

Izolacija DNA iz različitih uzoraka tkiva divljih (*Felis silvestris* Schreber, 1777) i domaćih (*Felis catus* Linnaeus, 1758) mačaka

Lindić, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:544788>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Petra Lindić
6850/BT

**IZOLACIJA DNA IZ RAZLIČITIH UZORAKA TKIVA DIVLJIH
(*Felissilvestris*Schreber, 1777) i DOMAĆIH (*Feliscatus*Linnaeus, 1758) MAČAKA
ZAVRŠNI RAD**

Mentor: Izv. dr. sc. RenoHrašćan

Zagreb, 2017.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

IZOLACIJA DNA IZ RAZLIČITIH UZORAKA TKIVA DIVLJIH (*Felis silvestris* Schreber, 1777) i DOMAĆIH (*Felis catus* Linnaeus, 1758) MAČAKA Petra Lindić, 6850/BT

Sažetak: Izolacija DNA je uklanjanje deoksiribonukleinske kiseline iz svih stanica koje se nalaze u određenom uzorku. Za izolaciju DNA korišten je komplet QIAamp® DNA Mini, a sama izolacija izvršena je prema protokolu proizvođača, koji se razlikuje za različite vrste uzoraka. Pomoću tog kompleta izolirana je genomska DNA, tj. DNA koja se ne nalazi samo u jezgramastanicaveć i u mitohondrijima. Istraživanje je provedeno na 21 uzorku divljih i 47 uzoraka domaćih mačaka. Uzorci iz kojih se izolirala DNA su: mišićna tkiva divljih mačaka, krv, slina i dlaka domaćih mačaka. Na kraju uspješne izolacije dobiveno je 300 ili 400 µl (ovisno o uzorku iz kojeg se izolira) otopine genomske DNA. Najuspješnije izolacije dobivene su iz krvi i sline, zatim iz mišićnog tkiva, a najneuspješnija izolacija je iz dlake. Od svih vrsta tkiva jedino iz dlake niti jednom nije uspješno izolirana DNA.

Ključne riječi: izolacija DNA, genomska DNA, divlja mačka, domaća mačka

Rad sadrži: 22 stranice, 4 slike, 4 tablice, 22 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u: Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Reno Hrašćan

Rad predan: 07.07.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

**DNA EXTRACTION FROM DIFFERENT TISSUE SAMPLES OF WILD (*Felis silvestris*
Schreber, 1777) AND DOMESTIC (*Felis catus* Linnaeus, 1758) CAT**
Petra Lindić, 6850/BT

Abstract: DNA extraction is the removal of deoxyribonucleic acid from all cells in a particular sample. For DNA extraction, QIAamp® DNA Mini kit is used and extraction was performed according to the manufacturer's protocol, which differs for different types of samples. With this kit genomic DNA is extracted, i.e. DNA that is not only found in the cell nuclei but also in the mitochondria. The study was conducted on 21 wild and 47 domestic cat samples. Samples from which DNA was extracting are: muscle tissue of wild cats, blood, slime and hair of domestic cats. At the end of successful extraction, 300 or 400 µl (depending on the sample from which it is extracted) solution of genomic DNA is obtained. The most successful extractions are obtained from blood and saliva, then from muscle tissue and the most unsuccessful extraction is from the hair. Of all tissue types, only from the hair DNA wasn't extracted.

Keywords: DNA extraction, genomic DNA, wild cat, domestic cat

Thesis contains: 22 pages, 4 figures, 4 tables, 22 literature references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Reno Hraščan, Associate Professor

Thesis delivered: 7th July 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KEMIJSKA SVOJSTVA DNA.....	2
2.2. PRINCIP IZOLACIJE DNA	3
2.3. DEGRADIRANA DNA.....	5
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. UZORCI DIVLJIH I DOMAĆIH MAČKA.....	8
3.2. IZOLACIJA DNA.....	11
3.2.1. IZOLACIJA DNA IZ MIŠIĆNOG TKIVA DIVLJE MAČKE	11
3.2.2. IZOLACIJA DNA IZ KRVI DOMAĆE MAČKE	12
3.2.3. IZOLACIJA DNA IZ SLINE (BRISA USNE ŠUPLJINE) DOMAĆE MAČKE	12
3.2.4. IZOLACIJA DNA IZ DLAKA DOMAĆE MAČKE	13
3.2.4.1. KORIŠTENJE QIAGEN KOMPLETA.....	13
3.2.4.2. KORIŠTENJE ENZIMSKOG PRAŠKA ZA PRANJE ODJEĆE(ref u tekst)	13
3.3. GEL ELEKTROFOREZA.....	13
3.4. ODREĐIVANJE ČISTOĆE I KONCENTRACIJE DNA	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
5. ZAKLJUČAK	19
6. ZAHVALE	20
7. POPIS LITERATURE	21

POPIS KRATICA

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

dsDNA - dvolančana DNA (eng. *double-stranded DNA*)

DTT - ditioltreitol (eng. *dithiothreitol*)

eDNA - okolišna DNA (eng. *environmental DNA*)

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

PBS - puferirana otopina fosfatnih soli (eng. *phosphatebufferedsaline*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerasechainreaction*)

RCF - relativna centrifugalna sila (eng. *relativecentrifugalforce*)

SDS - natrijev dodecil sulfat (eng. *sodiumdodecyl sulfate*)

ssDNA - jednolančana DNA (eng. *single-stranded DNA*)

TAE pufer - tris-acetat-EDTA pufer

1. UVOD

Divlja mačka (*Felis silvestris* Schreber, 1777) najmanje je istražena strogo zaštićena vrsta zvijeri u Hrvatskoj (1). Rasprostranjena je na gotovo cijelom području Hrvatske, osim na jadranskim otocima (2). Naoko je slična domaćim mačkama međutim, osnovne razlike su što ima veći rep s velikim, zaobljenim crnim vrhom i barem dva crna benda koja ga u potpunosti okružuju, na leđima ima jednu tanku, ravnu prugu koja je prekinuta u korijenu repa, bočne pruge koje nisu izražene i nisu povezane s leđnom prugom te svijetlo krzno ili krzno sive boje (3). U Europi je genomska čistoća populacije divlje mačke ugrožena zbog iznimno česte hibridizacije s domaćom mačkom, no nije istraženo kakvo je stanje populacije divljih mačaka u Hrvatskoj (4). Stoga je za potrebe očuvanja i reintrodukcije vrste nužno provesti analizu genomske različitosti populacije divlje mačke u Hrvatskoj. Kako bi se to moglo provesti potrebno je prvo izolirati DNA iz različitih uzoraka divljih, a zatim domaćih mačaka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KEMIJSKA SVOJSTVA DNA

