

Optimizacija lančane reakcije polimerazom za umnažanje mikrosatelitnih biljega divlje mačke *Felis silvestris* Schreber, 1777

Jaša-Šangulin, Lucija

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:159:816388>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Lucija Jaša-Šangulin

6982/BT

**OPTIMIZACIJA LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM ZA
UMNAŽANJE MIKROSATELITNIH BILJEGA DIVLJE
MAČKE *Felis silvestris* Schreber, 1777**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog projekta: Genotipizacijska procjena genetske raznolikosti populacije divlje mačke (*Felis silvestris silvestris*) u Hrvatskoj (voditeljica: Izv. prof. Lidija Šver)

Mentor: Doc.dr.sc. Ana Bielen

Zagreb, 2017.

TEMELJNA 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

OPTIMIZACIJA LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM ZA UMNAŽANJE MIKROSATELITNIH BILJEGA DIVLJE MAČKE *Felis silvestris* Schreber, 1777

Lucija Jaša-Šangulin, 6982/BT

Sažetak: Genomska čistoća populacije divlje mačke u mnogim je europskim zemljama ugrožena zbog učestale hibridizacije s domaćom mačkom. S ciljem utvrđivanja stanja populacije u Hrvatskoj potrebno je provesti genotipizaciju divljih i domaćih mačaka pomoću umnažanjem mikrosatelitnih biljega lančanom reakcijom polimerazom. U ovom je radu provedena optimizacija lančane reakcije polimerazom za umnažanje 12 odabranih mikrosatelitnih biljega divlje mačke. Utvrđena je optimalna količina DNA kalupa od 10 ng i koncentracija oligonukleotidnih početnica od 0.2 μ M. Optimizirani su i uvjeti provođenja reakcije; temperatura vezanja početnica od 57°C i vremena vezanja početnica i produljenja lanaca od 90 sekundi. Konačno, opisani optimalni uvjeti prilagođeni su provedbi multipleks PCR-a radi uštede vremena i resursa. Rezultati ovog rada će u nastavku istraživanja poslužiti za umnažanje mikrosatelitnih biljega većeg broja divljih i domaćih mačaka s ciljem određivanja stupnja hibridizacije s domaćim mačkama u Republici Hrvatskoj.

Ključne riječi: *Felis silvestris* Schreber 1777, mikrosatelitni biljezi, optimizacija PCR reakcije

Rad sadrži: 33 stranice, 14 slika, 8 tablica, 42 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Ana Bielen

Datum obrane: 17. srpnja, 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

OPTIMIZATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION FOR AMPLIFICATION OF MICROSATELLITE MARKERS OF WILDCAT *Felis silvestris* Schreber, 1777

Lucija Jaša-Šangulin, 6982/BT

Abstract: Genomic purity of European wildcat population is compromised by frequent hybridisation with domestic cats. Since the state Croatian wildcat population is unknown, it is necessary to carry out genotyping, i.e. amplify the microsatellite markers by polymerase chain reaction. In this work, optimization of PCR for amplification of 12 selected wildcat microsatellite markers was performed. An optimal amount of 10 ng DNA template and 0.2 μ M of oligonucleotide primers was determined. Thermal cycling conditions were also optimized; optimal annealing temperature was 57°C and annealing and elongation time of 90 seconds. Finally, reaction conditions were further adjusted to perform multiplex PCR in order to save time and resources. Results of this work will be the basis of future amplification of microsatellite markers of wild and domestic cats in order to determine genomic purity of wildcat population in Croatia.

Keywords: *Felis silvestris* Schreber 1777, microsatellite markers, optimization, PCR

Thesis contains: 33 pages, 14 figures, 8 tables, 42 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: dr. sc. Ana Bielen, assistant professor

Defence date: 17th July, 2017

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio.....	2
2.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	2
2.2. Mikrosatelitni biljezi	4
2.2.1. Mikrosatelitni biljezi divlje mačke <i>Felis silvestris</i> Schreber, 1777	4
3. Materijali i metode.....	6
3.1. DNA kalup - genomska DNA divlje mačke	6
3.2. Oligonukleotidne početnice	7
3.3. Umnožavanje odabranih mikrosatelitnih biljega divlje mačke lančanom reakcijom polimerazom.....	8
3.4. Detekcija mikrosatelitnih biljega elektroforezom DNA u agaroznom gelu	10
3.5. Detekcija mikrosatelitnih biljega kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru	10
4. Rezultati.....	12
4.1. Optimizacija PCR reakcije za pojedinačne parove početnica.....	12
4.1.1. Utjecaj vremena trajanja vezanja početnica na kalup i vremena produljivanja lanaca na učinkovitost PCR reakcije.....	12
4.1.2. Utjecaj različitih koncentracija oligonukleotidnih početnica na učinkovitost PCR reakcije	13
4.1.3. Utjecaj različitih koncentracija DNA kalupa na učinkovitost PCR reakcije	14
4.1.4. Utjecaj višestrukog odmrzavanja i smrzavanja oligonukleotidnih početnica na učinkovitost PCR reakcije.....	15
4.1.5. Utjecaj različitih temperatura pri kojima se početnice vežu na kalup na učinkovitost PCR reakcije	16
4.1.6. Optimalni uvjeti PCR reakcije za pojedinačne parove početnica	18
4.2. Optimizacija PCR reakcija s više parova početnica istovremeno (eng. Multiplex PCR)	19
4.2.1. Optimizacija multipleks PCR reakcije za skupine početnica MIX 1 i MIX 2	19
4.2.2. Optimizacija multipleks PCR reakcije za skupinu početnica MIX 3.....	22
5. Rasprava	24
6. Zaključak.....	28
7. Popis literature.....	29

1. Uvod

Iako je divlja mačka (*Felis silvestris* Schreber, 1777) najrasprostranjenija vrsta unutar porodice mačaka (Yamaguchi i sur., 2015), smatra se kako učestala hibridizacija s domaćom mačkom (*Felis silvestris catus*) predstavlja prijetnju genomske čistoci populacije divlje mačke (Oliveira i sur., 2015). Ovo je već pokazano za populacije u Italiji (Randi i sur., 2001), Škotskoj (Beaumont i sur., 2001) i Mađarskoj (Pierpaoli i sur., 2003), dok je u Hrvatskoj situacija nepoznata. Obzirom da su divlje mačke i hibridi divljih i domaćih mačaka izgledom jako slični (**Slika 1.**), stanje populacije čistokrvnih divljih mačaka teško je odrediti morfološkom diferencijacijom. Stoga, kako bi se utvrdio mogući protok gena između populacija divljih i domaćih mačaka te odredila genetska čistoća populacije divljih mačaka primjenjuje se genotipizacija pomoću mikrosatelitnih biljega.

Jedan od koraka genotipizacije uključuje lančanu reakciju polimerazom. Lančana reakcija polimerazom (PCR od eng. *polymerase chain reaction*) je često korištena metoda u molekularnoj biologiji. Omogućava brzo i specifično umnažanje točno određenog fragmenta DNA molekule u strogo kontroliranim uvjetima. Pritom nastane velik broj kopija željenog fragmenta koji se onda može koristiti za daljnju analizu. Kako bi se omogućilo umnažanje točno određenog, željenog dijela DNA potrebno je eksperimentalno odrediti optimalne uvjete reakcije (Katušić Hećimović, 2007).

Cilj ovog rada je optimizacija lančane reakcije polimerazom za umnažanje mikrosatelitnih biljega divlje mačke, a kako bi se smanjili troškovi i vrijeme utrošeno u provođenje pokusa težilo se umnažanju više mikrosatelitnih biljega istovremeno. U svrhu optimizacije uvjeta reakcije varirana je koncentracija kalupa DNA te koncentracija početnica, a osim toga ispitan je i utjecaj različitih temperatura i vremena pri kojima se početnice vežu na kalup te vremena trajanja produljivanja lanaca. Također, istražen je i utjecaj višestrukog odmrzavanja i smrzavanja početnica na uspješnost reakcije.

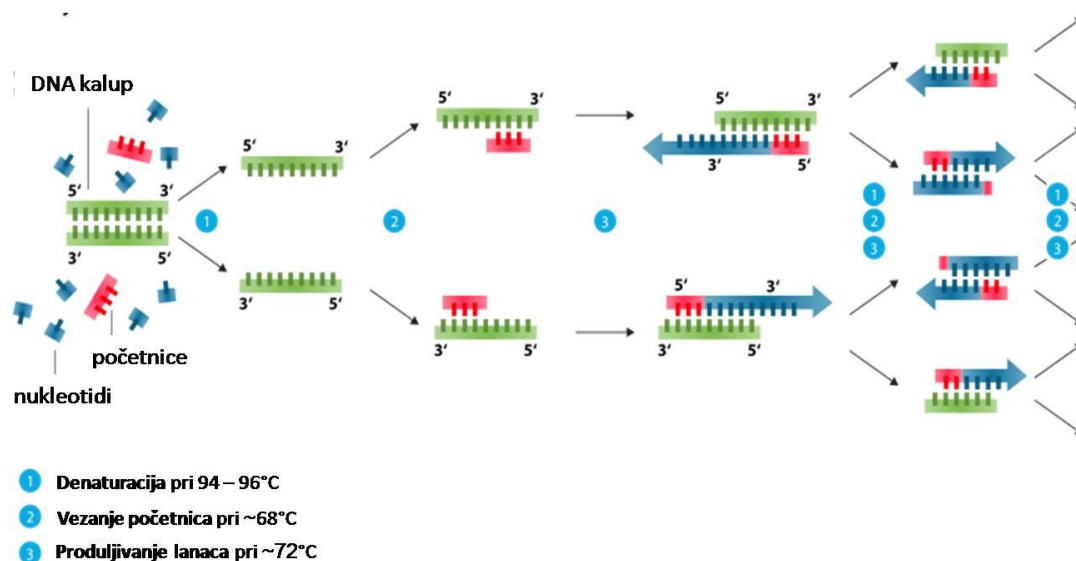


Slika 1. Izgled krzna kod divlje mačke *Felis silvestris silvestris* (lijevo) i domaće mačke *Felis silvestris catus* (desno). Izvor: Falsone i sur., 2013.

2. Teorijski dio

2.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

PCR (**Slika 2.**) je metoda *in vitro* umnažanja točno određenog dijela DNA molekule pomoću enzima DNA polimeraze. Osnovu metode čine tri koraka: denaturacija DNA kalupa, vezanje početnica na kalup i produljivanje lanaca DNA. Denaturacija podrazumijeva odvajanje lanaca dvostruke uzvojnice pri temperaturi od 94 do 98°C pri čemu se dobiju dva jednostruka lanca koji onda služe kao kalup na koje se vežu oligonukleotidne početnice (pri nižoj temperaturi, obično između 51 i 68°C). Nakon toga, zahvaljujući djelovanju termostabilne DNA polimeraze, slijedi produljivanje lanaca pri 72°C te se sintetiziraju nove dvolančane molekule DNA. Time je završen jedan ciklus PCR reakcije. Kontinuiranim ponavljanjem ciklusa količina novonastalih DNA eksponencijalno raste i u konačnici se dobije 2^n molekula DNA, pri čemu "n" označava broj ciklusa u reakciji (Katušić Hećimović, 2007).



Slika 2. Princip lančane reakcije polimerazom (<http://www.microbiologyinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-procedure-types-applications-and-animation/>), (25.06.2017.)

Razvoj PCR-a kao metode započeo je 1983. godine. Slijedeće dvije godine skupina znanstvenika iz Cetus Corporation, skupa sa začetnikom ideje Kary Mullis-om, radila je na njegovom usavršavanju, a 1985. metoda je predstavljena na godišnjem susretu Američkog društva za humanu genetiku (*The American Society for Human Genetics*) (Roche Molecular Systems Inc., 2016). Kasnije te godine objavljen je i prvi znanstveni rad u kojem je korišten

PCR (Saiki i sur., 1985). Kary Mullis je 1993. godine za izum PCR-a dobio Nobelovu nagradu za kemiju (Nobelprize.org, 2014).

