

Sveučilište u Zagrebu  
Veterinarski Fakultet

LANA PAĐEN i IVANA SADARIĆ  
apsolventice

Izrada vrsno specifičnih početnica za umnažanje  
mitohondrijske DNA divljih životinja Hrvatske

Zagreb, 2009.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za biologiju, patologiju i uzgoj divljači, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta Zdravstveni nadzor divljači (053-0532400-2398) prof. dr. sc. Alena Slavice. Rad je izrađen pod vodstvom dr.sc. Tomislava Gomerčića i Magde Sindičić, dr. vet. med. i predan je na natječaj za dodjelu rektorove nagrade u akademskoj godini 2008./2009.

## Sadržaj

Uvod	1
Materijal i metode	3
Rezultati	4
Rasprava	8
Zaključci	9
Literatura	11
Sažetak	13
Abstract	14

## Uvod

Podatak o prisutnosti životinjskih vrsta na određenom području osnovni je ekološki parametar i temelj za razumijevanje populacijske ekologije. To je također i temeljni podatak za istraživanje, zaštitu i upravljanje, kako tih životinjskih vrsta, tako i samog područja. Europska zakonska regulativa zahtjeva izradu Planova upravljanja i Akcijskih planova za zaštitu ugroženih životinjskih vrsta te staništa važnih za očuvanje biološke raznolikosti. Izrada i provedba takvih planova nemoguća je bez znanstvenih podataka o prisutnosti i gustoći vrsta na određenom području. Taj zadatak nije lagan budući da su jedinke mnogih, prvenstveno ugroženih vrsta prisutne u malom broju te su teško dostupne proučavanju. Istraživačke metode kao što su hvatanje i manipuliranje životinjama u ovim su slučajevima teško izvedive i često odstupaju od etičkih načela. Znakovi prisutnosti kao izmet, urin ili dlaka često su jedini dostupan izvor podataka. Da bi se ti problemi nadvladali razvijena je neinvazivna genetička metoda koja kao predmet istraživanja koristi uzorke s malom količinom DNA kao što su izmet, dlaka, urin i različiti uzorci tkiva. Iz uzoraka se izolira mitohondrijska DNA (mtDNA) i pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR) umnaža dio koji se naziva kontrolna regija. Prisutnost PCR produkta provjerava se elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu.

Mitohondrijska DNA je prisutna u svim životinjskim tkivima, ima mali genom jednostavne strukture, nema nekodirajućih dijelova (introna) i ima različitu stopu evolucije u svojim pojedinim dijelovima, što omogućava rješavanje filogenetskih pitanja na različitim taksonomskim razinama (ZHANG i HEWITT, 1996.). Vrlo je značajan dio genoma i nalazimo je u svakoj stanici sa 0.0006% ili 1% ukupne mase stanične DNA (CABLES, 2001.). MtDNA je kružna, dvolančana DNA molekula veličine između 15 000 i 20 000 parova baza (bp). Sadrži 37 gena, od čega 22 tRNA gena, 2 rRNA gena, 13 gena koji kodiraju za proteine uključene u transport elektrona i oksidativnu fosforilaciju. Kontrolna regija je nekodirajući dio mtDNA dužine oko 1000 bp sa sekvencama koje djeluju u začetku

replikacije i transkripcije mitohondrijskog genoma (HARRISON, 1989.; ODAK, 2004.). U kontrolnoj regiji nalazi se D – petlja (D – loop), trolančana struktura koja nastaje tijekom replikacije, a često se taj naziv upotrebljava i kao sinonim za kontrolnu regiju (TABERLET, 1996., WHITE i sur., 1998.). MtDNA podložna je brzom evoluciji i izuzetno je vrijedan genetski marker u populacijskoj i evolucijskoj biologiji. Dok su geni za rRNA molekulu izuzetno konzervativni, područje kontrolne regije često je podložno promjenama (SHEDLOCK i sur.,1992.). Dijelovi kontrolne regije evoluiraju četiri do pet puta brže od ostatka molekule mtDNA, što kontrolnu regiju čini jednom od najvarijabilnijih dijelova mtDNA (TABERLET, 1996., PAGE i HOLMES, 1998.). Velika varijabilnost objašnjava se time što jedan od dva lanca zavojnice biva premješten sintezom novog lanca tijekom replikacije. Kontrolna regija ne kodira za sintezu proteina i zbog toga ne podliježe prirodnoj selekciji, još jedan od razloga zbog kojeg je pogodna za filogenetska istraživanja.

