

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Željka Pezer

**Određivanje spola u nekih vrsta kitova (Cetacea)  
lančanom reakcijom polimerazom**

Diplomski rad

Zagreb, 2003.

Rad je izrađen u laboratoriju Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, pod vodstvom doc. dr. sc. Zorana Tadić i prof. dr. sc. Hrvoja Gomerčić, u sklopu znanstvenoistraživačkog projekta "Zdravstvene i ostale biološke osobitosti sisavaca Jadranskog mora" (053317, glavni istraživač H. Gomerčić) Ministarstva znanosti i tehnologije R. Hrvatske i uz Dopuštenje Ministarstva zaštite okoliša i prostornog uređenja R. Hrvatske, te uz financijsku pomoć Gesellschaft zur Rettung der Delphine e. V. iz Münchena.

Velika hvala prof. dr. sc. Hrvoju Gomerčić što mi je omogućio sudjelovanje u Projektu i izradu diplomskog rada.

Zahvaljujem se svom profesoru doc. dr. sc. Zoranu Tadić na ukazanom povjerenju, savjetima i zanimljivim predavanjima za vrijeme studija.

Mr. sc. Ivni Kocijan i mr. sc. Ani Galov dugujem neizmjernu zahvalnost za svu nesebičnu pomoć, beskrajnu strpljivost i pametne savjete koje su mi pružile tijekom eksperimentalnog rada i pisanja teksta.

Hvala Damiru Krunić, dipl. inž., Martini Đuras Gomerčić, dr. vet. med., Tomislavu Gomerčić, dr. vet. med., mr. sc. Damjanu Franjević, dr. sc. Srećku Jelenić, mr. sc. Brankici Mravinac, dr. sc. Nadi Oršolić i svima koji su na bilo koji način pomogli u izradi ovog rada.

Svim djelatnicima Zavoda za animalnu fiziologiju iskreno zahvaljujem na susretljivosti i gostoprimstvu.

I posljednja, ali najveća hvala mojoj obitelji na ljubavi i podršci.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Određivanje spola u nekih vrsta kitova (Cetacea) lančanom reakcijom polimerazom

Željka Pezer  
Zavod za animalnu fiziologiju, Rooseveltov trg 6, Zagreb  
Prirodoslovno-matematički fakultet

### SAŽETAK

Pri istraživanju biologije kitova znanstvenici često nailaze na probleme prilikom prikupljanja podataka na terenu. Ponekad nije moguće morfološki odrediti spol životinje čije je truplo pronađeno u uznapređovalom stanju truljenja. Također je teško ili čak nemoguće promatranjem u prirodi odrediti spol žive jedinke, budući da u većine vrsta kitova spolni dimorfizam nije izražen. Ovim istraživanjem pokušalo se uvesti pouzdanu molekularno-genetičku metodu kojom bi se određivao spol kitova na uzorcima tkiva uzetih s lešina, kao i na biopsijama kože. Ukupna DNA je izolirana iz mišićnog tkiva 49 jedinki; 27 dobrih dupina (*Tursiops truncatus*), 11 plavobijelih dupina (*Stenella coeruleoalba*), 7 glavatih dupina (*Grampus griseus*), 2 krupnozuba dupina (*Ziphius cavirostris*) i 2 velika sjeverna kita (*Balaenoptera physalus*). U jednom slučaju je DNA izolirana iz kože. Svi su uzorci uzeti s lešina različitih stupnjeva raspadanja. Lančanom reakcijom polimerazom uz tri oligonukleotidne početnice umnoženi su dijelovi ZFY i ZFX homolognih gena na Y- i X-kromosomima. Proizvodi reakcije, različite duljine i specifični za spol, razdvajani su elektroforezom u 1% agaroznom gelu. Uspješno je određen spol na 40 uzoraka. Pokazalo se da metoda nije primjenjiva u slučajevima raspadnutog tkiva, ali je pouzdana i učinkovita kad se primijeni na svježim ili dobro očuvanim uzorcima.

(28 stranica, 6 slika, 2 tablice, 31 literaturni navod, hrvatski jezik)

Ključne riječi: Cetacea, ZFY, ZFX, lančana reakcija polimerazom, određivanje spola

Voditelji: doc. dr. sc. Zoran Tadić i prof. dr. sc. Hrvoje Gomerčić

Ocjenjivači: doc. dr. sc. Zoran Tadić  
prof. dr. sc. Hrvoje Gomerčić  
doc. dr. sc. Tatjana Bakran-Petricioli  
prof. dr. sc. Dražena Papeš

Rad je prihvaćen u studenom 2003.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduate Thesis

## Sex determination in some Cetacean species by the polymerase chain reaction

Željka Pezer

Department of Animal Physiology, Rooseveltov trg 6, Zagreb  
Faculty of Science

### ABSTRACT

Investigations of cetacean biology often encounter problems in gaining information from the field. It is not always possible to morphologically determine sex of an animal whose carcass was found in an advanced state of decomposition. Determining the gender of living cetaceans is also difficult or impossible, since in most species sexually dimorphic characters are poorly marked. The purpose of this study was to introduce a reliable method for molecular sexing of cetaceans that could be used on tissue samples from carcasses, as well as on skin biopsies from living animals. Total DNA was extracted from muscle tissue of 49 cetacean specimens; 27 bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), 11 striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*), 7 Risso's dolphins (*Grampus griseus*), 2 Cuvier's beaked whales (*Ziphius cavirostris*) i 2 fin whales (*Balaenoptera physalus*). In one case DNA was extracted from skin. All samples were taken from corpses in different state of decomposition. The introduced method uses polymerase chain reaction (PCR) to amplify regions on ZFY and ZFX, which are the homologous genes located on Y- and X-chromosomes, respectively. Three oligonucleotide primers were employed to produce fragments specific for the ZFY and ZFX sequences. Amplification products differed in length and therefore gave distinct, sex-specific bands on 1% agarose gel after electrophoresis. The sex of 40 cetacean specimens was successfully determined. Method failed in cases of strongly decomposed tissues, but was shown to be reliable and efficient when applied on fresh or well preserved samples.

(28 pages, 6 pictures, 2 tables, 31 references, Croatian language)

Key words: Cetacea, ZFY, ZFX, polymerase chain reaction, sex determination

Supervisors: doc. dr. sc. Zoran Tadić and prof. dr. sc. Hrvoje Gomerčić

Reviewers: doc. dr. sc. Zoran Tadić  
prof. dr. sc. Hrvoje Gomerčić  
doc. dr. sc. Tatjana Bakran-Petricioli  
prof. dr. sc. Dražena Papeš

Thesis accepted: November 2003.

# SADRŽAJ

## 1.UVOD

<b>1.1. Spolna diferencijacija</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Spolna diferencijacija u sisavaca .....	1
1.1.2. Građa Y kromosoma .....	2
<b>1.2. ZFY/ZFX gen</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Kitovi (Cetacea)</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4. Metode određivanje spola</b> .....	<b>7</b>
1.4.1. Metode određivanja spola u kitova .....	8
<b>1.5. Cilj rada</b> .....	<b>10</b>

## 2.MATERIJAL I METODE

<b>2.1. MATERIJAL</b> .....	<b>11</b>
2.1.1. Standardne kemikalije.....	11
2.1.2. Otopine.....	11
2.1.3. Materijal za umnožavanje lančanom reakcijom polimerazom .....	12
2.1.4. Tkivo kitova .....	12
2.1.5. Krv .....	13
<b>2.2. METODE</b> .....	<b>14</b>
2.2.1. Sterilizacija pribora i materijala.....	14
2.2.2. Izolacija genomske DNA iz tkiva.....	15
2.2.3. Izolacija DNA sa FTA kartica .....	16
2.2.4. Provjera kakvoće izolirane genomske DNA na agaroznom gelu .....	17
2.2.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	17
2.2.6. Elektroforeza.....	19

## 3.REZULTATI

<b>3.1. Provjera kakvoće genomske DNA</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2. Određivanje spola</b> .....	<b>21</b>

<b>4.RASPRAVA</b> .....	<b>23</b>
-------------------------	-----------

<b>5.ZAKLJUČAK</b> .....	<b>25</b>
--------------------------	-----------

<b>6.LITERATURA</b> .....	<b>26</b>
---------------------------	-----------

## 1.UVOD

### 1.1. Spolna diferencijacija

Spol kod različitih vrsta određen je na različite načine. Poznato je da je spol kod vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) određen omjerom između broja X kromosoma i broja setova autosomalnih kromosoma. Kod mnogih opnokrilaca (mravi, pčele, ose) spol je određen ploidiom jedinke, gdje su mužjaci haploidni, a ženke diploidne. U nekih vodozemaca, gmazova i riba temperatura okoliša u kojem se jaja nalaze igra glavnu ulogu u diferencijaciji spola. Čak i otpadne tvari poput nekih fenolnih derivata u vodama, koje su stanište mnogih riba i vodozemaca, mogu znatno promijeniti spolnu strukturu njihove populacije (Uguz i sur. 2003). Međutim, kod sisavaca spol je određen isključivo genetički pomoću heteromorfnog para spolnih kromosoma.