Makromolekula DNA dugi je linearni polimer izgrađen od povezanih međusobno sličnih monomernih jedinica. Svaka monomerna jedinica unutar polimera je nukleotid, a svaki se nukleotid sastoji od triju komponenata: šećera, fosfata te jedne od četiriju baza. Dvije baze derivati su purina - adenin i gvanin, a druge dvije pirimidina - citozin i timin. Ono što jedinstveno karakterizira nukleinsku kiselinu je njen redosljed baza koji je oblik linearne konformacije. Šećer u DNA je deoksiriboza što znači na 2'-ugljikovu atomu nema kisikov atom, koji je na tom mjestu vezan u ribози. Atomi u bazama ne označuju se crticom kako bi se razlikovali od ugljikovih atoma šećera koji se označuju crticom('). U nukleinskim kiselinama šećeri su povezani fosfodiesterskim vezama te se niz povezanih šećera naziva okosnicom nukleinske kiseline. Svaka fosfodiesterska veza je negativno nabijena. One su manje osjetljive na hidrolizu od ostalih estera zahvaljujući negativnom naboju koji odbija nukleofilne reagense. Ta otpornost igra veliku ulogu u održavanju cjelovitosti informacije pohranjene u DNA. Pravilna spiralna struktura DNA nastaje tako da baze na dvama lancima tvore specifične parove baza. Upravo ta dvostruka uzvojnica omogućuje olakšano nastajanje dviju kopija nukleinske kiseline iz jedne, odnosno replikaciju nasljedne tvari (5). Trodimenzionalnu strukturu DNA otkrili su Watson i Crick 1953. godine, no međutim eksperimentalni podaci o strukturi DNA proizašli su iz kristalografskih ispitivanja Mauricea Wilkinsa i Rosalind Franklin. Analizom tih podataka utvrđeno je da je molekula DNA uzvojnica koja čini zavoje od 3,4 nm, da je razmak između susjednih baza 0,34 nm te da stoga jedan zavoj uzvojnice sadrži 10 parova baza. Važno otkriće koje je upućivalo na to da se molekula DNA ne sastoji od jednog nego dvaju lanaca bilo je da je promjer uzvojnice približno 2 nm. Na temelju ovih podataka Watson i Crick napravili su model molekule DNA (6). Osnovna svojstva modela su da se molekula DNA sastoji od dva spiralna polinukleotidna lanca koji su zamotani oko zajedničke osi, lanci teku u suprotnim smjerovima, sadrže šećerno-fosfatne okosnice na vanjskoj strani, a baze u unutrašnjosti. Vodikove veze omogućuju specifično sparivanje baza: adenin s timinom, a gvanin s citozinom. Iako su vodikove veze slabe, zbog njihova velikog broja u molekuli DNA stabiliziraju dvostruku uzvojnica. Erwin Chargaff je 1950. godine opazio da je količina adenina prema timinu i gvanina prema citozinu jednaka u svim istraženim vrstama, a da se količina adenina prema gvaninu značajno razlikuje. To opažanje objašnjava specifično sparivanje nasuprotnih purina i pirimidina(5,6).

2.2. PRINCIP IZOLACIJE DNA

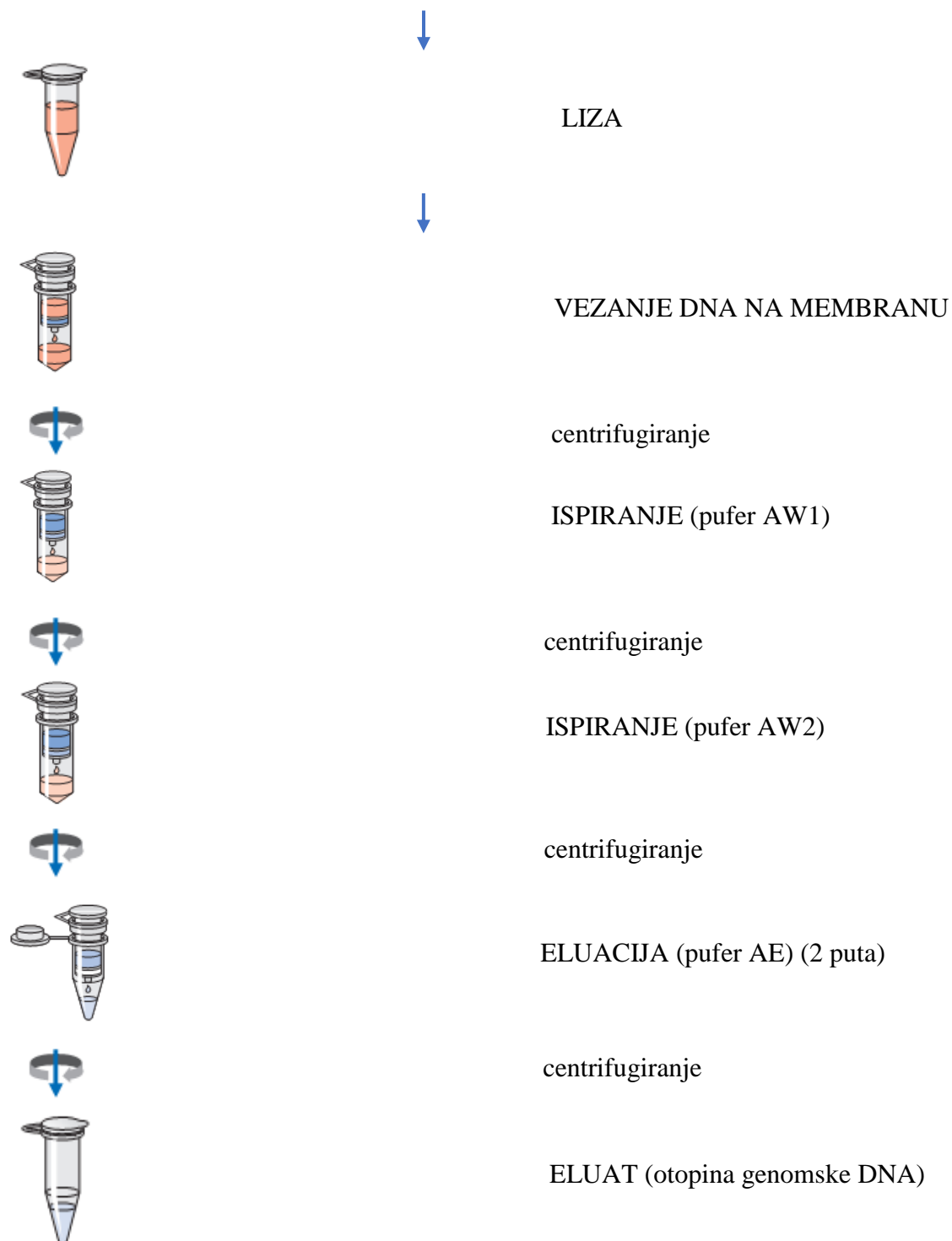
Izolacija DNA može se provesti različitim kompletima za izolaciju međutim, pokazano je da je osjetljivost PCR detekcije različita korištenjem različitih kompleta. Kao prvi korak jako je bitno odabrati pogodan komplet koji omogućuje izolaciju čiste i kvalitetne DNA koja se kasnije upotrebljava u PCR-u (7).

Izolacija DNA iz uzoraka divljih (*Felis silvestris* Schreber, 1777) i domaćih (*Felis catus* Linnaeus, 1748) mačaka izvršena je kompletom QIAamp®DNA Mini. Ukupna DNA (npr. genomska, virusna, mitohondrijska) može se pročistiti iz cijele krvi, plazme, seruma, koštane srži, limfocita, kultiviranih stanica, tkiva i forenzičkih uzoraka. QIAamp postupak prikladan je za svježnu ili smrznutu krv i krv koja je tretirana s citratom, heparinom ili EDTA. Iako u krvi samo leukociti sadrže jezgru u kojoj se nalazi DNA, nije ih potrebno prethodno izdvojiti iz krvi. DNA se može pročistiti iz tkiva do 25 mg ili od 200 µl tekućine (8).

Nije potrebna mehanička homogenizacija jer su tkiva enzimski lizirana, a vrijeme lize razlikuju se ovisno o izvoru uzorka. Liza stanica odvija se dodatkom lizirajućeg pufera i proteinaze K. Lizirajući pufer sadrži SDS koji razgrađuje lipide u staničnoj membrani te uništava prisutne nukleaze bez negativnog utjecaja na proteinazu K (9). Optimizirani puferi i enzimski lizirani uzorci također stabiliziraju nukleinske kiseline i poboljšavaju kasniju selektivnu adsorpciju DNA na QIAamp silikonsku membranu. Dodatkom 96%-tnog etanol dolazi do taloženja DNA budući je netopljiva u alkoholu(10) te nije potrebno provesti precipitaciju dodanog alkohola. Lizati se stavljaju u QIAamp spin kolonu koja sadrži membranu od silikagela na koju se veže DNA na temelju visoke ionske jakosti (pH<7) (11). Pročišćavanje vezane DNA provodi se puferima za ispiranje koji uklanjaju prisutne nečistoće, a čista i spremna za upotrebu DNA se zatim eluira u puferu niske ionske jakosti (pH>7) (11). Dobivena otopina genomske DNA pohranjuje se na -20°C za kasniju upotrebu PCR-a.

