

Sveučilište u Zagrebu
Veterinarski fakultet

Ines Vranešević i Tajma Trupec

Kreiranje vrsno specifičnih početnica za umnažanje
mitohondrijske DNA jelena lopatara (*Dama dama*)

Zagreb, 2010.

Ovaj rad izrađen je na 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 Magde Sindičić, dr. vet. med. i dr. sc. Tomislava Gomerčića i predan je na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2009./2010.

Sadržaj

Uvod	1
Hipoteza	2
Materijali i metode	3
Rezultati	4
Rasprava	7
Zaključci	8
Zahvala	9
Literatura	10
Sažetak	12
Summary	13

Uvod

Temelj istraživanja, upravljanja i zaštite životinjskih vrsta i njihovih staništa je prikupljanje podataka o prisutnosti vrsta na određenom području. Uzorci poput komadića kosti, sasušenog tkiva, izmeta, dlaka i perja često su jedini dokazi prisutnosti vrste, a takvim uzorcima vrlo je teško morfološki identificirati kojoj vrsti pripadaju već je najpouzdaniji način identifikacije pomoću DNA.

Važnost identifikacije vrste iz uzoraka DNA vidljiva je i prilikom provođenja kontrole mesnih namirnica u prehrambenoj industriji. Naime, meso divljači potencijalna je meta za netočna etiketiranja u svrhu većeg profita, što rezultira prodajom jeftinijeg mesa umjesto kvalitetnijeg i skupljeg (BRODMANN i sur., 2001.). Netočno etiketiranje hrane životinjskog podrijetla predstavlja komercijalnu prijevaru i uzrokuje potencijalne zdravstvene probleme potrošača osjetljivih na alergene koji nisu prethodno jasno otisnuti na etiketama, a dolazi i do problema kod prehrambene restrikcije iz vjerskih razloga (FAJARDO i sur., 2007b.). Meso divljači smatra se delikatesom i zahtijeva višu cijenu zbog karakterističnog i intenzivnog okusa, niže razine masnoće i kolesterola, a visoke razine viših masnih kiselina te činjenice da divljač nije tretirana hormonima i steroidima (FAJARDO i sur., 2008b.). Sve to upućuje na potrebu za pouzdanim i jednostavnim metodama razlikovanja mesa domaćih životinja od divljači u svrhu zaštite potrošača (PFEIFFER i sur., 2004.)

Tijekom posljednja dva desetljeća lančana reakcija polimerazom (PCR) i sekvencioniranje DNA, kao osnovne istraživačke metode u molekularnoj genetici, postale su učinkovite i ekonomski prihvatljive širem krugu znanstvenika (AVISE, 2004.). Stoga je danas najrašireniji i najprecizniji način identifikacije vrsta analiza DNA putem metoda molekularne genetike. Identifikacija se temelji na izolaciji DNA, umnažanju određenog dijela DNA (najčešće mitohondrijske DNA) pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR), te sekvencioniranju PCR produkta tj. određivanju slijedova nukleotida. Slijedovi nukleotida se zatim analiziraju pomoću računalnih programa i uspoređuju s referentnim sekvencama, na temelju kojih se određuje pripadnost vrsti (AVISE, 2004.).

Mitohondrijska DNA (mtDNA) je kružna dvolančana DNA molekula koja se sastoji od 15 000 do 20 000 parova baza (pb). Haploidna je, nema introna (nekodirajućih dijelova), a nasljeđuje se od majke. Sastoji se od 37 gena od čega 13 gena kodira za proteine koji sudjeluju u procesima transporta elektrona i oksidativne fosforilacije. Mjesto u kojem započinje replikacija i transkripcija mitohondrijskog genoma naziva se kontrolna regija. Kod kralježnjaka se u kontrolnoj regiji nalazi D-petlja, trolančana struktura, po kojoj se kontrolna regija vrlo često u literaturi i naziva (TABERLET, 1996.; WHITE i sur., 1998.). Kontrolna regija se sastoji od oko 1 000 parova baza, taj dio je nekodirajući i time nije podložan prirodnoj selekciji, što ga čini vrlo dobrim genetskim markerom u rješavanju filogenetskih pitanja. Mitohondrijska DNA podložna je brznoj evoluciji, tako da je kod sisavaca brzina evolucije mtDNA i do 10 puta veća nego kod jezgrinih gena, a u mitohondrijskoj DNA najbrže evoluirala kontrolna regija i to 4-5 puta brže od ostatka molekule (TABERLET, 1996.; PAGE i HOLMES, 1998.). Zbog toga je mtDNA dobar marker za razlučivanje promjena na nižim taksonomskim razinama, tj. između vrsta ili čak populacija (ZHANG i HEWITT, 1996.).