1986. godine uspješno je izolirana *Taq* polimeraza iz bakterije *Thermus aquaticus*. Za razliku od DNA polimeraze prvotno korištene u PCR reakciji, a koja je bila izolirana iz bakterije *Escherichia coli*, *Taq* polimeraza je bila stabilna pri visokim temperaturama te nije dolazilo do njene inaktivacije tijekom reakcije. Zahvaljujući ovom otkriću provedba PCR-a se uvelike pojednostavila. Dodatno pojednostavljenje metode nastupilo je 1987. godine kada je proizveden prvi uređaj za PCR tzv. *Thermocycler* programiran da mijenja temperaturu reakcije, odnosno da zagrijava ili hladi reakcijsku smjesu prema zadanim uvjetima (Roche Molecular Systems Inc.,2016).

Od početka korištenja metode do danas PCR je našao primjenu u brojnim znanstvenim poljima. Tako se primjerice često koristi prilikom dijagnosticiranja različitih bolesti, ali i za detekciju patogena u tjelesnim tekućinama, hrani ili vodi. Ova je metoda iznimno korisna i u forenzici obzirom da se iz male količine DNA, koja je primjerice sadržana u kapljici krvi, može dobiti dovoljna količina DNA za daljnje analize. Nadalje, PCR se u mikrobiologiji i molekularnoj biologiji, između ostalog, koristi za sekvencioniranje DNA, pripremu rekombinantne DNA i kloniranje gena, a koristi se i prilikom genotipizacije (Joshi i Deshpande, 2011).

PCR je izrazito specifična metoda jer omogućava umnažanje točno određenog odsječka DNA molekule. Jasno je kako onda ne postoji jedinstveni protokol za umnažanje svih mogućih DNA fragmenata. Zbog toga je PCR reakciju potrebno optimizirati kako bi se odredili parametri pogodni za umnažanje željenog fragmenta. Jedan od ključnih koraka u postavljanju PCR reakcije je odabir odgovarajućeg para početnica od kojih je jedna komplementarna 3' kraju jednog, a druga 3' kraju drugog lanca DNA kalupa te na taj način one omeđuju dio DNA kojeg se želi umnožiti (Katušić Hećimović, 2007). Problemi koji se mogu javiti prilikom provođenja PCR reakcije uključuju: pojavu nespecifičnih produkata, pojavu male količine produkta ili potpuni izostanak rezultata. Mogući uzrok pojave nespecifičnih produkata je previsoka koncentracija početnica u reakcijskoj smjesi ili prisutnost kontaminanata. Osim toga, nepravilno podešeni uvjeti umnažanja, poput preniske temperature vezanja početnica na kalup ili preduga vremena vezanja početnica i produljivanja lanaca, također mogu rezultirati pojavom nespecifičnih produkata. S druge strane, loša kvaliteta DNA kalupa te previsoka, odnosno preniska koncentracija pojedinih komponenata reakcijske smjese te nepravilno podešeni uvjeti umnažanja (prekratka

vremena vezanja početnica te produljenja lanaca, previsoka temperatura vezanja početnica, preduga ili pak prekratka denaturacija kalupa te preniska temperatura denaturacije kalupa) mogu uzrokovati pojavu male količine produkta ili potpuni izostanak amplifikacije (Bio-Rad Laboratories, Inc., n.d.). Kako bi se navedeni problemi razriješili potrebno je optimizirati reakciju, odnosno odrediti optimalne koncentracije pojedinih sastojaka reakcijske smjese (DNA kalup, početnice, polimeraza, pufer sa Mg^{2+} ionima te nukleotidi) te postaviti optimalne uvjete provođenja reakcije (npr. temperatura vezanja početnica, vrijeme vezanja početnica i vrijeme produljivanja lanaca, vrijeme i temperatura denaturacije kalupa).

2.2. Mikrosatelitni biljezi

Mikrosatelitni biljezi su kratke nukleotidne sekvence koje se uzastopno ponavljaju određeni broj puta (obično između 15 i 30 puta) (Koreth i sur., 1996). Sekvence su veličine 2 – 6 bp, a njihov raspored u genomu je nasumičan (Harcet i sur., 2007). Zahvaljujući svojstvu da se lako umnažaju pomoću PCR reakcije te činjenici da im je veličinu moguće precizno odrediti pomoću automatskih sekvencera, danas se mikrosatelitni biljezi sve češće koriste u populacijskoj genetici za utvrđivanje razine srodnosti populacija te za praćenje protoka gena među populacijama. Osim toga primjenjuju se i u forenzičkim analizama te medicinskoj dijagnostici. Postupak određivanja veličine mikrosatelitnih biljega provodi se u nekoliko koraka. Prvi korak predstavlja provođenje lančane reakcije polimerazom radi umnažanja željenih mikrosatelitnih biljega. U praksi se često primjenjuje tzv. *multiplex* PCR, odnosno istovremeno se umnaža više mikrosatelitnih biljega u istoj reakcijskoj smjesi, kako bi se smanjio broj potrebnih PCR reakcija u svrhu ubrzanja čitavog procesa. Pritom je jednu od početnica potrebno označiti fluorescentnom bojom kako bi se kasnije omogućila detekcija umnoženih fragmenata na automatskom sekvenceru. Slijedeći korak uključuje provedbu kapilarne elektroforeze kako bi se precizno odredila veličina umnoženih mikrosatelitnih biljega (Harcet i sur., 2007; Kocijan, 2007). Na temelju dobivenih rezultata izvode se zaključci ovisno o tome u koju svrhu se provodi genotipizacija.

2.2.1. Mikrosatelitni biljezi divlje mačke *Felis silvestris* Schreber, 1777

Genomska čistoća populacije divlje mačke ugrožena je zbog sve češće hibridizacije s domaćom mačkom. Glavni problem koji se javlja kao posljedica hibridizacije je "prijelaz

gena" između vrsta što može rezultirati izumiranjem čiste populacije divljih mačaka (Oliveira i sur., 2015). Kako bi se utvrdilo postoji li ovaj trend, u brojnim je europskim zemljama poput Škotske (Beaumont i sur., 2001), Italije (Randi i sur., 2001) i Mađarske (Pierpaoli i sur., 2003) provedeno istraživanje genomske čistoće populacija. Pritom je umnoženo 12 (Randi i sur., 2001; Pierpaoli i sur., 2003), odnosno 9 (Beaumont i sur., 2001) mikrosatelitnih biljega pomoću lančane reakcije polimerazom. Veličina mikrosatelitnih biljega za svaku je jedinku jedinstvena. Na temelju razlike, odnosno sličnosti u veličini pojedinih biljega moguće je zaključiti o srodnosti pojedinih jedinki. Što su veličine određenih mikrosatelita sličnije to znači i da su jedinke međusobno srodnije (Oliveira i sur., 2006). Nakon statističke obrade dobivenih podataka utvrđeno je stanje populacije divljih mačaka u pojedinim dijelovima Europe. Rezultati istraživanja pokazuju kako je na određenim područjima Škotske, Mađarske i Italije hibridizacija divljih i domaćih mačaka prisutna te se predlažu daljnja istraživanja sa većim brojem uzoraka (Randi i sur., 2001) te istraživanje većeg broja mikrosatelitnih biljega (Randi i sur., 2001; Pierpaoli i sur., 2003).

3. Materijali i metode

3.1. DNA kalup - genomska DNA divlje mačke

Uzorci genomske DNA divlje mačke korišteni kao kalup za lančanu reakciju polimerazom navedeni su u **Tablici 1**. DNA je iz skeletnog mišića izolirana uz pomoć kompleta QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN).

Tablica 1. Uzorci DNA

Oznaka jedinke	Lokalitet sakupljanja	Koncentracija DNA (ng/ μ L)	Omjer apsorbancija	
			260/280	260/230
WC#1	S. Požega	20	2,08	2,09
WC#3	Ogulin izlaz	20,5	1,43	0,29
WC#15	Rača	20,2	2,10	1,74
WC#18	Gudovac, V. Korenovo	19,8	2,07	1,64

Koncentracija i čistoća izolirane DNA određena je spektrofotometrijski na uređaju Nanodrop 2000 (Thermo Scientific Inc., SAD) mjerenjem apsorbancija pri 230 nm, 260 nm i 280 nm. Iz apsorbancije izmjerene pri 260 nm određuje se koncentracija DNA obzirom da pri toj valnoj duljini nukleinske kiseline apsorbiraju zračenje. O čistoći uzorka moguće je zaključiti iz vrijednosti omjera apsorbancija pri 260 i 280 nm, odnosno iz vrijednosti omjera apsorbancija pri 260 i 230 nm. „Čistim“ uzorkom DNA smatra se onaj kojemu je omjer 260/280 približno jednak 1,8. Vrijednosti znatno niže od 1,8 upućuju na prisutnost proteina, fenola ili drugih kontaminanata u uzorku koji apsorbiraju pri 280 nm. S druge strane vrijednosti više od 1,8 upućuju na prisutnost RNA. Nadalje, vrijednost omjera 260/230 manja od očekivane ukazuje na moguće kontaminante koji apsorbiraju pri valnim duljinama od 230 nm ili nižim. Očekivane vrijednosti ovog omjera kreću se u rasponu 2,0 - 2,2 i obično su više od vrijednosti omjera 260/280 (Thermo Fisher Scientific, n.d.).

Iz omjera vrijednosti apsorbancija 260/280 za uzorke WC#1, WC#15 i WC#18 moguće je zaključiti kako su uzorci (u određenoj mjeri) kontaminirani s RNA. Vrijednost omjera 260/230 za uzorak WC#1 nalazi se unutar očekivanog raspona (2,0 – 2,2), dok su vrijednosti omjera za ostale uzorke manje od očekivane što upućuje na moguće kontaminante koji apsorbiraju zračenje pri 230 nm ili nižim valnim duljinama. Unatoč tome, uzorci genomske DNA su uspješno poslužili kao kalup za umnažanje mikrosatelitnih biljega lančanom reakcijom polimerazom.

3.2. Oligonukleotidne početnice

U radu je korišteno 12 parova oligonukleotidnih početnica za umnožavanje mikrosatelitnih biljega divlje mačke (Randi i sur., 2001) dugačkih između 18 i 24 baznih parova (bp). Uzvodna početnica svakog para bila je označena fluorescentnom bojom, kako je navedeno u **Tablici 2**. Nakon umnožavanja mikrosatelitnih biljega njihova će se točna veličina odrediti detekcijom fluorescencije prilikom kapilarne elektroforeze na automatskom sekvenceru (Poglavlje 3.5.). S ciljem smanjivanja broja reakcija sekvencioniranja, odnosno ukupnog vremena i troška pokusa, težilo se umnažanju po četiri mikrosatelitna biljega u istoj PCR reakciji (tzv. *multiplex* PCR). Stoga su parovi početnica grupirani u tri skupine po četiri para, MIX 1, MIX 2 i MIX 3 (**Tablica 2**), te su različite početnice označene različitim fluorescentnim bojama kako bi se kasnije, prilikom određivanja veličine fragmenata kapilarnom elektroforezom lako raspoznalo koji fragment je produkt koje početnice.