Prema kompletu QIAamp® DNA Mini iz 25 mg uzetog tkiva, koncentracija DNA trebala bi iznositi 25-75 ng/µl te bi trebala biti očišćena od proteina, nukleaza i drugih kontaminanata ili inhibitora. Veličine je do 50 kb, a prevladavaju fragmenti od približno 20-30kb (12).

uzorak



Slika 1. Shema izolacije DNA pomoću QIAamp protokola (12).

2.3. DEGRADIRANA DNA

Iako je DNA nositelj genetske informacije, ima ograničenu kemijsku stabilnost zbog mogućnosti nastanka oštećenja. Najčešća oštećenja DNA nastaju hidrolizom, oksidacijom i neenzimskom metilacijom te se mogu popraviti specifičnim DNA popravcima. Koliki će biti stupanj i spektar oštećenja DNA ovisi o samom uzorku i vrsti okoliša kojemu je izložen. Najnestabilnija veza (ili bolje najosjetljivija) u molekuli DNA je N-glikozidna veza koja omogućuje vezanje baze na šećer deoksiribozu (13,14).

Djelovanjem DNA glikozilaze ili spontanom depurinacijom dolazi do hidrolize N-glikozidne veze što uzrokuje gubitak baze, odnosno nastaje apurinsko/apirimidinsko (AP)mjesto. Tijekom replikacije DNA, baza nadolazećeg nukleotida ne može tvoriti bazni par s nasuprotnom bazom zbog prisutstva AP mjesta. To rezultira lomom, međutim AP endonukleaza brzo pokreće popravak DNA dovođenjem loma na 5' kraj AP mjesta. Fosfodiesteraza uklanja preostali šećer i fosfat koji zatim djelovanjem DNA polimeraze i DNA ligaze popunjavaju jedno nukleotidno mjesto (13,15).

Zbog slabe N-glikozidne veze baze citozin i 5-metilcitozin osjetljive su na hidrolitičku deaminaciju. Hidrolitičko deaminacijom citozina nastaje uracil, a 5-metilcitozina timin. Deaminacija citozina odvija se 3 do 4 puta sporije nego deaminacija 5-metilcitozina međutim, izrezivanjem deaminiranog citozina (tj. uracila) uracil-DNA glikozilazom kako bi se regeneriralo AP mjesto se odvija brže od popravka 5-metilcitozina (13).

U reakciji amplifikacije ili sekvencioniranja učinak deaminiranog citozina ovisi o polimerazi. Neke polimeraze (npr. Taq DNA polimeraza) mogu učinkovito produžiti lanac pokraj deaminiranog citozina, umetanjem adenina nasuprot uracila umjesto umetanja gvanina. Iako je polimeraza 100% točna nastaje mutirani lanac kćeri. Lektorirajuće polimeraze, uključujući arhealne polimeraze (npr. Vent, Pfu, 9 ° N DNA polimeraze), zaustavljaju se na deoksiuracilu te je tako sprječeno nastajanje trajne mutacije u lancu kćeri. Njihovo ponašanje na deoksiuridinskim kalupima potpuno je uz prisutnost funkcije "čitanja unaprijed" u kojoj polimeraza "pregledava" kalup prije nego provede elongaciju (produljenje) primera i zaustavlja 5'-3' polimeraznu aktivnost kadgod registrira deoksiuridin. Za razliku od 3'-5' lektorirajuće egzonukleazne aktivnosti, kod mnogih polimeraza funkcija "čitanja unaprijed" je pasivna. Kada je lanac kalupa koji završava deoksiuridinom izložen takvoj polimerazi, nisu primjećene nikakve promjene u kemijskoj strukturi (14,16).

Također se može odvijati i deaminacija purina. Deaminacijom adenina nastaje hipoksantin te takva deaminacija čini samo 2-3% od ukupne deaminacije citozina. Hipoksantin stvara stabilniji bazni par s citozinom, umjesto timinom te je zbog toga produkt deaminacije adenina mutagen. Popravak citozina u uracil odvija se pomoću različitih DNA glikozilaza

međutim, popravak je manje efikasan zbog malog udjela hipoksantin-DNA glikozilaze. Deaminacijom gvanina dobiva se ksantin. Takva deaminacije slična je deaminaciji adenina ili je čak sporija, ali još nije identificiran niti jedan enzim koji sudjeluje u popravku DNA kada nastane ksantin (13).

Druga vrsta oštećenja je oksidacija pri čemu dolazi do oksidacije gvanina i nastaje 8-okso-gvanin. On tijekom replikacije tvori bazni par s adeninom pri tome dolazi do transverzije G-C u T-A. DNA koja se nalazi u mitohondrijima sadrži veće količine 8-okso-gvanina nego DNA iz jezgre te su također veće količine 8-okso-gvanina iz mitohondrija koji je prethodno izložen oksidativnom stresu. Oštećenje DNA koja se nalazi u mitohondriju, a inducirano je kisikovim radikalom može imati veliku ulogu u visokoj stopi mutacija, brzom evoluciji i starenju (17).

Treća vrsta oštećenja je neenzimska metilacija DNA. Molekula koja uzrokuje oštećenje je S-adenozilmetionin (SAM) koja služi kao kofaktor u mnogim transmetilacijskim reakcijama u stanici. Glavni supstrati su purini te metilacijom najčešće nastaju 3-metiladenin i 7-metilgvanin. 3-metiladenin je citotoksična baza koja blokira replikaciju. SAM se nalazi u jezgri stanice i služi kao kofaktor u enzimskoj metilaciji DNA te zbog toga nema nikakve zaštite od ove modifikacije međutim, postoji 3-metiladenin DNA glikozilaza koja izrezuje metiliranu bazu te brzo generira AP mjesto. Za razliku od 3-metiladenina 7-metilgvanin ima jako slabu mogućnost popravka te se može odrediti njegova količina u DNA u stanicama sisavaca (13).

Ostale vrste oštećenja samo u određenim okolnostima postaju prevladavajuće. DNA-protein ili DNA-DNA umreženja su važna vrsta oštećenja koja onemogućuju genetske istrage velikog broja pohranjenih uzoraka. Veliki broj uzoraka koji se nalazi u muzejima i koristi u medicinskim istraživanjima analizira se u formalinu (formaldehid) ili je u nekom trenutku izložen formalinu. Formalin inducira nastanak umreženja koja učinkovito čuvaju strukturnu morfologiju, ali su izuzetno štetne za naknadnu DNA analizu jer polimeraze s unakrsno povezanim bazama i DNA-DNA umreženja mogu inhibirati denaturaciju. Osim toga, tijekom vremena pH otopine formalina opada zbog formiranja mravlje kiseline, povećavajući brzinu formiranja AP mjesta i kasnije fragmentacije.

Pirimidinski dimeri uzrokuju oštećenje DNA kada je DNA izložena UV svjetlu te su vrlo učinkoviti u zaustavljanju DNA polimeraza.

Postoji obilje DNA sekvencijskih informacija sadržanih u degradiranim uzorcima međutim, ponekad je izdvajanje tih podataka vrlo teško. Sam problem potječe iz uzorka bez obzira je li glavni problem uspješnost izolacije DNA, prisustvo PCR inhibitora ili opseg oštećenja DNA koji nije određen u potpunosti te supotrebne tehnike koje omogućuju otkrivanje svih triju mogućnosti. Nadamo se da će istraživanja koja omogućuju određivanje vrste oštećenja u

degradiranim uzorcima i nove metodologije za njihovo nadvladavanje otkriti prethodno sakrivene informacije (14).