Postoje četiri tipa mehanizama diferencijacije spola uz sudjelovanje spolnih kromosoma: XY, ZW, X0 i složeni kromosomski sustav. U XY sustavu ženke imaju homomorfni par kromosoma (XX), a mužjaci heteromorfni (XY); u sustavu ZW koji postoji kod ptica, nekih riba i leptira, mužjaci su homomorfni (ZZ), a ženke heteromorfne (ZW). Kod X0 sustava postoji samo jedan oblik spolnog kromosoma pa ženke obično imaju paran broj kromosoma (XX), a mužjaci (X0) neparan jer posjeduju samo jedan X kromosom (mnogi kukci). Neki oblici i kukci imaju složeni kromosomski sustav određivanja spola u kojem sudjeluje po nekoliko X i Y kromosoma.

#### 1.1.1. Spolna diferencijacija u sisavaca

Spolna diferencijacija u sisavaca je uređeni slijed događaja koji započinje utvrđivanjem genetskog (kromosomskog) spola i postepeno se nastavlja kroz dugi period od fetalnog života do puberteta, odnosno spolne zrelosti.

U sisavaca ženka je homogametni spol jer u svojim stanicama ima dva X kromosoma i proizvodi jajašca s jednim X kromosomom. Mužjak je heterogametni spol jer posjeduje X i Y kromosome i proizvodi dvije populacije spermija, od kojih jedna nosi X, a druga Y kromosome. Stoga je spol određen genetski već u trenutku oplodnje, ovisno o tome kojoj populaciji pripada spermij koji se spojio s jajašcem. Gonadni (primarni) spol je određen genetskim spolom i čim gonade završe svoju diferencijaciju počinju upravljati razvojem fenotipskih sekundarnih spolnih svojstava (Nagai 1992).

## 1. UVOD

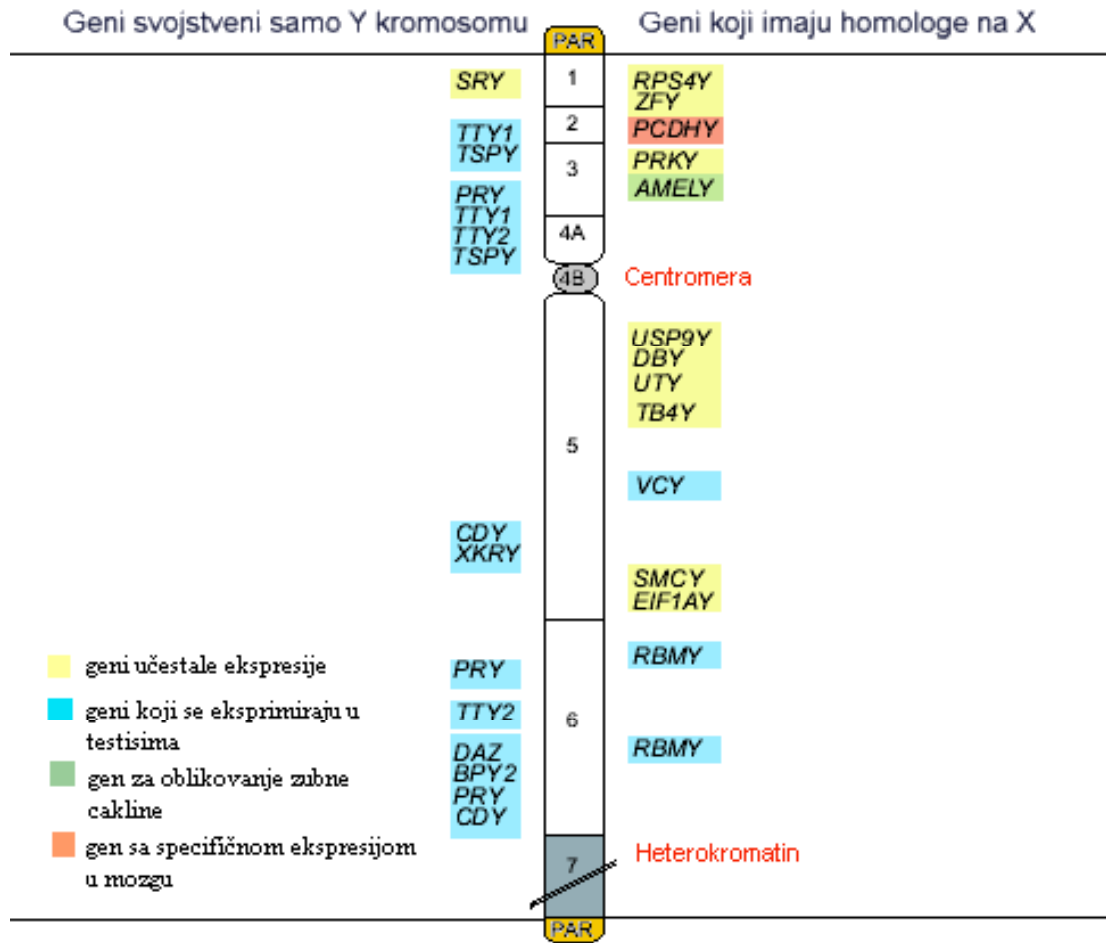
Danas se zna da je plan spolne diferencijacije u sisavaca u osnovi ženski. Stanice gonadnog zametnog tkiva su programirane da razviju jajnik. Međutim, u prisutnosti Y kromosoma razvija se sjemenik umjesto jajnika. Proučavanjem osoba s poremećajem u broju spolnih kromosoma utvrđeno je da se sjemenici neće razviti ako u stanici nije prisutan Y kromosom. Stoga je očito da Y kromosom sadrži neki čimbenik, nazvan TDF (engl. testis-determining factor), potreban za razvitak sjemenika. Ako se gonadni primordij razvije u sjemenike, razvit će se fenotipske značajke mužjaka, ali ne više pod izravnim utjecajem genske aktivnosti, već djelovanjem hormona proizvedenih u sjemenicima. Njihov razvitak iz gonadnog primordija ključan je trenutak u spolnoj diferencijaciji sisavaca, u kojoj TDF ima glavnu ulogu (Nagai 1992).

### 1.1.2. Građa Y kromosoma

Ljudski Y kromosom predstavlja 2 % genoma i velik je oko 60 Mb. Citogenetička istraživanja su pokazala da se sastoji od eukromatinskog područja koje obuhvaća cijeli kratki krak (p) i proksimalni dio dugog kraka (q) kromosoma te od heterokromatinskog područja koje čini centromerna regija i distalni dio dugog kraka (q).

Y kromosom posjeduje dvije tzv. pseudoautosomne regije (PAR) na samim krajevima svakog kraka u kojima je moguća rekombinacija između X i Y kromosoma za vrijeme mejoze u muškim spolnim stanicama, budući da se homologni geni iz tog područja nalaze i na X kromosomu (slika 1). Većinu kromosoma od 95 % čini nerekombinirajuća regija (NRY, engl. non-recombining region of Y). U toj regiji se nalazi i gen za cinkov prst nazvan ZFY gen. Do ZFY gena nalazi se SRY gen (engl. sex-determining region Y) za kojeg se smatra da bi mogao biti faktor koji određuje sjemenike, TDF. Eukromatin proksimalnog dijela dugog kraka (q) sadrži gene odgovorne za spermatogenezu, a distalna regija je inaktivni heterokromatin (Nagai 1992, Quintana Murci i sur. 2001).