Početnica (primer) je kratak, sintetizirani oligonukleotid izrađen da prepozna točno određeni slijed nukleotida u DNA, koji zatim tijekom PCR reakcije služi kao kalup na koji djeluje DNA polimeraza i umnaža željeni dio lanca. Početnice mogu biti i vrsno specifične što nam omogućava uspješno umnožavanje DNA samo ciljane vrste.

Cilj našeg istraživanja je izrada vrsno specifičnih početnica za identifikaciju jelena lopatara (*Dama dama*) i razvijanje genetičke metode za razlikovanje jelena lopatara od ostalih vrsta punorožaca koji obitavaju u Hrvatskoj - jelena običnog (*Cervus elaphus*) i srne (*Capreolus capreolus*). U znanstvenoj literaturi do sada nisu poznate vrsno specifične početnice za identifikaciju jelena lopatara.

Hipoteza

Pretpostavlja se da je na temelju gena, primjenom lančane reakcije polimerazom moguće iz uzorka tkiva razlikovati jelena lopatara (*Dama dama*) od ostalih vrsta punorožaca koji obitavaju u Hrvatskoj, jelena običnog (*Cervus elaphus*) i srne (*Capreolus capreolus*). Smatramo da je moguće kreirati vrsno specifične početnice i razviti učinkovitu metodu za razlikovanje jelena lopatara od drugih vrsta životinja.

Materijali i metode

Analizirale smo 8 uzoraka mišićnog tkiva jelena lopatara (*Dama dama*), 3 jelena običnog (*Cervus elaphus*) i 3 uzorka mišića srne (*Capreolus capreolus*). Uzorci su potjecali od životinja odstrijeljenih tijekom komercijalnog lova u Hrvatskoj te su bili pohranjeni u 96% etanolu na -20°C . Za izolaciju DNA iz uzoraka mišića koristili smo komercijalni kit ChargeSwitch[®] gDNA Tissue Kits, Invitrogen koji brzo i efikasno izdvaja DNA iz tkiva. Izolacija DNA rađena je prema protokolu proizvođača.

Za kreiranje početnica koristile smo WEB aplikaciju za izradu početnica Primer-blast (ROZEN i SKALETSKY, 2000.), koja se nalazi na internet adresi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Sekvencu mitohondrijske DNA jelena lopatara (GenBank No: AF291895.1), na temelju kojih su kreirane početnice, preuzele smo iz genske baze podataka, GenBank, koja se nalazi na internet adresi www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/.

Parametri korišteni u WEB aplikaciji su:

PCR template: AF291895.1

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Organism: Homo sapiens, Cervus elaphus, Capreolus capreolus, Sus scrofa, Rupicapra rupicapra

Database: nr

Ostali programski parametri nisu mijenjani.

Nakon kreiranja vrsno specifičnih početnica, optimizirale smo PCR protokol. Cilj optimizacije je definirati optimalnu temperaturu pri kojoj se početnica vrsno specifično veže na lanac DNA, stoga smo napravile niz PCR reakcija na temperaturnom gradijentu od 57° do 71° C. Liofilizirane početnice su naručene iz Invitrogen[™]. Prije korištenja početnice su otopljene u deioniziranoj vodi, s ciljem dobivanja "stock" otopine koncentracije $100\ \mu\text{M}$, koja se može čuvati na -20° C. Kao radnu otopinu koristile smo smjesu obje početnice (10XPM), u kojoj je koncentracija svake početnice $2\ \mu\text{M}$.

Za pripremu PCR smjese korišten je komercijalni kit "Platinum[®] PCR SuperMix, Invitrogen". Umnažanje kontrolne regije mtDNA je rađeno u smjesi volumena $10\ \mu\text{L}$ koja je sadržavala: $1\ \mu\text{L}$ DNA, $1\ \mu\text{L}$ otopine početnica i $9\ \mu\text{L}$ Platinum[®] PCR SuperMix,

In vitro. PCR reakcije su provođene u plastičnim epruveticama od 0,2 ml, MicroAmp Reaction Tubes (8 Tubes/Strip) i MicroAmp Caps (8 Caps/Strip), Applied Biosystems. Reakcija se provodila koristeći uređaj GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems).

Elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu je provjereno da li je došlo da umnažanja PCR produkta pomoću vrsno specifičnih početnica. Gel je pripremljen otapanjem 0,75 g agaroze u 50 ml 1 X TBE pufera te zagrijavanjem do vrenja, sve dok se agarozna nije potpuno otopila. U agarozu je dodano 5 μ l "SYBR Safe Gel stain". Ohlađena otopina je prelivena u kalup te je postavljen češalj za jažice. Nakon polimerizacije gela na sobnoj temperaturi, na parafilmu je izmiješano 5 μ l PCR proizvoda i 2 μ l LB (engl. Loading buffer) pufera i nanoseno u jažice. Elektroforeza se odvijala na sobnoj temperaturi, pri konstantnom naponu od 90V, 30 min. Gel smo promatrale pomoću transiluminatora i fotografirale digitalnim fotoaparatom.

Rezultati

Koristeći se WEB aplikacijom za izradu početnica dizajnirale smo nekoliko teoretski vrsno specifičnih početnica za umnažanje dijela kontrolne regije mtDNA jelena lopatara (*Dama dama*) (Slika 1.). Za daljnji rad smo izabrale prvi par od tih teoretski dizajniranih početnica (Tablica 1.) te naručile njihovu izradu od vanjskog servisa.



Primer-BLAST Primer designing tool

NCBI/Primer-BLAST :results [more...](#)

- Warnings: The template sequence is from Dama dama, but the organism for specificity checking is limited to Homo sapiens, Cervus elaphus, Capreolus capreolus, Sus scrofa, Rupicapra rupicapra.

Input PCR template

[AF291895.1](#) Cervus dama mitochondrial D-loop, partial sequence

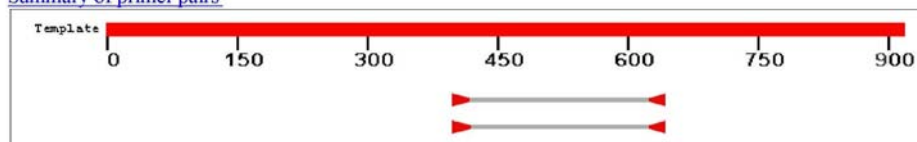
Range

1 - 916

Specificity of primers

Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) (Organism limited to Homo sapiens, Cervus elaphus, Capreolus capreolus, Sus scrofa, Rupicapra rupicapra)

[Summary of primer pairs](#)



[Detailed primer reports](#)

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Strandon template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	TCGCTCCGGGCCCATAGACT	Plus	20	399	418	59.11	65.00%
Reverse primer	GCTCCGGGTCGGGGCCTTAG	Minus	20	641	622	61.02	75.00%
Internal oligo		Plus					
Product length	243						

Slika 1. Rezultat dobiven korištenjem WEB aplikacije Primer-blast

Tablica 1. Specifične početnice za jelena lopatara sa slijedom nukleotida, duljinom početnica, temperaturom denaturacije te očekivanom duljinom PCR produkta

	Slijed nukleotida u početnici (5'→3')	Duljina početnica (pb)	Tm°C	Duljina PCR produkta (pb)
Uzvodna početnica	TCGCTCCGGGCCCATAGACT	20	59.11	243
Nizvodna početnica	GCTCCGGGTCGGGGCCTTAG	20	61.02	

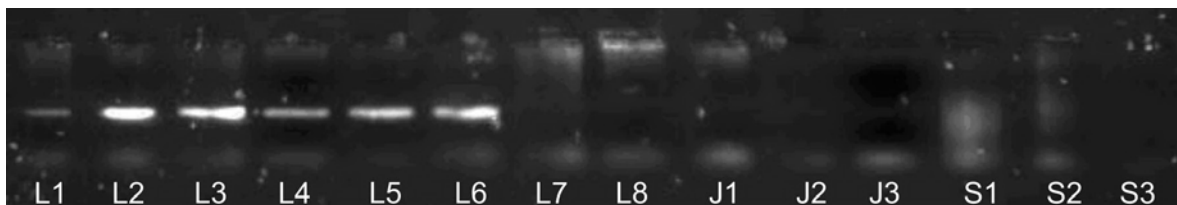
Početnice za jelena lopatara duge su 20 pb, vežu se na 399. i 641. mjesto kontrolne regije mtDNA jelena lopatara te daju PCR produkt duljine 243 pb.