Početnica je kratak, sintetizirani oligonukleotid koji se koristi u molekularnim istraživanjima. Izrađene su da prepoznaju točno određeni slijed nukleotida u DNA, koji zatim služi kao kalup na koji djeluje DNA polimeraza i umnaža željeni dio lanca. Jedan od najvažnijih čimbenika za uspješno umnažanje DNA je pravilan dizajn početnice, koji omogućava vrsnu specifičnost.

Cilj ovoga rada je razvijanje neinvazivne metode za razlikovanje životinjskih vrsta iz uzoraka s malom količinom DNA. Da bi to postigli cilj nam je bio dizajnirati početnice za umnažanje kontrolne regije mtDNA različitih vrsta divljih životinja koje su najčešći stanovnici hrvatskih šuma (jelen, lisica, medvjed, vuk, srna i divlja svinja), a na temelju kojih bi iz pronađenih uzoraka mogli identificirati vrstu životinje koristeći samo izolaciju DNA, PCR i elektroforezu. Ta metoda bi olakšavala ekološka istraživanja i gospodarenje s određenim životinjskim vrstama.

## Materijali i metode

Za izradu početnica koristile smo sekvence mitohondrijske DNA ciljnih životinjskih vrsta iz genske baze podataka, GenBank, koja se nalazi na internet adresi: [www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/). U radu smo koristile po tri sekvence kontrolne regije mtDNA jelena (*Cervus elaphus*), lisice (*Vulpes vulpes*) i medvjeda (*Ursus arctos*) te četiri kontrolne regije mtDNA vuka (*Canis lupus*), srne (*Capreolus capreolus*) i divlje svinja (*Sus crofa*).

U tablici 1. navedena je vrsta životinje, identifikacijski broj u genskoj bazi, te zemljopisno područje iz kojeg potječu uzorci čije su sekvence korištene u ovom radu.

Tablica 1. Podaci o korištenim sekvencama preuzetim iz GenBank baze

oznaka životinje	identifikacijski broj GenBank baze	područje iz kojeg potječe uzorak	referenca
jelen 4	EU004016	Norveška	SKOG i sur., 2007.
jelen 3	EU004017	Norveška	SKOG i sur., 2007.
jelen 2	EU004018	Norveška	SKOG i sur., 2007.
divlja svinja 1	EU979215	Kina	WANG i sur., 2008.
divlja svinja 4	EU979212	Kina	WANG i sur., 2008.
divlja svinja 3	EU979213	Kina	WANG i sur., 2008.
divlja svinja 2	EU979214	Kina	WANG i sur., 2008.
lisica 3	AF338801	Francuska	VALIERE i sur., 2002.
lisica 1	AF338789	Francuska	VALIERE i sur., 2002.
lisica 4	AF338800	Francuska	VALIERE i sur., 2002.
medvjed 2	AB055141	Japan	MASUDA i sur., 2001.
medvjed 1	AB055136	Japan	MASUDA i sur., 2001.
medvjed 3	AB055139	Japan	MASUDA i sur., 2001.
srna 1	DQ114763	Španjolska	PAJARES i sur., 2005.
srna 2	DQ114760	Španjolska	PAJARES i sur., 2005.
srna 3	DQ114761	Španjolska	PAJARES i sur., 2005.
srna 4	DQ114762	Španjolska	PAJARES i sur., 2005.
vuk 1	FJ213916	SAD	STRAUGHAN i sur., 2008.
vuk 4	FJ213913	SAD	STRAUGHAN i sur., 2008.
vuk 3	FJ213914	SAD	STRAUGHAN i sur., 2008.
vuk 2	FJ213915	SAD	STRAUGHAN i sur., 2008.

