

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2015

Bc. VOJTĚCH NOVÁK

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat



**Porovnání různých metod izolace genomové DNA
hmyzu**

Diplomová práce

Vedoucí práce:
prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Vypracoval:
Bc. Vojtěch Novák

Brno 2015

ZADÁNÍ

Po dohodě s vedoucím práce prof. RNDr. Alešem Knollem, Ph.D. byla diplomová práce rozsahově rozšířena kvůli zvýšenému počtu izolačních kitů a analýze většího počtu vzorků odebraných v různých časových intervalech.

Diplomová práce vznikla v rámci CEITEC - Středoevropského technologického institutu s pomocí výzkumné infrastruktury financované projektem CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu regionálního rozvoje.



ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci *Porovnání různých metod izolace genomové DNA hmyzu* vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat Ing. Čeňku Horeckému za odborné rady a metodické vedení při vypracovávání diplomové práce a Ekologickému centru Orlov za poskytnutí cenných vzorků lišaje svlačcového (*Agrius convolvuli* Linnaeus, 1758) potřebných k laboratorní analýze. Společnosti DYNEX s.r.o. za bezplatné poskytnutí izolačního kitu od firmy Qiagen, společnosti Bitech a.s. za bezplatné poskytnutí izolačního kitu od firmy Macherey-Nagel, společnosti Top-Bio, s.r.o. za bezplatné poskytnutí izolačních kitů Top-Bio. Ing. Ireně Vrtkové za zapůjčení magnetického separátoru a izolačního kitu Chemagic DNA Tissue10 Kit (Chemagen). Rovněž děkuji Ing. Lence Kovaříkové za cenné stylistické rady a korekturu. V neposlední řadě děkuji prof. RNDr. Aleši Knollovi, Ph.D., jakožto vedoucímu diplomové práce.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá popisem a ověřením různých metod izolace DNA z tkání hmyzu řádu Lepidoptera – motýlí, s důrazem na čeleď Sphingidae – lišajovití a následnou amplifikací genu *COI* pomocí metody PCR. Testované metody se porovnávaly a vyhodnocovaly z hlediska účinnosti, výtěžku a čistoty DNA, délky trvání izolace a finanční náročnosti. Podařilo se stanovit metodiku, která je dostačující pro získání sekvence genu *COI* pomocí genetického analyzátoru, její aplikace do systému BoldSystems a následnou determinaci zkoumaného vzorku. To je důležité ve snaze o zmapování druhové diverzity.

Klíčová slova: izolace DNA, čeleď lišajovití, BOLD, biodiverzita, gen *COI*

ABSTRACT

This thesis deals with description and verification of different methods of DNA isolation from insect tissue of order Lepidoptera – butterflies with an emphasis on family Sphingidae – hawk moths and subsequent amplification of *COI* gene by PCR method. All tested methods were compared and evaluated in terms of efficiency, yield and purity of the DNA isolation, duration and financial costs. We selected to establish a methodology which is sufficient for obtaining *COI* gene sequences using genetic analyzer, its application in the system BoldSystems and subsequent determination of the sample. This is important in effort to map the species diversity.

Keywords: DNA isolation, family Sphingidae, BOLD, biodiversity, *COI* gene

1 OBSAH

1	OBSAH.....	9
2	ÚVOD.....	11
3	CÍL PRÁCE.....	12
4	LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
4.1	Biodiverzita.....	13
4.2	Význam biodiverzity.....	14
4.3	Úrovně biodiverzity	14
4.3.1	Genetická diverzita	14
4.3.2	Druhová diverzita	15
4.3.3	Diverzita ekosystémů.....	15
4.4	DNA barcoding.....	15
4.4.1	Barcode of Life Data Systems (BOLD).....	16
4.4.1.1	MAS (Management and analysis system)	16
4.4.1.2	IDS (Identification system) – Identifikační systém	17
4.4.1.3	ECS (External connectivity system) – Systém externího zapojení.....	17
4.4.2	Partneři zabývající se barcodingem	18
4.4.2.1	CBOL.....	18
4.4.2.2	iBOL	18
4.4.2.3	GenBank	18
4.5	Mitochondriální marker - Cytochrom c oxidáza.....	19
4.6	Nukleární markery – ITS1 a ITS2	20
4.7	Extrakce DNA.....	21
4.7.1	Fenol-Chloroformová extrakce.....	21
4.7.2	Magnetická separace.....	22
4.7.2.1	Modifikace	24
4.7.3	Adsorpce na silikát.....	24
4.7.3.1	Silikátové částice	24
4.7.3.2	Silikátová kolonka	25
4.7.4	Chelex	25
4.7.4.1	Vliv skladování	26
4.8	Modelový organismus – motýli čeledi lišajovití (Sphingidae Latreille, 1802)	

