

---

## MOLEKULARNO-GENETIČKE METODE U VETERINARSKOJ MEDICINI

### Značaj i prednosti molekularno-genetičkih dijagnostičkih metoda u veterinarskoj medicini

U najširem smislu, molekularno-genetičke analize služe za proučavanje genetičke varijabilnosti na molekularnom nivou, obzirom da omogućavaju detekciju svake promene u molekulu DNK. Genetička varijabilnost je prilično velika i svaka jedinka, sa izuzetkom monozigotnih blizanaca, poseduje jedinstvenu DNK sekvencu. Genetička varijabilnost proističe iz dva osnovna procesa: mutacija i rekombinacija. Mutacije su izvor genetičkih promena, stvaranja sasvim novih oblika genskih alela, a rekombinacije su procesi tokom kojih dolazi do stvaranja novih kombinacija genskih alela. Obzirom da od genetičke varijabilnosti zavisi i fenotipska varijabilnost, jasno je da procesi mutacija i rekombinacija doprinose stvaranju velikog broja različitih fenotipova. Zbog toga su najstarija genetička istraživanja počinjala analizom fenotipova. Proučavanje fenotipskih razlika među jedinkama jedne populacije predstavlja jedan od najjednostavnijih načina analize genetičke varijabilnosti. Dakle, klasična genetička analiza podrazumevala je tumačenje genetičke varijabilnosti na osnovu analize fenotipskih razlika među jedinkama jedne populacije. Identifikacija gena i određivanje njihove funkcije obavljale su se na osnovu fenotipa mutiranih jedinki i njihovih potomaka. Takva analiza je korisna samo kod osobina koje imaju jednostavan način nasleđivanja, odnosno osobina koje su pod kontrolom jednog ili manjeg broja gena (boja dlake, perja, rogatost, monogenske bolesti i anomalije). Međutim, takvih osobina je relativno malo, a najveći broj proizvodno značajnih osobina životinja je poligene prirode, na primer, osobine vezane za zdravstveno stanje, reprodukciju i ponašanje, zatim dužina života, građa tela, osobine vezane za unos hrane i dnevni prirast, plodnost, mlečnost, odnosno kvantitet i kvalitet mleka, prinos mesa i karakteristike trupa (mesnatost, količina masti), produkcija jaja kod živine, itd. Kod takvih, ekonomski značajnih osobina, koje su poligene prirode, odnosno pod kontrolom velikog broja gena i značajnim uticajem faktora sredine, nepouzdanost je zaključivati o genetskoj determinisanosti samo na osnovu fenotipa. Nažalost, u stočarstvu su genetička istraživanja jako dugo obavljana upravo na osnovu fenotipa i primenom metoda selekcijskog ukrštanja. Drugim rečima, primenjivane su isključivo metode kvantitativne genetike, pri čemu je varijabilnost fenotipskih odnosno proizvodnih karakteristika populacije predstavljala temelj selekcijskog napretka. Ove procedure selekcije primenjivane su u velikom obimu bez detaljnog znanja o broju gena koji su uključeni u ekspresiju datih osobina, kao i bez ikakvog znanja o efektu tih gena na objektima selekcije i njihovom učešću u plejotropnom efektu ili vezanom delovanju na druge osobine. Primena ovakvog pristupa pokazala se korisnom u nekim slučajevima, na primer u poboljšanju prosečne količine mleka po laktaciji kod mlečnih krava. Međutim, češći su primeri neuspešne selekcije na osnovu fenotipa, jer je velika verovatnoća da, na primer, najbolje rangirani bikovi budu nosioci mutiranih alela. Razlog tome je da fenotipski normalni, čak eksterijerno superiorni bikovi, u genotipu nose mutirane alele i kao takvi, ako se odaberu za program veštačkog osemenjavanja, značajno doprinose širenju naslednih anomalija kod potomaka. Dakle, analize fenotipskih karakteristika omogućavale su samo ograničeni uvid u genetičku varijabilnost, jer je ona mnogo veća nego što se to može detektovati na osnovu analize fenotipske varijabilnosti. Klasičnim metodama bilo je moguće prepoznati mutacije samo u slučajevima kada one dovode do vidljivih fenotipskih promena, na primer do razvoja anomalija i velikih izmena morfologije praćenih letalnim

---

efektima (tzv. „funkcionalne“ mutacije), ali ne i „neutralne“ mutacije, koje dovode do stvaranja novog genskog alela, ali usled izrođenosti genetičkog koda, ne dovode do promene u sekvenci amino-kiselina, pa samim tim ni u metabolizmu ili fenotipskim karakteristikama („neutralne mutacije“). Osim toga, analizom fenotipskih razlika, nije moguće detektovati polimorfizme u nekodirajućim regionima genoma (koji kod sisara čine preko 90% DNK).

U klasičnim genetičkim istraživanjima za analizu genetičke varijabilnosti kvalitativnih osobina koristile su se morfometrijske, citogenetičke i biohemijske metode. **Morfometrijske metode**, odnosno metode analize morfoloških karakteristika, koriste se za analizu genetičke varijabilnosti ukoliko se zna priroda genetičke determinacije posmatrane osobine. **Citogenetičke metode**, koje podrazumevaju analize kariotipa (hromozoma), omogućavaju otkrivanje promena u broju ili strukturi hromozoma kod jedinki ispitivane populacije. Ove metode su omogućile veliki napredak u detekciji svih hromozomskih aberacija, a u programima selekcije izuzetno su značajne za otkrivanje heterozigotnih nosioca strukturnih hromozomskih aberacija, pre svega recipročnih i Robertsonovih translokacija i njihovo blagovremeno isključivanje iz odgajivačkog programa. Obzirom da za navedene hromozomske aberacije ne postoje molekularni markeri, citogenetička analiza i dalje predstavlja jedini i najbolji metod njihove detekcije. Takođe, u slučaju numeričkih hromozomskih aberacija, citogenetička analiza daje zadovoljavajuće rezultate i može se koristiti za utvrđivanje numeričkih odstupanja od normalnog kariotipa npr. kod monozomije X hromozoma kod kobilica,  $2n=63, XO$ ; himerizma kod kobilica i pastuva; trizomije polnih hromozoma kod pastuva  $2n=65, XXY$  i bika  $2n=61, XXY$ , mozaicizma  $59, XO/60, XX/61, XXX$  kod junica. Ipak, treba napomenuti da je dijagnostika kariotipovanjem teška, jer zahteva puno vremena, tehničkog rada, troškova i iskustva. Uzorci krvi za citogenetičku analizu zahtevaju posebnu temperaturu prilikom transporta i čuvanja. Takođe, problem može izazvati i kontaminacija krvi i medijuma. Inače, morfološki i hromozomski markeri obično pokazuju nizak nivo polimorfizma i stoga nisu posebno korisni kao genetički markeri za analizu genetičke varijabilnosti. **Biohemijske metode**, odnosno analize proteinskih polimorfizama su dugo i obimno korišćene za utvrđivanje genetičke varijabilnosti zbog povezanosti između gena i proteina, odnosno činjenice da promene nukleotidne sekvence DNK (tj. gena) mogu da dovedu do izmene primarne strukture kodiranog proteina. Brojna istraživanja obavljena su radi analize polimorfni proteina krvi (tipizacija krvnih grupa) i polimorfni tkivnih proteina radi utvrđivanja i praćenja genetičke strukture populacija. Međutim, nivo polimorfizama uočenih kod proteina je često nizak, što smanjuje upotrebljivost "tipovanja proteina" u proučavanjima genetičke strukture populacija i diverziteta. Danas se analize proteina smatraju prevaziđenom metodom zbog veoma niske rezolucije, odnosno zbog velikih ograničenja u ispitivanju genetičke varijabilnosti. Naime, analizom proteina mogu se detektovati samo neki genetički polimorfizmi. Jedan od razloga je izrođenost genetskog koda, zbog čega se ne mogu detektovati mutacije koje ne dovode do promene amino-kiselinske sekvence (tzv. *tihe mutacije*) čak i ako se obave analize amino-kiselinske sekvence. Drugi razlog je što su analize amino-kiselinskih sekvenci proteina veoma zahtevne (vremenski i finansijski), te se analize proteina najčešće obavljaju gel-elektroforezom, koja ima još nižu rezoluciju. Naime, elektroforeza se zasniva na tome da proteini, koji se razlikuju po sekvenci amino-kiselina, imaju različitu elektropokretljivost (na gelu u rastvoru slabog elektrolita). Drugim rečima, elektroforetska separacija proteina zasniva se na razlikama u električnom naboju ili razlikama u molekulskim masama kod različitih proteina. Međutim, takvom analizom se ne može detektovati svaka promena u sekvenci amino-kiselina, jer se neke zamene amino-kiselina ne odražavaju na elektroforetsku pokretljivost proteina (ukoliko se jedna amino-kiselina u proteinu zameni nekom hemijski bliskom amino-kiselinom). Konačno, navedene metode omogućavaju analizu varijabilnosti samo u kodirajućim regionima DNK, koje predstavljaju manje od 10% ukupnog genoma kod sisara.

Zbog svega navedenog, savremena genetička istraživanja obavljaju se u suprotnom smeru u odnosu na klasična, tako što ispitivanja nasledne osnove i genetičke determinisanosti fenotipskih karakteristika počinju analizom DNK sekvence i praćenjem uticaja uočenih polimorfizama na fenotip. **Molekularno-genetičke metode predstavljaju metode izbora za analizu genetičke varijabilnosti, obzirom da se njima otkrivaju razlike u samom molekulu DNK (tzv. DNK polimorfizmi) koji podrazumevaju svaku razliku u nukleotidnoj sekvenci (unutar gena i/ili nekodirajućih regiona DNK). Markerima kojima se detektuju razlike na nivou DNK nazivaju se molekularni ili DNK markeri. Molekularni markeri, sposobni da detektuju genetičke varijacije na nivou sekvenci DNK, ne samo da su prevazišli ograničenja prethodno korišćenih metoda (morfometrijskih, citogenetičkih, biohemijskih), nego poseduju i jedinstvena genetička svojstva koja ih čine mnogo korisnijim od ostalih genetičkih markera.** Oni su brojni i raspoređeni svuda po čitavom genomu. Nasleđuju se po Mendelovim pravilima, najčešće ko-dominantno i često su multialelni tako da se u proseku heterozigotnost ostvaruje u više od 70%. Na njih ne utiču faktori spoljašnje sredine i generalno nemaju plejotropni efekat na lokuse za kvantitativne osobine (*Quantitative Trait Loci-QTL*). Obzirom da genska ekspresija nije preduslov za analizu DNK polimorfizama, metodama molekularne genetike može se vizuelizovati praktično celokupan genom uključujući nekodirajuće regione.

**Molekularno-genetičke analize koje se baziraju na PCR metodologiji pružaju brojne metodološke prednosti** u odnosu na sve druge metode tradicionalno primenjivane u veterinarskoj medicini i stočarstvu.

- Pre svega, te metode omogućavaju korišćenje **bilo kog uzorka koji sadrži DNK životinje** (osim krvi, mogu se koristiti dlake, saliva, brisevi bukalne i vaginalne sluznice, mleko, sperma, uzorci tkiva, koža, perje, nokti, kandže, kosti, zubi i arhivirani preparati) **što je značajno za analizu uginulih ili ubijenih životinja i praćenje zaraza.**
- **Uzimanje uzorka** za DNK analize iz živih jedinki je **neinvanzivno**,
- Uzorci DNK se **lako mogu transportovati** između laboratorija i **jako dugo čuvati**, što omogućava **retrospektivnu analizu** u slučajevima kada životinje više nisu dostupne.
- Analiza DNK može se obaviti u **veoma ranim fazama života** jedinke, odnosno čak i na **stupnju embriona** (prenatalna dijagnostika) nezavisno od pola.
- Prednost molekularne dijagnostike je i to što se, **za razliku od klasičnih metoda, svi koraci mogu automatizovati.**
- **Automatizacijom se postiže istovremena i brža obrada većeg broja uzoraka pod standardizovanim uslovima i smanjuje rizik od kontaminacije i dobijanja lažno-pozitivnih rezultata.**
- Korišćenjem internih kontrola, postiže se **veća pouzdanost i preciznost analize.**

Zbog svega navedenog, **molekularno-genetičke analize** nalaze primenu u brojnim oblastima veterine, kao što su:

- molekularna dijagnostika naslednih bolesti
- detekcija i tipizacija virusnih, bakterijskih, gljivičnih patogena i parazita
- determinacija pola ptica i embriona sisara
- provera roditeljstva i verifikacija pedigreea
- otkrivanje genskih lokusa vezanih za ekonomski značajne proizvodne karakteristike
- odabir jedinki za odgajivačke programe i selekciju
- kontrola namirnica
- forenzičke analize

Značajno je napomenuti da je Organizacija za hranu i poljoprivredu pri Ujedinjenim nacijama - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) preporučuje molekularno-genetičke metode kao prioritetne za potrebe:

- karakterizacije animalnih genetskih resursa (AnGR) i razvoja strategija konzervacije i održivog korišćenja AnGR,
- procene genetičkog diverziteta (uz identifikaciju različitih oblika gena za ključne osobine),
- boljeg razumevanja otpornosti na bolesti (mehanizama infekcije i interakcija domaćin-patogen),
- boljeg razumevanja genetske osnove adaptacije na surove uslove životne sredine,
- očuvanja diverziteta i zdravlja autohtonih rasa životinja

Postupak molekularno-genetičke analize počinje **izolacijom (ekstrakcijom) DNK ili RNK iz bioloških uzoraka**.

**Izolacija DNK** iz ćelije podrazumeva oslobađanje DNK iz jedra (nuklearna DNK) ili organela (mitohondrijalna ili plastidna DNK). Pri tome se koriste hemikalije kojima se razbijaju i liziraju: ćelijska membrana (animalnih ćelija), membrane organela (mitohondrija i plastida), ćelijski zid (bakterija, biljaka, gljiva), ali i veoma čvrsti zidovi spora (sporogenih bakterija, protozoa) i druge jako čvrste tvorevine (hitinska kutikula, kosti, rožne tvorevine, keratin).