Pomoću programskog dodatka u Microsoft Wordu, MBCS1.2, sekvence mtDNA pretvorile smo u fasta format, da bi ih mogle koristiti u daljnjoj obradi. Koristeći programe BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 7.0.9.0 (HALL, 1999.) i ClustlW Multiple alignment (THOMPSON i sur., 1994.), sekvence različitih životinja iste vrste smo usporedile međusobnim poravnanjem (multiple alignment). Pomoću internetskog programa „Primer 3“ [http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) izradile smo početnice poštujući pravila za dizajn početnica (INNIS i GELFAND, 1990.):

1. početnice bi trebale biti veličine 17-28 nukleotida
2. sadržaj G-C parova bi se trebao kretati oko 50-60%, izbjegavati duge A-T i G-C parove
3. na 3' kraju početnice preferira se G ili C dušična baza
4. temperatura denaturacije ( $T_m$ ) bi se trebala kretati između 55-80°C; razlika  $T_m$  između jednog para početnica može iznositi 2-3 °C
5. ako se na 3' kraju početnice nalaze  $\geq 3$  C ili G dušičnih baza, može doći do pogrešnog vezanja početnice na području bogatog G-C parovima
6. 3' krajevi početnica ne smiju biti komplementarni jer će inače doći do stvaranja dimera početnica
7. treba izbjegavati komplementarnost početnice samoj sebi koja može dovesti do stvaranja sekundarnih struktura kao što su ukosnice
8. na 5' kraju početnice preferira se 1 ili 2 G-C par, a na 3' kraju ne više od 1 G-C para.

## **Rezultati**

Koristeći kompjuterske programe i poštujući pravila za dizajn početnica, izradile smo početnice za umnažanje kontrolne regije mitohondrijske DNA jelena, lisice, medvjeda, vuka, srne i divlje svinje (Tablica 2 i Tablica 3).

Tablica 2. Specifične početnice za određene vrste sa slijedom nukleotida, temperaturom denaturacije, duljinom početnice te očekivanom duljinom PCR produkta.

Slijed nukleotida u početnici	Vrsta životinje	Tm °C	Duljina parova baza	Duljina PCR produkta
5' GTAAATCTTATGCGCTTATAG 3'	jelen	57.7	21	192
3' GGACGGGATATGCATGTT 5'		65.2	18	
5' GCCCATGCTCACACATAACTG 3'	divlja	70.0	21	185
3' GTCCCGTAACCATTGACTGA 5'	svinja	66.9	20	
5' CTTGCCCTATGTACGTCGTGC 3'	lisica	71.3	21	241
3' TAGAAACCCCCACGTTGACA 5'		69.8	20	
5' CTTATTTTCAGGCGTATGGTCT 3'	medvjed	64.5	21	52
3' AGCTCCCGGACTAAGTG 5'		62.1	17	
5' ACCCAATTATATACGCTACAT 3'	srna	59.2	21	218
3' GACTTAATGCGCTATG 5'		53.2	16	
5' GAATCACCCCTACTGTGCTAC 3'	vuk	64.7	21	74
3' GCCATTAATGCACGACGTAC 5'		67.5	20	

Početnice za jelena duge su 21 i 18 bp, vežu se na 78. i 120. mjesto te daju PCR produkt duljine 192 bp. Početnice za divlju svinju duge su 21 i 20 bp, vežu se na 485. i 155. mjesto te daju PCR produkt duljine 185 bp. Početnice za lisicu duge su 21 i 20 bp, vežu se na 25. i 299. mjesto te daju PCR produkt duljine 241 bp. Za medvjeda smo dizajnirale početnice duge 21 i 17 bp, koje se vežu na 134. i 220. mjesto a PCR produkt je dug 52 parova baza. Za srnu su početnice duge 21 i 16 bp, vežu se na 21. i 106. mjesto, s PCR produktom dugim 218 bp. Za vuka su dizajnirane vrsno specifične početnice duge 21 i 20 bp, vežu se na 68. i 157. mjestu, a PCR reakcija rezultira proizvodom dugim 74 parova baza.



Tablica 3. Sekvence mitohondrijske DNA ciljnih životinjskih vrsta iz genske baze podataka, GenBank. Vertikalni brojevi se odnose na mjesto u poravnatoj sekvenci mitohondrijske DNA.