# 1. UVOD



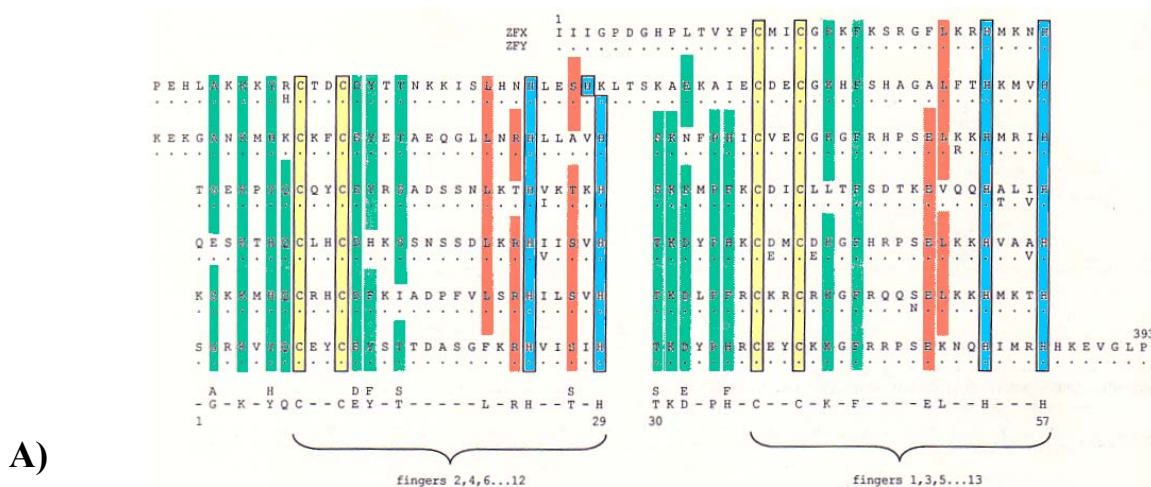
**Slika 1.** Shematski prikaz ljudskog Y kromosoma i položaj gena u nerekombinirajućoj regiji (NRY). Heterokromatin je označen sivom bojom. Od centromere prema gore: p-krak; prema dolje: q-krak

(preuzeto od Bachtrog i Charlesworth 2001)



## 1.2. ZFY/ZFX gen

ZFY gen (engl. zinc finger) se nalazi na kratkom kraku Y kromosoma u blizini pseudoautosomne regije, odmah uz SRY gen. Struktura i organizacija ZFY i ZFX gena nije u potpunosti istražena, no uočene su četiri regije na ljudskim ZFY i ZFX genima koje su evolucijski visoko sačuvane. Pretpostavlja se da sadrže jedan ili više eksona (ali nisu u potpunosti sastavljene od njih) s velikom sličnošću u sljedovima između Y i X kromosoma (Schneider-Gädicke i sur. 1989). Ranije se smatralo kako bi ovaj gen mogao biti dovoljan i nužan za induciranje diferencijacije bipotencijalnih gonada u sjemenike (Page i sur. 1987), no ta je teorija odbačena kad je otkriveno da postoje muškarci koji imaju deleciju ZFY gena.



## Slika 2.

A) Domena cinkova prsta ZFX i ZFY proteina

(preuzeto od Schneider-Gädicke i sur. 1989)

B) Shematski prikaz motiva cinkova prsta.  $\alpha$

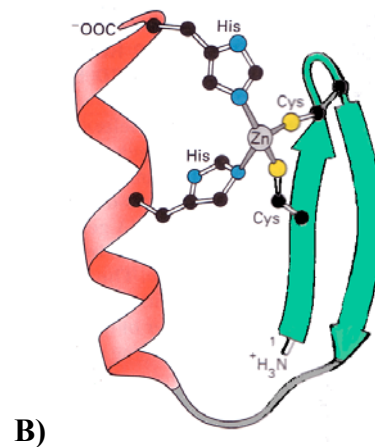
uzvojnica ima ključnu ulogu u prepoznavanju DNA

(preuzeto od Stryer 1997)

Cinkov ion je vezan na dva histidinska ostatka

uzvojnice (crveno) i dva cisteinska ostatka  $\beta$  nabrane

ploče (zeleno)



## 1. UVOD

Sekvenciranjem posljednjeg eksona ZFY gena pokazalo se da kodira protein s motivom cinkova prsta koji se uzastopno ponavlja 13 puta. Domena cinkova prsta ZFY/ZFX proteina sastoji se od šest i pol sekundarnih jedinica ponavljanja, sastavljenih od para prstiju, svaki 21 ili 22 ostatka dugačak, i od dviju poveznica (engl. linker) dugačkih sedam ili više aminokiselinskih ostataka (slika 2A). Evolucijski najočuvanija značajka motiva je par cisteina odvojen s 12 aminokiselinskih ostataka od para histidina, međusobno tetradarski raspoređeni oko središnjeg cinkovog kationa (slika 2B). Ostatak strukture čini DNA omču (Page i sur. 1987).

```

ZFX      1 ACITTTATATTCGCAAAGAACTGGAACAGAACTGGTTTGGAGCACTACATCTCTTTCTTTCTTTTCTTTTACGGA
ZFY      .AGC.T..A.AAAATTCATG.GGA..C.....G..T.A..A.....G.....C.....

1 I I I I G P D G H P L T V Y P C M I C G K K K F K S R G F L K R H M K N H P E H L A
75 ATAAITATGGCCCTGATGGACATCCCTTTGACTGTCTATCCTTGCATGATTTGTGGGAAGAGTTTAAAGTCGAGAGGTTTTTGAAAGGCCATGAAAACCATCCCGAACCCCTTCCG
.....T.....G.....A.....J.....

41 K K K Y B C T D C D Y T T N K K I S L H N H L E S H K L T S K A E K A I E C D E
195 AAGAGAAATACCCCTGTACTGACTGTGATTACACTACCAACAAGAAGATAAGTTTACACAACCCCTGGAGAGCCACAAGCTGACCAGCAAGGCAGAGAGGCCATGAATGGCATGAG
.....G...A.....T.....T.....

81 C G K H F S H A G A L F T H K M V H K E K G A N K M H K C K F C E Y E T A E Q G
315 TGTGGGAAGCATTTCCTCATGCGAGGGCTTTGTTACTCACAAAATGGTGCATAAGGAAAAGGAGCCAACAAAATGCACAAGTGAATCTGTGAAATACGAGACAGCTGAAGAAGGG
.....T.....G.....T.....

121 L L N R H L L A V H S K N F P H I C V E C G K G F R H P S E L K K H M R I H T G
435 TTATTTAATGCCACCTCTTGGCAGTCCACAGCAAGAACTTCCCTCATATTTIGTGTGGAGTGGTAAGGGTTTTCGTACCCTGACAGCTCAAAAAGCACATGAGAAATCCATACITGGG
.....A.....C..A.....G..A..G.G.....C.....C..C

161 E K P Y Q C Q Y C E Y R S A D S S N L K T H V K T K H S K E M P F K C O I C L L
555 GAGAAGCGTACCAATGCCAGTACTGCGAATATAGGCTCGAGACTTCTTAAGTTGAAAACGCATGCAAAAATAAGCATAGTAAAGAGATGCCATTCAAGTGTGACATTTGCTTCTGTG
.....A.....A.....A.....

201 T F S D T K E V Q Q H A L I H Q E S K T H Q C L H C D H K S S N S S D L K R H I
675 ACTTTCTCGGATACCAAGAGGTGCAGCAACTGCTCTTATCCACCAAGAAAGCAAAACACACCAGTGTTTGCAITGCCACCACAGAGTTCGAAGTCAAGTGAATTTGAAACGACACATA
.....A.....A.....G.....T.....

241 I S V H T K D Y P H K C D M C D K G F H R P S E L K K H V A A H K G K K M H Q C
795 ATTTCAAGTTCACAGAAAGACTACCCCATAGTGTGACATGTGTGATAAAGGCTTTCACAGGCCTTCAGAACTCAAGAAACAGCTGGCTGCCCAAGGGCAAAAATGCACCAAGTGT
.....T.....T.....G.....C..G.....T.....T.....T.....A..T.....A...

281 R H C D F K I A D P F V L S R H I L S V H T K D L P F R C K R C R K G F R Q Q S
915 AGACATTGTGACTTTAAGATTCAGATCCATTTCTTAAGTCCCATATTTCTCTCAGTTCACAAAAGGATCTTCCATTTAGGTGCAAGAGATGTAGAAAAGGATTTAGGCAACAGAGT
.....C.....A.....

321 E L K K H M K T H S G R K V Y Q C E Y C E Y S T T D A S G F K R H V I S I H T K
1035 GAGCTTAAAAGCATATGAAGACACAGTGGCAGGAAAGTGTATCAGTGTGAGTACTGTGAGTATAGCACTACAGATGCCTCAGGCTTTAAACGGCAGCTTATTTCCATTACACAGAAA
.....A.....

361 D Y P H R C E Y C K K G F R R P S E K N Q H I M R H H K E V G L P * 393
1155 GACTATCTCACCCTGTGACTACTGCAAGAAAGCTTCCGAAGACCTTCAGAAAAGAACCAGCACATAATGCGACATCATAAAGAAGTTGGCCCTGCCCTAAACAATCTTCTACAGAACG 1274
.....T.....A.....C.....T.....T.....G.GTG.....AGCTT