### **Izolacija (ekstrakcija) DNK klasičnom metodom isoljavanja („salting-out“ metod)**

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/extraction/>

- Potrebna laboratorijska oprema:
  - centrifuga,
  - vodeno kupatilo (termoblok),
  - epruvete (zapremine 1,5 i 2 ml),
  - set mikropipeta\* (za male, srednje i velike nastavke),
  - set nastavaka za mikropipete\* (malih, srednjih i velikih)

\*Postoje različite varijante mikropipeta (u zavisnosti od proizvođača), ali generalno ih delimo na tri grupe (male, srednje i velike) u zavisnosti od kapaciteta (tj. zapremine za koju je pipeta predviđena), jer postoji samo 3 tipa nastavaka za mikropipete (mali – zapremine do 10 µl, srednji – zapremine do 100 ili do 200 µl i veliki – do 1000 µl).

Na pipeti mora biti urezan opseg zapremina (u µl), npr.:

- 1-10 µl, 2–20 µl, 5-50 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl

Ili je urezana samo maksimalna zapremina, npr.:

10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl.

- 
- Potrebni reagensi:
    - **lizirajući rastvor** (koji može sadržati i **deterdžent** i enzim **proteinazu K** kao u ispod opisanom primeru, mada se proteinaza K često pakuje odvojeno),
    - **rastvor koncentrisane soli**
    - Izopropil alkohol
  
  - Oprema za uzimanje uzorka (vatirani štapići za uzimanje brisa, čiste epruvete)

Izolacija DNK iz brisa bukalne sluznice **metodom isoljavanja** obuhvata sledeće korake:

- 1) sakupljanje ćelija bukalne sluznice
- 2) razbijanje ćelija da se iz njih oslobodi DNK
- 3) odvajanje DNK od proteina i ćelijskih ostataka
- 4) izolacija koncentrovane DNK

*Detalji svakog koraka ekstrakcije:*

#### 1) sakupljanje ćelija bukalne sluznice (bris)

- Uzimanje ćelija epitela bukalne sluznice obavlja se pomoću vatiranog vrha štapića za uzimanje brisa.
- Bris (vatirani vrh štapića) treba staviti u epruvetu (1,5 ml). Bris sadrži stotine „finih“ (tankomembranoznih) ćelija bukalne sluznice. Unutar svake ćelije nalazi se jedro, a unutar jedra je DNK.

#### 2) razbijanje ćelija da se iz njih oslobodi DNK

- Odsecanje brisa (vrha štapića) kako bi epruveta mogla da se zatvori.
- Nalivanje **lizirajućeg rastvora**<sup>§</sup> (grč. *lysis* = razgradnja, raspadanje, razaranje, razlaganje)
- Inkubacija u vodenom kupatilu na 56°C (10 min – 30 min, zavisno od tipa uzorka, ali dovoljno dugo da se oslobodi DNK).

<sup>§</sup> **Lizirajući rastvor** sadrži dva važna sastojka: **deterdžent** i enzim **proteinazu K**.

**Deterdžent** razbija ćelijsku i jedarne membrane čime omogućava pucanje ćelija i oslobađanje DNK iz njih.

Međutim, DNK je i dalje veoma čvrsto obavijena proteinima (histonima), te **proteinaza K** seče i odvajava histone da oslobodi DNK.

Po završetku inkubacije vrh štapića treba izvaditi iz epruvete.

#### 3) odvajanje DNK od proteina i ćelijskih ostataka

- Tokom prethodnog koraka (inkubacije u vodenom kupatilu) oslobođena je DNK. Sledeći korak je dodavanje **rastvora koncentrisane soli** u epruvetu.
- So obezbeđuje da se **proteini i drugi ostaci** (razbijenih) **ćelija grupišu**.
- Epruveta se stavlja u centrifugu

- Obezbedi se „balans“ stavljanjem druge epruvete sa istom zapreminom tečnosti (može i obična voda).
- Centrifugiranjem epruvete na velikoj brzini postiže se da teški ugrušci **proteina i ćelijskih ostataka spadnu (stalože se) na dno epruvete**, dok **DNK lanci ostaju difuzno raspoređeni** u tečnom sadržaju epruvete.
- Tečni sadržaj epruvete prenosi se u čistu epruvetu, dok talog (koga čine proteini i ćelijski ostaci) ostaje u epruveti koju bacamo.

#### 4) izolacija koncentrovane DNK

- Dodaje se izopropil alkohol u epruvetu sa rastvorenim DNK i promeša laganim (ručnim) okretanjem epruvete. Time se postiže da se DNK, koja nije rastvorljiva u izopropil alkoholu, izdvoji iz rastvora u vidu ugrušaka vidljivih golim okom.
- Epruveta se centrifugira, pri čemu se ovog puta centrifugiranjem na dno epruvete „spušta“ (taloži) zgrušana DNK.
- Tečna faza (supernatant) se ukloni iz epruvete, a DNK sačuva (može se ostaviti u tom stanju ili da se ponovo rastvori u adekvatnom (blago slanom) puferu ili vodi).

### Izolacija (ekstrakcija) DNK metodom koja se bazira na primeni adsorpcione hromatografije (pomoću kolonica sa silikatnom gel membranom)

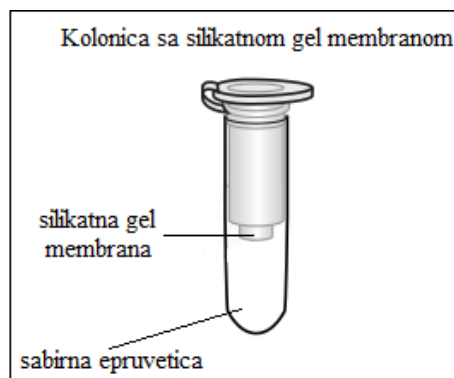
Postupak za brzu i čistu izolaciju DNK. Ovaj metod se oslanja na činjenicu da se DNK pod određenim uslovima vezuje za silikatni gel.

Osnovne faze tokom ovog postupka izolacije su:

**Priprema uzorka** (koja podrazumeva fizičku homogenizaciju uzorka i prečišćavanje centrifugiranjem).

**Liziranje** – korak u kome se razbijaju (razlažu) ćelijske strukture koje okružuju DNK.

**Vezivanje DNK** – u uzorak se dodaje rastvor pufera kome je prethodno dodat etanol ili izopropanol. Ovako formirana mešavina se prenosi u kolonicu sa silikatnom gel membranom (*spin column*), a zatim centrifugira. Tokom centrifugiranja mešavina prolazi kroz silikatnu gel membranu koja se nalazi u kolonici. Ukoliko su pH i koncentracija soli u rastvoru optimalni, DNK će se vezati za silikatni gel tokom prolaska rastvora kroz njega.



---

**Čišćenje uzorka** – iscedak koji se skupio u sabirnoj epruvetici se odbaci i u kolonicu se doda pufer za čišćenje (*wash buffer*). Kolonica se ponovo centrifugira kako bi dodati pufer prošao kroz silikatnu membranu. Na ovaj način se uklanjaju sve preostale nečistoće sa membrane, ostavljajući samo DNK vezanu za silikatni gel.

**Ispiranje** – iscedak iz sabirne epruvetice se odbaci i u kolonicu se doda pufer za ispiranje (*elution buffer*), mada je u nekim slučajevima dozvoljeno da se dvostruko destilovana voda (ddH<sub>2</sub>O) koristi u ovu svrhu (ukoliko se DNK odmah koristi za PCR i ne čuva za kasnije korišćenje). Kolonica se ponovo stavlja u centrifugu kako bi dodati pufer/voda prošli kroz silikatnu membranu. Ovaj pufer/voda uklanja DNK sa silikatne membrane i na ovaj način se DNK „ispira” i nakupi na dnu epruvetice.

## Izolacija (ekstrakcija) RNK

Izolacija RNK predstavlja odvajanje RNK od svih ostalih komponenti iz bioloških uzoraka. Celu proceduru izolacije RNK komplikuje prisustvo ribonukleaza (RNAza) koji se nalaze u ćelijama i tkivima, a koji vrlo brzo mogu da razgrade RNK. Pojedine RNAze mogu biti izuzetno otporne, pa je i njihova neutralizacija značajno teža u poređenju sa dezoksiribonukleazama (DNAzama). Pored ćelijskih, postoji i nekolicina RNAza koje se nalaze u našem okruženju, poput RNAaze 7 koju se oslobađa sa ljudske kože. Zbog svega navedenog, oprema koja se koristi u postupcima izolacije RNK se temeljno čisti, drži odvojeno od standardne laboratorijske opreme, ali se i tretira određenim hemikalijama koje uništavaju RNAaze. Iz istih razloga, laboranti koji učestvuju u izvođenju samog eksperimenta treba posebno da vode računa o tome da golim rukama ne dodiruju opremu i hemikalije.

Kao i u slučaju izolacije DNK, izolacija RNK može se obaviti na više različitih načina. Postupak izolacije RNK se veoma malo razlikuje od izolacije DNK, te navodimo samo osnovne korake izolacije RNK u primeru izolacije pomoću kolonica sa silikatnim gel membranama:

1. Priprema uzorka
2. Liziranje uzorka
3. Otklanjanje nečistoća i genomske DNK (gDNK) pomoću kolonice sa silikatnom gel membranom
4. Prečišćavanje (purifikacija) RNK:
  - a) Tretman za uništavanje preostalih tragova DNK pomoću enzima DNAaza
  - b) Prečišćavanje pomoću specifičnih pufera
  - c) Ispiranje RNK sa silikatnih gel membrana (elucija).

Za razliku od ekstrahovane DNK, koja je prilično stabilna čak i na sobnoj temperaturi, za RNK je svojstveno da brzo degradira. Okvirno, RNK je prilično stabilna na temperaturi od -80°C do godinu dana. Za sve periode duže od godinu dana preporučuje se lagerovanje RNK izolata u parama tečnog azota na temperaturi od -196 °C, ili u nekim komercijalnim reagensima koji stabilizuju RNK, odnosno sprečavaju degradaciju nukleinskih kiselina.

Izolacija RNK predstavlja prvi korak u postupku detekcije patogena koji kao genetski materijal sadrže samo RNK (npr. RNK virusa), ali i u postupku analize ekspresije gena.

Nakon izolacije DNK (ili RNK) iz ćelije, sledeći korak je **amplifikacija (kloniranje)** željenog (ciljanog) gena ili fragmenta DNK, što se može obaviti *in vivo* i *in vitro*.

---

U slučaju ***in vivo* kloniranja** željenog (ciljnog) fragmenta DNK, najpre se restrikcijom enzimima (**videti Box na kraju skripte**) „iseče” ciljani deo DNK, a zatim taj deo ugradi u DNK vektora (plazmida ili virusa), odnosno stvori se rekombinantna DNK. Da bi ona mogla da se umnožava, neophodno je da se vektor ubaci u ćeliju domaćina (najčešće u bakteriju *Escherichia coli*). DNK vektora je u mnogim slučajevima cirkularna i dvolančana. Pri svakoj replikaciji DNK vektora, istovremeno se umnožava i ugrađeno parče DNK, odnosno replikuje se čitava rekombinantna DNK. Na ovaj način se još od 1982. godine proizvodi humani insulin u ćelijama bakterija – ubacivanjem dela humane DNK koji sadrži gen za insulin u vektor, a zatim u bakterije čijim umnožavanjem se obezbeđuje proizvodnja sintetskog humanog insulina. To je, inače, prvi lek dobijen primenom metoda genetičkog inženjeringa.

***In vitro* kloniranje** željenog (ciljnog) fragmenta DNK obavlja se putem reakcije lančane polimerizacije, odnosno putem **PCR amplifikacije** – (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) u aparatu koji ima mogućnost brze promene temperaturnih uslova. Tvorac ove tehnike Kary Mullis je za taj svoj izum dobio Nobelovu nagradu 1993. godine.

### Principi PCR metode

Ključna komponenta u PCR procesu jeste DNA polimeraza izolovana iz bakterije *Thermus aquaticus*, koja je rezistentna na visoke temperature (živi i replicira se pri temperaturama do 95°C). Ta termostabilna polimeraza nazvana je *Taq* polimeraza (po bakteriji domaćinu) i koristi se za replikaciju *in vitro* čime se omogućava geometrijski porast broja kopija ciljane DNK.

**Za PCR reakciju potrebne su sledeće komponente:**

- **izolovana DNK** čiji određeni fragment želimo da amplifikujemo,
- **prajmeri** (oligonukleotidne sekvence), pri čemu se u PCR reakciji neophodan par prajmera (*forward* i *reverse*) koji se dizajniraju tako da budu komplementarni sekvencama koji okružuju ciljani region DNK (npr. gen) koji želimo da umnožimo.
- ***Taq* polimeraza,**
- **slobodni nukleotidi**, odnosno gradivne jedinice za sintezu novih lanaca DNK, u vidu mešavine deoksiribonukleozid trifosfata (**dNTP**): adeninskih (dATP), timinskih (dTTP), guaninskih (dGTP) i citozinskih (dCTP),
- **Magnezijumovi joni** ( $Mg^{2+}$ ), kofaktori neophodni za aktivnost *Taq* polimeraze i polimerizaciju (vezuju se za slobodne nukleotide i obezbeđuju njihovo ugrađivanje u rastući lanac DNK).
- **PCR puffer,**
- sterilna dejonizovana voda.



---

**Proces PCR amplifikacije obuhvata sledeće korake:**

**1. Inicijalna denaturacija DNK** u trajanju od dva do četiri minuta (zavisno od udela GC parova).

**2. Denaturacija DNK** – rasplitanje i razdvajanje lanaca DNK. Obavlja se na 94-96°C u trajanju od 30 sec do nekoliko minuta (zavisno od udela GC parova),

**3. Hibridizacija para prajmera** sa komplementarnim sekvencama koji okružuju ciljani region DNK. Obavlja se na temperaturi od 45-65°C u trajanju od 30 sekundi do nekoliko minuta,

**4. Elongacija prajmera (ekstenzija)**, odnosno **sinteza novih DNK lanaca** počev od prajmera, tako što se *Taq* polimeraza vezuje za mesta hibridizacije prajmera i katalizuje ugrađivanje novih nukleotida komplementarnih inicijalnim sekvencama. Ovaj proces se obavlja na 72°C i traje od 45 sec do 1 minuta.