Prikazan su samo varijabilna mjesta, dok crtica (-) označava identičnu bazu kao u prvoj sekvenci. Bojama su označene početnice.

	10	20	30	40	50	60	70	80
jelen 4	ATACAGCTTTCCACTCAACATCCATTTTACATTTTACATCCA-CTAACCACACAA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
jelen 3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
jelen 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lisica 3	C.GA.AT.C.TTTTAA.CT..T.CC.GACACCC--G...TA.-----G.TG-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lisica 1	C.GA.AT.C.TTTTAA.CT..T.CC.GACACCC--G...TA.-----G.TG-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lisica 4	C.GA.AT.C.TTTTAA.CT..T.CC.GACACCC--G...TA.-----G.TG-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
divlja svinja 1	T...TATC..TA.AA...A.AA-.CCCAT.AAA..G.GCA.-----A..T...	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
divlja svinja 4	T...TATC..TA.AA...A.AA-.CCCAT.AAA..G.GCA.-----A..T...	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
divlja svinja 3	T...TATC..TA.AA...A.AA-.CCCAT.AAA..G.GCA.-----A..T...	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
divlja svinja 2	T...TATC..TA.AA...A.AA-.CCCAT.AAA..G.GCA.-----A..T...	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
medvjed 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
medvjed 1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
medvjed 3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
srna 1	..T..T..GT.....T.C..A..ATATACGC.....AT.AT...T.....GCATGTAG..CG.....CGA..	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
srna 2	..T..T..GT.....T.C..A..ATATACGC.....AT.AT...T.....GCATGTAG..CG.....CGA..	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
srna 3	..T..T..GT.....T.C..A..ATATACGC.....AT.AT...T.....GCATGTAG..CG.....CGA..	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
srna 4	..T..T..GT.....T.C..A..ATATACGC.....AT.AT...T.....GCATGTAG..CG.....CGA..	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
vuk 1	C.GA.AT.C.T.TTAA.CT..T.CC.GATACCCCC.....T.....T.T.TTG-----A..CACCCC..	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
vuk 4	C.GA.AT.C.T.TTAA.CT..T.CC.GATACCCCC.....T.....T.T.TTG-----A..CACCCC..	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
vuk 3	C.GA.AT.C.T.TTAA.CT..T.CC.GATACCCCC.....T.....T.T.TTG-----A..CACCCC..	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
vuk 2	C.GA.AT.C.T.TTAA.CT..T.CC.GATACCCCC.....T.....T.T.TTG-----A..CACCCC..	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

  

	90	100	110	120	130	140	150	160
jelen 4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
jelen 3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
jelen 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lisica 3	CT...CCGC.-----CTCC-----C.TGCC---C-----CG-.C.G.....C.GC.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lisica 1	CT...CCGC.-----CTCC-----C.TGCC---C-----CG-.C.G.....C.GC.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lisica 4	CT...CCGC.-----CTCC-----C.TGCC---C-----CG-.C.G.....C.GC.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
divlja svinja 1	A...T...C-.AT.G.A.ACCA.A...TC...A...TA..CC-----CG-.C.G.....AT.GC..GT.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
divlja svinja 4	A...T...C-.AT.G.A.ACCA.A...TC...A...TA..CC-----CG-.C.G.....AT.GC..GT.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
divlja svinja 3	A...T...C-.AT.G.A.ACCA.A...TC...A...TA..CC-----CG-.C.G.....AT.GC..GT.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
divlja svinja 2	A...T...C-.AT.G.A.ACCA.A...TC...A...TA..CC-----CG-.C.G.....AT.GC..GT.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
medvjed 2	CTG.ACC..CGCAG...GTCCTC--G...ACT.T.TTCCCC.C.....C.G.....GCG.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
medvjed 1	CTG.ACC..CGCAG...GTCCTC--G...ACT.T.TTCCCC.C.....C.G.....GCG.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
medvjed 3	CTG.ACC..CGCAG...GTCCTC--G...ACT.T.TTCCCC.C.....C.G.....GCG.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
srna 1	T..CT.A.....T.....T.....T.....A.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
srna 2	T..CT.A.....T.....T.....T.....A.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
srna 3	T..CT.A.....T.....T.....T.....A.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
srna 4	T..CT.A.....T.....T.....T.....A.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
vuk 1	CTG.GC..C.TCAG...CTCCA--.....CCT.C.C.CC---C-----CG-.C.G.....GGCT.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
vuk 4	CTG.GC..C.TCAG...CTCCA--.....CCT.C.C.CC---C-----CG-.C.G.....GGCT.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
vuk 3	CTG.GC..C.TCAG...CTCCA--.....CCT.C.C.CC---C-----CG-.C.G.....GGCT.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
vuk 2	CTG.GC..C.TCAG...CTCCA--.....CCT.C.C.CC---C-----CG-.C.G.....GGCT.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