Tablica 3.Vrste oštećenja DNA (14).

IZVOR DNA	MOGUĆE OŠTEĆENJE	KOMENTARI
Drevna DNA	abazična mjesta, deaminiran citozin, oksidirane baze, fragmentacija, lomovi	deaminacija citozina zabilježena je kao najčešći problem sekvencioniranja drevne DNA
Okolišna DNA (eDNA)	fragmentacija, lomovi	fragmentacija i lomovi mogu uzrokovati povećanje formacije tijekom amplifikacije
IZVOR OŠTEĆENJA		
Izlaganje ionskoj radijaciji	abazična mjesta, oksidirane baze, fragmentacija, lomovi	ionska radijacija koristi se za sterilizaciju uzoraka
Izlaganje toplini	abazična mjesta, deaminiran citozin, oksidirane baze, fragmentacija, lomovi, lezije ciklopurina	zagrijana DNA ubrzava hidrolitičke i oksidacijske reakcije u vodenim medijima
Ekstrakcija fenol/kloroform	oksidirane baze	gvanin je najosjetljiviji od svih baza i formira 8-okso-gvanin 8-okso-G baza tvori par s adeninom čineći oštećenje potencijalno mutagenim
Izlaganje svjetlu (UV)	dimeritimina (pirimidinski dimeri ciklobutana), pirimidinski (4-6) foto produkti	UV-transformacija za vizualiziranje DNA uzrokuje stvaranje timinskih dimera
Mehaničko smicanje	fragmentacija, lomovi	mehaničko smicanje koristi se prije sekvencioniranja
Isušivanje	fragmentacija, lomovi, oksidirane baze	normalno rukovanje DNA kao što je pipetiranje ili miješanje može stvoriti lomove u DNA
Skladištenje u vodenom mediju	abazična mjesta, deaminiran citozin, oksidirane baze, fragmentacija, lomovi	dugo skladištenje u vodenoj otopini prilagođava DNA na oštećenja

Izlaganje formalinu	DNA-DNA umreženja, DNA-protein interakcije	otopina formaldehida koja nije ispravno puferirana postaje kisela, povećavajući stvaranje abazičnih mjesta
---------------------	---	--

3. MATERIJALI I METODE

3.1. UZORCI DIVLJIH I DOMAĆIH MAČAKA

Provedena je izolacija DNA iz ukupno 68 uzoraka: 20 uzoraka mišićnih tkiva divljih mačaka (*Felis silvestris* Schreber, 1777), 1 uzorka zuba divlje mačke, 38 uzoraka krvi domaćih mačaka (*Felis catus* Linnaeus, 1758), 5 uzoraka slina domaćih mačaka iz briseva usne šupljine i 4 uzorka dlaka domaćih mačaka. Uzorci su sakupljeni u različitim područjima Hrvatske. U Tablici 1 prikazano je gdje su sakupljeni uzorci divljih mačaka, a u Tablici 2 gdje su sakupljeni različiti uzorci domaćih mačaka te njihove oznake. Uzorci divljih mačaka uzeti su isključivo iz mačaka stradalih u prometu budući da ih je gotovo nemoguće uloviti zbog njihove male populacije i prebivališta u šumskim predjelima Hrvatske. Pronađene divlje mačke uzete su te pohranjene na -20 °C. Nakon uzimanja uzoraka tkiva, leševi mačaka zbrinuti su u veterinarski otpad, a uzorci stavljeni u 96%-tni etanol te pohranjeni na +4°C. Zub divlje mačke stajao je 2 mjeseca u otopini EDTA kako bi se omekšao, što omogućuje rezanje i usitnjavanje zuba te samu provedbu izolacije. Za razliku od njih, svi uzorci domaćih mačaka uzeti su iz živih mačaka. Brisevi usne šupljine, uzorci dlaka i uzorci krvi koji u epruvetama sadrže antikoagulans EDTA također su pohranjeni na +4°C.

Tablica 1. Popis uzoraka divljih mačaka s lokalitetom njihova pronalaska.

REDNI BROJ	DIVLJA MAČKA (WILD CAT = WC)	TKIVO	LOKALITET
1.	WC #2	skeletni mišić	nepoznato
2.	WC #3	skeletni mišić	Ogulin izlaz
3.	WC #5	skeletni mišić	Plitvice
4.	WC #4	skeletni mišić	Cugovec

5.	WC #6	skeletni mišić	nepoznato
6.	WC #7	skeletni mišić	Karlobag
7.	WC #8	skeletni mišić	Čvor Bosiljevo
8.	WC #9	skeletni mišić	Tunel Mala Kapela
9.	WC #10	skeletni mišić	nepoznato
10.	WC #12	skeletni mišić	Samobor
11.	WC #13	skeletni mišić	Dugo Selo
12.	WC #14	skeletni mišić	Pakrac, Kutina
13.	WC #15	skeletni mišić	Rača
14.	WC #16	skeletni mišić	Bjelovar
15.	WC #17	skeletni mišić	Daruvar, Sirač
16.	WC #18	skeletni mišić	Gudovac, V. Korenovo
17.	WC #19	skeletni mišić	Orovac
18.	WC #20	skeletni mišić	Cugovec
19.	WC #21	zub	Biokovo, Gornja Brela Škrabići
20.	WC #22	skeletni mišić	Gorski kotar, Stara sušica
21.	WC #23	skeletni mišić	nepoznato

Tablica 2. Popis uzoraka domaćih mačaka s lokalitetom njihova pronalaska.

REDNI BROJ	DOMAĆA MAČKA (DOMESTIC CAT = DC)	TKIVO	LOKALITET
1.	DC #1	krv	Samobor
2.	DC #2	krv	Samobor
3.	DC #3	krv	Samobor
4.	DC #4	krv	Samobor
5.	DC #5	krv	Samobor
6.	DC #6	krv	Samobor
7.	DC #7	krv	Samobor
8.	DC #8	krv	Samobor
9.	DC #9	slina	Nin
10.	DC #10	slina	Jasenovac
11.	DC #11	slina	Jasenovac
12.	DC #12	slina	Jasenovac

13.	DC #13	dlaka	Jasenovac
14.	DC #14	dlaka	Jasenovac
15.	DC #15	slina	Samobor
16.	DC #16	krv	Bjelovar
17.	DC #17	krv	Bjelovar
18.	DC #18	krv	Bjelovar
19.	DC #19	krv	Bjelovar
20.	DC #20	krv	Bjelovar
21.	DC #21	krv	Bjelovar
22.	DC #22	krv	Bjelovar
23.	DC #23	krv	Bjelovar
24.	DC #24	krv	Bjelovar
25.	DC #25	krv	Bjelovar
26.	DC #26	krv	Bjelovar
27.	DC #27	krv	Bjelovar
28.	DC #28	krv	Zagreb
29.	DC #29	krv	Zagreb
30.	DC #30	krv	Zagreb
31.	DC #31	krv	Zagreb
32.	DC #32	krv	Zagreb
33.	DC #33	krv	Zagreb
34.	DC #34	krv	Zagreb
35.	DC #35	krv	Zagreb
36.	DC #36	krv	Zagreb
37.	DC #37	krv	Zagreb
38.	DC #38	krv	Zagreb
39.	DC #39	krv	Zagreb
40.	DC #40	krv	Zagreb
41.	DC #41	krv	Zagreb
42.	DC #42	krv	Zagreb
43.	DC #43	krv	Zagreb
44.	DC #44	krv	Zagreb
45.	DC #45	krv	Zagreb
46.	DC #46	dlaka	Samobor
47.	DC #47	dlaka	Samobor

3.2. IZOLACIJA DNA

Na samom početku izolacije DNA trebalo je odlučiti hoće li se raditi s kompletom NucleoSpin®Tissue ili kompletom QIAamp® DNA Mini, odnosno vidjeti koji je bolji. DNA je iz uzorka WC #20 istovremeno izolirana s oba kompleta nakon čega je provedena gel elektroforeza kako bi bila provjerena uspješnost izolacije. Rezultati gel elektroforeze bili su iznenađujući jer su se 2 dobivene vrpce jako razlikovale prema intenzitetu. Budući da je intenzitet vrpce proporcionalan s koncentracijom izolirane DNA, utvrđeno je s kojim kompletom je dobiveno više DNA, a to je bilo s kompletom QIAamp® DNA Mini. Izolacija je izvršena prema protokolu proizvođača, koji se razlikuje za različite vrste tkiva odnosno uzoraka. Komplet QIAamp DNA Mini pruža brzo i jednostavno pročišćavanje ukupne DNA za kasniju provdbu PCR-a (12).