**Koraci od 2. do 4. ponavljaju se tokom 25 do 40 ciklusa**, kako bi se obezbedilo umnožavanje dovoljnog broja kopija ciljnog fragmenta DNK. **Umnoženi ciljni fragmenti DNK nazivaju se amplikoni ili PCR produkti.** U svakom ciklusu količina amplikona se duplicira (u prvom ciklusu nastaju 2 aplikona, u drugom 4, u trećem 8, u četvrtom 16, u petom 32, u šestom 64 ...) tako da na kraju PCR procesa nastaje od milion do bilion amplikona.

**5. Elongacija preostalih produkata** (na 72 °C, u trajanju od dva do četiri minuta).

<https://youtu.be/DkT6XHWne6E>

<https://youtu.be/iQsu3Kz9NYo>

**Kao rezultat PCR amplifikacije dobijaju se PCR produkti (amplikoni). Obzirom da je njihovo očitavanje moguće tek po završetku procesa amplifikacije, ovaj tip PCR metode zove se konvencionalni ili end-point PCR.**

Očitavanje rezultata se može obaviti na dva načina: **elektroforezom na gelu ili sekvenciranjem.**

## Elektroforeza

■ Potrebna laboratorijska oprema:

- laboratorijska vaga,
- erlenmajer adekvatne zapremine
- rešo ili mikrotalasna pećnica
- magnetna mešalica
- magnet i magnetni štap
- aparat za elektroforezu i transformator za podešavanje jačine struje
- mikropipete (mala - kapaciteta do 10 µl i srednja – kapaciteta do 100 µl).
- set nastavaka za mikropipete (malih - zapremine 10 µl; srednjih - zapremine 100 µl)
- posuda za bojenje gela
- UV transiluminator

- 
- Potrebni reagensi:
    - agarozna
    - pufer (npr. *TBE buffer*)
    - DNK marker (*DNA ladder*)
    - pufer za bojenje uzoraka (*loading buffer*)
    - PCR produkti
    - etidijum bromid- EtBr (ili neka druga savremena i bezbednija alternativna interkalirajuća boja, koja se koristi da fluorescentno obeleži molekul DNK).

**Elektroforeza** obezbeđuje razdvajanje molekula različite dužine pod uticajem električnog polja prilikom njihovog kretanja kroz inertan i porozan matriks (agarozni ili poliakrilamidni gel) potopljen u rastvor slabog elektrolita. Fragmenti DNK različite dužine imaju različitu elektropokretljivost (jer je ukupna količina naelektrisanja DNK proporcionalna njegovoj veličini), te kroz gel putuju različitom brzinom (od – ka + polu, obzirom da je DNK molekul negativno naelektrisan). Zbog toga fragmenti različite dužine tokom trajanja elektroforeze prolaze različiti put: kraći fragmenti (koji se kroz gel probijaju lakše te se kreću brže) pređu duži put u odnosu na duže fragmente (koji se teže probijaju kroz gel pa se kreću sporije). Međutim, to se ne vidi ako ne primenimo određene boje jer je DNK bezbojna. Za praćenje kretanja DNK kroz gel uzorci se pre nanošenja na gel mešaju sa puferom za bojenje uzoraka (tzv. *loading buffer*) koji ima dve funkcije: omogućava praćenje toka elektroforeze (zbog boje) i čini uzorke težim čime se sprečava njihovo izlivanje van gela. Pri svakom puštanju elektroforeze, osim uzoraka koje ispituujemo, nanosi se i DNK marker (tzv. *DNA ladder*) koji predstavlja mešavinu fragmenata tačno određene dužine (npr. 100, 200, 300, 500, 1000 bp) i služi kao „lenjir“ za određivanje veličine ispitujućih fragmenata. **Kada se elektroforeza završi, fragmenti različitih dužina su razdvojeni ali još uvek nisu vidljivi**, te je neophodno gel obojiti inkubiranjem u rastvoru etidijum bromida - EtBr (ili neke savremene bezbednije alternativne „boje“, npr. *SYBR<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain*, *GelRed<sup>®</sup>* and *GelGreen<sup>®</sup>* i dr.) koji interkalira između parova baza dva lanca DNK. EtBr (ili alternativna „boja“) fluorescira pod UV svetlošću, te je za konačnu **vizuelizaciju rezultata** neophodno da se gel (nakon bojenja sa EtBr) postavi na UV transiluminator. Kvalitativno očitavanje rezultata obavlja se odmah (dok je gel na transiluminatoru) kada se uzorci vide kao fluorescentne trake, ali za detaljnije čitanje i tumačenje koje zahteva određivanje dužine razdvojenih fragmenata DNK, preporučuje se fotografisanje gela (dok je osvetljen UV svetlošću) i njegovo čuvanje u arhivi. Napomena: gustina gela utiče na kretanje uzoraka tako što gušći gelovi bolje razdvajaju bliske fragmente DNK male dužine (npr. fragmente od 60 i 70 bp), dok ređu gelovi služe za razdvajanje velikih fragmenata (npr. 500, 700, 1000 i više bp).

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/>

---

## Sekvenciranje

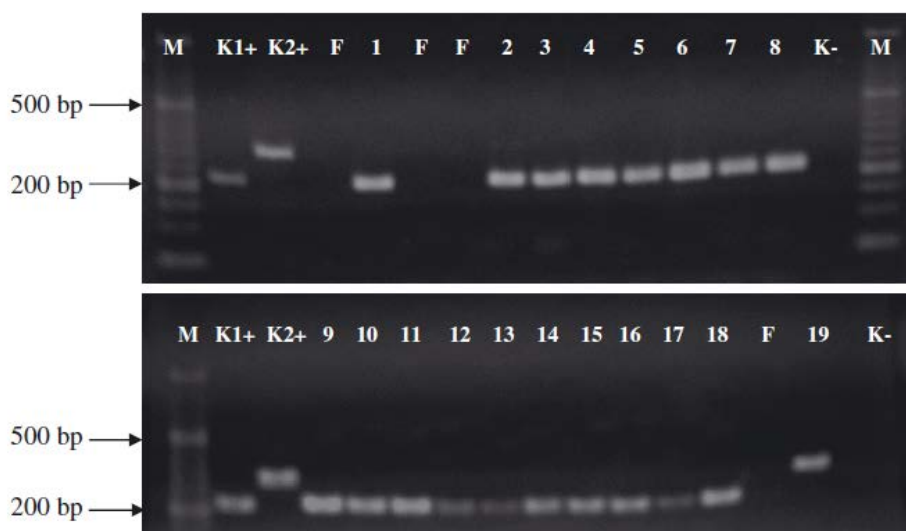
**Sekvenciranje** obezbeđuje utvrđivanje redosleda nukleotida (adeninskih, guaninskih, citozinskih i timinskih) u PCR produktu (odnosno amplifikovanom fragmentu DNK koji je predmet analize). Najpoznatija i najviše korišćena metoda sekvenciranja je SANGER (ili DIDEOKSI) metoda koja zahteva da se pri *in vitro* sintezi DNK pored normalnih gradivnih jedinica (dNTP) dodaju i **dideoksinukleotidi (ddNTP)** koji u pentoznom šećeru nemaju OH grupe na pozicijama 2' i 3', te se nakon njihovog ugrađivanja u polinukleotidni lanac zaustavlja dalja sinteza (jer nema slobodne OH grupe na poziciji 3' za koju bi sledeći nukleotid trebao da se veže). Zato se ova metoda naziva i „**metoda prekida sinteze lanca**“. Dideoksinukleotidi su obeleženi fluorescentnim markerima različite boje za svaki od četiri tipa dideoksinukleotida adeninski (ddATP), guaninski (ddGTP), citozinski (ddCTP) i timinski (ddTTP). Svaki ddNTP fluorescira različitom bojom kada ga osvetli laserski zrak: npr. ddATP zeleno, ddGTP žuto, ddCTP plavo i ddTTP crveno, što se automatski zabeleži putem skenera (npr. svaki put kada se registruje crvena boja – automatski skener registruje da taj nukleotid nosi timin). Obeležavanje ddNTP različitim fluorescentnim bojama omogućava da se koristi samo jedna reakciona smeša i razdvajanje (čitavanje rezultata) obavlja na jednom gelu. Čitav proces se odvija u sekvenceru, aparatu koji sve radi automatski od unošenja uzoraka do čitanja rezultata sa gela. Razdvajanje fragmenata se odvija kapilarnom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (koji se uliva u kapilarne cevi) čime se postiže izuzetno visoka rezolucija, odnosno razdvajanje fragmenata jednolančanih DNK fragmenata koji se razlikuju u dužini za samo jedan nukleotid. Prilikom sekvenciranja u jednom smeru očitava se redosled nukleotida samo sa jednog lanca DNK i za taj proces dovoljan je samo jedan prajmer (koji je komplementaran 3' kraju jednog lanca DNK fragmenta čiju sekvencu očitavamo). Ako je potrebna veća preciznost analize, onda se obavlja bidirekciono sekvenciranje (očitanje oba lanca ciljnog DNK fragmenta), ali tada je potreban i drugi prajmer (koji je komplementaran 3' kraju drugog lanca ciljnog DNK fragmenta).

<https://youtu.be/ONGdehkB8jU>

<https://youtu.be/KTstRrDTmWI>

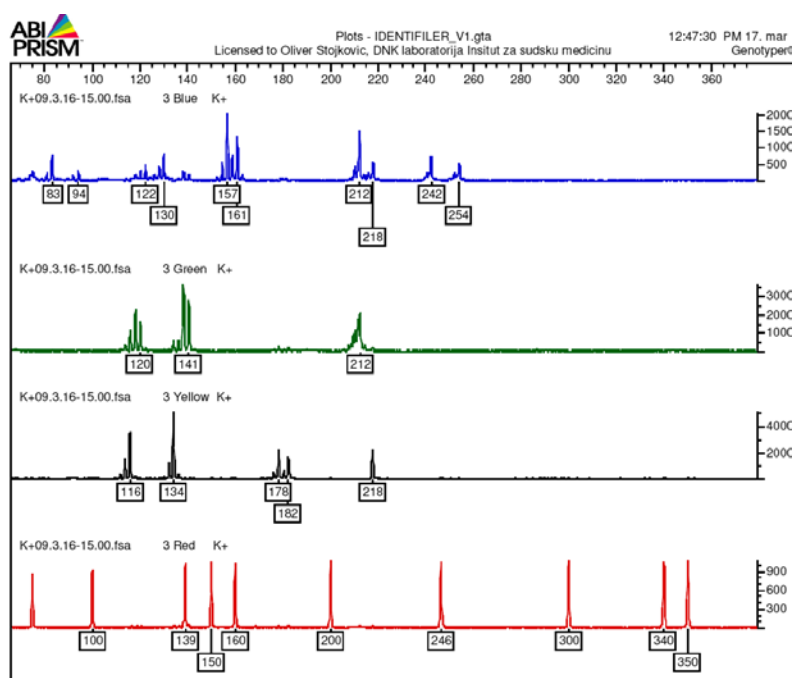
### Postoje različite modifikacije PCR metode:

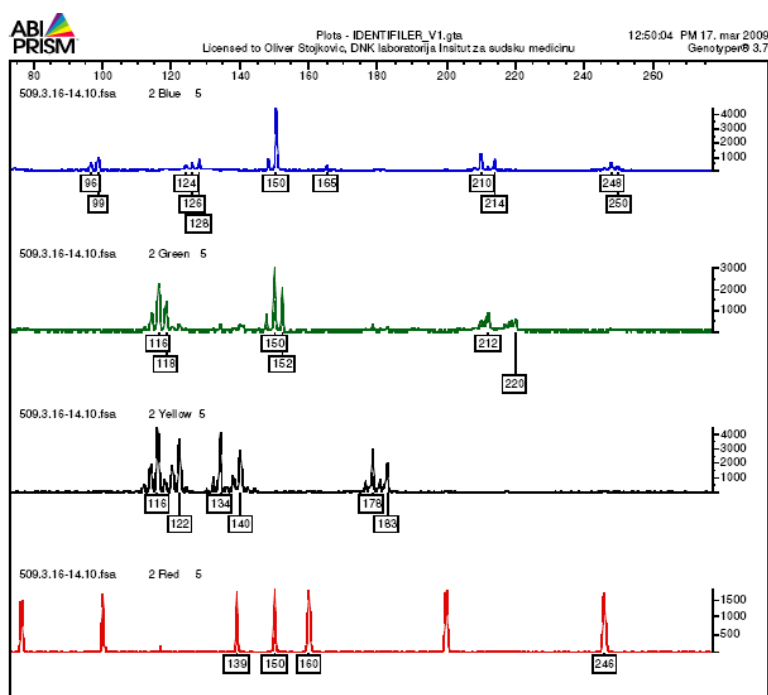
**Duplex PCR** – je varijanta PCR metode u kojoj se, umesto jednog, koriste dva para prajmera, pri čemu oni prepoznaju različite fragmente DNK i omogućavaju diferencijalnu dijagnostiku) (Primer na slici ispod: razlikovanje vrsta *Nosema apis* i *N. ceranae* putem duplex PCR uz primenu species-specifičnih prajmera).



**Figure 3.** Ethidium bromide stained agarose gels showing the results of duplex PCR using primers 321APIS-FOR/REV and 218MITOC-FOR/REV. Lane M, 50 bp ladder; K1+, positive *N. ceranae* control; K2+, positive *N. apis* control; F, failed PCR; K-, negative control; 1–18, PCR products of samples that correspond to *N. ceranae*; 19, PCR product of a single sample that correspond to *N. apis*.

**Multiplex PCR** podrazumeva korišćenje većeg broja parova prajmera što omogućava istovremeno umnožavanje većeg broja različitih ciljnih fragmenata. Tako se kod amplifikacije seta mikrosatelita, koji omogućava testiranje roditeljstva, goveda koristi 11 parova prajmera za amplifikaciju 11 mikrosatelita (kod ljudi mnogo više, od 14 do preko 30). (Primer na slici ispod: testiranje očinstva kod goveda analizom mikrosatelita – direktni rezultati analize dužine referentnih mikrosatelitskih lokusa dobijeni na sekvenceru). Ovom metodom se takođe može istovremeno utvrditi prisustvo ili odsustvo više različitih genotipova.