  

	170	180	190	200	210	220	230	240
jelen 4	TGCTTAT-AAGCATGTACTTTTATTATTATTACAGTACATA-GTACATGATGTTGTTTCATCGTACATAGCCGAT--TAAGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
jelen 3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
jelen 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lisica 3	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lisica 1	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lisica 4	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
divlja svinja 1	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
divlja svinja 4	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
divlja svinja 3	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
divlja svinja 2	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
medvjed 2	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
medvjed 1	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
medvjed 3	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
srna 1	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
srna 2	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
srna 3	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
srna 4	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
vuk 1	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
vuk 4	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
vuk 3	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
vuk 2	..A..T.....A.A.AC.-TA.ATA.T.....AG...AC.A.GT..A..T...ATAAT.T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

```

                250      260      270      280      290      300      310      320
jelen 4      CAAATCAATTCTTTGTCACACATGCATATCCCGTCCCTAGATCACGAGCTTGATCACCATGCCCGGTGAAACCAGCAACCC
jelen 3      .....
jelen 2      .....
lisica 3      .T.TCAGGAA.A.A.ATGAC...CG..A.T.AGT.C.--T.A.G.A..T.....T..A.....T..T..
lisica 1      .TGCAGGAG.A.A.ATGAC...CG..A.T.AGT.C.--T.A.G.A..T.....T..A.....T..T..
lisica 4      .T.TCAGGAG.A.A.ATGAC...CG..A.T.AGT.C.--T.A.G.A..T.....T..A.....T..T..
divlja svinja 1  ....-.C..CA.....A.CA..A.....A..CT.....
divlja svinja 4  ....-.....CA.....A.CA..A.....A..T.....
divlja svinja 3  ....-.....CA.....A.CA..A.....A..T.....
divlja svinja 2  ....-.C..CA.....A.CA..A.....A..T.....
medvjed 2      T..TGGTC..CA.G...T..T..A.T.AGT.CG--G---A.....G...T..A.....T..
medvjed 1      T..TAGTC..A.G...T..T..A.T.AGT.CG--G---G...T..A.....T..
medvjed 3      T..TGGTC..A.G...T..T..A.T.AGT.CG--G---G...T..A.....T..
srna 1      ....CG.C.....G.....A.....
srna 2      ....TG.C.....G.....A.....
srna 3      ....TG.C.....G.....A.....
srna 4      ....TG.C.....G.....A.....
vuk 1      .T-TCA.CAGT.G.-T.A.....A.T.AGT.C.A-T-----
vuk 4      .T.TCA.CAGT-AA.-C.A...C...A.T.AGT.C.A-T-----
vuk 3      .T-TCA.CAGT.G.-T.A.....A.T.AGT.C.A-T-----
vuk 2      .T-TCA.CAGT.G.-T.A.....A.T.AGT.C.A-T-----