4.8.1	Lišaj svlačcový (<i>Agrius convolvuli</i>)	28
4.9	Sphingidae museum	30
5	MATERIÁL A METODIKA	31
5.1	Izolační kity	31
5.1.1	Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Geneaid)	32
5.1.2	QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen)	33
5.1.3	NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel)	34
5.1.4	ZYMO ZR Tissue & Insect DNA MicroPrep™ (Zymo Research)	35
5.1.5	DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio)	36
5.1.6	Column DNA Lego Kit (Top-Bio)	37
5.1.7	DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio) přečištěna kolonou Column DNA Lego Kit (Top-Bio)	38
5.1.8	Chemagic DNA Tissue10 Kit (Chemagen)	39
5.2	Analyzovaný soubor vzorků a jejich odběr	40
5.3	Izolace DNA	41
5.4	Ověření kvality a kvantity izolované DNA	41
5.5	PCR	42
5.6	Elektroforéza	45
5.7	Sekvenování PCR produktů	47
6	VÝSLEDKY A DISKUSE	49
6.1	Délka procesu izolace DNA	49
6.2	Kontrola koncentrace a čistoty DNA	50
6.3	Kontrola izolace a kvalita DNA	57
6.3.1	PCR sekvence genu <i>COI</i> – 658 bp	59
6.3.2	PCR – sekvence fragmentu genu <i>COI</i> – 311 bp	61
6.3.3	PCR – sekvence fragmentu genu <i>COI</i> – 407 bp	63
6.4	Finanční náročnost izolace	66
6.5	Sekvenování PCR produktů	68
7	ZÁVĚR	71
8	POUŽITÁ LITERATURA	73
9	SEZNAM OBRÁZKŮ	80
10	SEZNAM TABULEK	82
11	SEZNAM ZKRATEK	83

2 ÚVOD

Bohatství života, které máme na planetě Zemi je tvořeno druhovou rozmanitostí, která tvoří křehké životní prostředí. Aby lidský druh přežil, musíme tyto složité vztahy biodiverzity chránit. V ochraně nám může pomoci pochopení rozsáhlého systému rostlin a živočichů a jaký je jejich účel ve složitém ekosystému. Každý živočišný druh, například v rámci čeledi, může mít rozdílné potřeby a nároky. Může mít v ekosystému rozdílnou funkci, být třeba opylovačem nebo predátorem škůdců kulturních plodin.

Při určování druhů a zařazování do taxonomie se využívá fragment DNA, extrahovaný z genu pro cytochrom oxidázu 1 (*COI*). Zařazováním lišajů do taxonomie se mimo jiné zabývá i Sphingidae museum Czech Republic Ekologického centra Orlov. Jedná se o sekvenci o velikosti 658 párů bází, která se nachází v genomu mitochondrií, jež je v rámci druhu téměř neměnný, zatímco napříč spektrem druhů je tento genom vysoce polymorfní. Pokud je tento genom úspěšně extrahován, sledovaná sekvence dostatečně amplifikována a sekvenována, může být její původ ověřen v systému BOLD, jenž je globální databází těchto sekvencí DNA.

Získání těchto sekvencí, takzvaných barcodů, je podpůrnou metodou při určování pomocí morfologických znaků. Pomocí tohoto systému je možné determinovat stávající, ale i zcela nové druhy.

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je prostudovat různé metody izolace genomové DNA z živočišné tkáně na základě literárního přehledu a aplikovat je na tkáň lišaje svlačcového (*Agrius convolvuli* Linnaeus, 1758). Stanovit metodiky, které budou opakovatelné, cenově dostupné a časově nenáročné v rámci souboru zvolených komerčně dostupných izolačních kitů. Ty poté laboratorně ověřit, tzn. zjistit její účinnost a vhodnost při determinaci druhu pomocí sekvence genu pro cytochrom oxidázu 1 (*COI*). Izolace genomové DNA bude provedena pomocí komerčně dostupných kolonkových izolačních kitů (Geneaid, Qiagen, Top-Bio, Macherey-Nagel, Zymo Research) a pomocí magnetické separace (Chemagen). Výsledkem by mělo být stanovení metodiky, která bude diskutována s podobnými pracemi a která je vhodná pro další laboratorní analýzy, zejména při určování druhů z čeledi lišajovitých.

4 LITERÁRNÍ PŘEHLED

4.1 Biodiverzita

Termínem biodiverzita, nebo biologická diverzita, se označuje druhová rozmanitost na planetě Zemi. Světový fond ochrany přírody (*World Wildlife Fund*) definuje biodiverzitu jako: „*Bohatství života na Zemi, miliony rostlin, živočichů a mikroorganismů, včetně genů, které obsahují a složité ekosystémy, které vytvářejí životní prostředí*“ (Primack *et al.* 2001).

Velikost biologické diverzity v průběhu věků velmi dynamicky kolísala. Dle Raup a Sepkoski (1982) prošla planeta pěti stádii hromadného vymírání. Nejsilnější extinkce proběhla přibližně před 250 miliony let. Po stádiích hromadného vymírání následovala doba, kdy speciace nových druhů a jejich současné vymírání bylo v relativní rovnováze, či byla dokonce speciace silnější. Odborníci se shodují, že na Zemi právě probíhá šesté stádium hromadné extinkce. Ukazuje se totiž, že v současné době je míra vymírání druhů sto- až tisícinásobně vyšší. Hlavní podíl na tom má především lidská činnost (Primack *et al.* 2001).

V posledních letech je možné zaznamenat zvýšenou snahu o ochranu globální biologické diverzity a rovněž snahu o její zmapování. Ukazuje se však, že současné určování druhů pomocí morfologických a fyziologických klíčů je nedostatečné. Navíc genotypová a fenotypová variabilita uvnitř druhu, ve znacích, které se používají pro určování druhů, často vede k chybným zařazením (Hebert *et al.* 2003a).

Morfologické určení také obvykle selhává u kryptických druhů. Ty jsou si navzájem morfologicky velmi podobné, avšak reprodukčně jsou to oddělené druhy. Mohou se odlišovat méně zjevnými znaky, například etologicky či fyziologicky (Reinoso a Benítez 2015). Navíc využití morfologických a fyziologických znaků jakožto určovací klíč může být použito často jen u určitého vývojového stádia organismu, či pohlaví. Východiskem může být molekulární analýza (Hebert *et al.* 2003a).