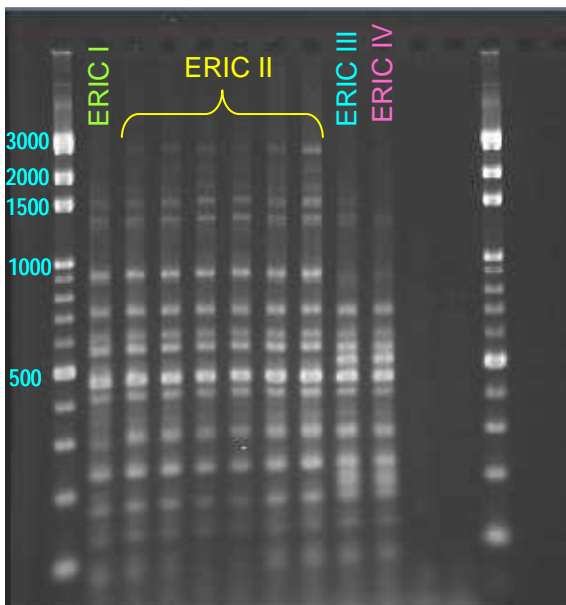


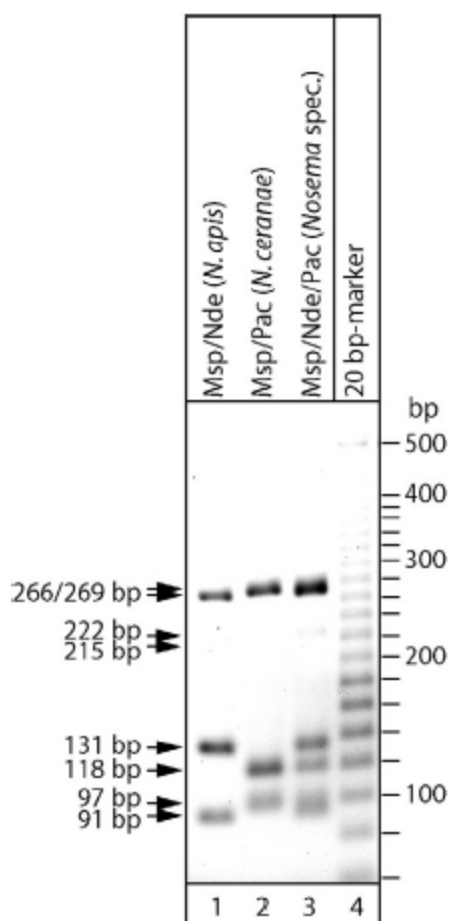


Analiza roditeljstva sastoji se u poređenju DNK profila jedinke (potomka) sa DNK profilima jedinki za koje se ispituje da li su roditelji te jedinke (potencijalnih roditelja). Pozitivan rezultat, odnosno potvrda roditeljstva, dobija se ukoliko za svaki analizirani lokus postoji poklapanje makar jednog alela između potomka i potencijalnog roditelja (**Primer ispod: uporedni prikaz DNK profila bika-potencijalnog oca i tri muška teleta**).

Mikrosatelitski lokus	Bik (otac) ID 780 392 1516	Tele (sin) ID 713 295 1116	Tele (sin) ID 717 278 8208	Tele (sin) ID 714 558 1406
TGLA227	89	79/89	89/91	89/97
BM2113	131/133	131/135	127/131	133
TGLA53	168	154/168	164/168	168/184
ETH10	217/219	217	217/221	213/219
SPS115	248/256	248/260	248	235/256
TGLA126	115/117	115/123	113/117	115
TGLA122	151/153	147/151	141/151	153
INRA23	208	208/218	208/222	208/214
ETH3	117/125	125	117	89/117
ETH225	150/142	148/150	150	136/142
BM1824	182/188	178/188	180/182	182

Repetitivni PCR (rep-PCR) se može koristiti kod bakterija kada u njihovoj DNK postoje kratke repetitivne sekvence (fragmenti DNK koji se ponavljaju više puta), a između njih su umetnute jedinstvene sekvence (koje se samo jednom javljaju u genomu) specifične za svaki soj-genotip bakterije. Na osnovu toga osmišljena je metoda rep-PCR u kojoj se amplifikuju te repetitivne sekvence DNK. Pošto su one različito raspoređene kod različitih sojeva, nakon elektroforeze PCR produkata dobija se niz traka različite dužine („kao lestvica“), čiji je raspored jedinstven za svaki soj –genotip bakterija i naziva se **fingerprint**, te se zato ova metoda koristi za diferencijaciju različitih sojeva iste vrste bakterija (Primer ispod: genotipizacija *Paenibacillus larvae*).





**Figure 1.** Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of a 16S rRNA gene region conserved for *N. apis* and *N. ceranae*. A conserved region of the 16S rRNA gene of *N. apis* and *N. ceranae* was amplified by PCR. Subsequently, discriminating restriction endonuclease sites within this region were used to differentiate between the two *Nosema* species. Digestion by *Msp* I/*Nde* I results in three bands (91 bp, 131 bp, 266 bp) for *N. apis* (lane 1). Digestion by *Msp* I/*Pac* I results in three bands (97 bp, 118 bp, 269 bp) for *N. ceranae* (lane 2). Weak bands of 222 bp and 215 bp represent incomplete digests by *Nde* I for *N. apis* and *Pac* I for *N. ceranae*, respectively. Mixed infections can also be identified using this method (lane 3).

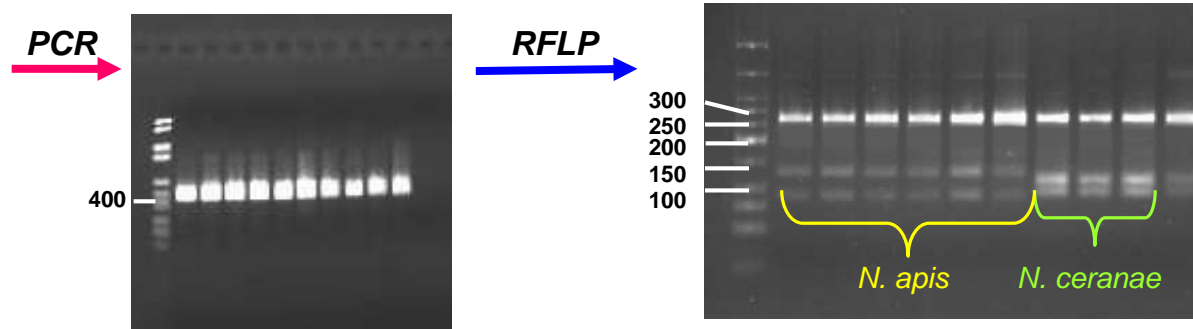
### PCR-RFLP metoda za detekciju polimorfizma u dužini restrikcionihih fragmenata

**Polimorfizam u dužini restrikcionihih fragmenata** (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) se detektuje nakon tretiranja PCR produkata restrikcionihih enzimima (koji seku DNK na tačno određenim „restrikcionihih mestima” unutar specifičnih nukleotidnih sekvenci). Na taj način se otkrivaju aleli koji se međusobno razlikuju po prisustvu, odnosno odsustvu restrikcionihih mesta.

Nakon tretmana restrikcionihih enzimima (digestije), dobijeni fragmenti se analiziraju putem elektroforeze. U zavisnosti od prisutva (broja i položaja) restrikcionihih mesta u analiziranom fragmentu, na gelu dobijamo DNK fragmente različite dužine (različite RFLP-profile). Ukoliko je u ampliconu postojalo jedno restrikciono mesto, na gelu će se videti dve trake, ukoliko je sečenje obavljeno na dva mesta, pojaviće se tri trake. Ukoliko nije bilo restrikcionihih mesta, amplicon će ostati ceo (jedna traka).

- **Primer razlikovanja vrsta PCR-RFLP metodom:**

Ukoliko se dve vrste razlikuju po prisustvu ili po broju i položaju restrikcionihih mesta za neki enzim, poređenjem dva ili više profila (nakon digestije istim enzimom) možemo utvrditi da li je reč o istim ili različitim vrstama. Ukoliko kod različitih vrsta isti DNK fragment ima restrikciona mesta za različite enzime, onda se uzorci tretiraju svim dijagnostičkim enzimima (istovremeno), pa se na osnovu dobijenog profila na gelu utvrđuje kojoj vrsti pripada svaki od uzoraka (**primer: razlikovanje vrsta *Nosema apis* i *N. ceranae* putem PCR-RFLP – slika levo i dve slike dole**).



Gel sa PCR produktima  
dobijenih sa prajmerima  
nos-16S-fw i nos-16S-rv

Gel na kome se vide šabloni RFLP  
nakon digestije enzimima  
*Msp I, Pac I i Nde I*  
(na osnovu šablona određuje se  
vrsta parazita roda *Nosema*)

- Primeri dijagnostike naslednih bolesti PCR-RFLP metodom

Genetski predisponirane (nasledne) bolesti često nastaju usled **zamene jednog nukleotida** (*Single Nucleotide Polymorphisms - SNPs*) odnosno „tačkaste“ mutacije u kodirajućim regionima DNK. Putem PCR-RFLP tehnike može se detektovati mutirani alel, odnosno otkriti jedinke nosioci SNP mutacija, ukoliko je SNP doveo do nastanka restriktionog mesta.

Na primer, SNP je uzrok bolesti policističnih bubrega kod mačaka (*Polycystic Kidney Disease - PKD*) i progresivne atrofija retine (*Progressive Rod-Cone Degeneration – PRCD*) kod pasa. Konkretno, uzrok autozomalno-dominantne PKD bolesti je *nonsense* stop-mutacija tipa transverzije C-A, dok je PRCD oboljenje autozomalno recesivno i uzrokovano *missense* mutacijom tipa tranzicije G-A.

Zamene jednog jedinog nukleotida (SNP) mogu imati fatalne posledice (letalni ishod), na primer kod:

- **deficijencije adhezije leukocita goveda (BLAD)** koju izaziva SNP na poziciji 383 CD18 gena (tranzicija A-G);
- **citruinemijske**, koju izaziva SNP na kodonu 86 unutar egzona 5 gena za argininosukcinat sintazu (tranzicija C-T).



---

## Reverzna transkripcija

**Reverzna transkripcija** (RT – engl. *reverse transcription*) je postupak koji se koristi u slučajevima kada se ciljane sekvenca (ona čiju amplifikaciju želimo da izvršimo) nalazi na molekulu RNK. Najčešće se primenjuje pri (1) analizi eukariotske informacione (engl. *messenger*) RNK (iRNK, mRNA) za praćenje genske ekspresije ili (2) analizu virusne RNK. Pre same amplifikacije, primenom neke od PCR metoda, neophodno je molekul RNK prevesti u **komplementaran** (engl. *complementary*) **lanac DNK (kDNK, cDNA)**.

U prvom koraku **reverzna transkriptaza (RT)**, osnovni enzim u ovoj reakciji, sintetiše prvi komplementarni DNK lanac i formira se dvolančani hibrid RNK/DNK. Enzim RNK-aza razgrađuje RNK lanac iz hibridnog molekula, a zatim se sintetiše drugi DNK lanac tako da se formira dvolančani DNK molekul koji može dalje poslužiti za amplifikaciju ciljane sekvence u nekoj od PCR metoda.

Za izvođenje reverzne transkripcije neophodno je i prisustvo određenih prajmera. U tu svrhu najčešće se koriste tri vrste prajmera:

1. **Oligo (dT) prajmeri** koji su jednolančane sekvence nekoliko uzastopnih deoksitimidinskih (dT) nukleotida koji se po sistemu komplementarnosti lepe za 3' poli A repu (nekoliko uzastopnih adenina) na eukariotskoj iRNK. Upotrebom ovih prajmera u kDNK se nespecifično prevode sve iRNK odjednom. Metoda je korisna kod analize ekspresije više gena, upravo zbog činjenice da se u jednoj reakciji svi molekuli iRNK prevode u kDNK koji se dalje mogu koristiti za različite PCR analize. Sa druge strane, ova metoda se ne može koristiti za analizu RNK poreklom od onih organizama koji nisu eukariotski.
2. **Random prajmeri** (engl. *random* = nasumično) su oligodeoksiribonukleotidne sekvence (najčešće su u upotrebi sekvence od 6 nukleotida – **random heksameri**) koje predstavljaju niz nasumično raspoređenih nukleotida (kod *random* heksamera niz od 6 nukleotida). U toku reakcije, zahvaljujući velikom broju kombinacija dobijenih nasumičnim rasporedom nukleotida u ovim prajmerima, obezbeđuje se pokrivanje svih regiona RNK, što kao posledicu ima prevođenje ukupne RNK u komplementaran lanac DNK. Zbog toga su i oni korisni kod metoda u kojima je u jednom uzorku potrebno izvršiti amplifikaciju više različitih sekvenci RNK. Neki istraživači koriste i mešavinu oligo i *random* prajmera radi dobijanja što uspešnije reakcije.
3. **Specifični prajmeri** su prajmeri dizajnirani za specifična mesta na molekulu RNK i njihovom upotrebom se sintetiše samo ciljane specifične kDNK sekvence za koju je prajmer i dizajniran, dok svi ostali molekuli RNK u uzorku ostaju neprevedeni u kDNK. Ovi prajmeri se najčešće koriste pri analizi prisustva specifične virusne RNK i to pre svega u *one-step* RT-PCR metodi.

Reverzna transkripcija može biti izvedena kao posebna, odvojena, reakcija, posle koje se dobijena kDNK koristiti kao uzorak za dalje PCR analize. Dakle, za dobijanje rezultata neophodna su dva koraka (prvi, reverzna transkripcija a zatim drugi, neka od PCR metoda) pa je ova metoda nazvana RT-PCR u dva koraka (engl. *two-step RT-PCR*). Osim toga, ove dve reakcije mogu biti izvedene u jednom koraku (engl. *one-step RT-PCR*), kada se u istu reakciju ubacuju komponente neophodne za oba koraka i najpre se izvede reverzna transkripcija, a zatim se bez prekidanja reakcije nastavi sama PCR amplifikacija.