```

```

                330      340      350      360      370      380      390      400
jelen 4      GC-TAGGCAGGGATCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAA-ATGTGGGGGTAGCTATTTAATGAATTTTATCAGACATCT
jelen 3      .....G-.C.....
jelen 2      .....-C.....
lisica 3      TTGCTC.A.-.T.....GTC.AC.....TT...C-.TG...C.A..C.T.G----
lisica 1      TTGCTC.A.-.T.....GTC.AC.....TT...C-.TG...C.A..C.T.G----
lisica 4      TTGCTC.A.-.T.....TC.AC.....TT...C-.TG...C.A..C.T.G----
divlja svinja 1  ...-T.....-CC.....TT...-G...C...A..G...
divlja svinja 4  ...-T.....-CC.....TT...-G...C...A..G...
divlja svinja 3  ...-T.....-CC.....TT...-G...C...A..G...
divlja svinja 2  ...-T.....-CC.....TT...-G...C...A..G...
medvjed 2      TTGCGA.T.C.TG.AT.....G-.A.....TT...G-TTGA..C.A..C.T.G....
medvjed 1      TTGCGA.T.C.TG.A.....GG-GG.....TT...G-TTGA..C.A..C.T.G....
medvjed 3      TTGCGA.T.C.TG.A.....GG-GG.....TT...G-TTGA..C.A..C.T.G....
srna 1      ...-T.....G.....
srna 2      ...-T.....C.....G.....
srna 3      ...-T.....C.....G.....
srna 4      ...-T.....C.....G.....
vuk 1      -----
vuk 4      -----
vuk 3      -----
vuk 2      -----

```

```

                410      420      430      440      450      460      470      480
jelen 4      GGTTCTTT-----
jelen 3      -----
jelen 2      -----
lisica 3      -----
lisica 1      -----
lisica 4      -----
divlja svinja 1  .....ACTTCAGGACCATCTCACCTAAAATCGCCCACTCTTCCCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTA
divlja svinja 4  .....ACTTCAGGACCATCTCACCTAAAATCGCCCACTCTTCCCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTA
divlja svinja 3  .....ACTTCAGGACCATCTCACCTAAAATCGCCCACTCTTCCCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTA
divlja svinja 2  .....ACTTCAGGACCATCTCACCTAAAATCGCCCACTCTTCCCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTA
medvjed 2      .....ACTTCAGGCCATGATAGCTCTAGACTCCAATCCTACTGACT-----
medvjed 1      .....ACTTCAGGCCATGATAGCTCTAGACTCCAATCCTACTAACC-----
medvjed 3      .....ACTTCAGGCCATGATAGCTCTAGACTCCAATCCTACTAACC-----
srna 1      -----
srna 2      -----
srna 3      -----
srna 4      -----
vuk 1      -----
vuk 4      -----
vuk 3      -----
vuk 2      -----

```

```

                490      500      510      520
jelen 4      -----
jelen 3      -----
jelen 2      -----
lisica 3      -----
lisica 1      -----
lisica 4      -----
divlja svinja 1  ATCAGCCCATGCTCACACATAACTGAGGTTTCATACATTT
divlja svinja 4  ATCAGCCCATGCTCACACATAACTGAGGTTTCATACATTT
divlja svinja 3  ATCAGCCCATGCTCACACATAACTGAGGTTTCATACATTT
divlja svinja 2  ATCAGCCCATGCTCACACATAACTGAGGTTTCATACATTT
medvjed 2      -----
medvjed 1      -----
medvjed 3      -----

```

## **Rasprava**

Cilj našeg rada bio je dizajnirati vrsno specifične početnice za umnažanje kontrolne regije mtDNA različitih vrsta divljih životinja koje su najčešći stanovnici hrvatskih šuma (jelen, lisica, medvjed, vuk, srna i divlja svinja), a na temelju kojih bi iz pronađenih uzoraka mogli identificirati vrstu životinje koristeći samo izolaciju DNA, PCR i elektroforezu. Neinvazivne metode za identifikaciju životinjskih vrsta većinom se temelje na detekciji DNA sekvenci, kroz sekvencioniranje i filogenetsku analizu (FARELL i sur. 2000.). Pri tome se najčešće koriste početnice dizajnirane za sekvencioniranje regije koja je konzervirana među različitim vrstama, tako da početnice nisu vrsno specifične i PCR se ne može potvrditi pripadnost vrsti, već je potrebno sekvencionirati PCR produkt i provesti filogenetsku analizu. Izradom vrsno specifičnih početnica htjele smo olakšati i ubrzati identifikaciju životinjskih vrsta koje su najbrojnije u hrvatskim šumama, a da se pri tome mogu koristiti uzorci dobiveni neinvazivnim putem (bez direktnog kontakta sa životinjom) i uzorci s malom količinom DNA. Dakle, upotrebom vrsno specifičnih početnica omogućuje se identifikacija vrste samo pomoću PCR reakcije, a izostavlja se skuplje i dugotrajnije sekvencioniranje. Osim istraživanja prisutnosti i gustoće životinjskih vrsta na određenom području, ova metoda je posebno korisna i za analizu prehrane mesoždera iz uzoraka izmeta, u kojem se DNA donorske vrste, plijena, mikroorganizama, a često i parazita i člankonožaca pojavljuju zajedno a i potrebno je obraditi veliki broj uzoraka. Analiza takvih uzoraka klasičnim metodama neprecizna je, dugotrajna i često rezultira lažno negativnim rezultatom. No ako se pri analizi prehrane iz izmeta koristite vrsno specifične početnice za identifikaciju različitih životinjskih vrsta rezultati će biti iznimno precizni. Ovakve početnice mogu imati i široku primjenu u forenzici, te u slučajevima kada je predmet istraživanja mala količina tkiva u kojem je došlo do razgradnje DNA.