Nakon testiranja PCR reakcija na temperaturnom gradijentu za spajanje početnica na denaturirani lanac DNA od 57° do 71°C rezultati su pokazali da se početnica optimalno specifično veže na temperaturi od 70° C (Tablica 2).

Tablica 2. Reakcijski uvjeti lančane reakcije polimerazom

	Temperatura (°C)	Vrijeme
Aktivacija polimeraze	92	2 min
Denaturacija kalupa	94	30 sek
Prianjanje početnica	70	30 sek
Produženje lanca	72	2 min
Završno produženje	72	10 min

Nakon definiranja optimalnog PCR protokola, istražili smo uspješnost dizajniranih početnica za razlikovanje jelena lopatara na 8 uzoraka DNA jelena lopatara, 3 uzorka jelena običnog i 3 uzorka srne. Elektroforezom na gelu smo utvrdile da je kod 6 od ukupno 8 uzoraka (75%) jelena lopatara dobiven PCR produkt, dok kod 3 uzorka jelena običnog i 3 uzorka srne nije dobiven PCR produkt (Slika 2.)



Slika 2. Prikaz agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata uzoraka jelena lopatara (L1-L6), jelena običnog (J1-J3) i srne (S1-S3)

Elektroforezom na gelu provjerile smo uspješnost izolacije DNA dva uzorka lopatara kod kojih nije dobiven PCR produkt i utvrdile smo da iz tih uzoraka DNA nije uspješno izolirana.

Rasprava

Ciljevi našeg rada bili su dizajnirati vrsno specifične početnice za umnažanje kontrolne regije mtDNA jelena lopatara, te optimizirati PCR protokol za korištenje tih početnica. Početnice se koriste za identifikaciju tkiva jelena lopatara i razlikovanje od ostalih vrsta, koristeći samo izolaciju DNA, PCR i elektroforezu. Takvim postupkom, u kojem se izostavlja skupo i dugotrajno sekvencioniranje, olakšavamo i ubrzavamo proces identifikacije životinjskih vrsta, te pri tom možemo koristiti uzorke dobivene neinvazivnim putem tj. uzorke s malom količinom DNA ili degradiranom DNA. Primjena ovakve metode je mnogostruka; osim istraživanja prisutnosti i gustoće populacije jelena lopatara na određenom području, koristeći dizajniranu početnicu moguće je vršiti analizu prehrane predatora iz uzoraka izmeta te analizu sastava mesnih prerađevina.

Specifičnom početnicom možemo precizno identificirati plijen na temelju DNA izolirane iz izmeta predatora, što je velika prednost pri usporedbi s konvencionalnim metodama (morfološka identifikacija dlaka i kostiju pronađenih u izmetu) koje su često neprecizne i dugotrajne.

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 (PAĐEN i SADARIĆ, 2009.)

Većina znanstvenih istraživanja kojima je cilj analiza mesa i mesnih prerađevina, a temelje se na PCR reakciji, do sada se bavila domaćim životinjama kao što su goveda, ovce, koze, svinje, purani i kokoši (GIRISH i sur., 2004.). Znatno je manje istraživanja koje se bave identifikacijom mesa divljači, iako tržište pokazuje sve veću potrebu za njima. Pokazalo se da je korištenje vrsno specifičnih početnica koje ciljaju točno određene kratke DNA fragmente odlična alternativa za utvrđivanje autentičnosti mesa, posebno kod uzoraka termički obrađene hrane ili mesa sastavljenog od dvije ili više životinjskih vrsta (kobasice, paštete, mljeveno meso itd.) (MONTIEL-SOSA i sur., 2000.). U prilog tome govore istraživanja koja su se temeljila na PCR-u i korištenju specifičnih početnica, a u svrhu analize mesa. Tako su FAJARDO i sur. (2007a.) dizajnirali tri vrsno specifične početnice za razlikovanje divokoze (*Rupicapra rupicapra*),