---

## Principi *real-time* PCR metode

**Real-time PCR** se razlikuje od tradicionalne (konvencionalne) PCR metode po tome što se **uzorci obeležavaju fluorescentnim markerima**, a real-time PCR aparat ima **detektor fluorescencije** i softver koji na osnovu intenziteta fluorescencije obezbeđuje i detekciju PCR produkta i praćenje kinetike reakcije od samog početka reakcije, odnosno **u svakom momentu dok traje reakcija**. Osim toga, **real-time PCR omogućava kvantifikaciju umnoženog segmenta DNK, a time i zastupljenost ciljane DNK u uzorku** (opis principa kvantifikacije dat u je u posebnom poglavlju). Ovo su **velike prednosti** u odnosu na konvencionalni PCR koji je samo kvalitativna metoda bez mogućnosti kvantifikacije PCR produkta i kod koga je postupak mnogo duži jer je potrebno da se ceo postupak završi, pa tek onda očitaju rezultati (najpre je neophodno sačekati da se kompletno završi amplifikacija, pa obaviti elektroforezu PCR produkata, obojiti gel etidijum bromidom i vizuelizovati PCR produkte na transiluminatoru).

Zahvaljujući opisanim karakteristikama real-time PCR pruža mogućnost primene u proceni efikasnosti terapije lekovima, u merenju stepena oštećenja DNK, u kvantifikaciji genske ekspresije, detekciji patogena, genotipovanju, analizi SNPs, kontroli kvaliteta i validaciji testova.

Vizuelizacija PCR amplifikacije u trenutku nastanka svake nove amplifikovane sekvence (amplikona) zasniva se na emitovanju fluorescentne boje prilikom nastanka svakog novog amplikona. Kako se kod pozitivne PCR reakcije iz ciklusa u ciklus broj amplikona povećava, fluorimetar (koji je sastavni deo aparata) detektuje svako povećavanje fluorescencije. Na osnovu toga što se praktično u momentu amplifikacije (trenutno) detektuje fluorescencija i to istovremeno emituje na monitoru računara, ova tehnika je i dobila ime "*real-time*".

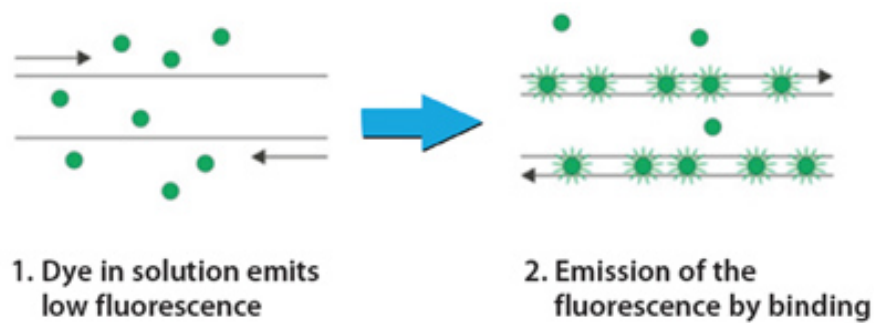
Razvijene su dve različite real-time PCR tehnologije:

1. **SYBR-Green® tehnologija** kod koje se fluorescentna boja vezuje za svaku dvolančanu DNK strukturu (Slika 1).

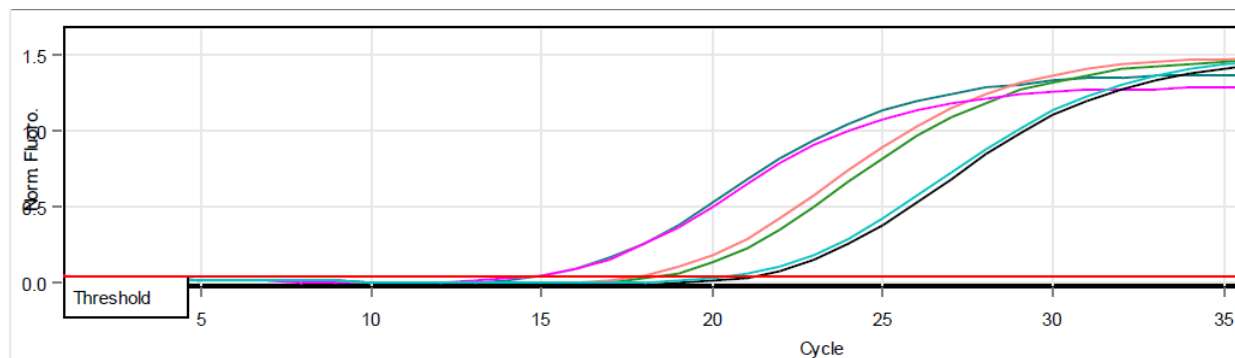
Imajući u vidu da se svaki ciklus u PCR protokolu sastoji iz:

- a) denaturacije (rasplitanja dvolančane DNK),
- b) hibridizacije (komplementarnog "lepljenja" prajmera na specifična mesta na DNK sekvenci) i
- c) elongacije (sintetisanja komplementarnog lanca DNK na ciljanoj sekvenci)

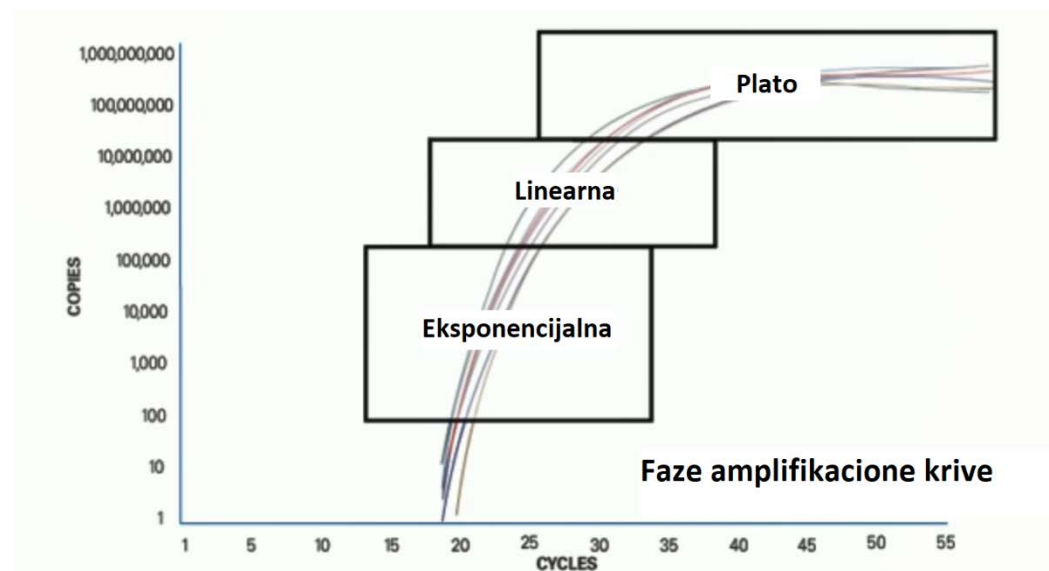
Na kraju svakog ciklusa uvećava se broj dvolančane DNK. Fluorescentna SYBR-Green® boja (koja slobodna u rastvoru slabo odaje fluorescenciju) se vezuje za veći broj mesta, počinje da fluorescira i fluorimetar očitava adekvatan porast fluorescencije (Slika I), što se istovremeno (*in real time*) prikazuje na monitoru računara povezanog sa real-time PCR aparatom (Slike IIa i IIb).



Slika I - SYBR-Green® tehnologija

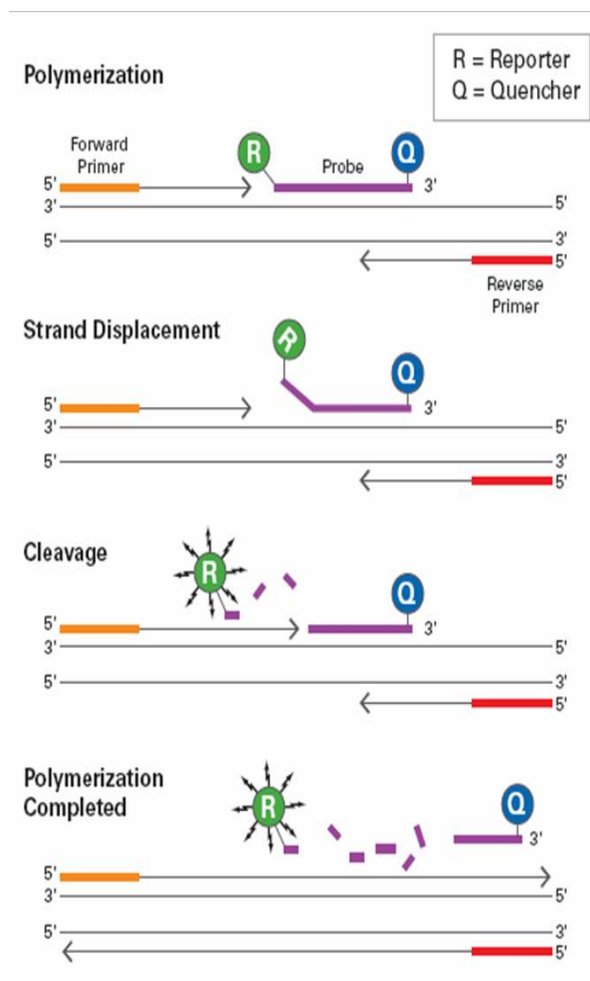


Slika IIa - Amplifikacione krive koje pokazuju nivo detektovane fluorescencije (y osa) kroz cikluse (x osa)



Slika IIb - Tri faze amplifikacione krive: **Eksponencijalna faza**, kada dolazi do dupliranja broja kopija u svakom ciklusu; **Linearna faza** kada reagensi u reakciji počinju da se troše i reakcija kreće da se usporava jer ne dolazi do dupliranja svake kopije; **Plato faza** kada se iscrpljuju reagensi i reakcija staje

2. **TaqMan® probe tehnologija** koja podrazumeva upotrebu specifičnih, fluorescentnim bojama obeleženih proba. Svaka proba predstavlja kratku sekvencu nukleotida komplementarnih i specifičnih za ciljenu sekvencu (kao kod prajmera). Dizajnirana je tako da se komplementarno i specifično vezuje između dva prajmera (*forward* i *reverse*). Pored nukleotidne sekvence, proba ima još dve komponente: *reporter* i *quencher* (slika III). *Reporter* emituje fluorescentnu boju dok *quencher* upija ovu fluorescenciju, te se fluorescencija ne emituje dok su zajedno vezani za probu. Kada u toku elongacije polimeraza pokida veze među njima, *quencher* prestaje da upija fluorescenciju, *reporter* je slobodno emituje i fluorimetar to detektuje (Slika III). Kako se iz ciklusa u ciklus povećava broj sekvenci na kojima dolazi do elongacije, proporcionalno se povećava količina detektovane fluorescencije i to se istovremeno (*in real time*) prikazuje na monitoru računara povezanog sa real-time PCR aparatom (Slike IIa i IIb).

Slika IV - TaqMan® probe tehnologija

<https://www.qiagen.com/us/resources/molecular-biology-methods/pcr/#Guidelines%20for%20RT-PCR>

<http://www.sigmaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/sybr-green-qpcr.html>

<http://technologyinscience.blogspot.it/2013/05/taqman-assay-vs-sybr-green-assay.html#.V1CdgpF97IU>

---

## Principi kvantitativne real-time PCR metode

Kvantitativni real-time PCR (qPCR) je metoda koja osim detekcije obezbeđuje i kvantifikaciju specifičnih sekvenci nukleinskih kiselina. Ovo se postiže upotrebom različitih fluorescentnih markera koji su u uzajamnoj vezi sa koncentracijom PCR produkta što se odražava na intenzitet fluorescencije. Analiza rezultirajućeg proizvoda se zasniva na merenju porasta fluorescencije koja je proporcionalna količini dobijene DNK tokom svakog PCR ciklusa. Na taj način se određuje proizvoljna vrednost granične fluorescencije (threshold) u eksponencijalnoj fazi. Za procenu rezultata neophodno je definisanje granične vrednosti fluorescencije (**threshold cycle - Ct vrednost**) koja predstavlja broj ciklusa gde fluorescentni signal prelazi graničnu vrednost fluorescencije. **Što je Ct vrednost niža to je početna količina ispitujuće sekvence u uzorku veća, jer je ranije postignuta granična vrednost fluorescencije.** Sam proces qPCR se očitava u vidu amplifikacione krive koja ima sigmoidni oblik i na kojoj se razlikuju 3 faze. Prva faza je linearna (*lag*) faza u kojoj se ne može detektovati amplifikacija, jer amplifikaciona kriva ne prelazi graničnu vrednost fluorescencije. Druga faza je eksponencijalna faza tokom koje su molekuli DNK denaturisani, nastupila je hibridizacija prajmera DNK matrice, a nakon toga elongacije prajmera aktivnošću DNK polimeraze. Ova faza traje oko 10 do 20 ciklusa i zavisi od količine ispitujućih sekvenci u reakcionoj smeši. U trećoj fazi komponente reakcione smeše ponestaju (jer su istrošeni nukleotidi i prajmeri), dok se inhibitori reakcije mogu akumulirati, a polimeraza izgubiti aktivnost.

Obe gore pomenute tehnologije (SYBR green i TaqMan probe) mogu se koristiti u ovu svrhu.

Metoda u kojoj se koristi SYBR green boja zasniva se na vezivanju te boje za nosivost dvolančane DNK molekule, što se odražava povećanjem fluorescencije. Ova metoda je osetljiva, ali nespecifična pošto se SYBR green boja vezuje za sve dvolančane strukture kao i nespecifične produkte PCR reakcije i dimere prajmera. Da bi se izbegli nespecifični produkti PCR reakcije analiziraju se krive topljenja PCR reakcije. DNK se topi na karakterističnoj temperaturi koja se zove temperatura topljenja ( $T_m$ ) i definiše se kao temperatura gde se 50% DNK heliksa denaturišu. Temperatura topljenja DNK molekula zavisi od veličine fragmenta i sastava nukleotida, dakle fragmenti bogati GC baznim parovima imaju višu  $T_m$  od fragmenata bogatih AT baznim parovima.