Tablica 2. Korištene oligonukleotidne početnice

	Oznaka lokusa	Očekivana veličina fragmenta / bp	Boja	Nukleotidni slijed uzvodne početnice 5' → 3'	T _m [°C]	Nukleotidni slijed nizvodne početnice 5' → 3'	T _m [°C]
MIX 1	FCA088	102-126	FAM	AGGAAAATGAAGTCAAGAAAATGG	58,4	TTTTTCTTTTTCCCGTAATACACA	56,7
	FCA126	113-151	HEX	GCCCCTGATACCCTGAATG	59,5	CTATCCTTGCTGGCTGAAGG	60,5
	FCA043	118-138	ROX	GAGCCACCCTAGCACATATACC	64	AGACGGGATTGCATGAAAAG	56,4
	FCA077	141-157	FAM	GGCACCTATAACTACCAGTGTGA	62,9	ATCTCTGGGGAAATAAATTTTGG	57,5
MIX 2	FCA008	119-151	FAM	ACTGTAAATTTCTGAGCTGGCC	60,3	TGACAGACTGTTCTGGGTATGG	62,1
	FCA149	120-138	HEX	CCTATCAAAGTTCTCACCAAATCA	60,1	GTCTCACCATGTGTGGGATG	60,5
	FCA023	130-154	ROX	CAGTTCCTTTTTCTCAAGATTGC	59	GCAACTCTTAATCAAGATTCCATT	58,4
	FCA096	179-231	FAM	CAGCCAAACTCTATGCTGA	58,4	CAATGTGCCGTCCAAGAAC	57,3
MIX 3	FCA132	132-160	FAM	ATCAAGGCCAACTGTCCG	56,1	GATGCCTCATTAGAAAAATGGC	58,4
	FCA026	136-162	HEX	GGAGCCCTTAGAGTCATGCA	60,5	TGTACACGCACCAAAAACAA	54,3
	FCA045	144-163	ROX	TGAAGAAAAGAATCAGGCTGTG	58	GTATGAGCATCTCTGTGTTCTGTG	62,9
	FCA058	209-231	FAM	CATCCCTGACTAGCCTGAGC	62,5	GTGAAGAAAGCTGGTGTGCA	58,4

3.3. Umnožavanje odabranih mikrosatelitnih biljega divlje mačke lančanom reakcijom polimerazom

Za umnožavanje odabranih mikrosatelitnih biljega divlje mačke korišten je EmeraldAmp[®] PCR 2X Master Mix (TAKARA) - dvostruko koncentrirana mješavina koja sadrži „hot-start“ DNA polimerazu, pufer za polimerazu te smjesu dNTP-ova potrebnih za reakciju produljenja lanaca. „Hot-start“ DNA polimeraza inaktivna je pri sobnoj temperaturi te se aktivira tijekom početne denaturacije (10 minuta pri 98°C). Na taj se način sprečava umnažanje nespecifičnih fragmenata nastalih kao posljedica nespecifičnog vezanja početnica na kalup ili međusobnog povezivanja početnica (Obradovic i Kevresan, 2010.). Osim toga, Master Mix sadrži i dvije boje, plavu i žutu, te sredstvo za povećavanje gustoće (tzv. *density reagent*), što omogućuje jednostavno i brzo nanošenje uzorka u jažice, bez potrebe da se dodaje boja za elektroforezu. Također, boje omogućavaju praćenje tijeka same elektroforeze. Obzirom da plava boja migrira kao fragment veličine oko 3 – 5 kb, a žuta boja kao fragment manji od 50 bp iz njihovog se položaja na gelu može zaključiti i o položaju željenih DNA fragmenata (TAKARA BIO INC, 2016).

Lančana reakcija polimerazom provedena je u uređaju Alpha Cycler 1 (PCRmax).

Sastav reakcijske smjese, uz različite modifikacije koje su testirane prilikom optimizacije lančane reakcije polimerazom, prikazan je u **Tablici 3**.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za umnažanje mikrosatelitnih biljega lančanom reakcijom polimerazom

Komponenta reakcijske smjese	Volumen
genomska DNA (kalup)	0,5 - 6 μ L (10 - 120 ng)
EmeraldAmp [®] PCR 2X Master Mix	12,5 μ L
10 μ M uzvodna početnica	0,5 ili 1 μ L (0,2 ili 0,4 μ M radna koncentracija)
10 μ M nizvodna početnica	0,5 ili 1 μ L (0,2 ili 0,4 μ M radna koncentracija)
dH ₂ O	do ukupnog volumena od 25 μ L

Korišteni program, uz različite modifikacije koje su testirane prilikom optimizacije lančane reakcije polimerazom, naveden je u **Tablici 4**.

Tablica 4. Uvjeti prilikom lančane reakcije polimerazom

		Vrijeme [min]	Temperatura [°C]
Početna denaturacija		10	98
35 ciklusa	Denaturacija kalupa	0,5	98
	Vežanje početnica na kalup	0,5 ili 1,5	51 – 61
	Sinteza komplementarnih lanaca	0,5 ili 1,5	72
Završno produživanje lanaca		5	72

Kako bi se omogućilo umnažanje po četiri mikrosatelitna biljega u istoj PCR reakciji proveden je tzv. *touchdown* PCR - modifikacija PCR-a u kojoj je početna temperatura vežanja početnica na kalup za nekoliko stupnjeva viša od optimalne te se sa svakim ciklusom postupno smanjuje do optimalne temperature (Anantha, 2015). Sastav reakcijske smjese za *touchdown* PCR prikazan je u **Tablici 5.**, a pritom korišteni program u **Tablici 6.**

Tablica 5. Sastav reakcijske smjese za *touchdown* PCR

Komponenta reakcijske smjese	Volumen
genomska DNA (kalup)	0,5 µL (10 ng)
EmeraldAmp® PCR 2X Master Mix	12,5 µL
10 µM uzvodna početnica	0,5 µL (0,2 µM radna koncentracija) ili 0,3 µL (0,12 µM radna koncentracija)
10 µM nizvodna početnica	0,5 µL (0,2 µM radna koncentracija) ili 0,3 µL (0,12 µM radna koncentracija)
dH ₂ O	do ukupnog volumena od 25 µL

Tablica 6. Uvjeti prilikom *touchdown* PCR-a

		Vrijeme [min]	Temperatura [°C]
Početna denaturacija		15	95
30 ciklusa	Denaturacija kalupa	0,5	98
	Vežanje početnica na kalup	1,5	62 → 57
	Sinteza komplementarnih lanaca	1,5	72
8 ciklusa	Denaturacija kalupa	0,5	98
	Vežanje početnica na kalup	1,5	57
	Sinteza komplementarnih lanaca	1,5	72
Završno produživanje lanaca		10	72

3.4. Detekcija mikrosatelitnih biljega elektroforezom DNA u agaroznom gelu

Elektroforeza DNA u agaroznom gelu provedena je radi provjere uspješnosti umnažanja željenih fragmenata. Ova metoda omogućava razdvajanje fragmenata nukleinskih kiselina u istosmjernom električnom polju na temelju razlike u njihovoj veličini, pri čemu manji fragmenti migriraju brže od većih (Yilmaz i sur., 2012). U ovom je radu kao nosač pripremljen 2%-tni agarozni gel otapanjem agaroze (Sigma-Aldrich) u TAE puferu (40 mM Tris; 20 mM octena kiselina; 1mM EDTA; Sigma-Aldrich), a za vizualizaciju DNA fragmenata u gel je dodana boja GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza), prema uputama proizvođača. Elektroforeza se provodila u TAE puferu, u električnom polju napona 100 V kroz 40 minuta, odnosno u električnom polju napona 80 V kroz 1 sat i 30 minuta. Vrpce na gelu vizualizirane su pod UV-svjetlom (transiluminator UVipure, UVITEC Cambridge) i fotografirane, a za provjeru veličine dobivenih fragmenata kao standard je korišten molekularni biljeg DirectLoad™ 50 bp DNA Step Ladder (Sigma-Aldrich).

3.5. Detekcija mikrosatelitnih biljega kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru

Kako bi se odredile točne veličine mikrosatelitnih biljega umnoženih lančanom reakcijom polimerazom provodi se kapilarna elektroforeza. Pritom se umnoženi fragmenti razdvajaju na temelju razlike u omjeru naboja i mase u električnom polju, unutar kapilare ispunjene

odgovarajućim elektrolitom (Nigović i sur., 2012). Pojedinačni fragmenti detektiraju se na temelju fluorescentne boje kojom su obilježeni tako što sefluorescencija inducira laserskim zrakama i kao rezultat se na kromatogramu dobiju maksimumi krivulje različitih boja. Fragmenti podjednake veličine označeni su različitim fluorescentnim bojama kako bi se lakše razlikovali prilikom očitavanja rezultata (Guichoux i sur., 2011).

Nakon uspješno provedene PCR reakcije i provjere na agaroznom gelu, pripremljeni uzorci poslani su na detekciju kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru u komercijalni servis MacroGen. Kao DNA standard upotrijebljen je 500 LIZ (Applied Biosystems), a nakon provedene kapilarne elektroforeze dobiveni su rezultati u obliku .fsa podataka. Pregledavanje rezultata i očitavanje veličina umnoženih mikrosatelitnih fragmenata provedeno je pomoću računalnog programa STRand (University of California, Davis' Veterinary Genetics Lab).

4. Rezultati

4.1. Optimizacija PCR reakcije za pojedinačne parove početnica

4.1.1. Utjecaj vremena trajanja vezanja početnica na kalup i vremena produljivanja lanaca na učinkovitost PCR reakcije

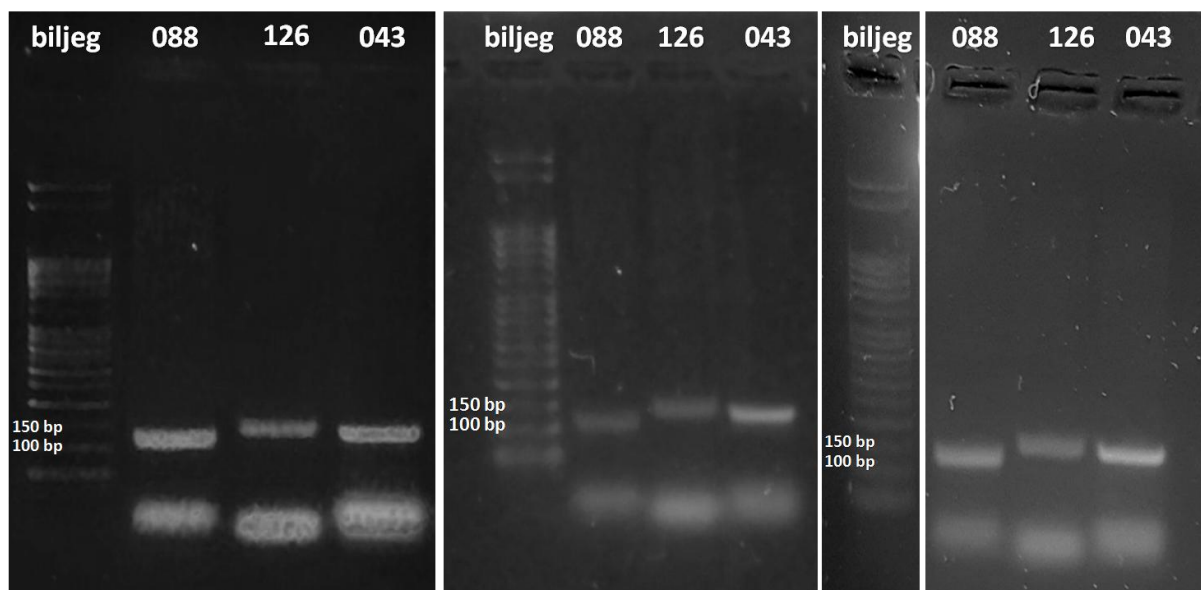
Početni uvjeti PCR reakcije kreirani su prema literaturi (Mattucci i sur., 2013.) i slijedeći upute proizvođača korištene DNA polimeraze (TAKARA BIO INC, 2016.) te su testirani koristeći početnice 088, 126 i 043. Temperatura vezanja oligonukleotidnih početnica iznosila je 51°C kako bi se omogućilo vezanje svih početnica na kalup. Naime, prema navodima iz literature, optimalna temperatura za vezanje početnica na kalup trebala bi biti 3 – 5°C niža od T_m početnica, ali u praksi to nije uvijek slučaj i treba se eksperimentalno ispitati za svaki par početnica (Applied Biological Materials (ABM) Inc., n.d.). Temperatura taljenja početnica (eng. *melting temperature*, T_m) je temperatura pri kojoj je 50% dvolančane DNA denaturirano, odnosno u jednolančanom obliku. U ovom istraživanju T_m početnica je bio između 56,1 i 62,9 °C (**Tablica 2**) te je odabrana temperatura vezanja oligonukleotidnih početnica od 51°C bila za 5,1 stupanj niža od najniže T_m vrijednosti početnica (početnica 132). Količina DNA (uzorak WC#1) iznosila je 10 ng, a koncentracija oligonukleotidnih početnica 0,4 μM. Na **Slici 3a** vidljivo je kako je PCR reakcija bila uspješna odnosno dobiveni su fragmenti očekivanih veličina, između 102 i 151 bp.