3.2.1. IZOLACIJA DNA IZ MIŠIĆNOG TKIVA DIVLJE MAČKE

1. Komadić tkiva približne mase 25 mg usitniti u sterilnoj Petrijevoj zdjelici te prenijeti u mikroeprevetu od 2 ml i dodati 180 µl ATL pufera.
2. Dodati 20 µl proteinaze K, vorteksirati i inkubirati 2 dana pri 56 °C. Tijekom inkubacije potrebno je povremeno izvaditi mikroeprevetu i vorteksirati je (3 do 4 puta) kako bi se uzorak jednoliko lizirao, odnosno kako na stijenci mikroeprevete ne bi zaostali komadići uzoraka koji pritom ne bi bili u doticaju s puferom ATL i proteinazom K te se tako ne bi mogli lizirati.
3. Kratko centrifugirati kako bi se uklonile kapljice zaostale u poklopcu mikroeprevete.
4. Dodati 200 µl AL pufera, vorteksirati 15 sekundi, inkubirati 10 minuta pri 70 °C i kratko centrifugirati.
5. Dodati 200 µl etanola (96%), vorteksirati 15 sekundi i kratko centrifugirati.
6. Prenijeti pripravljenu smjesu u QIAamp Mini kolonu pazeći da se membrana ne ošteti, zatvoriti poklopac, centrifugirati 1 minutu na 6000 rcf te kolonu prenijeti u novu sabirnu tubicu. Sabirna tubica koja sadrži filtrat se uklanja.
7. Dodati 500 µl AW1 pufera, centrifugirati 1 minutu na 6000 rcf, kolonu prenijeti u novu sabirnu tubicu, a sabirnu tubicu koja sadrži filtrat ukloniti.
8. Dodati 500 µl AW2 pufera, centrifugirati 3 minute na 20 000 rcf.
9. Kolonu prebaciti u čistu mikroeprevetu od 2 ml te ukloniti sabirnu tubicu koja sadrži filtrat.
10. Dodati 200 µl AE pufera, inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi, centrifugirati 1 minutu na 6000 rcf.
11. Ponoviti 10. postupak – dobije se 400 µl otopine genomske DNA.

3.2.2. IZOLACIJA DNA IZ KRVI DOMAĆE MAČKE

1. Dodati 20 µl proteinaze K u mikroeprevetu od 2 ml.
2. Dodati 200 µl krvi.
3. Dodati 200 µl AL pufera, vorteksirati 15 sekundi.
4. Inkubirati 20 minuta pri 56 °C, kratko centrifugirati kako bi se uklonile kapljice zaostale u poklopcu mikroeprevete.
5. Dodati 200 µl etanola (96%), vorteksirati 15 sekundi, kratko centrifugirati.
6. Prenijeti pripremljenu smjesu u QIAamp Mini kolonu pazeći da se membrana ne ošteti, zatvoriti poklopac, centrifugirati 1 minutu na 6000 rcf te kolonu prenijeti u novu sabirnu tubicu. Sabirna tubica koja sadrži filtrat se uklanja.
7. Dodati 500 µl AW1 pufera, centrifugirati 1 minutu na 6000 rcf, kolonu prenijeti u novu sabirnu tubicu, a sabirnu tubicu koja sadrži filtrat ukloniti.
8. Dodati 500 µl AW2 pufera, centrifugirati 3 minute na 20 000 rcf.
9. Kolonu prebaciti u čistu mikroeprevetu od 2 ml te ukloniti sabirnu tubicu koja sadrži filtrat.
10. Dodati 200 µl AE pufera, inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi, centrifugirati 1 minutu na 6000 rcf.
11. Ponoviti 10. postupak – dobije se 400 µl otopine genomske DNA.

3.2.3. IZOLACIJA DNA IZ SLINE (BRISA USNE ŠUPLJINE) DOMAĆE MAČKE

1. Odrezati pamučni dio brisa u mikroeprevetu. Dodati 400 µl PBS-a.
2. Dodati 20 µl proteinaze K i 400 µl AL pufera te odmah vorteksirati 15 sekundi.
3. Inkubirati 10 minuta pri 56 °C, kratko centrifugirati kako bi se uklonile kapljice zaostale u poklopcu mikroeprevete.
4. Dodati 400 µl etanola (96%), vorteksirati, kratko centrifugirati.
5. Prenijeti 700 µl pripremljene smjese iz 4. postupka u QIAamp Mini kolonu pazeći da se membrana ne ošteti, zatvoriti poklopac, centrifugirati 1 minutu na 6000 rcf te kolonu prenijeti u novu kolekcijsku tubicu. Sabirna tubica koja sadrži filtrat se uklanja.
6. Ponoviti 5. postupak dodajući 700 µl na preostalu smjesu iz 4. postupka, u QIAamp kolonu.
7. Dodati 500 µl AW1 pufera, centrifugirati 1 minutu na 6000 rcf, kolonu prenijeti u novu sabirnu tubicu, a sabirnu tubicu koja sadrži filtrat ukloniti.
8. Dodati 500 µl AW2 pufera, centrifugirati 3 minute na 20 000 rcf.
9. Kolonu prebaciti u čistu mikroeprevetu od 2 ml te ukloniti sabirnu tubicu koja sadrži filtrat.

10. Dodati 150 µl AE pufera, inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi, centrifugirati 1 minutu na 6000 rcf.

11. Ponoviti 10. postupak – dobije se 300 µl otopine genomske DNA.

3.2.4. IZOLACIJA DNA IZ DLAKA DOMAĆE MAČKE

3.2.4.1. KORIŠTENJE QIAGEN KOMPLETA

1. Dodati 300 µl ATL pufera, 20 µl proteinaze K i 20 µl 1M DTT u mikroepruvetu od 2 ml.

2. Odrezati komadiće dlaka duljine 0,5-1 cm počevši od korijena i prenijeti ih u mikroepruvetu od 2 ml. Zatvoriti poklopac i vorteksirati 10 s.

3. Inkubirati 2 h pri 56 °C, tijekom inkubacije vorteksirati smjesu kako bi se uzorak raspršio.

4. Vorteksirati 15 s. Dodati 300 µl AL pufera i vorteksirati. Dodati 300 µl etanola (96%) i ponovno vorteksirati.

5. Prenijeti pripremljenu smjesu u QIAamp Mini kolonu pazеći da se membrana ne ošteti, zatvoriti poklopac, centrifugirati 1 minutu na 8000 rcf te kolonu prenijeti u novu sabirnu tubicu. Sabirna tubica koja sadrži filtrat se uklanja.