TaqMan probe tehnologija u kojoj se koriste fluorescentne boje je specifičnija i senzitivnija. TaqMan probe je oligonukleotidna sekvenca specifična za ispitujuću sekvencu. Dizajnirana je tako da se komplementarno i specifično vezuje između dva prajmera (*forward* i *reverse*). TaqMan probe pored nukleotidne sekvence ima na 5'- kraju *reporter*, a na 3'- kraju *quencher*. Reporter emituje fluorescentnu boju dok quencher upija fluorescenciju, te se fluorescencija ne emituje dok su zajedno vezani za TaqMan probe. Pošto Taq-DNA-polimeraza poseduje 5'-3' nukleaznu aktivnost, tokom faze elongacije u PCR reakciji dolazi do isecanja TaqMan probe sekvence, a time i do odvajanja *reporter*-a i *quencher*-a, što se beleži kao povećanje fluorescencije reportera. Pored toga, upotreba TaqMan probe sekvenci obeleženih različitim markerima omogućava detekciju i kvantifikaciju većeg broja ciljnih gena u jednoj reakciji (multiplex real-time PCR). Postoje dve kategorije kvantifikacije putem qPCR i to su: apsolutna i relativna kvantifikacija.

---

## ■ Apsolutna kvantifikacija

Za apsolutnu kvantifikaciju koriste se serijska razblaženja standarda poznatih koncentracija kako bi se formirala standardna kriva. Standardna kriva predstavlja linearni odnos između Ct vrednosti i ukupne početne količine DNK, omogućavajući na taj način određivanje koncentracije ispitujućih uzoraka na osnovu njihovih Ct vrednosti. Ova metoda podrazumeva da svi standardi i uzorci imaju približno jednaku efikasnost amplifikacije. Kao standardi se koriste različiti molekuli, uključujući PCR- produkte pozitivnih kontrola, plazmide koji sadrže ciljanu sekvencu ili komercijalno pripremljena DNK poznate koncentracije. Pouzdanost standarda za qPCR je najvažniji deo prilikom kvantifikacije ispitujućeg uzorka. Jednom napravljen standard se može koristiti u dužem vremenskom periodu, ali je zato stabilnost standarda uvek pod znakom pitanja, naročito za dugotrajna proučavanja gde se standardi koriste u dužem vremenskom periodu.

Imajući u vidu da se qPCR metodom može kvantifikovati broj mikroorganizama ova metoda nam pruža mogućnost za praćenje infekcija, reakcije organizama na patogene i u proceni efikasnosti lekova, ali i aditiva i dijetetskih suplemenata u kontoli ili prevenciji određenih patoloških stanja.

## ■ Relativna kvantifikacija

Najznačajnija primena relativne kvantifikacije je u analizi ekspresije gena. Kako je primarni transkript RNK, najpre je iz uzorka potrebno ekstrahovati kompletnu RNK, prevesti je u komplementarnu DNK (kDNK) postupkom koji se naziva reverzna transkripcija (RT-PCR), a zatim količinu dobijene kDNK izmeriti real-time qPCR metodom. Za ovu potrebu najčešći i najadekvatniji način je relativna kvantifikacija metodom  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### ○ *Relativna kvantifikacija metodom $2^{-\Delta\Delta Ct}$*

Relativna kvantifikacija metodom  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  obezbeđuje analizu relativne promene u ekspresiji gena. Analiza ekspresije gena na ovaj način podrazumeva korišćenje navedene formule za koju su neophodna dva koraka:

(I) normalizacija ekspresije ciljanog gena (gene of interest) nivoom ekspresije endogene kontrole tzv. „house keeping genes“, koji najčešće predstavljaju konstitutivne gene potrebne za održavanje osnovne ćelijske funkcije i eksprimirani su u svim ćelijama organizma u normalnim i patofiziološkim uslovima. Na ovaj način se svi uzorci normalizuju sa svojim endogenim kontrolama i razlike u količini iRNK koje potiču od neujednačenosti uzoraka (npr. količina tkiva nekog organa uzeta biopsijom, broj uzorkovanih pčela po uzorku itd.), a ne od realne promene u ekspresiji samog gena se izbegnu tj. normalizuju.

(II) normalizovana vrednost ekspresije ciljanog gena u ispitivanim uzorcima (uzeti od tretiranih životinja) se zatim prikazuje u odnosu na te iste gene kod jedinki iz drugih grupa (npr. jedinke iz netretiranih, kontrolnih grupa) koje se nazivaju kalibratori.

Analizom uzoraka na ovakav način dobija se podatak o tome da li je i koliko ekspresija nekog gena smanjena (suprimirana) ili povišena u odnosu na kalibrator (nivoi ekspresije tih istih gena kod zdrave populacije jedinki – referentne vrednosti). Određivanjem nivoa ekspresije pojedinih gena mogu se pratiti odgovori organizma na različite agense. Nesumnjivo je da bolesti, stresni momenti, upotreba lekova i suplemenata, kvalitet ishrane i dr. utiču na ekspresiju različitih gena, što na kraju rezultira i određenim fenotipskim promenama (u zdravstvenom stanju, proizvodnim karakteristikama, eksterijeru i dr). Iz ovih razloga jasno je zašto ova metoda zauzima sve značajnije mesto u istraživanjima u svim oblastima veterinarske medicine i biotehnologije.

Analize stepena ekspresije pojedinih gena u poslednje vreme obavljaju se radi ispitivanja lekova i suplemenata, uticaja bolesti i kombinacije bolesti i aplikovanja lekova. Rezultati takvih istraživanja pomažu u razumevanju patofizioloških mehanizama bolesti, ali i u razvoju novih dijagnostičkih, terapijskih i uzgojnih strategija radi produžetka života kućnih ljubimaca i/ili poboljšanju efikasnosti komercijalnog uzgoja i proizvodnje hrane životinjskog porekla.

**Box**

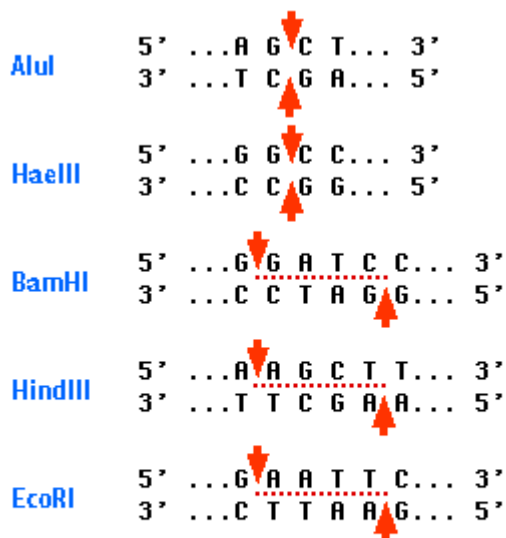
**Restrikcioni enzimi (endonukleaze)** prepoznaju tzv. specifične nukleotidne sekvence (tzv. palindromske sekvence) i seku ih na tačno određenim „restrikcionim mestima”. Naime, za svaki restrikcioni enzim postoji specifična sekvenca koju samo on prepoznaje i seče je na specifičan način. (Mesta sečenja nekih restrikcioni enzima prikazana su na **slici ispod**).

Za brojne potrebe u procesima molekularno-genetičkih istraživanja neophodno je prethodno iseći DNK u manje fragmente i za tu svrhu se koriste restrikcioni enzimi.

Neki restrikcioni enzimi (kao npr. *HaeIII* i *AluI*) **seku DNK ravno** tako da nastaju fragmenti sa ravnim krajevima. Ako se specifična sekvenca koju prepoznaje i seče npr. enzim *HaeIII* nalazi na 11 mesta duž cirkularne DNK virusa, nastaje 11 fragmenata **različitih po dužini i sekvencama nukleotida**. Nastali fragmenti se mogu odvojiti jedan od drugog elektroforezom, a zatim odrediti redosled nukleotida u njima postupkom sekvenciranja .

Međutim, **mnogi restrikcioni enzimi** (BamHI, HindIII, EcoRI) **seku DNK neravno** tako da **nastaju fragmenti sa “lepljivim” jednolančanim krajevima**. Ukoliko se DNK poreklom iz dva različita izvora tretiraju istim restrikcionim enzimom, nastaje fragmenti sa istim lepljivim krajevima, te ukoliko se dobijeni fragmenti pomešaju, dolazi do njihovog povezivanja, odnosno **spajanja njihovih lepljivih krajeva po principu komplementarnosti baza**. Konačno, **odaje se DNK ligaza** koja **spaja mesta prekida kovalentnim vezama** (formira kovalentne veze unutar svakog lanca i kao rezultat nastaje “rekombinantna” DNK (rDNA).

Stvaranje rekombinante DNK je revolucionarno otkriće, ne samo zbog toga što je usavršilo genetička istraživanja, nego i zbog velike mogućnosti primene u biotehnologiji i medicini. **Humani insulin (za dijabetičare), humani faktor VIII (za hemofiličare)** i drugi preparati danas se komercijalno proizvode zahvaljujuću otkriću načina stvaranja rekombinantne DNK.



**AluI** and **HaeIII** produce blunt ends

**BamHI** **HindIII** and **EcoRI** produce “sticky” ends



---

**REFERENCE ISTRAŽIVAČA SA KATEDRE ZA BIOLOGIJU U KOJIMA SU KORIŠĆENE  
MOLEKULARNE METODE BAZIRANE NA PCR TEHNOLOGIJI:**

1. Kozmus Petar, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran, Stojic Velibor, Kulisic Zoran, Meglič Vladimir (2007) Analysis of mitochondrial DNA in honey bees (*Apis mellifera*) from Serbia. *Acta Veterinaria* 57 (5-6) 465-476.
2. Forsgren E, Stevanovic Jevrosima, Fries I (2008) Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotype. *Veterinary Microbiology* 129 (3-4) 342-349.
3. Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Z, Dimitrijevic V, Stojic V, Fratric N, Lazarevic M (2009) Microsatellite DNA polymorphism and its usefulness for pedigree verification in Simmental cattle from Serbia. *Acta Veterinaria* 59 (5-6) 621-631.
4. Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Z, Dimitrijevic V, Maletic M (2010) Evaluation of 11 microsatellite loci for their use in paternity testing in the Yugoslav Pied cattle (YU Simmental cattle). *Czech Journal of Animal Science* 55 (6) 221-226.
5. Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Z, Radakovic Milena, Kovacevic R Sanja (2010) Biogeographic study of the honey bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia based on mitochondrial DNA analyses. *Russian Journal of Genetics* 46 (5) 603-609.
6. Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Z, Genersch Elke, Kovacevic R Sanja, Ljubenkovic J, Radakovic Milena, Aleksic Nevenka (2011) Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* 41 (1) 49-58.
7. Muñoz Irene, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Z, De la Rúa Pilar (2012) Genetic variation of *Apis mellifera* from Serbia inferred from mitochondrial analysis. *Journal of Apicultural Science* 56 (1) 59-69.
8. Stevanov–Pavlovic Marija, Vucicevic Milos, Bosnjak Jasna, Stevanovic Jevrosima, Dimitrijevic Vladimir, Resanovic Radmila, Stanimirovic Zoran (2013) Molecular sex determination of 20 bird species protected in the Republic of Serbia. *Acta Veterinaria*, 63 (1) 45-51.
9. Vucicevic Milos, Stevanov-Pavlovic Marija, Stevanovic Jevrosima, Bosnjak Jasna, Gajic Bojan, Aleksic Nevenka, Stanimirovic Zoran (2013) Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing. *Zoo Biology* 32 (3) 269-276.
10. Gajic Bojan, Radulovic Zeljko, Stevanovic Jevrosima, Kulisic Zoran, Vucicevic Milos, Simeunovic Predrag, Stanimirovic Zoran (2013) Variability of the honey bee mite *Varroa destructor* in Serbia based on mtDNA analysis. *Experimental and Applied Acarology* 61 (1) 97-105.
11. Stevanovic Jevrosima, Simeunovic Predrag, Gajic Bojan, Lakic Nada, Radovic Dejan, Fries Ingemar, Stanimirovic Zoran (2013) Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies. *Apidologie* 44 (5) 522-536.
12. Bosnjak Jasna, Stevanov-Pavlovic Marija, Vucicevic Milos, Stevanovic Jevrosima, Simeunovic Predrag, Resanovic Radmila, Stanimirovic Zoran (2013) Feasibility of non-invasive molecular method for sexing of parrots. *Pakistan Journal of Zoology* 45 (3) 715-720.
13. Dimitrijevic Vladimir, Stevanovic Jevrosima, Savic Mila, Petrujkic Branko, Simeunovic Predrag, Milosevic Ivan, Stanimirovic Zoran (2013) Validation of 10 microsatellite loci for their use in parentage verification and individual identification in the Yugoslavian Shepherd Dog – Sharplanina, *Annals of Animal Science* 13 (4) 715-722.
14. Maletic Milan, Vakanjac Slobodanka, Djelic Ninoslav, Lakic Nada, Pavlovic Milos, Nedic Svetlana, Stanimirovic Zoran (2013) Analysis of lactoferrin gene polymorphism and its assotion to milk quality and mammary gland health in Holstein-Fiesian cows. *Acta Veterinaria-Beograd* 63 (5-6) 487-498