```

**Slika 3.** Nukleotidni slijed eksona ZFX i ZFY gena. Deset aminokiselinskih ostataka u kojima se razlikuju domene cinkova prsta ZFY i ZFX proteina su podcrtane u ZFX aminokiselinskom slijedu

(preuzeto od Schneider-Gädicke i sur. 1989)

Protein se veže na specifični slijed u DNA i djeluje kao transkripcijski faktor, točna funkcija kojeg nije poznata. Motiv cinkova prsta jedan je od evolucijski najočuvanijih

## 1. UVOD

motiva. Većina placentalnih sisavaca, osim miševa, imaju dva ZF alela: na Y i na X kromosomu (Nagai 1992). Građa ZFX na ljudskom X kromosomu je vrlo slična ZFY (slika 3), sličnost u nukleotidnom slijedu posljednjeg eksona je 95 % (Schneider-Gädicke i sur. 1989, Palmer i sur. 1990). Smatra se da su nastali iz zajedničkog ancestralnog gena prije 60 do 80 milijuna godina, prije radijacije placentalnih sisavaca (Page i sur. 1987).

### 1.3. Kitovi (Cetacea)

Kitovi su red sisavaca koji cijeli svoj život provode u vodi, zbog čega su razvili niz prilagodbi na takav način života. Taksonomski su podijeljeni u tri podreda – Archaeoceti (prakitovi), poznati samo iz fosilnih ostataka, i dvije skupine živućih kitova – Mysticeti (kitovi usani) i Odontoceti (kitovi zubani).

Iako su kroz povijest nađene i opisane mnoge vrste kitova u Jadranskom moru, jedino su obični i dobri dupini bili pravi stalni stanovnici Jadrana (Gomerčić i sur. 1998). Prije Drugog svjetskog rata brojčano je prevladavao obični dupin (*Delphinus delphis*) dok danas ovdje živi samo dobri dupin (*Tursiops truncatus*). Danas se zna da je dobri dupin jedini morski sisavac u Hrvatskoj. Procjenjuje se da je kod nas trajno nastanjeno oko 220 jedinki ove vrste dok ostale vrste dupina i kitova ovdje borave samo povremeno. Podaci su utemeljeni na višegodišnjem promatranju životinja u prirodi i fotodokumentaciji s terena (Gomerčić i sur. 1998).

Citogenetička istraživanja su pokazala značajnu genetsku jedinstvenost unutar reda kitova. Većina vrsta ima 44 kromosoma ( $2n$ ) i vrlo slične kariotipove. Vrste iz porodica Ziphiidae i Physteridae, te Balaenidae imaju  $2n = 42$  kromosoma (Árnason i sur. 1984). Visoko ponavljajuća satelitna DNA između vrsta iz podreda Odontoceti i Mysticeti vrlo je očuvana, što podupire teoriju o monofiletskom porijeklu ovih dviju skupina (Árnason i sur. 1984).

## 1. UVOD

### 1.4. Metode određivanje spola

Otkrića na polju molekularne tehnologije u posljednjih nekoliko godina otvorila su novo poglavlje u populacijskoj biologiji. Molekularne metode kojima znanost danas raspolaže pružaju uvid u odnose između jedinki, populacija i vrsta te omogućavaju praćenje onih vrsta koje je vrlo teško pratiti u prirodi (Haig 1998). Danas je modernim molekularnim analizama moguće dobiti informacije o jedinkama iz minimalnih količina njihovog genetskog materijala izoliranog iz kožnih biopsija (Caldwell i sur. 2002, Darling i Bérubé 2001). Kako istraživanje populacija u prirodi ima neizbježan popratni učinak na promjenu populacijske dinamike koji je teško predvidjeti, ili može promijeniti neke značajke koje istraživač pokušava istražiti, razvijaju se i razne neinvazivne metode uzorkovanja: sakupljanje izmeta (Kohn i Wayne 1997, Parsons 2001), dlake (Gilson i sur. 1998) pa čak i oljuštenih komadića kože kitova (Valsecchi i sur. 1998).

Za istraživanje populacija određene vrste životinja nužni podaci uključuju poznavanje spola pojedine jedinke. Utvrđivanje spola može biti otežano u nekim slučajevima, kao na primjer u ranoj embrionalnoj fazi, kod vrsta sa neizraženim sekundarnim spolnim značajkama ili u vrsta sa unutaršnjim gonadama (kitovi, ptice i dr.). U nekim skupinama životinja, kao što su mnogi gmazovi, vodozemci i ribe, spol jedinke ovisi o okolišu (temperaturi) u kojem je jaje bilo inkubirano, no u većine vrsta spol ima jasnu genetsku osnovu. Za takve vrste molekularni biljezi vezani za spolne kromosome predstavljaju moćno oruđe utvrđivanja spola (Avisé 1994).

Metode određivanja spola tradicionalno su bile usredotočene na citološke tehnike, no danas lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR) otvara mogućnost razvoju niza jednostavnih metoda za određivanje spola iz minimalnih količina genetskog materijala. Postoje dva pristupa u kojima se koristi PCR za spolno određivanje kod sisavaca: (I) umnožavanje fragmenata svojstvenih samo Y kromosomu i (II) umnožavanje homolognih fragmenata sa X i Y kromosoma. Prvi pristup zasniva se na umnožavanju SRY gena, gdje mužjak daje pozitivni rezultat na elektroforetskom gelu (Palsbøll i sur. 1992, Gilson i sur. 1998). Međutim, negativni rezultat ne potvrđuje nužno ženku, on može biti posljedica neuspjeha PCR reakcije iz mnogih razloga. Stoga je potrebno paralelno umnožavati kontrolnu regiju koja je najčešće dio mitohondrijske DNA ili ZFX gena (Palsbøll i sur. 1992, Gilson i sur. 1998). Međutim, takve kontrole često su se

## 1. UVOD

pokazale nepouzdanima (Fernando i Melnick 2001), budući da je teško uskladiti osjetljivost i optimalne uvjete za oba seta početnica u istoj reakciji.

Umnožavanje X i Y homolognih nizova je mnogo pouzdaniji pristup jer se u PCR ulazi s jednim setom početnica, a razlikovanje X i Y sljedova zahtijeva polimorfizam veličine fragmenata (Nakahori i sur. 1991) ili jedinstveno restrikcijsko mjesto (Aasen i Medrano 1990). U takvom pristupu koriste se gen za amelogenin (Nakahori i sur. 1991) i ZFY/ZFX geni (Aasen i Medrano 1990, Bérubé i Palsbøll 1996).

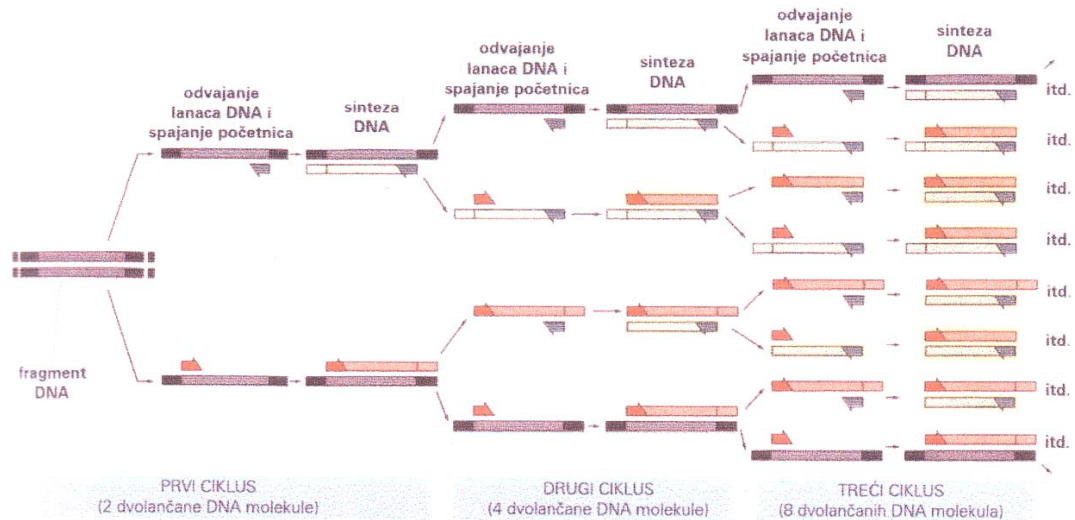
### 1.4.1. Metode određivanja spola u kitova

Spol kitova određuje se morfološki na mrtvim životinjama, no ponekad je truplo toliko raspadnuto ili su pronađeni samo dijelovi trupla (ostaci kože ili kostiju), da takvim jedinkama nije moguće morfološki odrediti spol. Također je teško, ili čak nemoguće, promatranjem u prirodnom okolišu odrediti spol žive jedinke, budući da u većine vrsta kitova spolni dimorfizam nije izražen. Fotodokumentacija u takvim slučajevima ne može poslužiti kao tehnika za spolno određivanje pa je potrebno sakupiti uzorke i primijeniti neku od molekularnih metoda određivanja spola.