U slijedećem je koraku istražen utjecaj vremena trajanja vezanja početnica na kalup i vremena produljivanja lanaca na učinkovitost PCR reakcije. Testirano je vrijeme od 30 i 90 sekundi (**Slika 3**). Moguće je zaključiti kako povoljnije vrijeme vezanja početnica na kalup i vrijeme produljivanja lanaca iznosi 90 sekundi, jer je korištenjem tog vremena dobiven veći prinos PCR produkata, posebice za parove oligonukleotidnih početnica 088 i 126. Stoga je ovo vrijeme korišteno u daljnjim pokusima.

a) vrijeme vezanja početnica i produljivanja lanaca 90 s

b) vrijeme vezanja početnica 30 s, vrijeme produljivanja lanaca 90 s

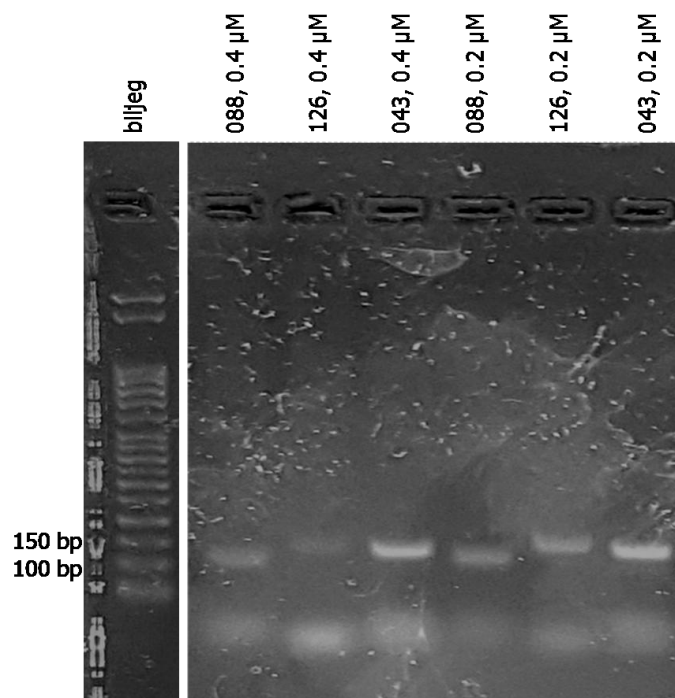
c) vrijeme vezanja početnica 90 s, vrijeme produljivanja lanaca 30 s



Slika 3. Rezultati optimizacije vremena vezanja početnica i produljivanja lanaca, temperatura vezanja početnica 51°C, količina DNA kalupa (WC#1) 10 ng, parovi početnica 088, 126, 043 koncentracije 0,4 μM .

4.1.2. Utjecaj različitih koncentracija oligonukleotidnih početnica na učinkovitost PCR reakcije

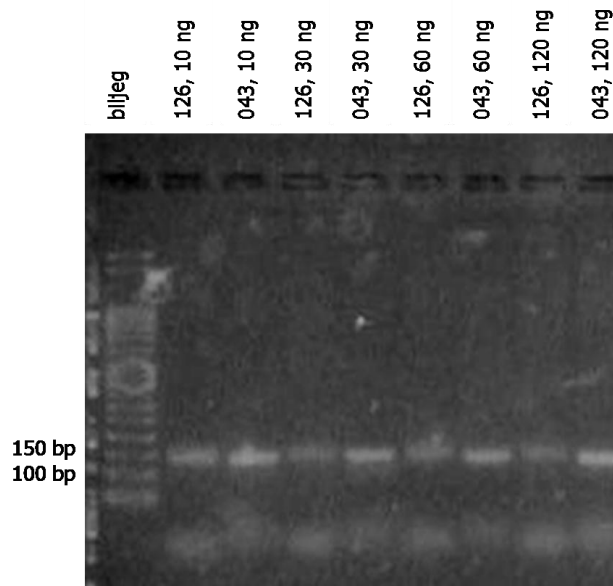
Za uspješnu provedbu PCR reakcije važnu ulogu igra koncentracija oligonukleotidnih početnica. U ovom slučaju ispitane su dvije koncentracije početnica, 0,2 i 0,4 μM . Dobiveni fragmenti veličine su između 100 i 150 parova baza što odgovara očekivanim vrijednostima (**Slika 4**). Intenzitet vrpce je bio veći pri koncentraciji oligonukleotidnih početnica od 0,2 μM , posebice za početnice s oznakama 088 te 126. Stoga je moguće zaključiti kako je koncentracija početnica od 0,2 μM povoljnija za PCR reakciju.



Slika 4. Utjecaj koncentracije početnica na lančanu reakciju polimerazom, vrijeme vezanja početnica na kalup te vrijeme sinteze komplementarnih DNA lanaca 90 sekundi, temperatura vezanja početnica 51°C, količina DNA kalupa (WC#1) 10 ng, parovi početnica 088, 126, 043 koncentracije 0,4 te 0,2 μM .

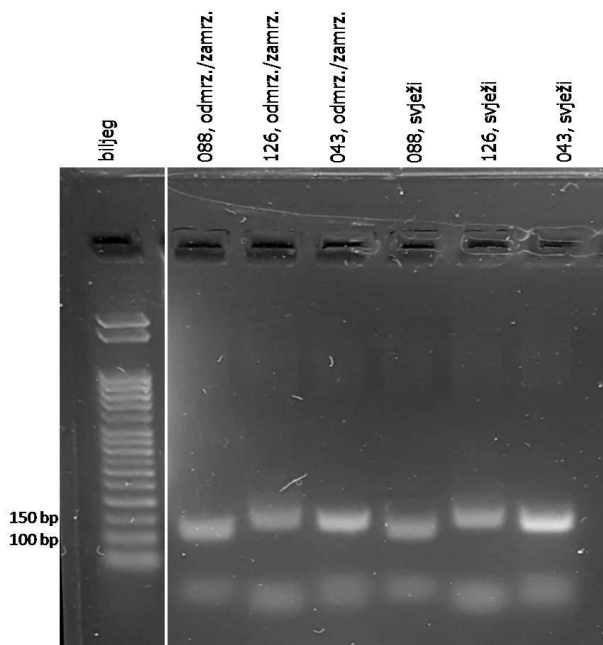
4.1.3. *Utjecaj različitih koncentracija DNA kalupa na učinkovitost PCR reakcije*

Kako bi se provjerio utjecaj koncentracije kalupa na uspješnost reakcije te kako bi se izbjegla moguća inhibicija kalupom provedene su PCR reakcije s različitom količinom DNA: 10 ng, 30 ng, 60 ng te 120 ng (**Slika 5**). Veličine dobivenih fragmenata kreću se u očekivanom rasponu od 100 – 150 bp. Za početnicu 043 učinkovitost je u svim reakcijama bila jednaka, a kod početnice 126 uočava se pad prinosa produkta porastom koncentracije kalupa. Shodno tome moguće je zaključiti kako je količina DNA kalupa u iznosu od 10 ng optimalna za provedbu PCR reakcije.



Slika 5. Utjecaj količine kalupa na lančanu reakciju polimerazom, vrijeme vezanja početnica na kalup te vrijeme sinteze komplementarnih DNA lanaca 90 sekundi, temperatura vezanja početnica 51°C, količine DNA kalupa (WC#1) 10 ng, 30 ng, 60 ng, 120 ng, parovi početnica 126, 043 koncentracije 0,2 μ M.

4.1.4. *Utjecaj višestrukog odmrzavanja i smrzavanja oligonukleotidnih početnica na učinkovitost PCR reakcije*



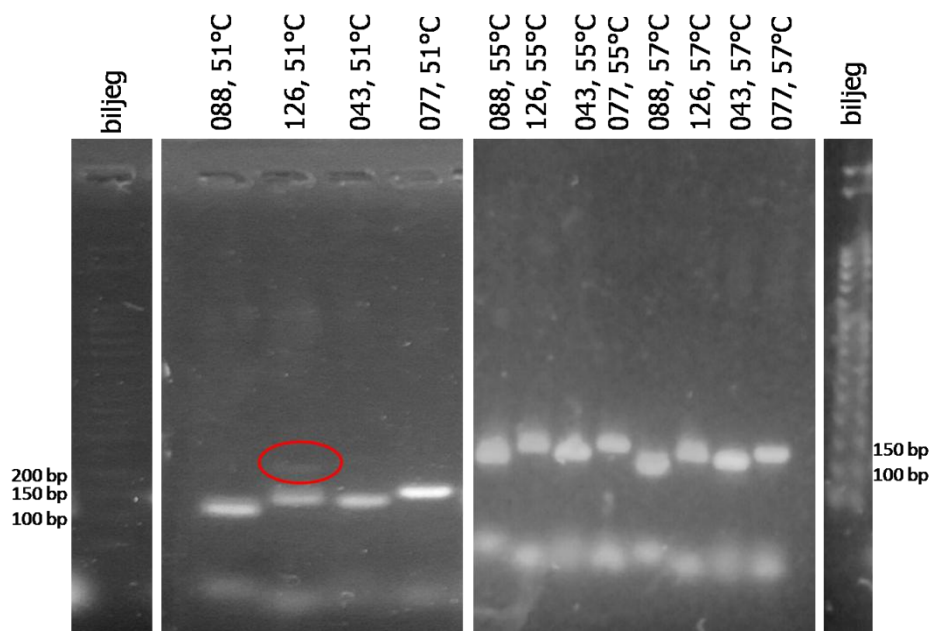
Slika 6. Rezultati lančane reakcije polimerazom sa svježim, odnosno višestruko odmrzanim i smrzanim početnicama, vrijeme vezanja početnica na kalup te vrijeme sinteze komplementarnih DNA lanaca 90 sekundi, temperatura vezanja početnica 51°C, količina DNA kalupa (WC#1) 10 ng, parovi početnica 088, 126, 043 (višestruko odmrzavani i smrzavani te svježi) koncentracije 0,2 μ M.

Kako bi se usporedila učinkovitost svježe razrijeđenih početnica u odnosu na višestruko smrzavane i odmrzavane početnice tri su para početnica (088, 126, 043) odmrznuti te potom ponovno smrznuti šesnaest puta uzastopno. Na **Slici 6** uočljivo je kako je intezitet vrpce dobivenih korištenjem višestruko odmrzavanih i smrzavanih početnica nešto slabiji u odnosu na svježe početnice, osobito za par oligonukleotidnih početnica 043. Stoga su u daljnjem radu prilikom provedbe svake PCR reakcije korištene svježe početnice.

4.1.5. Utjecaj različitih temperatura pri kojima se početnice vežu na kalup na učinkovitost PCR reakcije

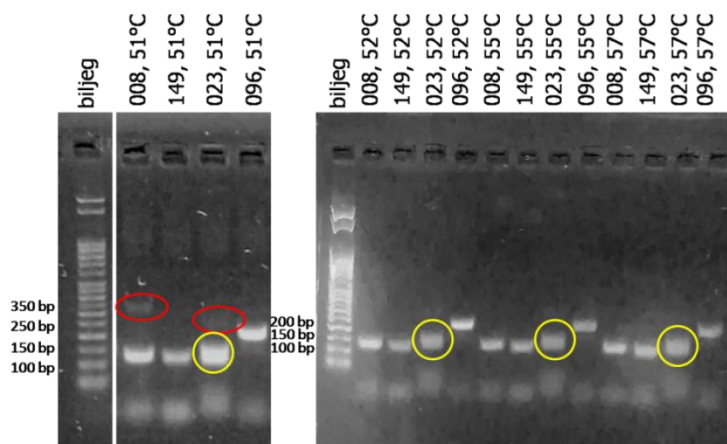
Za uspješnu provedbu PCR reakcije iznimno je važno odabrati odgovarajuću temperaturu vezanja oligonukleotidnih početnica na kalup (eng. *annealing temperature*). Gradijent PCR omogućava testiranje nekoliko različitih temperatura vezanja početnica istovremeno, na način da se odabere raspon temperatura koje se onda automatski rasporede po stupcima termo bloka PCR mašine, tj. u svakom je stupcu različita temperatura (Prezioso i Jahns, 2000). Za svaku skupinu oligonukleotidnih početnica (MIX 1, MIX 2 i MIX 3) testirano je nekoliko različitih temperatura vezanja početnica pomoću gradijent PCR-a.