- 
15. Simeunovic Predrag, Stevanovic Jevrosima, Vidanovic Dejan, Nisavic Jakov, Radovic Dejan, Stanisic Ljubodrag, Stanimirovic Zoran (2014) A survey of deformed wing virus and acute bee paralysis virus in honey bee colonies from Serbia using real-time RT-PCR. *Acta Veterinaria* 64 (1) 81-92.
  16. Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Đuric Spomenka, Vejnovic Branislav, Stanimirovic Zoran (2014) *Nosema ceranae* DNA in honey bee haemolymph and honey bee mite *Varroa destructor*. *Acta Veterinaria* 64 (3) 349-357.
  17. Gajic Bojan, Bogunovic Danica, Stevanovic Jevrosima, Kulišić Zoran, Simeunovic Predrag, Stanimirovic Zoran (2014) Canine and feline thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* in Serbia. *Acta Veterinaria* 64 (4) 447-455.
  18. Simeunovic Predrag, Stevanovic Jevrosima, Cirkovic Dragan, Radojicic Sonja, Lakic Nada, Stanisic Ljubodrag, Stanimirovic Zoran (2014) *Nosema ceranae* and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony. *Journal of Apicultural Research* 53 (5) 545-554.
  19. Davitkov Darko, Vucicevic Milos, Stevanovic Jevrosima, Krstic Vanja, Tomanovic Snezana, Glavinic Uros, Stanimirovic Zoran (2015) Clinical babesiosis and molecular identification of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs from Serbia. *Acta Veterinaria Hungarica* 63 (2) 199-208.
  20. Stevanov-Pavlović Marija, Dimitrijević Vladimir, Marić Saša, Radović Dejan, Stevanović Jevrosima, Stanimirović Zoran (2015) Applicability assessment of a standardized microsatellite marker set in endangered Busha cattle. *Slovenian Veterinary Research* 52 (3) 133-139.
  21. Özvegy József, Marinković Darko, Vučićević Miloš, Gajić Bojan, Stevanović Jevrosima, Krnjaić Dejan, Aleksic-Kovacevic Sanja (2015) Cytological and molecular identification of *Haemogregarina stepanowi* in blood samples of European pond turtle (*Emys orbicularis*) from quarantine at Belgrade zoo. *Acta Veterinaria* 65 (4) 525-533.
  22. Davitkov Darko, Vucicevic Milos, Stevanovic Jevrosima, Krstic Vanja, Slijepcevic Dajana, Glavinic Uros, Stanimirovic Zoran (2016) Molecular detection and prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses of central Balkan. *Acta Parasitologica* 61 (2) 337-342.
  23. Vucicevic Milos, Slijepcevic Dajana, Davitkov Darko, Avdalovic Vladimir, Aleksic Kovacevic Sanja, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2016) First report of Polycystic kidney disease occurrence in Persian cats in Serbia. *Veterinaria Italiana* 52 (1) 51-56.
  24. Stevanovic Jevrosima, Schwarz Ryan S, Vejnovic Branislav, Evans Jay D, Irwin Rebecca E, Glavinic Uros, Stanimirovic Zoran (2016) Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: a nine-year survey (2007-2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees, *Journal of Invertebrate Pathology* 139, 6-11.
  25. Gajić Bojan, Stevanovic Jevrosima, Radulović Željko, Kulišić Zoran, Vejnović Branislav, Glavinic Uroš, Stanimirović Zoran (2016) Haplotype identification and detection of mitochondrial DNA heteroplasmy in *Varroa destructor* mites using ARMS and PCR-RFLP methods. *Experimental and Applied Acarology* 70, 287-297.
  26. Radakovic Milena, Davitkov Darko, Borozan Sunčica, Stojanovic Srdjan, Stevanovic Jevrosima, Krstic Vanja, Stanimirovic Zoran (2016) Oxidative stress and DNA damage in horses naturally infected with *Theileria equi*. *The Veterinary Journal* 217, 112-118.
  27. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Jovanovic Biljana, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2017) Assessment of 17 microsatellite loci for their use in parentage verification and individual identification in the Balkan donkey breed. *Genetika-Belgrade* 49 (1) 21-30.
  28. Davitkov Dajana, Davitkov Darko, Vucicevic Milos, Stanisic Ljubodrag, Radakovic Milena, Glavinic Uros, Stanimirovic Zoran (2017) A molecular and hematological study of *Theileria equi* in Balkan donkeys. *Acta Veterinaria Hungarica* 65 (2) 234-241.

- 
29. Davitkov Dajana, Glavinić Uroš, Nešić Ksenija, Davitkov Darko, Vučićević Miloš, Nešić Vladimir, Stanimirović Zoran (2017) Improved DNA-based identification of Cervidae species in forensic investigations. *Acta Veterinaria* 67 (4) 449-458.
  30. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Jovanovic Biljana, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2017) Assessment of 17 microsatellite loci for their use in parentage verification and individual identification in the Balkan donkey breed. *Genetika-Belgrade* 49 (1) 21-30.
  31. Stanisic Ljubodrag, Aleksic Jelena, Dimitrijevic Vladimir, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2017) New insights into the origin and the genetic status of the Balkan donkey from Serbia. *Animal Genetics* 48 (5) 580-590.
  32. Glavinic Uros, Stankovic Biljana, Draskovic Vladimir, Stevanovic Jevrosima, Petrovic Tamas, Lakić Nada, Stanimirovic Zoran (2017) Dietary amino acid and vitamin complex protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* 12 (11) e0187726.
  33. Vejnovic Branislav, Stevanovic Jevrosima, Schwarz Ryan S, Aleksic Nevenka, Mirilovic Milorad, Jovanovic Nemanja M, Stanimirovic Zoran (2018) Quantitative PCR assessment of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* colonies co-infected naturally with *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 151, 76-81.
  34. Vucicevic Milos, Vucicevic Ivana, Davitkov Darko, Davitkov Dajana, Stevanovic Jevrosima, Resanovic Radmila, Stanimirovic Zoran (2018) Detection and analysis of new psittacine beak and feather disease virus (PBFV) nucleotide sequences. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 68 (4) 653-660.
  35. Draskovic Vladimir, Bosnjak-Neumüller Jasna, Vasiljevic Marko, Petrujkic Branko, Aleksic Nevenka, Kukolj Vladimir, Stanimirovic Zoran (2018) Influence of phytogenic feed additive on *Lawsonia intracellularis* infection in pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 151, 46-51.
  36. Ristanic Marko, Stanisic Ljubodrag, Maletic Milan, Glavinic Uros, Draskovic Vladimir, Aleksic Nevenka, Stanimirovic Zoran (2018) Bovine foetal sex determination—Different DNA extraction and amplification approaches for efficient livestock production. *Reproduction in Domestic Animals* 53 (4) 947-954.
  37. Taric Elmin, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Vejnovic Branislav, Aleksic Nevenka, Dimitrijevic Vladimir, Stanimirovic Zoran (2019) Occurrence of honey bee (*Apis mellifera* L.) pathogens in commercial and traditional hives. *Journal of Apicultural Research* 58 (3) 433-443.
  38. Cirkovic Dragan, Stevanovic Jevrosima, Glavinic Uros, Aleksic Nevenka, Djuric Spomenka, Aleksic Jelena, Stanimirovic Zoran (2018) Honey bee viruses in Serbian colonies of different strength. *PeerJ* 6:e5887.
  39. Glavinic Uros, Tesovnik Tanja, Stevanovic Jevrosima, Zorc Minja, Cizelj Ivanka, Stanimirovic Zoran, Narat Mojca (2019) Response of adult honey bees treated in larval stage with prochloraz to infection with *Nosema ceranae*. *PeerJ* 7:e6325.
  40. Stanimirović Zoran, Glavinić Uroš, Ristanić Marko, Aleksić Nevenka, Jovanović Nemanja, Vejnović Branislav, Stevanović Jevrosima (2019) Looking for the causes of and solutions to the issue of honey bee colony losses. *Acta Veterinaria-Beograd* 69 (1) 1-31.
  41. Djuric Milos, Milcic-Matic Natalija, Davitkov Darko, Glavinic Uros, Davitkov Dajana, Vejnovic Branislav, Stanimirovic Zoran (2019) Efficacy of oral fluralaner for the treatment of canine generalized demodicosis: a molecular-level confirmation. *Parasites & Vectors* 12 (1) 270.
  42. Gajić Bojan, Muñoz Irene, De la Rúa Pilar, Stevanović Jevrosima, Lakić Nada, Kulišić Zoran, Stanimirović Zoran (2019) Coexistence of genetically different *Varroa destructor* in *Apis mellifera* colonies. *Experimental and Applied Acarology*, 78 (3) 315–326.

- 
43. Maletić Milan, Paprikić Nevres, Lazarević Miodrag, Hodžić Aida, Davidović Vesna, Stanišić Ljubodrag, Stanimirović Zoran (2019) Insight in leptin gene polymorphism and impact on milk traits in autochthonous Busha cattle. *Acta Veterinaria-Beograd* 69 (2) 153-163.
  44. Djelić Ninoslav, Radaković Milena, Borozan Sunčica, Dimirijević-Srećković Vesna, Pajović Nevena, Vejnović Branislav, Borozan Nevena, Bankoglu Ezgi Eylül, Stopper Helga, Stanimirović Zoran (2019) Oxidative stress and DNA damage in peripheral blood mononuclear cells from normal, obese, prediabetic and diabetic persons exposed to adrenaline in vitro. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 843, 81-89.
  45. Tesovnik Tanja, Zorc Minja, Ristanić Marko, Glavinić Uroš, Stevanović Jevrosima, Narat Mojca, Stanimirović Zoran (2020) Exposure of honey bee larvae to thiamethoxam and its interaction with *Nosema ceranae* infection in adult honey bees. *Environmental Pollution* 256, 113443.
  46. Stanisic Ljubodrag, Aleksic M Jelena, Dimitrijevic Vladimir, Kovacevic Branislav, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2020) Banat donkey, a neglected donkey breed from the central Balkans (Serbia). *PeerJ* 8:e8598.
  47. Taric Elmin, Glavinic Uros, Vejnovic Branislav, Stanojkovic Aleksandar, Aleksic Nevenka, Dimitrijevic Vladimir, Stanimirovic Zoran (2020) Oxidative stress, endoparasite prevalence and social immunity in bee colonies kept traditionally vs. those kept for commercial purposes. *Insects* 11 (5) 266.
  48. Dimitrijević Vladimir, Ristanić Marko, Stanišić Ljubodrag, Drobñjak Darko, Urošević Milivoje, Ozkanal Umit, Stanimirović Zoran (2020) Use of microsatellites in genetic diversity assessment, parentage testing and individual identification of the Kangal Shepherd Dog. *Acta Veterinaria-Beograd* 70 (2) 170-181.
  49. Dimitrijević Vladimir, Savić Mila, Tarić Elmin, Stanišić Ljubodrag, Stanimirovic Zoran, Tabaković Aleksandar, Aleksić M. Jelena (2020) Genetic characterization of the Yugoslavian Shepherd Dog – Sharplanina, a livestock guard dog from the Western Balkans. *Acta Veterinaria-Beograd* 70 (3) 329-345.
  50. Zikić Biljana, Aleksic Nevenka, Ristanic Marko, Glavinic Uros, Vejnovic Branislav, Krnjaic Igor, Stanimirovic Zoran (2020) Anti-varroa efficiency of coumaphos and its influence on oxidative stress and survival of honey bees. *Acta Veterinaria-Beograd* 70 (3) 355-373.
  51. Vučićević Miloš, Vučićević Ivana, Došenović Milan, Ristanić Marko, Aleksić Nevenka, Resanović Radmila, Stanimirović Zoran (2020) Is PBFD symptomatology species specific rather than strain specific? – A case of 8 lovebirds. *Acta Veterinaria-Beograd* 70 (3) 386-394.
  52. Ristanic Marko, Glavinic Uros, Vejnovic Branislav, Maletic Milan, Kirovski Danijela, Teodorovic Vlado, Stanimirovic Zoran (2020) Beta-casein gene polymorphism in Serbian Holstein-Friesian cows and its relationship with milk production traits. *Acta Veterinaria-Beograd* 70 (4) 497-510.
  53. Petrović Slobodan, Maletić Milan, Lakić Nada, Aleksić Nevenka, Maletić Jelena, Ristanić Marko, Stanimirović Zoran (2020) The effects of antioxidants provided with feed on certain quality parameters of bull semen under heat stress conditions. *Acta Veterinaria-Beograd* 70 (4) 453-470.
  54. Jovanovic M Nemanja, Glavinic Uros, Delic Biljana, Vejnovic Branislav, Aleksic Nevenka, Mladjan Vladimir, Stanimirovic Zoran (2021) Plant-based supplement containing B-complex vitamins can improve bee health and increase colony performance. *Preventive Veterinary Medicine* 190, 105322.
  55. Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Ristanic Marko, Rajkovic Milan, Davitkov Dajana, Lakić Nada, Stanimirovic Zoran (2021) Potential of fumagillin and *Agaricus blazei* mushroom extract to reduce *Nosema ceranae* in honey bees. *Insects* 12, 282.
  56. Došenović Milan, Radaković Milena, Vučićević Miloš, Vejnović Branislav, Vasiljević Maja, Marinković Darko, Stanimirović Zoran (2021) Evaluation of the effects of two anaesthetic protocols on oxidative status and DNA damage in red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*) undergoing endoscopic coeliotomy. *Acta Veterinaria Hungarica* 69 (1) 102-103.

- 
57. Davitkov Dajana, Vucicevic Milos, Glavinic Uros, Skadric Ivan, Nestic Vladimir, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2021) Potential of inter- and intra-species variability of CHD1 gene in birds as a forensic tool. *Acta Veterinaria-Beograd* 71 (2) 147-157.
  58. Glavinic Uros, Rajkovic Milan, Vunduk Jovana, Vejnovic Branislav, Stevanovic Jevrosima, Milenkovic Ivanka, Stanimirovic Zoran (2021) Effects of *Agaricus bisporus* mushroom extract on honey bees infected with *Nosema ceranae*. *Insects* 12, 915.