4.2 Význam biodiverzity

Hlavní zdroj většiny produktů, které jsou lidmi běžně používané, pochází přímo z přírody. Snižování biologické diverzity zákonitě musí vyústit v enormní pokles přírodního bohatství a zdrojů, který ohrozí ekosystém, jenž lidská společnost využívá. Tato degradace ekosystémů a životního prostředí, především pak obhospodařovaných půd, je v současné době nejvíce způsobena lidskou činností (Small 2008).

Snižování biodiverzity se děje v celosvětovém měřítku. S rostoucím počtem lidí na světě je zvýšený tlak i na ekosystémy. Je vyšší poptávka po potravinách, zdrojích pitné vody, nerostných surovinách a zejména zemědělské půdě. Snižuje se rozloha lesů a pralesů a zvyšuje se znečištění životního prostředí (Hlaváček 2004).

Jestliže ze zemědělské půdy vymizí bakterie a houby, které rozkládají organickou hmotu a tím ji zúrodňují, lze očekávat snížení zemědělské produkce. Při neuváženém používání pesticidů může dojít k poklesu hmyzu, který opyluje kulturní plodiny, či nepřímo slouží jako predátoři pro likvidaci rostlinných škůdců. Příkladem predátorů může být hmyz z řádu pavouků (Araneae). Snížením diverzity pravděpodobně dojde také ke snížení produkce léčiv, protože mnohé účinné látky pocházejí z volné přírody, proto na zdravých ekosystémech závisí budoucnost lidstva, snižováním biologické diverzity člověk ohrožuje sám sebe (Benn 2010).

4.3 Úrovně biodiverzity

4.3.1 Genetická diverzita

Genetickou diverzitu tvoří všechny odlišné geny, obsažené ve všech žijících jedincích, což zahrnuje rostliny, živočichy, houby a mikroorganismy (Benn 2010). Geny jsou zodpovědné za variabilitu a jedinečnost organismů. Genetická rozmanitost může být buď kontinuální (varianty přechází jedna v druhou a mají nekonečné množství svých forem, například otisky prstů), nebo diskontinuální (počet variant je konečný a není mezi nimi plynulý přechod, například krevní skupiny).

Výsledkem, proč se od sebe vzájemně odlišují různé druhy, jedinci v rámci jedné populace či populace mezi sebou, je genotyp. Jedná se o neopakovatelnou kombinaci genů, společně s fenotypem, jenž je projevem genotypu v prostředí (Šípek 2011). Soubor všech genů a jejich alel v populaci tvoří genofond (Urban 2008).

4.3.2 Druhová diverzita

Druhová diverzita je biodiverzitou na úrovni druhů, jejím měřítkem je celkový počet všech druhů na Zemi (Benn 2010). Celkový počet rostlinných i živočišných druhů není dosud znám. V současné době je katalogizováno přibližně jeden a půl milionu druhů. Odhady dosud nepopsaných druhů se liší, pohybuje se v rozmezí od půl milionu do 100 milionů (Giller 2014).

4.3.3 Diverzita ekosystémů

Ekosystémová biodiverzita je komplexnější pojem, zabývá se rozmanitostí jednotlivých společenstev, biotopů, ale také vzájemnými vztahy organismů a biotického prostředí. Ochrana přirozeného prostředí, v němž se nacházejí nezměněná přírodní společenstva, se může označit jako jeden z nejdůležitějších způsobů zachování biodiverzity vůbec (Primack *et al.* 2001).

4.4 DNA barcoding

DNA barcoding je taxonomická metoda, která využívá krátký genetický marker obsažený v DNA určitého organismu, k identifikaci, ke kterému konkrétnímu druhu tento organismus patří (Žurovcová 2008).

Princip vychází z čárových kódů, takzvaných EAN (European Article Numbering) čárových kódů. Takový kód se běžně nachází na výrobcích a skládá se z čísel 0 – 9 na 11 pozicích, která dává 10^{11} různých kombinací (Žurovcová 2008).

Genetická sekvence se může skládat sice jen ze 4 písmen na jednu pozici, avšak délka kódu je mnohem větší. Už i krátké sekvence tedy předčí počtem různých kombinací. Například pro DNA dlouhou jen 10 nukleotidů existuje teoreticky 4^{10} tj. 1 048 576 kombinací (Little 2005).

Tato metoda se liší od molekulární fylogenetiky, jejímž předmětem je zjistit příbuznost jedinců. U DNA barcoding jde o určení neznámého vzorku. Nejběžněji používanou barcode oblastí u zvířat, je segment o přibližné velikosti 650 párů bází, nacházejícím se v oblasti mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu, podjednotka I (*COI*) (Hebert *et al.* 2003b). Tato metoda je nyní používána k tvorbě DNA databází například hub, ryb korálových útesů, lidských parazitů a patogenů, savců, komárů i čeledi Sphingidae.

4.4.1 Barcode of Life Data Systems (BOLD)

Barcode of Life Data Systems (BOLD) je databáze, dostupná na adrese www.barcodinglife.org, zabývající se ukládáním, analýzou, podporou získávání aktualizací databází a publikační činností záznamů DNA barcodů. Sestavováním molekulárních a morfologických dat se snaží doplňovat tradiční bioinformatiku (Ratnasingham a Hebert 2007).