Metoda kojom određujem spol u ovom radu se zasniva na lančanoj reakciji polimerazom, PCR (engl. polymerase chain reaction). PCR se temelji na denaturaciji dvolančane DNA, hibridizaciji komplementarnih početnica na DNA kalup i sintezi DNA pomoću termostabilne DNA polimeraze (Mullis 1990). Danas postoji mnogo različitih termostabilnih DNA polimeraza, dobivenih rekombinantim putem ili pročišćenih iz bakterija. U svom radu sam koristila jednu od najpoznatijih – Taq polimerazu iz vrste *Thermus aquaticus*. Enzim je optimalno aktivan na temperaturama između 70 i 80 °C, dok aktivnost gubi, ali se ne denaturira, iznad 90 °C. Pri povratku na niže temperature ponovo se aktivira. Osnovni princip lančane reakcije polimerazom prikazan je na slici 4.

PCR mi je poslužio za umnožavanje dijela posljednjeg eksona X-Y homologne regije za gen cinkova prsta, ZFY/ZFX. Bérubé i Palsbøll (1996) su dizajnirali tri početnice: ZFYX0582F prema slijedu ljudskog ZFX (Schneider-Gädicke i sur. 1989), a ZFY0767R i

## 1. UVOD



**Slika 4.** PCR, shematski prikaz (preuzeto od Alberts i sur. 1994)

ZFX0923R prema slijedu ZF regije kitova zubana, Odontoceti. Uzvodna oligonukleotidna početnica priliježe i ZFX i ZFY slijedu. 3'-kraj svake od dviju nizvodnih početnica pranja na mjesta koja imaju spolno specifične supstitucije. Stoga svaka od nizvodnih početnica umnožava (u kombinaciji s uzvodnom početnicom) samo ZFY ili ZFX slijed. Budući da te početnice pranjaju kalupu na različitim mjestima, umnožavaju se fragmenti različite veličine koje je potom moguće razdvojiti u elektroforetskom gelu.

Opisani postupak osigurava unutarnju kontrolu uspješnosti reakcije bez uporabe dodatnih početnica i bez razgradnje PCR proizvoda restriktivnim endonukleazama. Metoda se oslanja na pretpostavku da ne postoji polimorfizam na mjestu gdje se kalup spaja s 3'-krajevima početnica. Budući da autori nisu uočili takve supstitucije prilikom sekvenciranja dijela ZFY/ZFX gena, one vjerojatno niti ne postoje ili su vrlo rijetka pojava.

Metodu koju su opisali Bérubé i Palsbøll (1996) odabrala sam jer umnožava relativno kratak slijed, a budući da je tkivo s kojim sam radila bilo u lošem stanju, očekivala sam visoku degradaciju DNA kalupa. Naime, u stanicama tkiva koje se nalazi u stanju truljenja odvijaju se procesi slični nekrotičnim i apoptotičnim procesima. Jedna od značajki ovih procesa je razgradnja jezgrine DNA endogenim nukleazama na manje fragmente (Ueda i Shah 1994, Trump 1996).

### 1.5. Cilj rada

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Uvesti u naš laboratorij molekularnu metodu određivanja spola kitova koja bi se mogla primijeniti na uzorcima tkiva s izuzetno raspadnutih lešina i s nepotpunih lešina, kod kojih nije moguće odrediti spol morfološki, te na uzorcima biopsija.
2. Procijeniti informativnost uzoraka mišićnog tkiva s lešina različitog stupnja raspadanja.
3. Primijeniti metodu (Bérubé i Palsbøll 1996) na DNA drugih vrsta (čovjeka, miša, štakora i goveda) kako bih ispitala univerzalnost početnica i mogućnost kontaminacije stranom DNA.
4. Odrediti spol 50 jedinki različitih vrsta kitova koristeći metodu koju su opisali Bérubé i Palsbøll (1996).

## 2. MATERIJAL I METODE

### 2.1. MATERIJAL

#### 2.1.1. Standardne kemikalije:

agaroza (Sigma, Njemačka)

borna kiselina (Kemika, Hrvatska)

Chelex 100, 5 % (Bio-Rad, SAD)

EDTA, etilendiamintetraoctena kiselina (Kemika, Hrvatska)

etanol, 100 % (Kemika, Hrvatska)

etidijev bromid, 2.5 mg/ml (Serva, Njemačka)

kloridna kiselina (Kemika, Hrvatska)

natrijev hidroksid (Kemika, Hrvatska)

natrijev klorid, (Kemika, Hrvatska)

natrijev dodecilsulfat, SDS (Serva, Njemačka)

Tris-(hidroksimetil)-aminometan,  $C_4H_{11}NO_3$  (Kemika, Hrvatska)

#### 2.1.2. Otopine:

- otopine za izolaciju DNA:

pufer TNE: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,5

pufer TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4

proteinaza K, 50 mg/ml (Sigma, Njemačka)

- otopine za elektroforezu u agaroznom gelu:

pufer TBE: 45 mM Tris borat, 1 mM EDTA

pufer za nanošenje uzoraka na gel: 0,25 % bromfenol plava, 0,25 % ksilencijanolo

fluorofosfat, 15 % fikol

DNA biljeg: 100 bp Molecular Ruler, 100 µg/ml (Bio-Rad, SAD)



## 2. MATERIJAL I METODE

### 2.1.3. Materijal za umnožavanje lančanom reakcijom polimerazom:

10xPCR pufer (Roche, Njemačka)

MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Roche, Njemačka)

dATP, dCTP, dGTP, dTTP svaki po 10 mM (Roche, Njemačka)

AmpliTaq Gold 5 U/μl (Roche, Njemačka)

Tween20, 10 % (Roche, Njemačka)

početnice:

ZFYX0582F ( 5' - ATAGGTCTGCAGACTCTTCTA - 3' ) (VBC-Genomics, Austrija)

ZFY0767R ( 5' - TTTGTGTGAACTGAAATTACA - 3' ) (VBC-Genomics, Austrija)

ZFX0923R ( 5' - AGAATATGGCGACTTAGAACG - 3' ) (VBC-Genomics, Austrija)

### 2.1.4. Tkivo kitova:

Uzorci tkiva sakupljeni su duž hrvatske jadranske obale u razdoblju od 1997. do 2002. godine s mrtvih jedinki ukupno 50 kitova: 28 dobrih dupina (*Tursiops truncatus*), 11 plavobijelih dupina (*Stenella coeruleoalba*), sedam glavatih dupina (*Grampus griseus*), dva krupnozuba dupina (*Ziphius cavirostris*) i dva velika sjeverna kita (*Balaenoptera physalus*). Svi su uzorci bili iz mišićnog tkiva, osim jednog koji je uzet s kože dobrog dupina zajedno s potkožnim masnim tkivom. Čuvani su u 96 % etanolu na -20 °C.

Tkiva su se nalazila u različitim stanjima raspadanja, osim u slučaju uzorka kože, kod kojeg je lešina bila stara tek nekoliko sati.

Spol 10 jedinki mi je bio unaprijed poznat iz morfoloških podataka: dva mužjaka i dvije ženke dobrog dupina, mužjak i ženka glavatog dupina, mužjak i ženka plavobijelog dupina, ženka krupnozubog dupina i mužjak velikog sjevernog kita. Ove podatke sam iskoristila za utvrđivanje pouzdanosti metode i optimizaciju uvjeta reakcije. Spol ostalih jedinki nije mi bio poznat, no postojala je mogućnost provjere rezultata usporedbom s morfološkim podacima.