6. Dodati 500 µl AW1 pufera, centrifugirati 1 minutu na 8000 rcf, kolonu prenijeti u novu sabirnu tubicu, a sabirnu tubicu koja sadrži filtrat ukloniti.

7. Dodati 500 µl AW2 pufera, centrifugirati 3 minute na 20 000 rcf.

8. Kolonu prebaciti u čistu mikroepruvetu od 2 ml te ukloniti sabirnu tubicu koja sadrži filtrat.

9. Dodati 200 µl AE pufera, inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi, centrifugirati 1 minutu na 6000 rcf.

10. Ponoviti 10. postupak – dobije se 400 µl otopine genomske DNA.

3.2.4.2. KORIŠTENJE ENZIMSKOG PRAŠKA ZA PRANJE ODJEĆE

1. Dodati 100 µl PCR pufera u mikroepruvetu od 2 ml.

2. Dodati 1 mg dlaka, prethodno nasjeckanih na komadiće od 2 mm.

1. Dodati 3 mg enzimskog praška za pranje odjeće.

3. Inkubirati 1,5 h pri 50 °C, tijekom inkubacije vorteksirati smjesu.

4. Inkubacija 10 minuta pri 95 °C (18).

3.3. GEL ELEKTROFOREZA

Nakon svake izolacije provedena je gel elektroforeza u agaroznom gelu kako bi se provjerilo je li DNA uspješno izolirana iz uzoraka. Gel elektroforeza je metoda razdvajanja fragmenata molekula DNA prema veličini, odnosno parovima baza pod utjecajem istosmjernog

električnog polja pri čemu se kraći DNA fragmenti kreću brže od dužih. DNA je negativno nabijena molekulate zbog toga putuje prema pozitivno nabijenoj elektrodi. Njeno putovanje kroz gelovisi o koncentraciji agaroze i o naponu pri kojem se odvija (19,20,21).

Pripravljen je 1%-tni agarozni gel tako što je odvagano 0.8 g (1.6 g) agaroze (Sigma-Aldrich) koja je zatim stavljena u 80 ml 1xTAE pufera te je smjesa ostavljena u mikrovalnoj pećnici dok se agarozna nije potpuno otopila. Kada se smjesa ohladila dodano je 8 μ l GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain boje koja se koristi umjesto etidij-bromida kao "safe alternative" budući je manje mutagena. Njezina uloga je da interkalira u DNA i omogućuje kasniju vizualizaciju fluorescentnih vrpca na UV-transiluminatoru (UVIpure, UVITEC Cambridge). Pripremljena smjesa izlivena je u kalup, stavljen je odgovarajući češljic te nakon što se gel stvrdnuo stavljen je molekularni biljeg i 10 μ l otopine DNA u svaku jažicu te provedena elektroforeza. Molekularni biljeg DirectLoad™ 50 bp DNA StepLadder (Sigma-Aldrich) korišten je za provjeru veličine dobivenih fragmenata. Elektroforeza se provodila 30 minuta pri naponu od 100 V.

3.4. ODREĐIVANJE ČISTOĆE I KONCENTRACIJE DNA

Apsorbancije su izmjerene spektrofotometrijski na uređaju NanoDrop 2000 (ThermoScientific Inc., SAD) te uključuju apsorbancije svih molekula u uzorku koje apsorbiraju pri valnoj duljini od 260 nm (nukleotidi, RNA, ssDNA, dsDNA). Pomoću apsorbancija izmjerena je čistoća i koncentracija DNA molekula izoliranih iz 18 uzoraka mišićnih tkiva divljih mačaka.

Kao procjena čistoće DNA i RNA molekula koristi se omjer apsorbancija pri 260 nm i 280 nm. "Čistom" DNA smatra se ona kojoj je omjer 260/280 od 1,7-1,9, a "čistom" RNA onom čiji je omjer \sim 2.0. Ako je u oba slučaja omjer znatno manji to može ukazati na prisutnost proteina, fenola ili drugih kontaminanata koji apsorbiraju pri ili u blizini 280 nm.

Adenin, gvanin, citozin, uracil i timin pokazuju vrlo različite vrijednosti omjera 260/280:

adenin: 4,50

gvanin: 1,15

citozin: 1,51

uracil: 4,00

timin: 1,47

Dobiveni omjer 260/280 za proučavanu nukleinsku kiselinu približno je jednak prosjeku omjera 260/280 svih prisutnih nukleotida. U praksi su prihvaćeni omjeri od \sim 1,8 za DNA i \sim 2,0 za RNA, ali stvarni omjer zapravo ovisi o sastavu nukleinske kiseline. RNA će uglavnom imati veći omjer 260/280 od DNA zbog veće vrijednosti omjera uracila u usporedbi s omjerom timina.

Kao sekundarna mjera čistoće nukleinskih kiselina koristi se omjer 260/230. Vrijednosti omjera 260/230 za "čistu" nukleinsku kiselinu često su veće od odgovarajućih 260/280 vrijednosti te su u rasponu od 2,0-2,2. Omjer znatno manji od očekivanog ukazuje na moguće kontaminanate koji apsorbiraju pri 230 nm (22).

Koncentracije su izmjerene mjerenjem apsorbancije pri 260 nm. Prema kompletu QIAamp® DNA Mini, iz 25 mg uzetog tkiva koncentracija DNA trebala bi iznositi 25-75 ng/μl.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Nakon izolacije DNA te provedene gel elektroforeza, očekuju se lijepe, uske, fluorescentne vrpce međutim, to nije bio svaki put slučaj. Ponekad uopće nije dobivena vrpca, a ponekad je izgledala kao razmaz. Kada vrpca nije dobivena, znači nije izolirana DNA, a kada vrpca izgleda kao razmaz radi se o degradiranoj DNA.

Iz samo jednog od 20 uzoraka mišića divlje mačke DNA nije uspješno izolirana. Uspješnost izolacije iz mišića je 95,24% međutim, jedna (WC #9) od 19 DNA izoliranih iz mišića je degradirana (5,26%). Kada iz uzorka WC #10 nije dobivena vrpca, izolacija je ponovljena kako bi se utvrdilo je li došlo do pogreške u samom postupku međutim, vrpca nije niti drugi put dobivena (Slika 2.). Iz nedobivene vrpce ne može se zaključivati je li problem u samom uzorku ili je izolirana minimalna koncentracija DNA koju je nemoguće vidjeti gel elektroforezom. Mjerenjem koncentracija DNA izoliranih iz uzoraka mišićnih tkiva divljih mačaka dokazano je da iz uzorka WC #10 nije izolirana niti minimalna koncentracija DNA te da je problem u samom uzorku (Tablica 4.). Za kasniju provedbu PCR-a sve vrijednosti koncentracija su zadovoljavajuće osim koncentracije DNA iz uzorka WC #20 koja je izolirana kompletom NucleoSpin®Tissue (WC #20N). DNA izolirana MACHEREY-NAGEL kompletom ionako je nebitna jer je poslužila samo kako bi se usporedila uspješnost izolacija dvaju različitih kompleta.

Na temelju vrijednosti omjera 260/280 i 260/230 može se vidjeti kolika je čistoća DNA izoliranih iz mišićnih tkiva divljih mačaka. Iz većih vrijednosti omjera 260/280 za uzorke WC#1, WC#7, WC#8, WC#12, WC#14, WC#15, WC#16, WC#18, WC#19, WC#20N i WC#23 moguće je zaključiti da su uzorci kontaminirani RNA molekulama. Kod izolacije DNA nije korištena RNAaza kako bi se uklonile RNA molekule jer za kasnije provođenje PCR-a i sekvencioniranja nije potrebna RNA-slobodna (RNA-free) genomska DNA (Tablica 4.).