Početnice koje smo izradile specifične su za određenu životinjsku vrstu, što uvelike pridonosi evolucijskim istraživanjima, u ekologiji, zaštiti i gospodarenju pojedinim divljim vrstama. Tako su PALOMARES i sur. (2002.) dizajnirali 4 vrsno specifična primera za istraživanja iberijskog risa, što je uvelike unaprijedilo istraživanje i zaštitu te ugrožene vrste (JOHNSON i sur., 2004.; PERTOLDI i sur., 2005.). Vrsno specifične početnice za umnažanje citokroma b mitohondrijske DNA dizajnirane su za zvijeri Iberijskog poluotoka (FERNANDES i sur., 2008.), dok su početnice u ovom radu prve vrsno specifične početnice za umnažanje kontrolne regije mitohondrijske DNA hrvatskih divljih životinja.

### **Zaključci**

1. Dizajnirano je 6 parova početnica specifičnih za umnažanje kontrolne regije mitohondrijske DNA jelena, lisice, medvjeda, vuka, srne i divlje svinje.
2. Pomoću izrađenih početnica moguće je identificirati životinjsku vrstu koristeći samo izolaciju DNA, PCR i elektroforezu, što omogućuje brže i jeftinije istraživanje.
3. Početnice imaju široku primjenu u ekološkim istraživanjima, istraživanjima prehrane te u forenzičkim slučajevima.

### **Zahvala**

Zahvaljujemo se našem mentorima dr. sc. Tomislavu Gomerčiću, dr. vet. med. i Magdi Sindičić dr. vet. med. na strpljenju, stručnom i tehničkom vodstvu pri izradi ovog rada.

## Literatura

CABLES, L. (2001): Mitochondria. Horsepower.

<http://homepages.ihug.co.nz/~lcables/mitochondria.htm>

FARRELL, L. E., J. ROMAN, M. E. SUNQUIST (2000): Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology* 9, 1583–1590.

FERNANDES, C. A., C. GINJA, I. PEREIRA, R. TENREIRO, M. W. BRUFORD, M. SANTOS-REIS (2008): Species-specific mitochondrial DNA markers for identification of non-invasive samples from sympatric carnivores in the Iberian Peninsula. *Conservation genetics* 9,691-690.

HALL, T. A. (1999.): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41,95-98.

HARRISON, G. (1989): Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolution biology. *Tree* 4,6 – 12.

INNIS M. A., GELFAND D.H. (1990): Optimization of PCRs. U: Innis, Gelfand, Sninsky, White (ur.):PCR Protocols. Academic Press, New York, str. 3-12.

JOHNSON W. E., J. A. GODOY, F. PALOMARES, M. DELIBES, M. FERNANDES, E. REVILLA, S. J. O'BRIEN (2004): Phylogenetic and Phylogeographic analysis of Iberian lynx population. *Journal of heredity* 95,19-28.

ODAK, T. (2004.): Molekularno-biološka obilježja endemske Mekousne pastreve (*Salmothymus obtusirostirs salonitana*). Magistarski rad. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

PAGE, R. D. M., E. C. HOLMES (1998.): *Molecular evolution a phylogenetic approach*. Oxford University press. Oxford.