## 2. MATERIJAL I METODE

### 2.1.5. Krv:

Krv je uzeta mužjaku i ženki kućnog miša (*Mus musculus*) i štakora selca (*Rattus norvegicus*) iz repne vene. Muškarcu i ženi (*Homo sapiens*) je krv uzeta iz jagodice prsta.

Krv je sakupljena i čuvana na FTA karticama (Whatman Bioscience) na sobnoj temperaturi.

## 2. MATERIJAL I METODE

### 2.2. METODE

#### 2.2.1. Sterilizacija pribora i materijala

Kako bi se smanjio rizik od zagađenja uzoraka stranom DNA ili prijenosom iz uzoraka, trebalo je poduzeti određene mjere: u svakom koraku od izolacije genetskog materijala pa do samog kraja reakcije koristila sam sterilni pribor – bilo da sam ga sama sterilizirala ili sam koristila pribor za jednokratnu upotrebu (epruvete, skalpeli, filter papir itd.). Metalni pribor sam sterilizirala u etanolu i potom spaljivala, a plastični pribor (epruvete, pipete, nastavci za pipete) i kemikalije (puferi, razne otopine neosjetljive na UV svjetlo) sam izlagala ultraljubičastom svjetlu. Prostorije za izolaciju DNA, pripremu reakcijske smjese te pripremu PCR-produkata za elektroforezu, bile su fizički odvojene. Uz to, reakcijske smjese sam pripravljala u laminaru koji je prethodno bio svaki put steriliziran etanolom i UV-zračenjem.

## 2. MATERIJAL I METODE

### 2.2.2. Izolacija genomske DNA iz tkiva

Izolirala sam DNA iz svih 50 uzoraka metodom isoljavanja (Miller i sur. 1988), gdje se visokom koncentracijom natrijeva klorida postiže taloženje denaturiranih proteina. Ova metoda je brža i manje toksična od standardne izolacije fenol-kloroformom, a dobiveni je izolat zadovoljavajuće čistoće. Postupak izolacije opisan je prema protokolu:

#### *Izolacija genomske DNA isoljavanjem*

1. U plastične epruvete od 2 ml s čepom staviti po 1 ml TNE, pH 7,5.
2. Odrezati oko 50 mg tkiva i usitniti skalpelom na filter papiru te prebaciti u epruvetu s TNE puferom. Prije pripreme svakog slijedećeg uzorka treba promijeniti filter papir, a skalpel sterilizirati u etanolu i na plamenu kako bi se izbjegla kontaminacija.
3. Dodati po 30 µl 20 % SDS i promućkati.
4. Dodati po 1,5 µl proteinaze K, koncentracije 50 mg/ml. Promućkati te inkubirati na tresilici preko noći na 45 °C.
5. Dodati po 500 µl 6M NaCl i snažno protresti.
6. Centrifugirati 10 minuta na 2500 okretaja u minuti.
7. Supernatant prenijeti u novu epruvetu. Ako je supernatant "prljav" treba ponoviti korak 6.
8. Dodati 2.5X veći volumen 100 % etanola ohlađenog na -20 °C.
9. Pažljivo miješati izvrtanjem epruvete, a zatim centrifugirati 5 minuta na 13000 okretaja u minuti.
10. Izliti pažljivo etanol a talog DNA isprati sa 1 ml 70 % etanola.
11. Centrifugirati 5 minuta na 13000 okretaja u minuti.
12. Izliti etanol i preko noći ostaviti epruvete položene naopako kako bi se talog DNA osušio.
13. Otopiti talog DNA u 50 µl TE pufera, pH 7,4, i ostaviti na 4 °C preko noći da se DNA dobro otopi. Dalje čuvati na -20 °C.

## 2. MATERIJAL I METODE

### 2.2.3. Izolacija DNA sa FTA kartica

Izolacija je napravljena prema protokolu:

#### *Izolacija DNA s FTA kartica*

1. Komad FTA kartice veličine oko 5 x 5 mm staviti u 1 ml sterilne destilirane vode te ostaviti na sobnoj temperaturi 15 min.
2. Snažno promiješati na vortex miješalici i centrifugirati 3 minute na 13000 okretaja u minuti.
3. Odbaciti supernatant i dodati 150  $\mu$ l 5 % Chelex-a i 5  $\mu$ l proteinaze K (20 mg/ml).
4. Inkubirati 1 h na 56 °C u vodenoj kupelji i povremeno miješati.
5. Miješati na vortex miješalici 5-10 sekundi.
6. Kuhati 8 minuta u vodenoj kupelji.
7. Miješati na vortex miješalici 5-10 sekundi. Centrifugirati 3 minute na 13000 okretaja u minuti.
8. Supernatant prebaciti u nove epruvete i čuvati na –20 °C.

## 2. MATERIJAL I METODE

### 2.2.4. Provjera kakvoće izolirane genomske DNA na agaroznom gelu

Elektroforeza u agaroznom gelu metoda je koja omogućava razdvajanje molekula DNA. Agarozna je polimerna molekula sa svojstvom stvaranja umreženih struktura. U takvoj umreženoj strukturi u električnom polju, molekule DNA – koje su negativno nabijene pri neutralnom pH, putuju prema anodi. Brzinu putovanja određuju veličina i konformacija molekule, koncentracija i vrsta agaroze, napon struje, prisutnost etidijevog bromida i sastav elektroforetskog pufera (Maniatis i sur. 1989).

Kakvoću izolirane DNA sam ispitala na 1 % agaroznom gelu. Gel sam pripremila otapanjem 0,5 g agaroze u 50 ml TBE pufera uz miješanje i zagrijavanje smjese u mikrovalnoj pećnici do vrenja. Smjesu sam zatim ohladila na oko 60 °C i izlila u kadicu za elektroforezu. U gel sam dodala etidijev bromid tako da njegova konačna koncentracija u gelu bude 0,15 µg/ml. Etidijev bromid se ugrađuje u molekulu DNA i fluorescira narančastom svjetlošću kad se gel osvijetli ultraljubičastim svjetlom valne duljine 312 nm, čime je omogućeno promatranje uzoraka DNA (Maniatis i sur. 1989). U kadicu s gelom postavila sam češalj kako bi se napravile jažice. Nakon što je gel polimerizirao, uronila sam ga u sustav za elektroforezu napunjen puferom TBE. U jažice sam nanijela po 15 µl izolata u TE puferu i po 5 µl pufera za nanošenje. U dvije krajnje jažice nanijela sam DNA biljeg 100 bp Molecular Ruler, po 4 µl. Elektroforeza se odvijala 60 minuta pri konstantnom naponu od 90 V i na sobnoj temperaturi. Gelove sam promatrala na transiluminatoru i fotografirala pomoću sustava za fotografiranje.

### 2.2.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Dio gena za cinkov prst na Y i X kromosomima sam umnažala lančanom reakcijom polimerazom. PCR reakcija je provedena na GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems) u 10µl reakcijske smjese čiji je sastav prikazan u tablici 1. Tražeći najpovoljniji reakcijski sastav, mijenjala sam koncentracije početnica, količinu DNA i Taq polimeraze, no nije bilo značajnih razlika u dobivenim rezultatima. Budući da su volumeni pojedinih reagensa premali za pojedinačno pipetiranje svake reakcijske smjese posebno, a i kako bih smanjila pogreške prilikom pipetiranja, napravila sam zajedničku reakcijsku smjesu (engl. "master mix") za nekoliko uzoraka tako da sam pomnožila volumene svakog

## 2. MATERIJAL I METODE

reagensa za pojedinačnu smjesu s brojem uzoraka koje sam htjela podvrgnuti lančanoj reakciji polimerazom. Zatim sam u epruvete za PCR razdijelila po 9  $\mu\text{l}$  zajedničke reakcijske smjese te po 1  $\mu\text{l}$  izolata DNA različitih uzoraka. Sastav zajedničke reakcijske smjese za 10 reakcija također je prikazan u tablici 1. Reakcijsku smjesu sam pripravljala na ledu kako bih spriječila prijevremenu aktivaciju polimeraze.