Prva skupina početnica (MIX 1) korištena je u PCR reakciji pri tri različite temperature vezanja početnica na kalup: 51°C, 55°C te 57°C (**Slika 7**). Pri temperaturi vezanja od 51 °C, kod para početnica 126 bila je prisutna nespecifična vrpca čija je veličina veća od očekivane (očekivana veličina vrpce je između 113 i 151 bp, a vrpca vidljiva na gelu veličine je oko 200 bp). Međutim, povišenjem temperature vezivanja početnica do 57 °C, nespecifična vrpca nestaje, a prinos DNA je i dalje velik. Stoga optimalna temperatura vezanja početnica na kalup za skupinu početnica MIX 1 iznosi 57 °C.

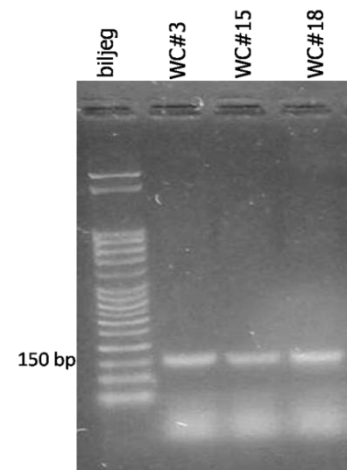


Slika 7. Utjecaj temperature vezanja početnica na rezultate lančane reakcije polimerazom za skupinu početnica MIX 1, vrijeme vezanja početnica na kalup te vrijeme sinteze komplementarnih DNA lanaca 90 sekundi, količina DNA kalupa (WC#1) 10 ng, parovi početnica 088, 126, 043, 077 koncentracije 0,2 μ M, temperature vezanja početnica 51°C, 55 °C, 57 °C. Nespecifična vrpca, čija je veličina veća od očekivane, označena je crveno.

Za drugu skupinu početnica (MIX 2), testirane su temperature vezanja početnica na kalup u rasponu od 51°C do 57°C (**Slika 8**). Pri temperaturi vezanja od 51°C jasno su vidljive nespecifične vrpce prisutne kod početnica 008 te 023. Očekivane veličine fragmenata nalaze se u rasponu 119 – 151 bp (za par početnica 088), odnosno 130 – 154 bp (za par početnica 023). Dobivene nespecifične vrpce veće su od očekivanih (oko 350 bp kod para početnica 088 te oko 250 bp kod para početnica 023). Povišenjem temperature vezanja početnica na 52, 55 i 57 °C nespecifične vrpce više nisu vidljive. Stoga je 57°C odabrana kao optimalna temperatura vezanja početnica za skupinu MIX 2. Nadalje, na **Slici 8**, je također vidljivo kako je vrpca početnica s oznakom 023 difuzna što upućuje na prisutnost još jednog fragmenta veličine slične onoj željenog fragmenta. Obzirom da veličina dobivenog fragmenta odgovara očekivanom rasponu veličina u pb za taj lokus, moguće je zaključiti kako je mačka s oznakom WC#1 heterozigot za taj lokus. Kako bi se protvrdila ova teza provedena je reakcija s parom početnica 023 pri istim uvjetima uz temperaturu vezanja početnica 57°C pri čemu su kao kalupi korišteni uzorci DNA izolirani iz divljih mačaka s oznakama WC#3, WC#15 te WC#18 (**Slika 9**). Iz slike je vidljivo kako pri temperaturi vezanja od 57°C ukoliko se koriste drugi uzorci DNA dodatne vrpce nisu vidljive, kao što je to slučaj prilikom korištenja uzorka DNA WC#1 kao kalupa. Ovime je potvrđeno da je mačka WC#1 heterozigot za lokus FCA023.

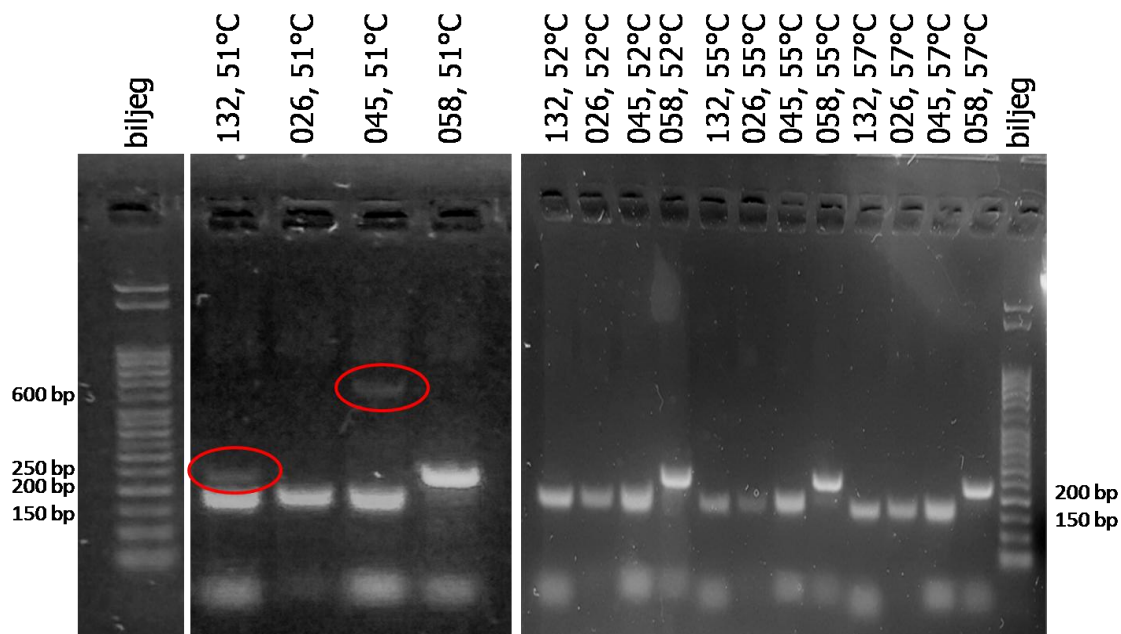


Slika 8. Utjecaj temperature vezanja početnica na rezultate lančane reakcije polimerazom za skupinu početnica MIX 2, vrijeme vezanja početnica na kalup te vrijeme sinteze komplementarnih DNA lanaca 90 sekundi, količina DNA kalupa (WC#1) 10 ng, parovi početnica 008, 149, 023, 096 koncentracije 0.2 μ M, temperature vezanja početnica 51°C, 52°C, 55 °C, 57 °C. Nespecifične vrpce, čija je veličina veća od očekivane, označene su crveno. Žutom bojom označene su dvije vrpce dobivene kao rezultat heterozigotnosti mačke WC#1 za lokus FCA023.



Slika 9. Rezultati lančane reakcije polimerazom za skupinu početnica 023 uz korištenje različitih uzoraka DNA kao kalupa, vrijeme vezanja početnica na kalup te vrijeme sinteze komplementarnih DNA lanaca 90 sekundi, DNA kalupi WC#3 (10.25 ng), WC#15 (10.1 ng), WC#18 (9.9 ng), par početnica 023 koncentracije 0.2 μ M, temperatura vezanja početnica 57 °C.

Vežanje početnica iz treće skupine (MIX 3) na kalup ispitano je pri temperaturama od 51°C, 52°C, 55°C te 57°C (**Slika 10**). Pri temperaturi vežanja od 51 °C bile su vidljive nespecifične vrpce prisutne kod početnica 132 te 045 veličine oko 250, odnosno 600 bp što je veće od očekivanih vrijednosti (132 – 160 bp za par početnica 132, i 144 – 163 bp za par početnica 045). Postavljanjem temperature vežanja na 52, 55 ili 57 °C nespecifične vrpce više nisu bile vidljive na gelu, stoga je 57 °C odabrana kao optimalna temperatura za skupinu početnica MIX 3.



Slika 10. Utjecaj temperature vežanja početnica na rezultate lančane reakcije polimerazom za skupinu početnica MIX 3, vrijeme vežanja početnica na kalup te vrijeme sinteze komplementarnih DNA lanaca 90 sekundi, količina DNA kalupa (WC#1) 10 ng, parovi početnica 132, 026, 045, 058 koncentracije 0,2 μ M, temperature vežanja početnica 51°C, 52 °C, 55 °C, 57 °C. Nespecifične vrpce, čija je veličina veća od očekivane, označene su crveno.

4.1.6. *Optimalni uvjeti PCR reakcije za pojedinačne parove početnica*

Nakon provedenog postupka optimizacije PCR reakcije umnažanja mikrosatelitnih biljega divlje mačke s pojedinačnim parovima oligonukleotidnih početnica (poglavlja 4.1.1. do 4.1.5.) utvrđeni su slijedeći optimalni uvjeti PCR reakcije:

- količina DNA kalupa u 25 μ L reakcijske smjese: 10 ng
- koncentracija oligonukleotidnih početnica u reakcijskoj smjesi: 0,2 μ M

- za svaku reakciju koriste se svježi alikvoti oligonukleotidnih početnica koncentracije 10 μ M

Tablica 7. Optimalni uvjeti PCR reakcije za pojedinačne parove početnica

		Vrijeme [min]	Temperatura [°C]
Početna denaturacija		10	98
35 ciklusa	Denaturacija kalupa	0,5	98
	Vežanje početnica na kalup	1,5	57
	Sinteza komplementarnih lanaca	1,5	72
Završno produživanje lanca		5	72

4.2. Optimizacija PCR reakcija s više parova početnica istovremeno (eng. *Multiplex PCR*)

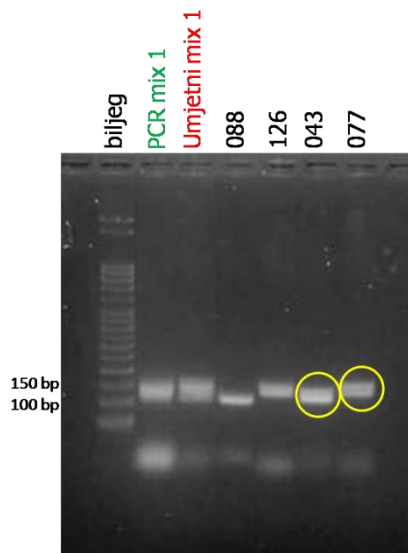
Ispitana je uspješnost multipleks PCR reakcija koristeći istovremeno četiri para početnica iz MIX-a 1, 2 ili 3. Uspješnost svake reakcije provjerena je na agaroznom gelu i to tako da je uspoređen rezultat multipleks PCR-a ("PCR mix") s rezultatom pojedinačnih PCR reakcija provedenih sa svakim parom početnica zasebno koji su naknadno pomiješani u omjeru 1:1:1:1 ("umjetni mix"). Ukoliko su rezultati na agaroznom gelu bili podudarni, provedena je dodatna provjera uspješnosti multipleks PCR-a kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru radi precizne provjere veličine svakog pojedinog fragmenta (koje na agaroznoj elektroforezi nije bilo moguće razlikovati). Za sve skupine početnica prvo je testirano da li se korištenjem uvjeta PCR reakcije ranije optimiziranih za pojedinačne parove početnica (Poglavlje 4.1.) može provesti multipleks PCR. Ukoliko to nije bilo uspješno, korišten je *touchdown* PCR, kako je opisano u nastavku teksta.