Mnoge vrijednosti omjera 260/230 izrazito su male što ukazuje na prisutnost kontaminacije. DNA izolirana iz uzoraka WC#2, WC#3, WC#4, WC#6, WC#20N i WC#20Q najviše je "nečista" odnosno kontaminirana (Tablica 4.).

Tablica 4. Omjer 260/280, 260/230 i koncentracije DNA molekula izoliranih iz mišićnih tkiva divljih mačaka.

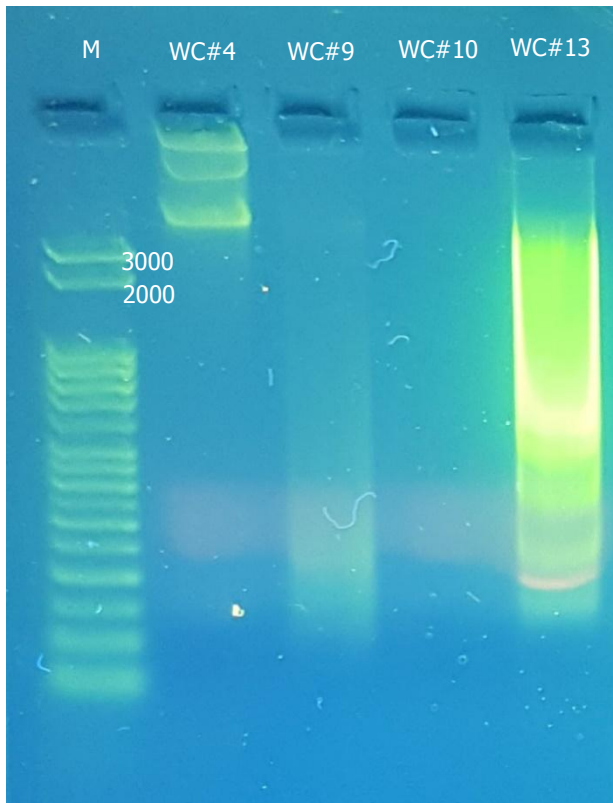
REDNI BROJ	UZORAK	260/280	260/230	Koncentracija DNA (ng/μl)
1.	WC #1	2,08	2,09	20
2.	WC #2	1,31	0,18	18,7
3.	WC #3	1,43	0,29	20,5
4.	WC #4	1,49	0,25	21,8
5.	WC #6	1,71	0,53	51,8
6.	WC #7	1,99	2,53	43,4
7.	WC #8	2,14	4,22	16
8.	WC #10	/	/	/
9.	WC #12	1,97	2,41	34,8
10.	WC #13	1,9	2,13	72,6
11.	WC #14	2,11	2,52	15,8
12.	WC #15	2,1	1,74	20,7
13.	WC #16	1,98	1,27	11,5
14.	WC #18	2,07	1,64	15,8
15.	WC #19	1,97	2,22	19,8
16.	WC #20N	2,13	-0,06	0,9
17.	WC #20 Q	1,84	0,43	13,9
18.	WC #23	2,15	2,38	14,6

Iz uzorka zuba divlje mačke (WC #21) DNA nije uspješno izolirana niti QIAGEN niti MACHEREY-

NAGEL kompletom. Zub je potrebno prethodno omekšati kako bi se mogao nasjeckati na komadiće, zatim je potrebno izdvojiti pulpu te provesti izolaciju DNA. Smatrano je da zub treba stajati 2 mjeseca u otopini EDTA kako bi se omekšao. Rezultati gel elektroforeze bili su iznenađujući budući da su bile očekivane vidljive vrpce s obzirom na veliku količinu pulpe. Nije ustanovljeno je li problem u postupku pripreme zuba, u samom uzorku ili u premaloj količini izolirane DNA zbog koje nije dobivena vidljiva vrpca.

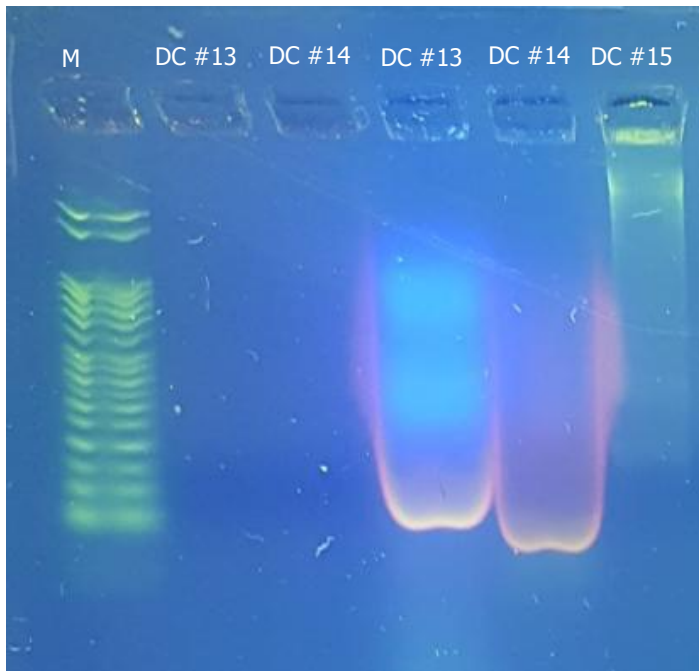
Iz uzoraka dlake DC #13, DC #46, DC#47 provedena je izolacija DNA korištenjem kompleta QIAamp DNA Mini, a iz uzorka DC #14 korištenjem enzimskog praška za pranje odjeće, no nažalost niti jednim protokolom nije uspješno izolirana DNA. Smatrano je da nije problem u protokolima nego u količini korijena dlaka kojih je bilo premalo (Slika 3.).

Najuspješnije izolacije su iz sline (Slika 3.) i krvi (Slika 4.) s uspjehom od 100 %, odnosno iz svih uzoraka sline i krvi izolirana je DNA. Izolacijom iz sline dobiven je veći postotak degradiranih DNA te manja koncentraciji izolirane DNA nego one iz krvi. Kod krvi niti jedna DNA nije degradirana (0 %), a kod sline je jedna od njih 5 (20%). Što se tiče koncentracije DNA, vidljivo je iz intenziteta vrpce (intenzitet je proporcionalan koncentraciji) da je puno veća koncentracija DNA izolirane iz krvi nego iz sline domaće mačke.