**Tablica 1.** Sastav reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom

REAGENS	POLAZNA KONC.	KONAČNA KONC.	VOLUMEN ZA JEDNU REAKCIJU ( $\mu\text{l}$ )	VOLUMEN ZA 10 REAKCIJA ( $\mu\text{l}$ )
H <sub>2</sub> O, deionizirana			3,75	37,5
PCR pufer	10 x	1 x	1,00	10,0
Mg <sup>2+</sup>	25 mM	1,5 mM	0,60	6,0
dNTP	1,25 mM	0,2 mM	1,60	16,0
ZFYX0582F	10 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	0,50	5,0
ZFY0767R	10 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	0,50	5,0
ZFX0923R	10 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	0,50	5,0
Tween20	10 %	0,5 %	0,50	5,0
Taq polimeraza	5 U/ $\mu\text{l}$	0,025 U/ $\mu\text{l}$	0,05	0,5
DNA kalup			1,00	
Konačni volumen			10,00	

Svaki uzorak, odnosno izolat njegove DNA sam podvrgla lančanoj reakciji polimerazom najmanje dvaput kako bih potvrdila rezultat. Temperaturni profil reakcijskih uvjeta prikazan je u tablici 2.

## 2. MATERIJAL I METODE

**Tablica 2.** Temperaturni profil lančane reakcije polimerazom

Početa denaturacija	94 °C / 5 min
Denaturacija kalupa	94 °C / 60 sek
Prianjanje početnica	52 °C / 60 sek
Produljivanje lanca	72 °C / 90 sek
Završno produljenje	72 °C / 10 min

### 2.2.6. Elektroforeza

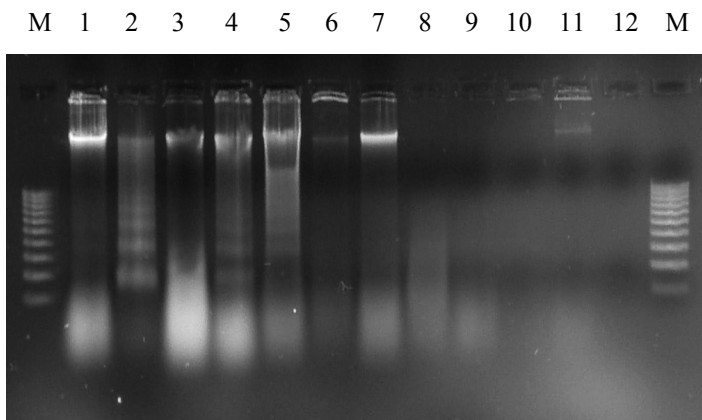
Produkte lančane reakcije polimerazom sam stavljala na 1 % agarozni gel koji sam pripremila na isti način kao i gel za provjeru kakvoće izolirane DNA. U jažice sam nanosila po 3  $\mu$ l PCR produkta i 2  $\mu$ l pufera za nanošenje prethodno pomiješanih na parafilmu. U jednu jažicu sam nanijela DNA biljeg 100 bp Molecular Ruler (4  $\mu$ l) pomoću kojeg sam kasnije procijenila veličinu umnoženih fragmenata. Gel sam podvrgla konstantnom naponu od 90 V kroz 40 minuta na sobnoj temperaturi.



### 3.REZULTATI

#### 3.1. Provjera kakvoće genomske DNA

Elektroforetski gel s reprezentativnim uzorcima izolirane DNA prikazan je na slici 5.



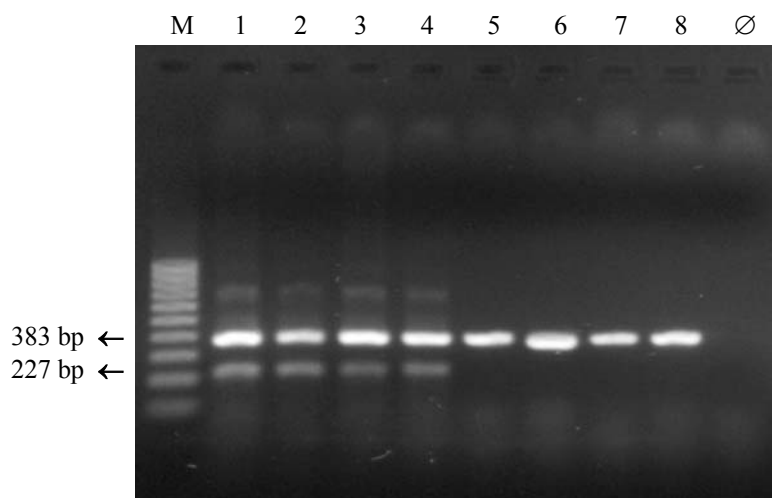
**Slika 5.** Kakvoća izolirane DNA. M, DNA biljeg; 5, 7, 10, plavobijeli dupin; 6, 12, glavati dupin; 8, krupnozubi dupin; ostalo, dobri

Razvučeni tragovi na gelu ukazuju na uznapredovanu razgradnju izolirane DNA. Kod nekih uzoraka se nije mogla uočiti prisutnost DNA na gelu, a lančanom reakcijom polimerazom je ipak dokazana u izolatu.

### 3.REZULTATI

#### 3.2. Određivanje spola

Umnožavanjem pomoću ZFYX0582F i ZFX0923R početnica kod oba spola nastaje fragment veličine 383 bp, a fragment veličine 227 bp nastaje samo kod mušjaka uz ZFYX0582F i ZFY0767R početnice. Stoga je PCR kod mušjaka dao dva fragmenta, veličine 383 i 227 bp, a kod ženke jedan fragment od 383 bp (slika 6).



**Slika 6.** Izgled gela nakon elektroforeze produkata PCR reakcije. M, DNA biljeg; Ø, negativna kontrola; 1-4, uzorci mušjaka; 5-8, uzorci ženki; 2 i 8, plavobijeli dupin; ostalo, dobri dupin.

Fragmenti veličine oko 720 bp predstavljaju nespecifične produkte reakcije koji su se javljali u nekim slučajevima, ali nisu utjecali na određivanje spola.

Uspješno sam odredila spol ukupno 40 kitova: 22 dobra, deset plavobijelih dupina, pet glavatih dupina, obje jedinke velikog sjevernog kita i jednog krupnozubog dupina. Rezultate sam usporedila s podacima dobivenim morfološkim istraživanjem lešina. U četiri slučaja spol određen metodom PCR nije se podudarao s morfološkim podacima: PCR je pokazao ženku i mušjaka dobrog dupina te po jednu ženku glavatog i krupnozubog dupina,

### 3.REZULTATI

gdje je morfološki utvrđeno da se radilo o mužjaku i ženki dobrog te mužjacima glavatog i krupnozubog dupina. U šest slučajeva gdje su tkiva bila u stanju truljenja nisam uspjela odrediti spol: četiri dobra dupina, jedan glavati dupin i jedan plavobijeli dupin. Iz uzorka DNA koju sam izolirala iz svježeg tkiva kože, dobila sam bogato umnožene fragmente svojstvene mužjaku.

Uz navedene početnice i u opisanim reakcijskim uvjetima nisam uspjela umnožiti spolno specifične niti kakve druge fragmente kod čovjeka, kućnog miša, štakora selca i goveda.

#### 4.RASPRAVA

Uspješno umnožavanje kod istraživanih vrsta upućuje na zaključak visoke konzerviranosti ZFY/ZFX slijeda unutar podreda Odontoceti. Međutim, primijećeno je redovito slabije umnožavanje fragmenta od 227 bp u odnosu na fragment duljine 383 bp. Ono bi moglo biti uzrokovano razlikom između primijenjene i izračunate optimalne temperature spajanja početnica uz kalup (Hoelzel 1998) koja za ZFY0767R iznosi 49°C, a za ZFX0923R i ZFYX0582F 55°C. Moguće je da je na temperaturi od 52°C, pri kojoj se provodilo prijanjanje početnica uz kalup, vezivanje ZFY0767R početnice bilo otežano, što je rezultiralo slabijim umnožavanjem.

Loša kakvoća izolirane DNA posljedica je procesa truljenja u stanicama raspadajućeg tkiva, koji slični nekrotičnim i apoptotičnim procesima. Za genetski materijal stanica u takvom stanju svojstven je razvučeni trag na gelu – rezultat djelovanja oslobođenih endonukleaza. Kod nekih uzoraka se na gelu mogao primijetiti i tipičan apoptotični obrazac ljestvičaste DNA, koji je posljedica internukleosomnih oligonukleotidnih lomova u ranoj fazi apoptoze (Ueda i Shah 1994, Trump 1996).