BOLD je v současnosti nejvíce používaným barcoding softwarem. Je volně k dispozici všem vědcům zabývajícím se DNA barcodingem, je rovněž přístupný široké veřejnosti a po jednoduché registraci je zde možné spravovat vlastní projekty, pomocí systému MAS (management and analysis system) (Waterton *et al.* 2013). Navíc poskytuje specializované služby, jež pomáhají zařadit nově získané barcodey s určitými standardy do globální databáze sekvencí.

Kopie všech získaných sekvencí a klíčová data jednotlivých druhů jsou poskytovány také organizacím jako National Center for Biotechnology Information (NCBI), sesterské společnosti DNA DataBank of Japan (DDBJ) a European Molecular Biology Laboratory (EMBL) a to hned, jakmile jsou výsledky připraveny k publikování (Ratnasingham a Hebert 2007).

V současnosti se BOLD nezabývá pouze živočišnou a rostlinnou říší, ale obsahuje také databáze hub a prvoků. K dnešnímu dni (26. 2. 2015) má databáze 5 201 824 vzorků s barcodey a druhů s barcodey je 233 164.

System se skládá ze tří dílčích systémů:

4.4.1.1 MAS (*Management and analysis system*)

System managementu a analýzy, kde každý výzkumný pracovník, ale i veřejnost, může získat pravomoc k založení vlastního projektu po uživatelské registraci na BOLDu (Waterton *et al.* 2013).

Jakmile je projekt zadán, je třeba přidat 2 základní prvky dat. Informace o sekvenci a informace o vzorku - taxonomii. Nicméně záznam o vzorku nemůže získat svůj formální barcode, dokud k nim není přiřazeno dalších 7 elementů (Ratnasingham a Hebert 2007).

System se skládá z následujících dílčích podjednotek:

1. Název druhu
2. Potvrzovací údaje (katalogové číslo a instituce skladování)
3. Záznam sbírky (sběratel, datum a místo sběru, GPS souřadnice)
4. Kdo vzorek určil
5. *COI* sekvence (alespoň 500 bp)
6. Primery použité při PCR
7. Trace files (záznamy o sekvenci)

Sekvence, která má standardně délku 658 bp, nejméně však 500 bp nesmí obsahovat více než 1 % nejednoznačných pozic nukleotidů na celou sekvenci, aby bylo možné s jistotou zařadit vzorek do databáze. BOLD má navíc několik systémů ověření, zda se jedná skutečně o sekvenci z *COI*, či zda-li nedošlo ke kontaminaci vzorku, například lidskou DNA. Databáze kromě kvality dále spravuje hlášení o anomáliích, úpravy záznamů sekvencí či tvorbu fylogenetických stromů (Ratnasingham a Hebert 2007).

4.4.1.2 IDS (*Identification system*) – Identifikační systém

Identifikační systém, jak již jeho název napovídá, slouží k identifikaci neznámých vzorků. Ty mohou být určeny jednoduchým vložením získané sekvence do systému a následným porovnáním s již existujícími záznamy. Jedinými podmínkami však jsou délka vkládané sekvence a odlišnost vzorku od referenční sekvence. Sekvence vzorku musí být minimálně 300 bp a její rozdílnost nesmí přesáhnout 1% (Ratnasingham a Hebert 2007).

4.4.1.3 ECS (*External connectivity system*) – Systém externího zapojení

Je systém, který mimo jiné poskytuje data externím webovým stránkám a umožňuje denní aktualizace těchto dat. Tento systém monitoruje pokrok v systému barcoding dat pro jednotlivé taxonomické skupiny nebo geografické regiony. Rovněž umožňuje tato data snadněji sdílet a zasílat na jiná pracoviště (Ratnasingham a Hebert 2007).

4.4.2 Partneři zabývající se barcodingem

Dle BOLD (2015) by organizace Barcode of Life Data Systems sama, jako taková, nemohla fungovat. Proto existuje sdružení partnerů, které se rovněž zabývá barcodingem a tvoří spolu s BOLDem ucelený systém pro výzkum a ochranu biodiverzity.

4.4.2.1 CBOL

Consortium for the Barcode of Life (CBOL) bylo založeno roku 2004 s podporou nadace Alfreda P. Soana. Jedná se mezinárodní iniciativu pro podporu projektu DNA barcodingu a jeho využívání jako globálního standardu pro identifikaci biologických druhů. CBOL propaguje barcoding pomocí workshopů, konferencí, seminářů a pracovních skupin. Sdružuje kolem 200 členských organizací z 50 zemí světa a svou základnu má v institutu Smithsonian Národního muzea přírodní historie ve Washingtonu DC. Rovněž podporuje rozvoj mezinárodních výzkumných aliancí pro vybudování knihovny barcodů pro veškerý eukaryotický život v průběhu příštích 20 let (Ratnasingham a Hebert 2007).

4.4.2.2 iBOL

Je zkratka z anglického International Barcode of Life. Jedná se o mezinárodní neziskovou organizaci, sdružující vědce z celého světa. Jejím hlavním cílem je sestavit knihovnu sekvencí a zajistit potřebné technologie pro levnou a rychlou identifikaci organismů a geografické a taxonomické rozšíření referenčních barcodů systému BOLD. Ukládá záznamy barcodů a poskytuje k nim přístup (James 2012).

4.4.2.3 GenBank

Je veřejně přístupná databáze sekvencí nukleotidů dostupná na adrese <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Obsahuje více než 260 000 nukleotidových sekvencí dosud popsáných druhů organismů. Tento systém je spravován organizací National Center for Biotechnology Information (NCBI), nacházející se v Bethesdě v USA. Je součástí databáze takzvané „Velké trojky“, do níž patří i DDBJ a EMBL, která denně vzájemně sdílejí a aktualizují svá data, čímž je i zároveň zálohují. Do databáze GenBank mohou přispívat jak malá laboratorní pracoviště, tak i velká sekvenční centra (Benson *et al.* 2007).