kozoroga (*Capra ibex*) i muflona (*Ovis musimon*). Isti tim znanstvenika (FAJARDO i sur. 2008a.) je također proveo istraživanje vršno specifičnih početnica za razlikovanje divlje (*Sus scrofa scrofa*) i domaće svinje (*Sus scrofa domestica*) ciljajući D - petlju kontrolne regije mitohondrijske DNA i jezgrine melanokortin-receptor 1 (MC1R) gene. PCR ima sposobnost selektivnog spajanja početnice na specifičan dio DNA u mnoštvu filogenetski sličnih dijelova DNA i među uzorcima različitih životinjskih vrsta. Uspoređujući je s ostalim metodama, PCR sa specifičnim početnicama je jeftinija, brža i pogodnija metoda za rutinske analize velikog broja uzoraka (HERMAN, 2001.).

Tijekom ovog istraživanja ustanovljen je i nedostatak ove metode - u slučaju dobivanja negativnih rezultata nakon elektroforeze, nemoguće je sa sigurnošću zaključiti da li izolirana DNA ne pripada jelenu lopataru ili izolacija DNA nije uspjela. Taj nedostatak bi se prevladao korištenjem para početnica koje bi se sigurno vezale na DNA svih životinjskih vrsta (umnaža se konzervativni dio DNA zajednički npr. svim sisavcima), a služile bi kao kontrola, odnosno dokaz da je izolacija DNA iz tkiva uspjela.

Zaključci

1. Dizajniran je jedan par početnica specifičnih za umnožavanje kontrolne regije mitohondrijske DNA jelena lopatara (*Dama dama*).
2. Testiranjem PCR reakcija na temperaturnom gradijentu za spajanje početnica na denaturirani lanac DNA od 57° do 71°C dobivena je optimalna temperatura od 70°C.
3. Široka je primjena dizajnirane početnice u ekološkim istraživanjima, istraživanjima prehrane predatora, u forenzičkim slučajevima i u kontroli mesnih namirnica u prehrambenoj industriji.

Zahvala

Zahvaljujemo prof. dr. sc. Đuri Huberu što nam je omogućio izradu ovog rada u Laboratoriju za molekularnu biologiju na Zavodu za biologiju te financijski pomogao izradu rada. Zahvaljujemo prof. dr. sc. Zdravku Janickom i dr. sc. Deanu Konjeviću na pomoći u nabavi uzoraka. Posebna zahvala Magdi Sindičić dr. vet. med. i dr. sc. Tomislavu Gomerčiću na strpljenju, stručnom i tehničkom vodstvu pri izradi ovog rada.

Literatura

- AVISE, J. C. (2004): The hope, hype, and reality of genetic engineering. Oxford University Press. New York. USA.
- BRODMANN, P. D., G. NICHOLAS, P. SCHALTENBRAND, E. C. ILG (2001): Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool search. *Eur Food Res Technol.* 212, 491-496.
- FAJARDO, V., I. GONZÁLEZ, I. LÓPEZ-CALLEJA., I. MARTÍN, M. ROJAS, T. GARCÍA, P. E. HERNÁNDEZ, R. MARTÍN (2007a): PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D – loop region. *Meat Sci* 76, 644-652.
- FAJARDO, V., I. GONZALÉZ, I. LÓPEZ-CALLEJA, I. MARTÍN, M. ROJAS, P. E. HERNÁNDEZ, T. GARCÍA, R. MARTÍN (2007b): Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene, *Meat Sci* 76, 234-240.
- FAJARDO, V., I. GONZÁLEZ, I. MARTÍN, P. E. HERNÁNDEZ, T. GARCÍA, R. MARTÍN (2008a): Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and melanocortin receptor 1 (MC1R) genes. *Meat Sci* 78, 314-322.
- FAJARDO, V., I. GONZALÉZ, I. MARTÍN, M. ROJAS, P. E. HERNÁNDEZ, T. GARCÍA, R. MARTÍN (2008b): Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat Sci* 79, 289-298.
- GIRISH, P. S., A. S. R. ANJANEYULU, K. N. VISWAS, M. ANAND, N. RAJKUMAR, B. M. SHIVAKUMAR (2004): Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Sci* 66, 551-556.