Šest uzoraka tkiva, iz kojih nisam uspjela odrediti spol, pripadala su truplima u uznapredovanom stanju truljenja pa smatram da je DNA bila previše degradirana da bi se umnožili fragmenti potrebne duljine. U jednakom stanju je bilo i tkivo u četiri slučaja gdje se spol određen PCR reakcijom nije podudaraao sa morfološkim podacima. U sva četiri slučaja sam produkte uspjela dobiti samo jednom iako sam izolaciju DNA i PCR reakciju ponovila najmanje dva puta sa svakim uzorkom. Pritom su se umnoženi fragmenti jedva vidjeli na gelu te stoga smatram da su rezultat kontaminacije drugim uzorcima prilikom pripreme reakcijske smjese. U jedinom slučaju gdje sam DNA izolirala iz kože tek uginulog dupina, dakle tkivo je bilo u dobrom stanju, reakcija je bila vrlo uspješna i potvrdila je mužjaka. Stoga zaključujem da je upotrijebljena metoda pogodna za primjenu na uzorcima biopsije, no nije učinkovita za određivanje spola iz uzoraka s lešina visokog stupnja raspadanja.

Budući da sam DNA izolirala metodom isoljavanja, koristila sam 20 % SDS za otapanje stanične membrane i denaturaciju proteina. Poznato je da vrlo male količine SDS-a (samo 0.01 %) smanjuju aktivnost Taq polimeraze i do 10 % pa sam u reakcijsku smjesu uključila i neionski detergent Tween20. Osim što neutralizira inhibitorni učinak SDS-a u koncentracijama već od 0.5 %, Tween20 stabilizira enzim (Hoelzel 1998). Primjetila sam znatno bolje umnožavanje PCR produkata kad sam u reakciju dodala ovaj detergent.

#### 4.RASPRAVA

Fragment veličine oko 720 bp koji se ponekad javljao kod uzoraka mužjaka je vjerojatno nespecifični produkt lančane reakcije polimerazom, koji se pojavljivao i u izvornom radu (Bérubé i Palsbøll 1996) te nije smetao određivanju spola.

Kako bih istražila utjecaj strane DNA u reakcijskoj smjesi na određivanje spola kod kitova, napravila sam izolaciju genetskog materijala iz krvi kućnog miša (*Mus musculus*) i štakora selca (*Rattus norvegicus*), budući da su to vrste s kojima se u laboratoriju najčešće radilo te čovjeka (*Homo sapiens*). Uzela sam i već izoliranu DNA goveda (*Bos taurus*) te sam DNA iz svake vrste podvrgla PCR reakciji. Iako sam mijenjala reakcijske uvjete, uz početnice ZFYX0582F, ZFY0767R i ZFX0923R, nisam uspjela ni u jednom slučaju umnožiti spolno specifične niti kakve druge fragmente kod istraživanih vrsta. Usporedila sam nukleotidne sljedove za protein cinkova prsta kod navedenih vrsta ([PubMed](#)) sa korištenim početnicama i uočila da 3'-OH krajevi ZFY0767R i ZFX0923R početnica nisu komplementarni sa slijedom na kalupu ni kod jedne navedene vrste. Budući da je prijanjanje upravo 3'-OH kraja ključno za pravilno vezanje Taq polimeraze za kalup, smatram da je to glavni razlog nemogućnosti umnožavanja spolno specifičnih fragmenata uz korištene početnice.

Iako je opisana metoda (Bérubé i Palsbøll 1996) razvijena za određivanje spola u nekih vrsta kitova zubana, nije mi poznato iz literature da je dosad korištena za spolno određivanje dobrog, plavobijelog i glavatog dupina. Ovo istraživanje je pokazalo da je metoda primjenjiva i na navedene vrste.

## 5.ZAKLJUČAK

1. Upotrijebljena metoda je pogodna za primjenu na uzorcima biopsije kao i na uzorcima dobro očuvanog tkiva. Metoda je jednostavna, brza i pouzdana.
2. Budući da PCR zahtijeva određenu kakvoću DNA kalupa, ovom metodom nije moguće odrediti spol iz uzoraka tkiva na visokom stupnju raspadanja.
3. Osim na vrstama kitova koje su Bérubé i Palsbøll naveli u svome radu (1996), metoda se jednako učinkovito može primijeniti za određivanje spola u dobrog, plavobijelog i glavatog dupina.
4. Ne postoji mogućnost umnožavanja mišje, štakorske, goveđe niti ljudske DNA u opisanim reakcijskim uvjetima pa je stoga i svaka kontaminacija genetskim materijalom ovih vrsta bez utjecaja na određivanje spola kod kitova.

## 6.LITERATURA

**Aasen E & Medrano JF (1990)** Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle sheeps and goats. *Biotechnology*, 8, 1279-1281.

**Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994)** *Molecular Biology of the Cell*. 3<sup>rd</sup> edition, Garland Publishing Inc., New York & London, 317.

**Árnason U, Höglund M, Widegren B (1984)** Conservation of highly repetitive DNA in cetaceans. *Chromosoma*, 89, 238-242.

**Avise JC (1994)** *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York, 167.

**Bachtrog D & Charlesworth B (2001)** Towards a complete sequence of the human Y chromosome. *Genome Biology*, 2(5), 1016.1-1016.5.

**Bérubé M & Palsbøll P (1996)** Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology*, 5, 283-287.

**Caldwell M, Gaines MS, Hughes CR (2002)** Eight polymorphic microsatellite loci for bottlenose dolphin and other cetacean species. *Molecular Ecology Notes*, 2, 393-395.

**Darling JD & Bérubé M (2001)** Interaction of singing humpback whales with other males. *Marine Mammal Science*, 17, 570-584.

**Fernando P & Melnick DJ (2001)** Molecular sexing eutherian mammals. *Molecular Ecology Notes*, 1, 350-353.

**Gilson A, Syvanen M, Levine K, Banks J (1998)** Deer gender determination by polimerase chain reaction: validation study and application to tissues, bloodstains, and hair forensic samples from California. *Fish and Game*, 4, 159-169.

## 6.LITERATURA

**Gomerčić H, Huber Đ, Mihelić D, Lučić H, Gomerčić T, Đuras M (2002)** Estimation of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) population in the Croatian part of the Adriatic Sea. U: 9th International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and adjacent Regions, The Hellenic Zoological Society, 2002: 43.

**Haig SM (1998)** Molecular contributions to conservation. *Ecology*, 79, 413-425.

**Hoelzel AR (1998)** *Molecular Genetic Analysis of Populations*. Oxford University Press, Oxford.

**Kohn MH & Wayne RK (1997)** Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 12, 223-227.

**Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989)** *Molecular Cloning – a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

**Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988)** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1215.

**Mullis KB (1990)** Process for amplifying, detecting and/or cloning nucleic acid sequences using a thermostable enzyme. US Patent 4,965,188.

**Nagai Y (1992)** Primary sex determination in mammals. *Zoological Science*, 9, 475-498.

**Nakahori Y, Hamano K, Iwaya M, Nagakome Y (1991)** Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer. *American Journal of Medical Genetics*, 39, 472-473.

**Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EMC, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown LG (1987)** The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell*, 51, 1091-1104.



## 6.LITERATURA

**Palmer MS, Berta P, Sinclair AH, Pym B, Goodfellow PN (1990)** Comparison of human ZFX and ZFY transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 1681-1685.

**Palsbøll PJ, Vader A, Bakke I, El-Gewely MR (1992)** Gender determination in cetaceans by the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Zoology*, 70, 2166-2170.

**Parsons KM (2001)** Reliable microsatellite genotyping of dolphin DNA from faeces. *Molecular Ecology Notes*, 1, 341-344.

**PubMed:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>

**Quintana-Murci L, Krausz C, McElreavey K (2001)** The human Y chromosome: function, evolution and disease. *Forensic Science International*, 118, 169-181.

**Schneider-Gädicke A, Beer-Romero P, Brown LG, Nussbaum R, Page DC (1989)** ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell*, 57, 1247-1258.

**Stryer L (1997)** *Biochemistry*. 4<sup>th</sup> edition, W. H. Freeman and Company, New York, 1000.

**Trump BF (1996)** Characteristics and mechanisms of cell injury and cell death: the role of  $[Ca^{2+}]_i$ . *Marine Environmental Research*, 42, 57-63.

**Ueda N & Shah SV (1994)** Apoptosis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 124, 169-177.

**Uguz C, Iscan M, Togan I (2003)** Developmental genetics and physiology of sex differentiation in vertebrates. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 14, 9-16.

**Valsecchi E, Glockner-Ferrari D, Ferrari M (1998)** Molecular analysis of the efficiency of sloughed skin sampling in whale population genetics. *Molecular Ecology*, 7, 1419-