4.5 Mitochondriální marker - Cytochrom c oxidáza

Cytochrom c oxidáza je enzymatický membránový komplex proteinů, který v metabolismu oxiduje chromoprotein cytochrom c a energii získanou tímto procesem využívá k tvorbě vodíkového gradientu, potřebného ke vzniku ATP nejen v mitochondriích v závěrečné fázi buněčného dýchání, během takzvané oxidativní fosforylace (Ferguson-Miller *et al.* 2012). Primární struktura genu cytochrom c oxidázy je složena z řetězce čítajícího asi 100 aminokyselin. U eukaryotických organismů se cytochrom c oxidáza vyskytuje na vnitřní membráně mitochondrií a skládá se z více podjednotek. Pro určování eukaryotických živočichů se dnes nejvíce využívá gen pro podjednotku 1 (Žurovcová 2008).

Gen *COI* se ukázal jako nejvhodnější pro barcoding u eukaryotických organismů. Tento gen je kódován přibližně 658 páry bází. Výhoda tohoto genu spočívá i v obsahu mitochondrií v buňce. Jediná buňka jich průměrně může obsahovat kolem 1000 (Sládek 2002). Proto i malý vzorek může poskytnout dostatečné množství DNA pro izolaci a následné sekvenování.

Hlavním důvodem využití tohoto genu pro určení jedince nebo druhu je ten, že rozdíly v primární struktuře v rámci jednoho druhu jsou minimální, zatímco rozdíly napříč spektrem živočišných druhů jsou zjevné. Rozlišení druhů touto metodou přináší až 95 % účinnost (Hebert *et al.* 2003b).

Například při detekci druhů v rámci čeledi Sphingidae pomocí morfologického popisu je třeba získat mnoho jedinců obou pohlaví, zatímco při použití barcoding metody postačí pouze malý vzorek tkáně (Moritz *et al.* 2004).

Další výhodou genetické determinace pomocí genu *COI* je její nezávislost na vývojovém stádiu jedince. Je možné odebrat DNA z larválního, juvenilního či adultního jedince (Shearer a Coffroth 2007).

DNA vlivem času a různých podmínek skladování degraduje a proto může být získání plně dlouhé sekvence genu *COI* komplikované. Přesto k určení jedince nemusí být klíčové získání celé sekvence, ale postačí i fragmenty o přibližné velikosti okolo 120 bp. Tyto fragmenty se totiž mohou poskládat tak, aby se překrývaly a získala se tak celá sekvence. Tento postup se může použít v případě, kdy je úspěšnost získání celého fragmentu pod 50 %, či v případech, kdy je jeho získání příliš finančně náročné, zejména u starších a nedokonale skladovaných vzorků (Hajibabaei *et al.* 2006).

Získat rychle a levně u vzorků starších více než 10 let dostatečně dlouhý fragment, je obecně obtížné právě kvůli degradaci DNA (Hajibabaei *et al.* 2005). Běžné protokoly pro získání dlouhé sekvence ze starších vzorků, které většinou bývají nedokonale chráněné před degradací (zmrazení, uložení v ethanolu aj.), bývají většinou příliš nákladné a časově náročné. Pro ověření zařazení do taxonomie bude nutné moderní vzorky srovnat se staršími, z toho důvodu se začalo uvažovat o použití krátkých fragmentů (Hajibabaei *et al.* 2006).

Z výzkumů Hajibabaei *et al.* (2006) vyplývá, že použití krátkých sekvencí pro barcoding je možné, avšak u nedegradovaných a dobře skladovaných vzorků je stále levnější a přesnější použití dlouhých fragmentů.

4.6 Jaderné markery – ITS1 a ITS2

Mezigenové mezerníky ITS1 a ITS2 (internal transcribed spacer) jsou často používanými markery pro určování a identifikaci druhů. Jedná se o nekódující sekvence, jejichž velikost je v eukaryotických organismech vysoce variabilní. Jsou evolučně konzervované, takže se liší jen minimálně i při srovnání sekvencí dvou vzdálených druhů (Doležal 2014).

ITS1 a ITS2 se vyskytují mezi konzervativními kódujícími podjednotkami 18S, 5,8S a 28S, které jsou součástí ribozomální DNA (rDNA je úsek DNA kódující ribozomální RNA) (Douglas a Haymer 2001). Bylo však prokázáno, že obsahují jeden nebo více promotorů, které jsou schopné podporovat transkripci *Pol I* (polymeráza I) *in vivo* i *in vitro* (Mayer *et al.* 2006). Pomocí PCR může být velikost tohoto polymorfismu snadno detekovatelná a použitelná pro identifikaci jedinců. Porovnáním různých sekvencí ITS a vytvořením vývojového stromu je možné zjistit příbuznost druhů a to, jak se postupně během evoluce odštěpovaly (Doležal 2014).

Výhodou, tak jako u fragmentu *COI*, je jeho použitelnost v jakémkoliv stádiu životního cyklu organismu (Douglas a Haymer 2001). Dalším pozitivem oproti *COI* je konzervativnost úseků obklopujících ITS1, zejména při navrhování primerů. Avšak úspěšnost sekvenování z úseků s vysokým počtem inzercí a delecí může být nízká a celý proces se komplikuje nutností použít metodu klonování. Z tohoto důvodu se některé studie nesnaží používat pouze úsek ITS1 a nahradit jím *COI*, nýbrž obě metody kombinují, zvláště pokud je mitochondriální marker nedostačující (Smith *et al.* 2007).