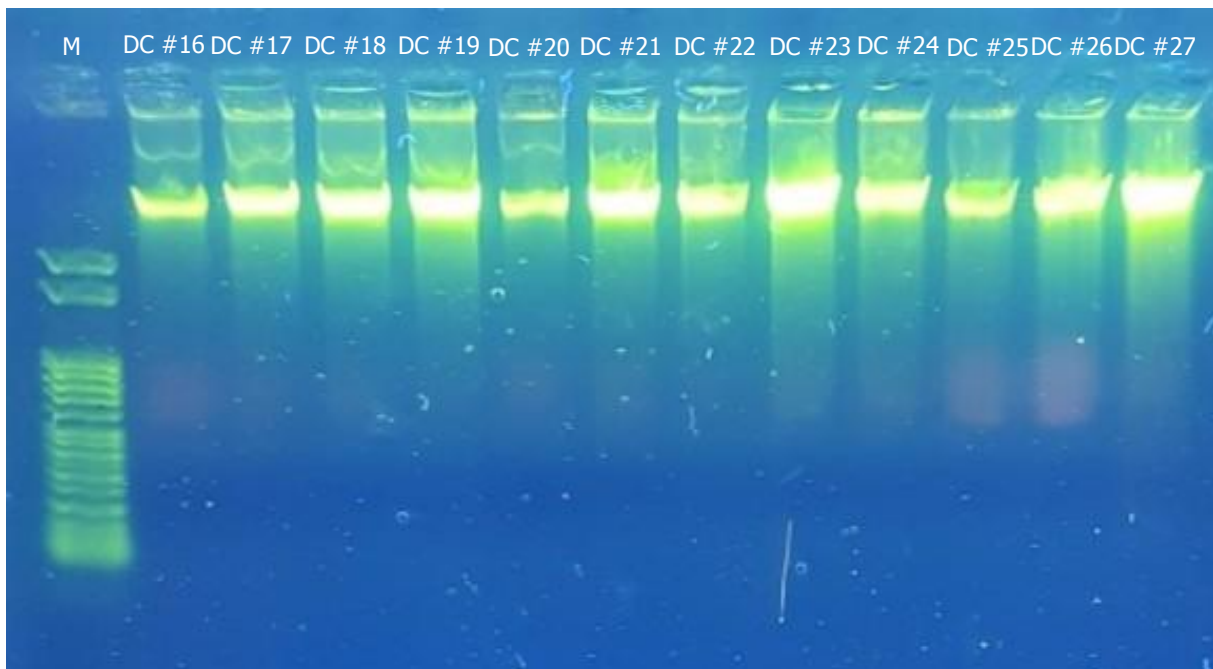


M – molekularni biljeg

Slika 2. Genomska DNA iz mišićnih tkiva divljih mačaka (WC #4, WC #9, WC#10 i WC#13). 1%-tni agarozni gel nakon gel elektroforeze.



Slika 3. Genomska DNA iz dlaka (DC #13, DC #14) i sline (DC #15) domaćih mačaka. 1%-tni agarozni gel nakon gel elektroforeze.



Slika 4. Genomska DNA iz krvi domaćih mačaka (DC #16, DC #17, DC #18, DC #19, DC #20, DC #21, DC #22, DC #23, DC #24, DC #25, DC #26, DC #27). 1%-tni agarozni gel nakon gel elektroforeze.

5. ZAKLJUČAK

Izolacija DNA provedena je iz uzoraka mišića, krvi, sline i dlake.

Najuspješnije izolacije dobivene su iz krvi i sline s uspjehom od 100 %, odnosno iz svih uzoraka izolirana je DNA. Razlika je u tome što je obrađeno puno više uzoraka krvi nego sline, puno je veća koncentracija DNA izolirane iz krvi te niti jedna DNA nije degradirana, dok je kod sline 20% od ukupno izoliranih DNA degradirano.

Samo iz jednog od 20 uzoraka mišića nije uspješno izolirana DNA te je uspješnost izolacije DNA iz mišića 95,24 %.

Najmanje uspješna izolacija dobivena je iz dlake s uspjehom od 0 %.

U nastavku istraživanja provest će se izolacija iz 20-tak uzoraka krvi domaćih mačaka.

6. ZAHVALE

Zahvaljujem se svim prijateljima i kolegama koji su sudjelovali u prikupljanju uzoraka, veterinarskim ambulancama Samobor i Špansko, Veterinarskom fakultetu u Zagrebu, a posebno se zahvaljujem mentoru profesoru Renu Hrašćanu, profesorici Lidiji Šver i docentici Ani Bielen na njihovoj brižnosti, trudu, vremenu, strpljenju i znanju kojime su mi omogućili provedbu ovog završnog rada.

7. POPIS LITERATURE

1. DIVLJA MAČKA - STROGO ZAŠTIĆENA SVOJTA NA CIJELOM TERITORIJU RH, <<http://www.lovac.info/lov-divljac-hrvatska/zivotinje-priroda/3053-divlja-macka-strogo-zasticena-svojta-na-cijelom-teritoriju-rh.html>>. Pristupljeno 26. svibnja 2017.
2. Prvo telometrijsko istraživanje divlje mačke (*Felis silvestris*) u Hrvatskoj, <<http://vrbovec.org/vrbovec/hrvatska/prvo-telemetrijsko-istrazivanje-divlje-mackefelis-silvestris-u-hrvatskoj>>. Pristupljeno 26. svibnja 2017.
3. Say, L., Devillard, S., Leger, F., Pontier, D., Ruetten, S. (2012) Distribution and spatial genetic structure of European wildcat in France. *Animal Conservation* **15**: 18-27.
4. Randi, E., Pierpaoli, M., Beaumont, M., Ragni, B., Sforzi, A. (2001) Genetic Identification of Wild and Domestic Cats (*Felis silvestris*) and Their Hybrids Using Bayesian Clustering Methods. *Molecular Biology Evolution* **18**: 1679-1693.
5. Berg, J.M., Stryer, L., Tymoczko, J.L. (2013) Biokemija, 1. izd. (hrvatsko), Školska knjiga str. 107-112.
6. Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2010) Stanica – Molekularni pristup, 5. izd., Medicinska naklada str. 108-109.
7. DNA Extraction and Purification, <<https://www.labome.com/method/DNA-Extraction-and-Purification.html>>. Pristupljeno 30. svibnja 2017.
8. QIAamp DNA Mini Kit, <<https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiaamp-dna-mini-kit/?autoSuggest=true#productdetails>>. Pristupljeno 30. svibnja 2017.
9. Lysis Buffer for Nucleic Acids, <<http://www.bio-rad.com/featured/en/lysis-buffer.html>>. Pristupljeno 2. lipnja 2017.

10. DNA extraction,
<<https://www.sciencelearn.org.nz/resources/2036-dna-extraction>>. Pristupljeno 9. lipnja 2017.
11. ResearchGate,
<[https://www.researchgate.net/post/How do AW1 wash buffer 1 and AW2wash buffer 2 componentes allow DNA remains bound to the silica columns in DNA isolation with Qiagen KIT](https://www.researchgate.net/post/How_do_AW1_wash_buffer_1_and_AW2wash_buffer_2_components_allow_DNA_remains_bound_to_the_silica_columns_in_DNA_isolation_with_Qiagen_KIT)>. Pristupljeno 2. lipnja 2017.
12. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook.
13. Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**: 709–715.
14. DNA Damage - the major cause of missing pieces from the DNA puzzle,
<<https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/dna-damage-the-major-cause-of-missing-pieces-from-the-dna-puzzle>>. Pristupljeno 6. lipnja 2017.
15. Nakamura, J., Walker, V.E., Upton, P.B., Chiang S., Kow Y.W., Swenberg, J.A. (1998) Highly Sensitive Apurinic/Apyrimidinic Site Assay Can Detect Spontaneous and Chemically Induced Depurination under Physiological Conditions. *Cancer Research* **58**: 222-225.
16. Greagg, M.A., Fogg, M.J., Panayotou, G., Evans, S.J., Connolly, B.A., Pearl, L.H. (1999) A read-ahead function in archaeal DNA polymerases detects promutagenic template-strand uracil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 9045-9050.
17. Bruner, S.D., Norman, D.P.G., Verdine, G.L. (2000) Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* **403**: 859-866.
18. Guan, Z., Zhou, Y., Liu, J., Jiang, X., Li, S., Yang, S., Chen, A. (2013) A Simple Method to Extract DNA from Hair Shafts Using Enzymatic Laundry Powder. *Plos ONE* **8**: e69588.

19. Li, J., Yang, Y., Mao, Z., Huang, W., Qiu, T., Wu, Q. (2016) Enhanced Resolution of DNA Separation Using Agarose Gel Electrophoresis Doped with Graphene Oxide. *Nanoscale Research Letters* **11**: 404.
20. Boffey, S.A. (1984) Agarose Gel Electrophoresis of DNA. U: Methods in molecular biology - Nucleic acids, 2. izd., Walker, J.M., ur., Human Press, Inc. str.43-50.
21. Boots, S. (1989)Gel electrophoresis of DNA.*Analytical Chemistry* **61**: 551A-553A.
22. 260/280 and 260/230 Ratios,
<<http://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf>>. Pristupljeno 4. lipnja 2017.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Petra Šindić

Ime i prezime studenta