohio University, the faculty of the College of Arts and Science.
- [11.] Dash H. R. in Das S. 2018. Microbial Degradation of Forensic Samples of Biological Origin: Potential Threat to Human DNA Typing. *Molecular Biotechnology* 60(2): 141–153.
- [12.] Davis C. S. in Strobeck C. 1998. Isolation, variability, and cross-species amplification of polymorphic microsatellite loci in the family mustelidae. *Molecular Ecology* 7(12): 1776–1778.

- [13.] Dieffenbach C. W., Lowe T. M. J. in Dveksler G. S. 1993. General concepts for PCR primer design. *Genome Research* 3(3): 30–37.
- [14.] Direktiva Sveta 92/43/EGS z dne 21. maja 1992 o ohranjanju naravnih habitatov ter prosto živečih živalskih in rastlinskih vrst Svet Evropske unije: PRILOGA V - Živalske in rastlinske vrste v interesu skupnosti, pri katerih za odvzem iz narave in izkoriščanje lahko veljajo ukrepi. 2007. Ur.l. Evropskih skupnosti. 206/7: 61–64.
- [15.] Domingo-Roura X. 2002. Genetic Distinction of Marten Species By Fixation of a Microsatellite Region. *Journal of Mammalogy* 83(3): 907–912.
- [16.] Harris S. in Jones D. 1997. Optimisation of the polymerase chain reaction. *British Journal of Biomedical Science* 54(3): 166–173.
- [17.] Huggett J. F., Novak T., Garson J. A., Green C., Morris-Jones S. D., Miller R. F. in Zumla A. 2008. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Research Notes* 70 (1).
- [18.] The Jackson Laboratory. No Bands - Genotyping. <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/technical-support/genotyping/troubleshooting/no-bands#> (datum dostopa: 21.12.2021)
- [19.] Jelenčič M. 2008. Genetska pestrost rjavega medveda (*Ursus arctos*) v Sloveniji. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.
- [20.] Kaunitz J. D. 2015. The Discovery of PCR: ProCuRement of Divine Power. *Digestive Diseases and Sciences* 60(8): 2230–2231.
- [21.] Kelc I. 2018. Ekspresijski in epigenetski vzorci pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo. Univerza v Mariboru.
- [22.] Kryštufek B. 1991. Sesalci Slovenije. Prirodoslovni muzej Slovenije : 215–218.
- [23.] Konvencija o varstvu prosto živečega evropskega rastlinstva in živalstva ter njunih naravnih življenjskih prostorov: Dodatek III- Zavarovane živalske vrste. 1979. Ur.l. EU. 38. 10.2.1982: 3–32.
- [24.] Lanszki J., Hancz C., Zalewski A. 1999. Feeding habits and trophic niche overlap in a Carnivora community of Hungary. *Acta Theriologica* 44 (4): 429–442.
- [25.] Lanszki J., Sárdi B., Széles G.L. 2009. Feeding habits of the stone marten (*Martes foina*) in villages and farms in Hungary. *Natura Somogyiensis* 15: 231–246.
- [26.] Leberg P. L. 2002. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology*: 2445–2449.
- [27.] Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu C. Y. in Kim, Y. H. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments* 62: 1–5.

- [28.] Lepais O., Chancerel E., Boury C., Salin F., Manicki A., Dutech C., ... Guichoux E. 2020. Fast sequence-based microsatellite genotyping development workflow. *PeerJ* 8: 1–30.
- [29.] Löffert D., Karger S., Berkenkopf M., Seip N. in Kang J. 1997. PCR optimization: primer design. *QIAGEN News*. Hilden, Germany: QIAGEN GmbH.
- [30.] Mink (Importation And Keeping) Order. 1962. UK Parliament. Hansard. Lords: 26 July 1962. Lords Chamber. Volume 242.
- [31.] Opel K. L., Chung D. in McCord B. R. 2010. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of Forensic Sciences* 55 (1): 25–33.
- [32.] Pertoldi C., Barker S. F., Madsen A. B., Jørgensen H., Randi E., Muñoz J., ... Loeschcke V. 2008. Spatio-temporal population genetics of the Danish pine marten (*Martes martes*). *Biological Journal of the Linnean Society* 93(3): 457–464.
- [33.] Pienaar E., Theron M., Nelson M. in Viljoen H. J. 2006. A quantitative model of error accumulation during PCR amplification. *Computational Biology and Chemistry* 30(2): 10.
- [34.] Pilot M., Gralak B., Goszczyński J. in Posłuszny M. 2007. A method of genetic identification of pine marten (*Martes martes*) and stone marten (*Martes foina*) and its application to faecal samples. *Journal of Zoology* 271(2): 140–147.
- [35.] Porta A. R. in Enners E. 2012. Determining Annealing Temperatures for Polymerase Chain Reaction. *The american biology teacher* 74(4): 256–260.
- [36.] PREMIER Biosoft.
http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html (datum dostopa: 28.8.2021)
- [37.] Prezioso V. R. in Jahns A. 2000. Using Gradient PCR to Determine the Optimum Annealing Temperature. Eppendorf Scientific Inc.
<https://www.drugdiscoveryonline.com/doc/using-gradient-pcr-to-determine-the-optimum-a-0002> (datum dostopa: 26.12.2021)
- [38.] QIAGEN. Is Q-Solution required for PCR with QIAGEN's PCR kits?
<https://www.qiagen.com/nl/resources/faq?id=66b24579-8104-44be-8754-550624868882&lang=en> (datum dostopa: 25.12.2021)
- [39.] Repnik K. in Potočnik U. 2013. Genomika v biomedicinski tehnologiji: Navodila za laboratorijske vaje. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 18–21.
- [40.] Rychlik W., Spencer W. J. in Rhoads R. E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research* 18(21): 6409–6412.

- [41.] Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L. in Johne R. 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* 113: 1014–1026.
- [42.] Slovenski portal Termania. <https://www.termania.net/slovarji/slovenski-medicinski-slovar/7952986/depurinacija>. (datum dostopa: 28.8.2021)
- [43.] Spletna stran Nacionalnega inštituta za raka Združenih držav Amerike (NCI). <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/genotyping> (datum dostopa: 11.8.2021)
- [44.] Thermo Fisher Scientific. PCR Primer Design Tips. <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/pcr-primer-design-tips/> (datum dostopa: 04.09.2021)
- [45.] Wages J. M. 2005. Polymerase Chain Reaction. V: Worsfold P., Townshend A. in Poole C. (ur.). *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. Elsevier: 243–250.
- [46.] Wierzbowska I. A., Lesiak M., Zalewski A., Gajda A., Widera E., Okarma H. 2017. Urban carnivores: A case study of sympatric stone marten (*Martes foina*) and red fox (*Vulpes vulpes*) in Kraków, Southern Poland. V: *The Martes complex in the 21st century: Ecology and conservation*. Zalewski A., Wierzbowska I.A., Abury K.B., Birks J.D.S., O'Mahony D.T., Proulx G. (ur.). Białowieża. Mammal Research Institute: 161–178.
- [47.] Wright S. 1950. Genetical structure of populations. *Nature*. 166 (4215): 247–249.
- [48.] Zrim T. 2011. Dokazovanje parehovirusov z metodo verižne reakcije s polimerazo. Univerza v Ljubljani.