4.7 Extrakce DNA

Metod, které slouží k izolaci nukleových kyselin, existuje celá řada, proto se tato práce bude zabývat popisem pouze těch, které byly následně použity v experimentální části diplomové práce.

Prvním a nejdůležitějším krokem je lýza buněk, ze kterých chceme nukleovou kyselinu získat. U klasických buněk, jaké jsou například obsaženy v krvi, stačí rozpuštění biomembrán a denaturace proteinů detergentem, ovšem pro lýzu pevných či tvrdých částí, jako jsou houbové nebo rostlinné buňky, nebo buňky tkáně hmyzího exoskeletu, je třeba použít i určitou formu mechanické síly, jako je například tření skleněnými kuličkami, protřepávání pomocí vortexu, rozrušení tkáně drcením v třecí misce po ošetření tekutým dusíkem a podobně (Vinod 2004). Aby se zvýšila čistota vyextrahované nukleové kyseliny, může se k lyzačnímu roztoku přidat proteináza K, jenž je enzymem štěpícím bílkoviny, včetně histonů vázaných na strukturu DNA (Kodíček 2007).

Buněčný obsah, včetně požadovaných nukleových kyselin, je z lyzovaných buněk uvolněn do pufovaného roztoku, který mimo jiné obsahuje etylendiaminotetraoctovou kyselinu (EDTA). Ta je zodpovědná za chelataci iontů vápníku, které pro svou činnost potřebují nukleázy. Ty jsou příčinou štěpení izolované nukleové kyseliny. Nukleázy jsou rovněž součástí obsahu lyzovaných buněk a bez vápenných iontů nepracují, kyselina etylendiaminotetraoctová je tedy jejich inhibitor a slouží ke zvýšení stabilizace vyextrahované DNA (Raclavský 2003).

4.7.1 Fenol-Chloroformová extrakce

Fenol – chloroformová extrakce je takzvaná liquid – liquid metoda, to znamená, že odděluje směsi na základě různého rozpuštění individuálních molekul ve dvou nesmíselných roztocích. Tento typ metod je široce používaný k extrakci RNA, DNA nebo proteinů (Zumbo 2012).

Tradiční fenol – chloroformová extrakce zanechává nukleové kyseliny rozpuštěné ve vodném prostředí – pufru a odstraňuje ostatní složky lyzovaného roztoku, zejména proteiny. K tomuto roztoku lyzátu se přidává směs fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu. Chloroform patří mezi organická rozpouštědla a nemísí se s vodným roztokem lyzované buňky, čímž dojde k rozdělení směsi na dvě fáze, dolní chloroformovou a horní vodnou. Při míšení protřepáváním obou roztoků dochází

ke srážení proteinů, které jsou přítomny ve vodném lyzátu. Po skončení míšení přejde fenol do chloroformové fáze a to díky izoamylalkoholu, který zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu. Aby došlo k dokonalému oddělení obou fází, musí být roztok centrifugován. Po tomto procesu se na rozhraní obou fází objeví bílý prsteneček, obsahující sražené proteiny. Vodná fáze nad tímto prstencem obsahuje požadované nukleové kyseliny a je přenesena do nové, nepoužité zkumavky. Tento proces přidávání fenol – chloroform – izoamylalkoholové směsi se opakuje do té doby, dokud se po centrifugaci nepřestane bílý prsteneček sražených proteinů objevovat. Tím dosáhneme dokonalého odstranění proteinů (Raclavský 2003). U některých vzorků, jako jsou rostliny, houby a některé bakterie bývá často nutné odstranění i polysacharidů extrakcí s cetyltrimetylamonium bromidem (CTAB) (Porebski *et al.* 1997). Nakonec se celá směs ještě jednou musí extrahovat směsí jen chloroformu a izoamylalkoholu, aby byly odstraněny i zbytky fenolu v roztoku, které by mohly interferovat nukleové kyseliny, například při použití některých enzymů (Zumbo 2012).

Z takto přečištěného vodného roztoku je možné nukleové kyseliny vysrážet přidáním koncentrovaného etanolu. Taková směs se poté znovu centrifuguje a vysrážené nukleové kyseliny se usadí na dně zkumavky jako bílá, mléčně zakalená sraženina, nazývaná též peleta. Bílé zbarvení je dáno přítomností solí, které se srážejí společně s nukleovými kyselinami a účinnost srážení ještě zvyšují. Tyto soli je poté třeba odstranit přidáním 70% ethanolu. 95% objemu získaných nukleových kyselin tvoří RNA. Pokud potřebujeme pracovat pouze s čistou DNA, RNA musí být odstraněna působením enzymu RNázy. Roztok je dále přečišťován fenol – chloroformovou extrakcí a DNA sražena ethanolem. Výtěžek poté může být dále rozpuštěn ve vodě, nebo vhodném pufru. Nevýhodou může být časová náročnost vzhledem k několikrát se opakující centrifugaci a také vyšší spotřeba reagensů (Raclavský 2003).

4.7.2 Magnetická separace

V posledních letech se mezi izolačními metodami uplatňují magnetické částice. Jedná se o kulovité útvary o velikosti několika nanometrů až mikrometrů (5 nm – 100 μm), tvořené kovovým jádrem. Velikost se ovšem dá přizpůsobit dle struktury, kterou chceme izolovat. Například 5 – 50 nm pro proteiny nebo 10 – 100 μm pro celé buňky. Pro izolaci nukleových kyselin je ideální velikost 20 – 450 nm. Metoda je tedy vhodná pro všechny zmíněné biomolekuly. Materiálem, který tvoří toto jádro, je nejčastěji

gamma - Fe_2O_3 (maghemit) nebo Fe_3O_4 (magnetit), může být tvořen ale i zlatem (Hsing *et al.* 2007).