PALOMARES, F., J. A. GODOY, A. PIRIZ, S. J. O'BRIEN, W. E. JOHNSON (2002.):

- Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for Iberian lynx. *Molecular ecology* 11, 2171–2182.
- PAUK, M. (2007.): Određivanje slijeda kontrolne regije mitohondrijske DNA dobrog dupina *Tursiops truncatus*. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- PERTOLDI, C., R. GARCÍA-PEREA, J. A. GODOY, M. DELIBES, V. LOESCHCKE (2005): Morphological consequences of range fragmentation and population decline on the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Journal of Zoology* 268,73-86.
- SHEDLOCK, A. M., J. D. PARKER, D. A. CRISPIN, T. W. PIETSCH, G. C. BURMER (1992): Evolution of the salmonid mitochondrial control region. *Molecular phylogenetics and evolution* 1, 179 – 192.
- TABERLET, P. (1996.): The use mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. In: *Molecular genetics approaches in conservation* (T. B. Smith, R. K. Wayne, urednici). Oxford University press. New York, Oxford. pp. 125–142
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, T. J. GIBSON (1994.): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- WHITE, P. S., O. L. TATUM, H. TEGELSTROM, L. D. DENSMORE III (1998): Mitochondrial DNA isolation, separation and detection of fragments. U: *Molecular genetic analysis of population* (A. R. Hoelzel, urednik). Oxford University press. New York. pp. 65–101.
- ZHANG D-X, G. M. HEWITT (1996.): Nuclear intergrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in ecology and evolution* 11,247–251.

## Izrada vrsno specifičnih početnica za umnažanje mitohondrijske DNA divljih životinja Hrvatske

LANA PAĐEN I IVANA SADARIĆ

Zavod za biologiju, patologiju i uzgoj divljači Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

---

### PAĐEN, L. i I. SADARIĆ (2009): Izrada početnica za umnažanje mitohondrijske DNA i razlikovanje divljih životinja Hrvatske

#### Sažetak

Cilj ovog rada je bio izraditi vrsno specifične početnice za vuka (*Canis lupus*), lisicu (*Vulpes vulpes*), medvjeda (*Ursus arctos*), srnu (*Capreolus capreolus*), jelena (*Cervus elaphus*) i divlju svinju (*Sus crofa*). Početnice su dizajnirane temeljem sekvenci navedenih životinjskih vrsta uzetih iz genske baze podataka GenBank te uz korištenje kompjuterskih programa BioEdit i Primer 3. Određena je duljina početnica, mjesto vezivanja i duljina PCR produkta za svaku navedenu vrstu. Pomoću dobivenih vrsno specifičnih početnica životinjske vrste se mogu identificirati iz minimalnih količina različitih tkiva koristeći se samo izolacijom DNA, PCR reakcijom i elektroforezom, tako da imaju široku primjenu u mnogim ekološkim istraživanjima i forenzičkim slučajevima.

**Ključne riječi:** početnica, mitohondrijska DNA, kontrolna regija, vuk, lisica, medvjed, srna, jelen, divlja svinja

---

## **Design of species specific primers for amplification of mitochondrial DNA of Croatian wild animals**

**LANA PAĐEN I IVANA SADARIĆ**

Department for game biology, pathology and breeding Faculty of Veterinary Medicine  
University of Zagreb

---

### **PAĐEN, L. and I. SADARIĆ (2009): Design of species specific primers for amplification of mitochondrial DNA of Croatian wild animals**

#### **Abstract**

The goal of this paper was to design species specific primers for wolf (*Canis lupus*), fox (*Vulpes vulpes*), bear (*Ursus arctos*), roe deer (*Capreolus capreolus*), red deer (*Cervus elaphus*) and wild boar (*Sus crofa*). Primers have been designed using sequences of the listed species from GenBank, using software BioEdit and Primer 3. We have defined the size and location of primers for each species, and size of the PCR product. With this species specific primers animal species can be identified using minimal quantities of different tissues using only DNA isolation, PCR and electrophoresis, so they can be used in a variety of ecological researches and in forensic cases.

**Ključne riječi:** primer, mitochondrial DNA, control region, wolf, fox, brown bear, roe deer, red deer, wild boar

---