- HERMAN, B. L. (2001): Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *J Dairy Res* 68, 429-436.
- MONTIEL-SOSA, J. F., E. RUIZ-PESINI, J. MONTOYA, P. ROCALÉS, M. J. LÓPEZ-PÉREZ, A. PÉREZ-MARTOS (2000): Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *J Agric Food Chem* 48, 2829-2832.
- PAĐEN, L., I. SADARIĆ (2009): Izrada vrsno specifičnih početnica za umnažanje mitohondrijske DNA divljih životinja Hrvatske. Studentski znanstveni rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- PAGE, R. D. M., E. C. HOLMES (1998): *Molecular Evolution – A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science. Oxford.
- PFEIFFER, I., J. BURGER, B. BRENIG (2004): Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and red deer by PCR-RFLP, *Genetics* 5., 30.
- ROZEN, S., H. J. SKALETSKY (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. U: Krawetz, S., S. Misener (urednici) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, str. 365-386.
- TABERLET, P. (1996): The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. U: *Molecular Genetic Approaches in Conservation* (Smith, T. B., R. K. Wayne, urednici). Oxford University Press. New York, Oxford. str. 125-142.
- WHITE, P. S., O. L. TATUM, H. TEGELSTRÖM, L. DENSMORE (1998): Mitochondrial DNA isolation, separation, and detection of fragments. U: *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach*. 2nd ed. (Hoelzel, A. R., urednik). Oxford University Press. Oxford. str. 65-101.
- ZHANG, D. X., G. M. HEWITT (1996): Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol Evol* 11, 247-251.

**Kreiranje vrsno specifičnih početnica za umnažanje
mitohondrijske DNA jelena lopatara (*Dama dama*)**

TAJMA TRUPEC I INES VRANEŠEVIĆ

Zavod za biologiju, patologiju i uzgoj divljači

Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu

**TRUPEC, T., VRANEŠEVIĆ I. (2010.): Kreiranje vrsno specifičnih početnica za
umnažanje mitohondrijske DNA jelena lopatara (*Dama dama*)**

Sažetak

Ciljevi našeg rada bili su dizajnirati vrsno specifične početnice za umnažanje kontrolne regije mitohondrijske DNA jelena lopatara (*Dama dama*), te optimizirati PCR protokol za korištenje tih početnica. Početnice su dizajnirane temeljem sekvenci jelena lopatara preuzetih iz genske baze podataka GenBank uz korištenje WEB aplikacije za izradu početnica. Određena je duljina početnica, mjesto vezivanja i duljina PCR produkta. Početnice se koriste za identifikaciju jelena lopatara i razlikovanje od ostalih vrsta, koristeći samo izolaciju DNA, PCR i elektroforezu. Upotreba početnica ispitana je na osam uzoraka jelena lopatara, tri uzorka jelena običnog i tri uzorka srne. Tako dizajnirane vrsno specifične početnice moguće je primjenjivati u ekološkim istraživanjima, istraživanjima prehrane predatora, u forenzičkim slučajevima i u kontroli mesnih namirnica u prehrambenoj industriji.

Ključne riječi: početnica, mitohondrijska DNA, PCR protokol, kontrolna regija, jelen lopatar

**Design of species specific primers for amplification of
fallow deer (*Dama dama*) mitochondrial DNA**

TAJMA TRUPEC AND INES VRANEŠEVIĆ

Department for game biology, pathology and breeding

Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb

**TRUPEC, T., VRANEŠEVIĆ I. (2010.): Design of species specific primers for
amplification of fallow deer (*Dama dama*) mitochondrial DNA**

Abstract

Goals of our work were to design species specific primers for amplification of control region of mitochondrial DNA for fallow deer (*Dama dama*) and to find optimal PCR protocol for application of those primers. Primers have been designed based on fallow deer sequences from GenBank using the WEB application for primer design. We have defined the size, location of and the size of the PCR product. With these specific primers fallow deer can be identified and distinguished from the other animal species using only DNA isolation, PCR and electrophoresis. Application of the primers has been tested on eight samples of fallow deer, three samples of roe deer and three reed deer samples. These species specific primers can be applied in ecological researches, researches of predators feeding habits, in forensic cases and in control of game meat products in food industry.

Key word: primer, mitochondrial DNA, PCR protocol, control region, fallow deer