4.2.1. Optimizacija multipleks PCR reakcije za skupine početnica MIX 1 i MIX 2

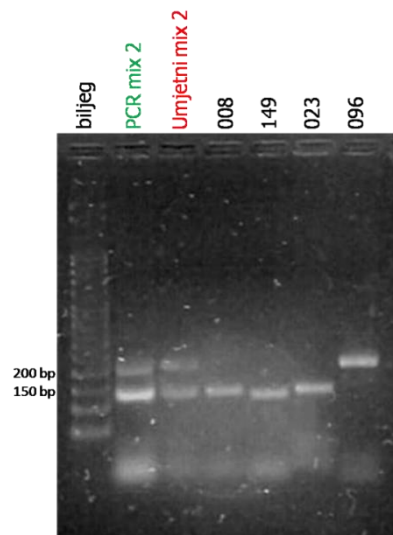
Rezultati *multiplex* PCR-a za skupine početnica MIX 1 i MIX 2 provedenog pri uvjetima opisanim u Poglavlju 4.1. nisu bili uspješni, odnosno rezultati multipleks PCR-a nisu se

podudarali s rezultatima pojedinačnih PCR reakcija provedenih sa svakim parom početnica zasebno koji su naknadno pomiješani u omjeru 1:1:1:1 (rezultati nisu prikazani). Stoga je, radi uspješnog umnažanja sva četiri mikrosatelitna biljega parovima početnica iz MIX-a 1, odnosno MIX-a 2, u istoj reakcijskoj smjesi, proveden *touchdown* PCR. U slučaju kada je u reakcijskoj smjesi za *touchdown* PCR koncentracija svih početnica bila jednaka (0,2 μ M), prinos produkta za početnice 088 (MIX 1) i 096 (MIX 2) bio je manji u odnosu na produkte drugih početnica (rezultati nisu prikazani). Zato je, kako bi se povećala učinkovitost reakcije, proveden *touchdown* PCR pri kojem je u reakcijskoj smjesi koncentracija početnica 088 (MIX 1) i 096 (MIX 2) bila viša (0,2 μ M) od ostalih početnica po (0,12 μ M). Kako je vidljivo na agaroznom gelu (**Slike 11.** i **12.**), i za MIX 1 i za MIX 2 dobivene vrpce PCR mix-a, osim što se nalaze u očekivanom rasponu veličina željenih fragmenata (102 – 157 bp za MIX 1, odnosno 119 – 231 bp za MIX 2), odgovaraju svojom veličinom vrpcama dobivenim u pojedinačnim PCR reakcijama. Stoga je na temelju ovih rezultata moguće pretpostaviti kako je *multiplex* PCR za skupine početnica MIX 1 i MIX 2 uspješno proveden.

Obzirom da na temelju rezultata dobivenih elektroforezom nije moguće sa sigurnošću zaključiti o uspješnosti pojedinačnih PCR reakcija niti multipleks PCR-a provedena je i kapilarna elektroforeza te su određene veličine umnoženih fragmenata u bp. Rezultati kapilarne elektroforeze prikazani su u **Tablici 8.** Na temelju dobivenih rezultata sa sigurnošću se može utvrditi kako su uspješno optimizirani uvjeti za provedbu pojedinačnih PCR reakcija obzirom da veličine dobivenih fragmenata odgovaraju očekivanim veličinama. Isto tako, veličine fragmenata dobivenih u multipleks reakciji za skupinu početnica MIX 1 odgovaraju ne samo očekivanim vrijednostima nego i veličinama fragmenata dobivenih u pojedinačnim reakcijama. Stoga je moguće zaključiti kako je uspješno optimizirana reakcija multipleks PCR-a za skupinu početnica MIX 1. S druge strane, rezultate kapilarne elektroforeze dobivene za skupinu početnica MIX 2 nije bilo moguće očitati, što znači da ili reakcija multipleks PCR-a ili kapilarna elektroforeza nije uspješno provedena. Ovaj će pokus trebati ponoviti u nastavku istraživanja.



Slika 11. Rezultati *touchdown* PCR-a za skupinu početnica MIX 1, vrijeme vezanja početnica na kalup te vrijeme sinteze komplementarnih DNA lanaca 90 sekundi, temperatura vezanja početnica 57 °C, količina DNA kalupa (WC#15) 10 ng, parovi početnica 088, 126, 043, 077 koncentracije 0.2 µM. "PCR mix" (označen zelenom bojom) predstavlja rezultat multiplex PCR-a, "Umjetni mix" (označen crvenom bojom) pripremljen je miješanjem PCR produkata pojedinačnih početnica u omjeru 1:1:1:1. Žutom bojom označene su dvije vrpce dobivene kao rezultat heterozigotnosti mačke WC#15



Slika 12. Rezultati *touchdown* PCR-a za skupinu početnica MIX 2, vrijeme vezanja početnica na kalup te vrijeme sinteze komplementarnih DNA lanaca 90 sekundi, temperatura vezanja početnica 57 °C, količina DNA kalupa (WC#3) 10 ng, parovi početnica 008, 149, 023, 096 koncentracije 0.2 µM. "PCR mix" (označen zelenom bojom) predstavlja rezultat *multiplex* PCR-a, "Umjetni mix" (označen crvenom bojom) pripremljen je miješanjem PCR produkata pojedinačnih početnica u omjeru 1:1:1:1.

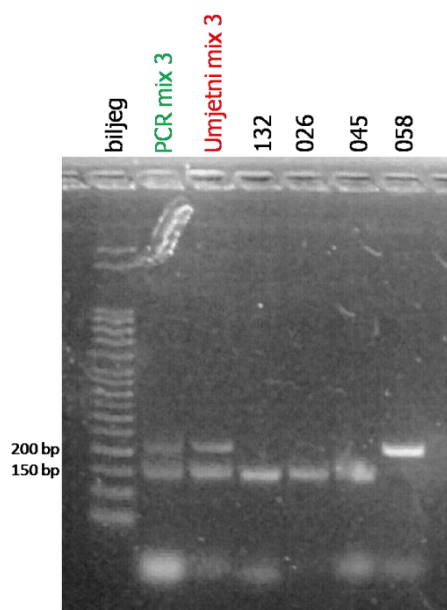
Tablica 8. Veličine umnoženih fragmenata određene kapilarnom elektroforezom.

	Boja	Očekivana veličina fragmenata / bp	Detektirana veličina fragmenata / bp				Uzorak DNA	Pojava heterozigotnosti	
			PCR mix		Umjetni mix				
MIX 1	088	FAM	102 – 126	114*	116	114	116	WC#15	DA
	126	HEX	113 – 151	133	137	133	137	WC#15	DA
	043	ROX	118 – 138	122	130	122	130	WC#15	DA
	077	FAM	141 – 157	142	152	142	152	WC#15	DA
MIX 2	008	FAM	119 – 151	/		136		WC#15	NE
	149	HEX	120 – 138	/		127	129	WC#15	DA
	023	ROX	130 – 154	/		134	136	WC#15	DA
	096	FAM	179 – 231	/		212	214	WC#15	DA
MIX 3	132	FAM	132 – 160	154	157	154	157	WC#1	DA
	026	HEX	136 – 162	155	159	155	159	WC#1	DA
	045	ROX	144 – 163	146	153	146	153	WC#1	DA
	058	FAM	209 – 231	224	226	224	226	WC#1	DA

(* dobiveni pik je smanjenog inteziteta; / reakcija određivanja veličine fragmenata nije uspjela)

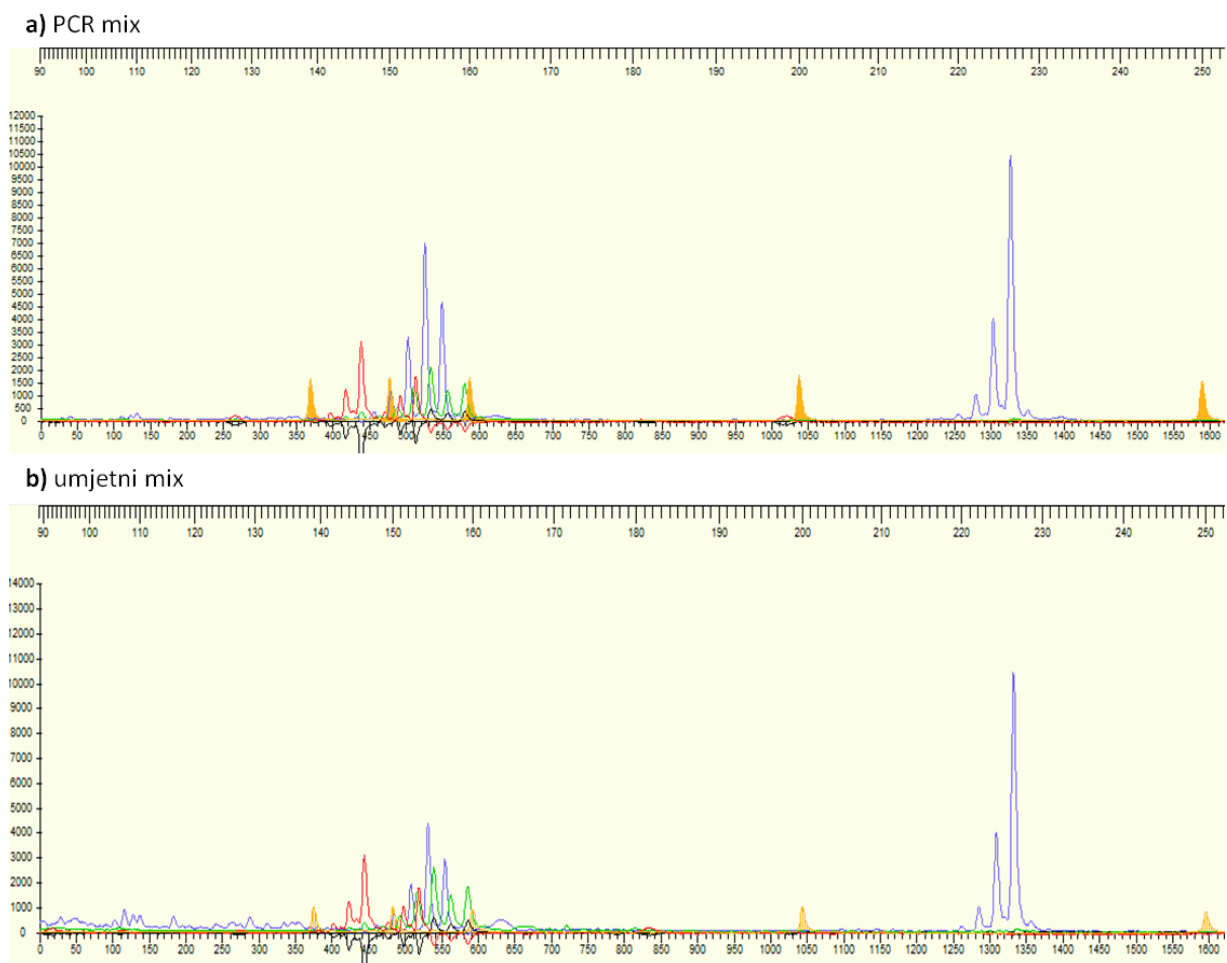
4.2.2. Optimizacija multipleks PCR reakcije za skupinu početnica MIX 3

Rezultati *multiplex* PCR-a za skupinu početnica MIX 3 provedenog pri uvjetima opisanim u Poglavlju 2.6. prikazani su na **Slici 13**. Moguće je pretpostaviti kako je reakcija *multiplex* PCR-a uspješno provedena jer se dobivene vrpce nalaze u rasponu očekivanih veličina (132 – 231 bp) te veličinom odgovaraju vrpcama pojedinačnih fragmenata. Rezultati dodatne provjere uspješnosti *multiplex* PCR kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru prikazani su u **Tablici 8** i na **Slici 14**. Kao i u slučaju MIX-a 1, može se utvrditi kako su uspješno optimizirani uvjeti za provedbu pojedinačnih PCR reakcija obzirom da veličine dobivenih fragmenata odgovaraju očekivanim veličinama. Isto tako, veličine fragmenata dobivenih u multipleks reakciji za skupinu početnica MIX 3 odgovaraju veličinama fragmenata dobivenih u pojedinačnim reakcijama, odnosno uspješno je optimizirana reakcija multipleks PCR-a za ovu skupinu početnica.