#### RADOVI SA SKUPOVA

1. Stevanović Jevrosima, Maletić M, Stanimirović M, Stanimirović Z (2008) Molekularno genetičke metode u ekologiji i menadžmentu divljači. Zbornik radova X Savetovanja iz kliničke patologije i terapije životinja *Clinica Veterinaria*<sub>2005</sub>, Sept 1-5, pp 108-109, Kragujevac, Srbija.
2. Muñoz Irene, Dall'Olio R, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Z, de la Rúa Pilar (2009) Diversidad genetica y estructura poblacional de *Apis mellifera* en Europa Oriental, Book of abstracts, Segundo Congreso de la Sociedad Espanola de Biologia Evolutiva, Nov 29-Dec 02, pp. 78, Valencia, Spain.
3. Stevanović Jevrosima, Stanimirović Z, Radaković Milena, Maletić M, Đelić H (2009) Molekularno genetička identifikacija roditeljstva u analizi pedigrea životinja. Zbornik radova XI Savetovanja iz kliničke patologije i terapije životinja *Clinica Veterinaria*<sub>2009</sub>, Jun 19-21, pp 47-49. Subotica, Srbija.
4. Stevanović Jevrosima, Stanimirović Z, Radaković M (2009) Species identification of *Nosema* microsporidian pathogen in samples of *Apis mellifera* from Serbia using PCR-RFLP method, Book of Abstracts, IV Congress of the Serbian Genetic Society, June 1-5, pp 171, Tara, Serbia.
5. Stevanović Jevrosima, Stanimirović Z, Đelić N, Radaković M (2009) Parentage verification and sex determination in cattle using molecular markers, Book of Abstracts, IV Congress of the Serbian Genetic Society, June 1-5, pp 156, Tara, Serbia.
6. Stevanović Jevrosima, Stanimirović Z, Radaković M (2009) Investigations of genetic diversity of *Paenibacillus larvae* from Serbia using rep-PCR fingerprint technique, Book of Abstracts, IV Congress of the Serbian Genetic Society, June 1-5, pp 141, Tara, Serbia.
7. Stevanović Jevrosima, Stanimirović Z, Radaković Milena, Đelić N (2009) Utvrđivanje roditeljstva i pola goveda iz uzoraka biološkog materijala primenom molekularnih markera, Zbornik predavanja sa XXX Seminara za inovacije znanja veterinarara, Feb 13, pp 47-53, Beograd, Srbija.
8. Muñoz Irene, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Z, de la Rúa Pilar (2010) Molecular analysis discriminated among Serbian ecotypes of *Apis mellifera carnica*. Proceedings of the 4th European Conference of Apidology EurBee 2010. Sept 7-9, pp 132, Metu-Ankara, Turkey.
9. Maletić M, Stevanović Jevrosima, Stanimirović Z (2010) Polimorfizam laktoferin i  $\beta$ 4defensin gena i njihov značaj u otpornosti krava na mastitis. Zbornik radova XI Savetovanja iz kliničke patologije i terapije životinja *Clinica Veterinaria*<sub>2010</sub>, Jun 18-20, pp 55-56, Subotica, Srbija.
10. Vučićević M, Stevanov-Pavlović Marija, Bošnjak Jasna, Stevanović Jevrosima, Stanimirović Z (2010) Determinacija pola ptica primenom molekularnih markera. Zbornik radova XI Savetovanja iz kliničke patologije i terapije životinja *Clinica Veterinaria*<sub>2010</sub>, Jun 18-20, pp 53-54, Subotica, Srbija.
11. Stevanović Jevrosima, Stanimirović Z (2010) Specijska identifikacija mikrosporidija *Nosema apis/N. ceranae* korišćenjem molekularnih metoda dupleks PCR i PCR-RFLP. Zbornik radova XI Savetovanja iz kliničke patologije i terapije životinja *Clinica Veterinaria*<sub>2010</sub>, Jun 18-20, pp 45-47, Subotica, Srbija.
12. Gajić Bojan, Radulović Željko, Stevanovic Jevrosima, Kulišić Zoran, Stanimirović Zoran (2011) Preliminarni rezultati molekularno-genetičkih analiza varijabilnosti mtDNK *Varroa destructor* u pčelinjim zajednicama na teritoriji Srbije. Zbornik plenarnih referata i rezimea, Simpozijum entomologa Srbije 2011, Sep 21-25, p 69. Donji Milanovac, Srbija.

- 
13. Stanimirović Zoran, Stevanović Jevrosima (2012) Primena molekularno-genetičkih analiza u veterinarskoj medicini. Zbornik predavanja sa XXXIII Seminara za inovacije znanja veterinarara, Feb 24, pp 17-33, Beograd, Srbija.
  14. Vučićević Miloš, Stevanović Jevrosima, Simeunović Predrag, Vučićević Ivana, Đelić Ninoslav, Stanimirović Zoran, Stojić Velibor (2012) Analysis of the CHD gene for sex determination of protected bird species, Proceedings of the International symposium on hunting »Modern aspects of sustainable management of game population«, June 22–24, pp. 83-86, Zemun-Belgrade, Serbia.
  15. Vučićević Miloš, Stevanović Jevrosima, Vučićević Ivana, Pantelić Aleksandar, Đelić Ninoslav, Resanović Radmila, Stanimirović Zoran (2012) Sex determination in game birds management, Proceedings of the International symposium on hunting »Modern aspects of sustainable management of game population«, June 22–24, pp. 91-94, Zemun-Belgrade, Serbia.
  16. Vučićević Miloš, Stevanović Jevrosima, Stanimirović Zoran (2012) Provera uspešnosti izolacije DNK iz različitih tkiva ptica, Zbornik radova XIV Regionalnog savetovanja iz kliničke patologije i terapije životinja *Clinica Veterinaria*<sub>2012</sub>, Jun 14-16, pp. 132-133, Subotica, Srbija.
  17. Čobanović Nikola, Vučićević Miloš, Stevanović Jevrosima, Stanimirović Zoran (2012) Uzorkovanje tkiva i izolacija DNK za molekularna ispitivanja kod gmizavaca, Zbornik radova XIV Regionalnog savetovanja iz kliničke patologije i terapije životinja *Clinica Veterinaria*<sub>2012</sub>, Jun 14-16, pp.130-131, Subotica, Srbija.
  18. Gajić Bojan, Radulović Željko, Stevanović Jevrosima, Kulišić Zoran, Simeunović Predrag, Stanimirović Zoran (2013) Varijabilnost mtDNK ektoparazita *Varroa destructor* u Srbiji: detekcija novih haplotipova. Plenarni referati i rezimei, Simpozijum entomologa Srbije sa međunarodnim učešćem 2013, 18-22. septembar 2013. pp. 31. Tara, Srbija.
  19. Stevanović Jevrosima, Munoz Irene, De la Rua Pilar, Gajić Bojan, Stanimirović Zoran (2013) Genetički diverzitet medonosne pčele *Apis mellifera* u Srbiji na osnovu analize mtDNK. Plenarni referati i rezimei, Simpozijum entomologa Srbije sa međunarodnim učešćem 2013, 18-22. septembar 2013. pp. 33. Tara, Srbija.
  20. Vučićević Miloš, Simeunović Predrag, Davitkov Darko, Stanišić Ljubodrag, Stevanović Jevrosima, Stanimirović Zoran (2014) Analize DNK i RNK u funkciji detekcije i genotipizacije patogena životinja i njihov značaj u veterinarskoj praksi. Zbornik predavanja XVI regionalnog savetovanja iz kliničke patologije i terapije životinja *Clinica Veterinari*<sub>2014</sub>, Jun 23-25, pp. 152-159, Kopaonik, Srbija.
  21. Gajić Bojan, Bogunović Danica, Stevanović Jevrosima, Kulišić Zoran, Simeunović Predrag, Glavinic Uroš, Stanimirović Zoran (2014) Molecular identification of *Thelazia callipaeda* in dogs and cats from Serbia. Book of Abstracts, V Congress of the Serbian Genetics Society, Sept 28-Oct 2, p. 74, Kladovo, Serbia.
  22. Gajić Bojan, Stevanović Jevrosima, Radulović Zeljko, Glavinic Uros, Kulisic Zoran, Stanimirovic Zoran (2014) Haplotype determination of *Varroa destructor* mites in Serbia using ARMS and RFLP methods, Book of Abstracts, Sixth European Conference of Apidology (EURBEE6). Sept 9-11, pp. 105, Murcia, Spain.
  23. Stanimirovic Zoran, Simeunovic Predrag, Stevanovic Jevrosima, Vidanovic Dejan, Glavinic Uros (2014) Occurrence and distribution of deformed wing virus, acute bee paralysis virus, sacbrood virus and chronic bee paralysis virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Serbia – a Real-time RT-PCR based survey, Book of abstracts, Sixth European Conference of Apidology (EURBEE6). Sept 9-11, pp. 47, Murcia, Spain.
  24. Davitkov Darko, Vučićević Miloš, Stevanović Jevrosima, Krstić Vanja, Gajić Bojan, Glavinic Uroš, Stanimirović Zoran (2014) Značaj PCR-RFLP metode u preciznoj, specijskoj identifikaciji uzročnika babezioze pasa (plenarni rad). Zbornik radova i kratkih sadržaja, 25. Savetovanje veterinarara Srbije, Sept 11-14, pp. 299-303, Zlatibor, Srbija.
  25. Davitkov Darko, Vučićević Milos, Stevanović Jevrosima, Krstić Vanja, Tomanović Snežana, Glavinic Uroš, Stanimirović Zoran (2014) Molecular characterization of *Babesia canis* and *B. gibsoni* from

- 
- naturally infected dogs from Serbia. Book of Abstracts, V Congress of the Serbian Genetics Society, Sept 28-Oct 2, p. 219, Kladovo, Serbia.
26. Stevanov-Pavlović Marija, Dimitrijević Vladimir, Marić Saša, Stevanović Jevrosima, Stanimirović Zoran (2014) Verification of a standardized microsatellite marker set for paternity testing in endangered Busha cattle. Book of Abstracts, V Congress of the Serbian Genetics Society, Sept 28-Oct 2, p. 195, Kladovo, Serbia.
  27. Radaković Milena, Djelić Ninoslav, Stevanović Jevrosima, Soković Marina, Glavinić Uroš, Van Griensven L.J.L.D., Stanimirović Zoran (2014) Evaluation of antigenotoxic potential of *Agaricus blazei* extract against thymol in the Comet assay. Book of Abstracts, V Congress of the Serbian Genetics Society, Sept 28-Oct 2, p. 156, Kladovo, Serbia.
  28. Vučićević Milos, Slijepčević Dajana, Davitkov Darko, Stevanović Jevrosima, Krstić Vanja, Ilić Vojislav, Stanimirović Zoran (2014) Frequency of Polycystic Kidney Disease (PKD) in population of Persian cats from Serbia and comparison between ultrasound diagnosis and genetic testing. Book of Abstracts, V Congress of the Serbian Genetics Society, Sept 28-Oct 2, p. 76, Kladovo, Serbia.
  29. Maletić Milan, Vakanjac Slobodanka, Djelić Ninoslav, Lakić Nada, Stevanović Jevrosima, Glavinić Uroš, Stanimirović Zoran (2014) Association of lactoferrin gene polymorphism with mammary gland health and production characteristics of Holstein-Friesian cows. Book of Abstracts, V Congress of the Serbian Genetics Society, Sept 28-Oct 2, p. 75, Kladovo, Serbia.
  30. Stanimirović Zoran, Simeunović Predrag, Vučićević Miloš, Davitkov Darko, Stanišić Ljubodrag, Maletić Milan, Gajić Bojan, Glavinić Uroš, Stevanović Jevrosima (2015) Primena molekularno-genetičkih analiza u forenzici i dijagnostici kod domaćih životinja i divljači. Zbornik predavanja sa XXXVI Seminara za inovacije znanja veterinarara, Feb 20, pp 137-146, Beograd, Srbija.
  31. Stevanović Jevrosima, Schwarz S. Ryan, Vejnović Branislav, Evans D. Jay, Irwin E. Rebecca, Glavinic Uros, Stanimirovic Zoran (2016) The earliest record and first report of *Lotmaria passim* in Serbian honey bees. Proceedings of the Seventh European Conference of Apidology (EURBEE7). Sept 7-9, pp. 110-111, Cluj-Napoca, Romania.
  32. Stanimirović Zoran, Simeunović Predrag, Stanišić Ljubodrag, Maletić Milan, Stevanović Jevrosima (2016) Determinacija pola kod domaćih životinja, plenarni referat, Zbornik predavanja, 7. Naučni Simpozijum Reprodukcijska domaćih životinja, 6-9. Okt, str. 105-116, Divčibare, Srbija.
  33. Stevanović Jevrosima, Glavinić Uroš, Ristanić Marko, Drašković Vladimir, Stanimirović Zoran (2018) Kvantitativni real-time PCR u praćenju infekcija, reakcija organizama na patogene i proceni efikasnosti lekova i dijetetskih suplemenata (plenarno predavanje). Zbornik predavanja XXXIX Seminara za inovacije znanja veterinarara, Feb 23, pp 27-35, Beograd, Srbija.
  34. Radaković Milena, Vejnović Branislav, Glavinić Uroš, Aleksić Nevenka, Mirilović Milorad, Stanimirović Zoran, Stevanović Jevrosima (2018) Oxidative stress increases in honey bees infected with *Lotmaria passim*. Abstract Book, 8th Congress of Apidology (EURBEE 8), Sept 18-20, pp. 108, Ghent, Belgium.
  35. Tarić Elmin, Glavinić Uroš, Vejnović Branislav, Aleksić Nevenka, Dimitrijević Vladimir, Stanimirović Zoran, Stevanović Jevrosima (2018) Bee pathogen occurrence in commercial and traditional beekeeping. Abstract Book, 8th Congress of Apidology (EURBEE 8), Sept 18-20, pp. 192, Ghent, Belgium.
  36. Glavinić Uroš, Stevanović Jevrosima, Tarić Elmin, Drašković Vladimir, Ristanić Marko, Lakić Nada, Stanimirović Zoran (2018) Dietary supplementation protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*. Abstract Book, 8th Congress of Apidology (EURBEE 8), Sept 18-20, pp. 196, Ghent, Belgium.
  37. Stevanović Jevrosima, Glavinić Uroš, Ristanić Marko, Vučićević Miloš, Drašković Vladimir, Jovanović Nemanja, Stanimirović Zoran (2019) Pravilno uzorkovanje, čuvanje i slanje materijala za molekularno genetičke analize u veterinarskoj medicini. Zbornik predavanja XL Seminara za inovacije znanja veterinarara, Feb 22, pp 107-117, Beograd, Srbija.

38. Glavinic Uros, Ristanic Marko, Jovanovic M. Nemanja, Rajkovic Milan, Niketic Mia, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2022) Novi trendovi u kontroli Nosema ceranae. Zbornik predavanja XLIII Seminara za inovacije znanja veterinarara, Feb 25, pp 79-91, Beograd, Srbija.

**SVA NAŠA ISTRAŽIVANJA PUBLIKOVANA U NAUČNIM RADOVIMA, KAO I SVE  
NOVE SEKVENCE DEPONOVA NE U GENSKOJ BAZI**

nalaze se na internet stranici:

<http://biologija.vet.bg.ac.rs/nastavnici-i-saradnici/>

u okviru BIOGRAFIJA zaposlenih