Princip je založen na fyzikálně – chemických vlastnostech magnetických částic. Tyto jsou schopné vázat různé bioaktivní molekuly, jež mají silnou afinitu k biologickému materiálu, jímž je modifikován povrch magnetických částí (Zhou *et al.* 2013).

Samotná izolace probíhá tak, že se magnetické části přidají ke vzorku a námi požadované molekuly nukleové kyseliny se na ně specificky naváží. Takto modifikované magnetické částice se separují ke stěně zkumavky pomocí magnetu, zbylý roztok s nenavázanými látkami se odstraní. Následuje promytí a uvolnění magnetických částic z komplexu do nově přidaného roztoku. Navázané molekuly nukleových kyselin se oddělí pomocí denaturace, čímž získáme námi požadované látky, s nimiž můžeme dále pracovat (Húska *et al.* 2008).

Magnetická separace se běžně používá jako automatická metoda izolace DNA. Ve forenzních laboratořích se mohou uplatňovat kombinace přístrojů pro izolaci (*Freedom EVO1 150 extraction robot*) s magnetickým separátorem (*Te-MagS*). Hlavním důvodem je bezesporu snížení časové i finanční náročnosti. V neposlední řadě se zde však uplatňuje omezení lidského faktoru při běžné manuální manipulaci se vzorky a jejich křížová kontaminace či záměna. Využití robotické platformy umožňuje moderní analýzu vysokého počtu vzorků za současného snížení lidských zdrojů, jakožto možných strůjců chyb (Witt *et al.* 2012).

Výhodou automatizované metody izolace nukleových kyselin magnetickou separací je její časová nenáročnost. Vzorek se totiž nemusí složitě upravovat (např. centrifugací či dialýzou), jako je tomu u běžných purifikačních metod (Húska *et al.* 2008).

Další výhodou magnetické separace buněk nebo nukleových kyselin oproti konvenčním metodám je jednoduchost jejího použití. Metoda navíc nezatěžuje životní prostředí, nevyžaduje totiž vysoké objemy toxických chemikálií. Lze ji navíc provádět při běžné laboratorní teplotě. Metody molekulární biologie, jako je například PCR, navíc vyžadují vysokomolekulární výtěžek DNA. V porovnání s metodami, které zahrnují filtraci a centrifugaci, magnetická separace není destruktivní vůči biomolekulám (Zhou *et al.* 2013).

4.7.2.1 Modifikace

Pro metodu magnetické separace existují dva různé způsoby modifikace v závislosti na adhezi biomolekul. První z nich funguje na principu pokrytí povrchu nabitou vrstvou pro elektrostatickou adsorpci molekul. Tou může být například látka zvaná aminosilan, použitá v roztoku toluenu. Tyto modifikované magnetické částice bývají používány pro izolaci DNA díky interakci mezi záporně nabitou molekulou DNA a navázanou skupinou NH_2 , čili kladně nabitými částicemi. Pro oddělení molekul DNA není při použití této metody potřeba použití organického rozpouštědla, které by mohlo mít později negativní vliv při detekci. Druhým způsobem je modifikace magnetických částic navázáním skupin biomolekul, které jsou specifické. Používají se aktivní chemické skupiny, jako jsou například amino skupiny. Dalším typem modifikace je navázání streptavidinu nebo avidinu na povrch částice. Ty se specificky vážou na biotinylované biomolekuly. Poly(T) řetězec na povrchu částic se zase používá pro izolaci mRNA. Po izolaci cílových molekul se tato metoda často používá k imobilizování specifických receptorů (Hsing *et al.* 2007).

4.7.3 Adsorpce na silikát

4.7.3.1 Silikátové částice

DNA v přítomnosti takzvaných chaotropních solí adhezuje na silikátový povrch, obecně na oxid křemičitý (SiO_2). Chaotropní soli jsou iontové sloučeniny snižující strukturovanost vody. Ta je dána přechodně vznikajícími vodíkovými můstky mezi vodíkem a kyslíkem sousedících molekul. Nejčastěji používanou látkou je jodid sodný (NaI) nebo ionty guanidinu (Rivero *et al.* 2006).

K roztoku, který obsahuje lyzovaný buněčný obsah, se přidá chaotropní sůl a suspenze částic silikátu. Adhezi DNA na částice zvyšuje protřepávání směsi. Ostatní látky, které se nepřipojí na silikát, zůstávají v roztoku a jsou následně odstraněny. Silikátové částice se nechají usadit nebo se směs centrifuguje. Roztok nad nimi se opatrně odsaje a propláchne novou směsí pufru s chaotropními solemi. Proces se opakuje nejlépe ještě jednou, čímž lze získat čistou DNA adherovanou na částicích. Ta se poté uvolňuje přidáním vody nebo vhodného pufru, který neobsahuje chaotropní soli. Směs se znovu centrifuguje. Výsledkem je roztok DNA nad sedimentem silikátových částic ve zkumavce (Raclavský 2003).