Slika 13. Rezultati *multiplex* PCR-a za skupinu početnica MIX 3, vrijeme vezanja početnica na kalup te vrijeme sinteze komplementarnih DNA lanaca 90 sekundi, temperatura vezanja početnica 57 °C, količina DNA kalupa (WC#1) 10 ng, parovi početnica 132, 026, 045, 058 koncentracije 0,2 μM. "PCR mix" (označen zelenom bojom) predstavlja rezultat *multiplex* PCR-a, "Umjetni mix" (označen crvenom bojom) pripremljen je miješanjem PCR produkata pojedinačnih početnica u omjeru 1:1:1:1.

Na **Slici 14.** prikazan je kromatogram dobiven za skupinu početnica MIX 3. Vidljivo je kako produkti dobiveni reakcijom multipleks PCR-a (PCR mix, **Slika 14a**) veličinom odgovaraju produktima iz umjetnog mix-a, odnosno produktima pojedinačnih PCR reakcija (**Slika 14b**). Također je moguće uočiti kako su dobivena dva pika za svaki fragment. Ovakvi rezultati upućuju na heterozigotnost mačaka, u ovom slučaju divlje mačke WC#1, za odabrane lokuse. Ista pojava primjećena je i kod ostalih skupina početnica za divlju mačku #15. Zato su u **Tablici 8.** navedene dvije veličine za svaki lokus.



Slika 14. Rezultati provjere multiplex PCR-a kapilarnom elektroforezom za skupinu početnica MIX 3. Plavom bojom označeni su produkti parova početnica s oznakama 132 i 058, crvenom produkt para početnica 045 i zelenom produkt para početnica 026. Narančasti pikovi odgovaraju DNA standardu 500 LIZ (Applied Biosystems). "PCR mix" (slika **a**) predstavlja rezultat multiplex PCR-a, "Umjetni mix" (slika **b**) pripremljen je miješanjem PCR produkata pojedinačnih početnica u omjeru 1:1:1:1.

5. Rasprava

Lančana reakcija polimerazom (PCR) omogućuje brzo i učinkovito umnažanje željenih fragmenata DNA molekule te je stoga jedna od nezaobilaznih metoda u molekularnoj biologiji (Hernandez-Rodriguez i Ramirez Gomez, 2012). U ovom su radu optimizirane pojedinačne i multipleks PCR reakcije za umnažanje 12 različitih mikrosatelitnih biljega divlje mačke.

Vrijeme trajanja pojedinih faza PCR reakcije utječe na uspješnost umnažanja kalupa. Tako vrijeme vezanja početnica na kalup (eng. *annealing time*) mora biti dovoljno dugo kako bi se omogućilo njihovo komplementarno sparivanje sa točno određenim regijama na DNA kalupu. S druge strane, predugo vezanje početnica može rezultirati pojavom nespecifičnih vrpca zbog nespecifičnog vezanja početnica na kalup (Subramanian, 2008). Standardno vrijeme vezanja početnica na kalup iznosi 30 sekundi (Lorenz, 2012.), a tako je preporučeno i od strane proizvođača DNA polimeraze korištene u ovom radu (TAKARA BIO INC, 2016). Međutim, kod umnožavanja mikrosatelitnih biljega mačaka i drugih organizama često se koristi produljeno vrijeme vezanja početnica (QIAGEN, 2009; Mattucci i sur., 2013). U skladu s tim, i u ovom se radu kao povoljnije vrijeme vezanja početnica pokazalo ono od 90 sekundi. Smatra se kako produljeno vrijeme vezanja početnica omogućava svim početnicama da se vežu na odgovarajuće mjesto na DNA kalupu (Henrichs i sur., 2008).

Optimalno vrijeme trajanje faze produljivanja lanaca DNA (eng. *extension time*) ovisi o veličini fragmenta kojeg se želi umnožiti te o njegovoj količini u reakcijskoj smjesi, ali i o temperaturi pri kojoj se provodi reakcija. Standardna temperatura pri kojoj se provodi produljivanje lanaca iznosi 72°C. Riječ je o temperaturi koja je optimalna za rad DNA polimeraze (Innis i Gelfand, 1990) te je prema uputama proizvođača (TAKARA BIO INC, 2016) korištena i u ovom radu. Nadalje, preporučeno vrijeme trajanja faze ekstenzije iznosi 1 min/kb (TAKARA BIO INC, n.d.), odnosno 15 – 30 sekundi za fragmente manje od 500 bp (Morel i Raccurt, 2003). Ako je faza produljivanja lanaca prekratka tada uopće ne dolazi do umnažanja željenog fragmenta ili se sintetiziraju kraći, nespecifični fragmenti. S druge strane, predugo trajanje faze ekstenzije dovodi do povećanog umnažanja nespecifičnih produkata, što kasnije rezultira difuznim vrpcama na gelu (TaKaRa Bio USA, n.d.). Međutim, duljim vremenom ekstenzije osigurava se potpuna sinteza novih lanaca što rezultira i boljim rezultatima umnažanja. U ovom radu se također kao optimalno vrijeme trajanja faze produljivanja lanaca pokazalo ono od 90 sekundi, kao i u nekim drugim istraživanjima mikrosatelita divlje mačke (Mattucci i sur., 2013) i drugih organizama (Henrichs i sur., 2008).

Koncentracija početnica jedan je od kriterija o kojima ovisi uspješnost PCR reakcije. Ako je koncentracija početnica u reakcijskoj smjesi preniska onda ne može doći do umnažanja

kalupa. S druge strane, ako je koncentracija početnica previsoka tada dolazi do nespecifičnog vezanja početnica na kalup te nastaju nespecifični fragmenti. Smatra se kako je optimalna koncentracija početnica u reakcijskoj smjesi između 0,1 i 1 μM (Veeramuthumari i Isabel, 2012). U ovom je radu eksperimentalno utvrđeno da je povoljnije koristiti 0,2 μM početnice za pojedinačne reakcije nego 0,4 μM . Sličnu koncentraciju istih parova početnica koristili su i Randi i sur. (2001).

Učestalo odmrzavanje i smrzavanje početnica može dovesti do njihove degradacije što rezultira smanjenim prinosom reakcije ili izostankom rezultata. Smatra se kako stvaranje kristala leda može uzrokovati lomove unutar nukleinskih kiselina (Brunstein, 2015). S obzirom da su matične i radne otopine oligonukleotidnih početnica u ovom radu pripremljene u destiliranoj vodi, istražen je utjecaj višestrukog odmrzavanja i zamrzavanja otopina početnica na provedbu reakcije. U skladu s očekivanjima, uočeno je kako je prinos reakcije provedene sa svježim početnicama veći nego prilikom primjene odmrzavanih i smrzavanih početnica.

Kao čimbenik koji može utjecati na uspješnost PCR reakcije je i količina DNA kalupa u reakcijskoj smjesi. Prema navodima u literaturi, količina genomske DNA potrebne za uspješno umnažanje željenih fragmenata nalazi se u rasponu 10 – 100 ng. Prevelika količina DNA kalupa može dovesti do pojave nespecifičnih fragmenata (Zangenberg i sur., 1999), ali isto tako može uzrokovati tzv. inhibiciju kalupom. Do inhibicije dolazi zbog prisutnosti inhibitora u samom DNA uzorku ili zbog nedovoljne denaturacije u prvom koraku PCR reakcije, što onemogućava vezanje početnica na kalup (Bio-Rad Laboratories, Inc., n.d.). U ovom radu ispitane su količine DNA u rasponu 10 – 120 ng, a kao optimalna količina genomske DNA pokazala se ona od 10 ng, što odgovara količini DNA korištenoj u radu s istim parovima početnica (10 – 20 ng) (Randi i sur., 2001). Činjenica da se kao optimalna količina DNA kalupa pokazala upravo najniža vrijednost od 10 ng ukazuje na moguću inhibiciju kalupom kod povećane količine DNA u reakciji, a u skladu je s rezultatima analize čistoće uzoraka DNA. Naime, pokazano je kako prevelika količina DNA u reakcijskoj smjesi može umanjiti uspješnost PCR reakcije, posebice ako uzorak sadrži kontaminante (Kramer i Coen, 2000).

Odabir odgovarajuće temperature pri kojoj se početnice vežu na kalup najkritičniji je korak prilikom optimizacije PCR reakcije. Prema literaturi, temperatura vezanja početnica na kalup treba biti za 3 – 5 $^{\circ}\text{C}$ niža od T_m vrijednosti. Međutim, u praksi nije uvijek slučaj da je optimalna temperatura jednaka tako izračunatoj vrijednosti zbog čega se najpovoljnija temperatura najčešće određuje eksperimentalno (Applied Biological Materials (ABM) Inc.,

n.d.). Nižim temperaturama postiže se veći prinos reakcije zbog uspješnijeg vezanja početnica na kalup, ali postoji veća vjerojatnost pojave nespecifičnih produkata. S druge strane, više temperature osiguravaju veću specifičnost reakcije što je i poželjno tijekom provođenja lančane reakcije polimerazom, međutim može doći do smanjenja prinosa produkta (Zangenberg i sur., 1999). U ovom je istraživanju prvo ispitana učinkovitost temperature od 51°C (temperatura za 5,1 stupanj niža od najniže T_m vrijednosti početnica). Očekivano, kod nekih početnica (126 – T_m uzvodne početnice=59,5°C, T_m nizvodne početnice=60,5°C; 008 – T_m uzvodne početnice=60,3°C, T_m nizvodne početnice=62,1°C; 023 – T_m uzvodne početnice=59°C, T_m nizvodne početnice=58,4°C; 132 – T_m uzvodne početnice=56,1°C, T_m nizvodne početnice=58,4°C; 045 – T_m uzvodne početnice=58°C, T_m nizvodne početnice=62,9°C) pojavile su se nespecifične vrpce. Tek nakon povišenja temperature vezanja početnica na 57°C, koja je u prosjeku za 2,3°C niža od T_m vrijednosti, nespecifične vrpce više nisu bile vidljive ni kod jednog para početnica. U usporedbi s ovim rezultatima, temperatura vezanja početnica u prethodno spomenutom radu u kojem su korištene iste početnice kretala se u rasponu 50 – 55°C (Randi i sur., 2001).

Danas je u brojnim istraživanjima, poput određivanja genetičke čistoće populacije, korisno umnažanje više fragmenata DNA istovremeno kako bi se skratilo vrijeme i troškovi istraživanja - multipleks PCR (Mattucci i sur., 2013). U ovom je radu uspješno optimizirana reakcija multipleks PCR-a u svrhu umnažanja mikrosatelitnih biljega divlje mačke za skupine početnica MIX 1 i MIX 3, dok su za optimizaciju multipleks PCR-a za skupinu početnica MIX 2 potrebni dodatni pokusi. Teoretski, specifičnost vezanja početnica na kalup te učinkovitost reakcije multipleks PCR-a ne bi trebala odstupati od rezultata dobivenih pomoću pojedinačnih reakcija za svaki par početnica zasebno uz iste uvjete reakcije. Međutim, u praksi se pokazalo kako povećanjem broja oligonukleotidnih početnica u reakcijskoj smjesi raste i vjerojatnost pojave nespecifičnih fragmenata (Chamberlain i Chamberlain, 1994). U skladu s tim, u ovom je istraživanju pokazano da su samo u slučaju skupine početnica MIX 3 uvjeti pojedinačne PCR reakcije bili optimalni i za multipleks PCR. U slučaju druge dvije skupine početnica (MIX 1 i MIX 2), kako bi se postigla visoka specifičnost reakcije te postavili uvjeti pogodni za sve parove početnica, provedena je optimizacija reakcije. Optimalni uvjeti pojedinačnih PCR reakcija prilagođeni su tzv. touchdown PCR-u prema uvjetima opisanim u istraživanju Mattuccija i sur. (2013). Ovaj oblik PCR-a koristi se radi poboljšanja specifičnosti, a samim time i uspješnosti PCR reakcije jer se na ovaj način potiče umnažanje samo željenih fragmenata (Rithidech i Dunn, 2003). Pritom se u početnim ciklusima reakcije koriste temperature vezanja početnica koje su nekoliko stupnjeva više od optimalne. Svakim se ciklusom temperatura snižava sve dok ne dostigne optimalnu vrijednost. Na ovaj se način na

samom početku reakcije potiče vezanje početnica koje su u potpunosti komplementarne kalupu, a smanjenjem temperature postiže se viši prinos reakcije (Anantha, 2015). Tako je i u ovom radu primjećeno poboljšanje u odnosu na prethodno dobivene rezultate. Nadalje, prilikom provedbe multipleks PCR-a važno je da svi parovi početnica djeluju sa podjednakom efikasnošću (Chamberlain i Chamberlain, 1994). U slučaju da postoje parovi početnica za koje je vidljivo da je prinos produkta manji u odnosu na druge početnice iz MIX-a, preporuča se smanjenje koncentracije početnica s višim prinosom produkta, odnosno povišenje koncentracije onih početnica čija je uspješnost provedbe reakcije manja (QIAGEN, 2010). Iz tog je razloga za provedbu multipleks PCR-a za skupine početnica MIX 1 i MIX 2 koncentracija svih početnica, osim početnica s oznakama 088 (MIX 1) i 096 (MIX 2), smanjena na 0,12 μM , dok je koncentracija početnica 088 i 096 ostala 0,2 μM .

6. Zaključak

U ovom je radu uspješno provedena optimizacija lančane reakcije polimerazom u svrhu umnažanja 12 mikrosatelitnih biljega divlje mačke *F. silvestris*. Uspješno su optimizirane i PCR reakcije s pojedinačnim parovima početnica, i multipleks PCR reakcije za skupine početnica MIX 1 i MIX 3 u kojima su istovremeno umnožena po četiri različita mikrosatelitna biljega.

- optimalna količina genomske DNA kalupa u reakcijskoj smjesi od 25 μ L iznosi 10 ng
- optimalna koncentracija oligonukleotidnih početnica u reakcijskoj smjesi je 0,2 μ M
- optimalna temperatura vezanja početnica na kalup je 57°C
- optimalno vrijeme vezanja početnica i sinteze komplementarnih lanaca je 90 sekundi
- prilikom provedbe multipleks PCR-a za parove početnica iz skupina MIX 1 treba koristiti touchdown PCR te u reakcijsku smjesu dodati nejednake količine početnica (više onih početnica koje slabije amplificiraju svoju ciljnu regiju u uvjetima multipleks PCR-a).

Obzirom da multipleks PCR za parove početnica iz skupine MIX 2 nije uspješno proveden, potrebno je dodatno optimizirati uvjete pri kojima će se provoditi navedena reakcija.

U nastavku istraživanja će se optimizirani uvjeti PCR reakcije koristiti kako bi se umnožili mikrosatelitni biljezi većeg broja divljih i domaćih mačaka. Analizom njihove dužine i statističkom obradom podataka utvrdit će se genomska čistoća populacije divlje mačke u te stupanj hibridizacije s domaćim mačkama na teritoriju Republike Hrvatske.

7. Popis literature

1. Anantha, S., (2015) Touchdown PCR: A Primer and Some Tips.
<<http://bitesizebio.com/2203/touchdown-pcr-a-primer-and-some-tips/>>
2. Applied Biological Materials (ABM) Inc., Polymerase Chain Reaction (PCR) - An Introduction.
<https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php> Pristupljeno 27.06.2017.
3. Beaumont, M., Barratt, E.M., Gottelli, D., Kitchener, A.C., Daniels, M.J., Pritchard, J.K., Bruford, M.W. (2001), Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. *Molecular Ecology* **10**: 319 – 336
4. Bio-Rad Laboratories, Inc., PCR Troubleshooting. < <http://www.bio-rad.com/en-hr/applications-technologies/pcr-troubleshooting>> Pristupljeno 26.06.2017.
5. Brunstein, J. (2015) Freeze-thaw cycles and nucleic acid stability: what's safe for your samples?. <<https://www.mlo-online.com/freeze-thaw-cycles-and-nucleic-acid-stability-whats-safe-for-your-samples.php>> Pristupljeno 01.07.2017.
6. Chamberlain, J.S., Chamberlain, J.R. (1994) Optimization of Multiplex PCRs. U: The Polymerase Chain Reaction, Mullis, K.B., Ferre, F., Gibbs, R.A., ur., Springer Science + Business Media str. 38 – 46
7. Falsone, L., Brianti, E., Gaglio, G., Napoli, E., Anile S., Mallia, E., Giannelli, A., Poglajen, G., Giannetto, S., Otranto, D. (2014) The European wildcats (*Felis silvestris silvestris*) as reservoir hosts of *Troglostrongylus brevior* (Strongylida: Crenosomatidae) lungworms. *Veterinary Parasitology* **205**: 193 – 198.
8. Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., Petit, R.J. (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* **11**: 591 – 611
9. Harcet, M., Četković, H. (2007), Genotipizacija pomoću mikrosatelita. U: Metode u molekularnoj biologiji, Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Herak Bosnar, M., Hranilović, D., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D., ur., Institut Ruđer Bošković str. 492 – 494

10. Henrichs, D.W., Renshaw, M. A., Santamaria, C. A., Richardson, B., Gold, J. R., Campbell, L. (2008) PCR Amplification of Microsatellites from Single Cells of *Karenia brevis* Preserved in Lugol's Iodine Solution. *Marine Biotechnology* **10**: 122 – 127
11. Hernandez-Rodriguez, P., Ramirez Gomez, A.P. (2012) Polymerase Chain Reaction: Types, Utilities and Limitations. U: Polymerase Chain Reaction, Hernandez-Rodriguez, P., ur., InTech str. 157 – 172
12. Innis, M.A., Gelfand, D.H. (1990) OPTIMIZATION OF PCRs. U: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., ur., ACADEMIC PRESS, INC. str. 3 – 12
13. Joshi, M., Deshpande, J.D. (2011) Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research* **2**: 87-97
14. Katušić Hećimović, S. (2007) Osnovna metoda PCR. U: Metode u molekularnoj biologiji, Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Herak Bosnar, M., Hranilović, D., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D., ur., Institut Ruđer Bošković str. 361 – 379
15. Kocijan, I. (2007) Metoda određivanja duljine mikrosatelitskih alela kapilarnom elektroforezom. U: Metode u molekularnoj biologiji, Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Herak Bosnar, M., Hranilović, D., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D., ur., Institut Ruđer Bošković str. 495 – 496
16. Koreth, J., O'Leary, J.J., O'D McGee J. (1996) Microsatellites and PCR genomic analysis. *Journal of Pathology* **178**: 239 – 243
17. Kramer, M. F., Coen, D.M. (2000) Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. U: Current Protocols in Toxicology, 3:3C, str. A.3C.1–A.3C.14
18. Lorenz, T. (2012) Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846334/?report=classic>>
Pristupljeno 30.06.2017.

19. Mattucci, F., Oliveira, R., Bizzarri, L., Vercillo, F., Anile, S., Ragni, B., Lapini, L., Sforzi, A., Alves, P.C., Lyons, L. A., Randi, E. (2013) Genetic structure of wildcat (*Felis silvestris*) populations in Italy. *Ecology and Evolution* **3**: 2443 – 2458
20. Morel, G., Raccurt, M. (2003), *PCR/RT-PCR in situ: light and electron microscopy*, CRC PRESS, str. 115
21. Nigović, B., Mornar, A., Sertić M. (2012) A review of current trends and advances in analytical methods for determination of statins: Chromatography and Capillary Electrophoresis. U: *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*, De Azevedo Calderon, L., ur., InTech str.385 – 428
22. Nobelprize.org (2014) The Nobel Prize in Chemistry 1993. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-facts.html> Pristupljeno 25.06.2017.
23. Obradovic, D., Kevresan, S.(2010) Optimization of PCR in Application of Hot Start *Taq* DNA Polymerase for Detection of *Erwinia amylovora* with Primers FER1-F and FER1-R. *Microbiology* **79**: 816–821
24. Oliveira, E.R., Gomes Pádua J.G., Imaculada Zucchi, M.,Vencovsky R., Carneiro Vieira, M.L. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* **29**: 294 – 307
25. Oliveira, R., Randi, E., Mattucci, F., Kurushima, J.D., Lyons, L.A., Alves, P.C. (2015.) Toward a genome-wide approach for detecting hybrids: informative SNPs to detect introgression between domestic cats and European wildcats (*Felis silvestris*). *Heredity* **115**: 195 – 205
26. Pierpaoli, M., Birò, Z. S., Herrmann, M., Hupe, K., Fernandes, M., Ragni, B., Szemethy, L., Randi, E. (2003) Genetic distinction of wildcat (*Felis silvestris*) populations in Europe, and hybridization with domestic cats in Hungary. *Molecular Ecology* **12**: 2585 – 2598
27. Prezioso, V.R., Jahns, A. (2000) Using Gradient PCR to Determine the Optimum Annealing Temperature. <<https://www.drugdiscoveryonline.com/doc/using-gradient-pcr-to-determine-the-optimum-a-0002>> Pristupljeno 27.06.2017.

28. QIAGEN® Multiplex PCR Handbook For fast and efficient multiplex PCR without optimization (2010) QIAGEN, str. 42
29. 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 and Evolution* **18**: 1679–1693
30. Rithidech, K., Dunn, J.J. (2003) Combining Multiplex and Touchdown PCR for Microsatellite Analysis. U: PCR Protocols, 2. izd., Bartlett, J.M.S., Stirling, D., Humana Press str. 295 – 299
31. Roche Molecular Systems Inc. (2016) History of PCR,
<<https://molecular.roche.com/innovation/pcr/history/>> Pristupljeno 25.06.2017.
32. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic Amplification of β -globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **230**: 1350 – 1354
33. Subramanian, A., Mamedov, T., Pinnear, E., Viljoen, H. (2008) Importance of annealing times in the PCR amplification of GC-rich genes. *Journal of Biotechnology* **136** (Suppl. 1): 100
34. TAKARA BIO INC (2016) EmeraldAmp® PCR Master Mix: Sample Data Sheet.
<<http://www.clontech.com>> Pristupljeno 27.06.2017.
35. TAKARA BIO INC, FAQs PCR.
<http://www.clontech.com/NL/Products/PCR/Resources/PCR_FAQs> Pristupljeno 30.06.2017.
36. TaKaRa Bio USA, Successful PCR Guide,
<http://www.separations.co.za/fileadmin/themes/default/pdf/2.%20PRODUCT%20LINES/X.%20TAKARA/PCR_Guide.pdf> Pristupljeno 30.06.2017.
37. Thermo Fisher Scientific, 260/280 and 260/230 Ratios.
<<http://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf>> Pristupljeno 26.06.2017.
38. Type-it® Microsatellite PCR Handbook (2009) QIAGEN, str. 17 – 20

39. Veeramuthumari, P., Isabel, W. (2012) Identification of Genetic Markers Using Polymerase Chain Reaction (PCR) in Graves' Hyperthyroidism. U: Polymerase Chain Reaction, Hernandez-Rodriguez, P., ur., InTech str. 517 – 530
40. Yamaguchi, N., Kitchener, A., Driscoll, C., Nussberger, B. (2015.) *Felis silvestris*. The IUCN Red List of Threatened Species.
<<http://www.iucnredlist.org/details/60354712/0>> Pristupljeno 24.06.2017.
41. Yilmaz, M., Ozic, C., Gok, I. (2012) Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis. U: Gel Electrophoresis - Principles and Basics, Magdeldin, S., ur., InTech str. 33 – 40
42. Zangenberg, G., Saiki, R. K., Reynolds, R. (1999) MULTIPLEX PCR: OPTIMIZATION GUIDELINES. U: PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Innis, M.A., Gelfand, D.H. Sninsky, J.J., ur., ACADEMIC PRESS str. 73 – 94

Izjava o izvornosti

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

Lucija Jara-Šaučević
ime i prezime studenta