4.7.3.2 Silikátová kolonka

Funguje na stejném principu, jako metoda popsaná výše. Na rozdíl od ní se ale silikát nachází v plastové zkumavce zvané kolonka a to ve formě matrix. Jedná se o komerčně dostupnou rychlou a spolehlivou metodu poskytující zisk DNA o dostatečné čistotě pro většinu následujících aplikací a v dnešní době se jedná o nejčastější způsob izolace genomové DNA. Na trhu je v současnosti k dispozici celá řada izolačních kolonkových kitů (např. Qiagen, Sigma-Adrich, Geneaid, Macherey-Nagel, Zymo Research, Top-Bio) (Ip *et al.* 2015).

Obecný postup izolace je pro většinu komerčních kitů stejný, může se lišit drobnými modifikacemi, časovou náročností nebo použitými reagensy. Nejdříve se musí získat lyzát důkladným rozrušením tkání a buněk dostatečným působením proteázy či proteinázy K. Takto získaný roztok se nanese do kolonky. DNA obsažená v lyzátu se naváže na silikátovou membránu a zbytek roztoku proteče vlivem gravitace do zkumavky pod kolonkou. Pro dokonalé odstranění tekutiny bez navázané DNA se provede centrifugace. Matrix s navázanou DNA se promyje promývacím pufrem a opět odstředí. Po promytí se nukleová kyselina vyváže z membrány nejčastěji elučním pufrem nebo vodou do předem připravené nové sběrné zkumavky (Shaw *et al.* 2009).

U kolonkových kitů, ještě před začátkem samotné izolace, se musí brát v potaz několik parametrů. Z jakého druhu vstupního materiálu bude DNA izolována, jestli z živočišné tkáně, krve či rostliny. Jaké množství vstupního materiálu je k dispozici, proto existují kity pro malá, střední i velká množství. Jaký výtěžek je očekáván. Ten se totiž pohybuje většinou v řádech desítek mikrogramů DNA či RNA. Čistota výtěžku, určená absorbcí světla (A_{260}/A_{280}), udávající kontaminaci proteiny se pohybuje od 1,6 do 2,0 (dle výrobce kitu). Tyto informace pomohou zvolit správný izolační kit pro laboratorní činnost (Raclavský 2003).

4.7.4 Chelex

Metoda izolace nukleových kyselin pomocí chelexu je speciální a je často využívána ve forenzní genetice. Chelex poskytuje kvalitní extrakci DNA i z velmi malého množství vstupního materiálu, jakým může být například lidský vlas. Čistota vyizolované DNA je sice menší, ovšem pro PCR je dostatečná. Tato metoda je poměrně levná a rychlá. Velkou výhodou je minimalizace vnější kontaminace vzorku, jelikož celý proces extrakce probíhá pouze v jedné zkumavce (Frydrychová *et al.* 2012).

Dle Giraffa (2000) je protokol izolace na bázi chelexu použitelný pro široké spektrum organismů.

Chelex je pryskyřice, která je složená ze styren – divinilbenzen kopolymeru, je makromolekulární látkou, jejíž makromolekula je tvořena alespoň ze dvou odlišných monomerů. Na tuto látku se párují iminodiacetátové ionty, je to kovalentně imobilizovaná kyselina imidoctvá (IDA). Právě tyto ionty fungují jako chelatátory, které váží polyvalentní kovové ionty (Yang *et al.* 1999). Dvojmocné kationty kovů obsažené ve vzorku (Ca^{2+} , Mn^{2+} a Mg^{2+}) mohou při působení vysokých teplot ($95 - 100^\circ\text{C}$) způsobit poškození DNA. Za alkalických podmínek zvyšuje Chelex afinitu právě k těmto kationům. Mimo to, chelatace hořčnatých kationů (Mg^{2+}) zvyšuje inaktivaci nukleáz, které jsou zodpovědné za degradaci DNA (DNázy). Mg^{2+} kationty jsou nutné kvůli jejich enzymatické aktivitě (Frydrychová *et al.* 2012).

Principiálně se v této metodě izolace musí provést destrukce a homogenizace vzorku. Následuje degradace buněčných membrán, proteinů a denaturace nukleové kyseliny v alkalickém prostředí a za působení vysoké teploty ($95 - 100^\circ\text{C}$). Dále probíhá centrifugace vzniklé suspenze, kvůli oddělení pryskyřice a zbytků buněčných komponent. Nad touto vrstvou se nachází supernatant obsahující DNA. Ta se může použít rovnou v PCR amplifikaci. Je však třeba zabránit přímému kontaktu pryskyřice s PCR reakcí, protože Chelex je jejím inhibátorem (Horáková *et al.* 2008, Frydrychová *et al.* 2012).

4.7.4.1 Vliv skladování

Caenazzo *et al.* (2009) vycházel se studie, ve které byl znovu otevřen případ vraždy z roku 1992. Při opětovném vyšetřování byly použity k získání DNA 2 metody izolace (ChelexTM 100 a QIAamp DNA Micro Kit [Qiagen]). Jeden z analyzovaných vzorků oběti byl skladován 16 let při teplotě -80°C ostatní při pokojové teplotě. Pomocí chelexu byly získány vhodné výsledky pouze ze vzorku, který byl skladován při -80°C , zatímco pomocí kitu QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen), se podařilo vyizolovat DNA i ze vzorků, které byly uchovány při pokojové teplotě po dobu 15 let. Z toho vyplývá, že izolace pomocí chelexu je účinná zvláště při dodržení přísných skladovacích podmínek.

4.8 Modelový organismus – motýli čeledi lišajovití (Sphingidae Latreille, 1802)

Motýli čeledi lišajovití (Sphingidae) jsou velcí až zavalití motýli, jejichž tělo je aerodynamického tvaru. Jsou velmi dobrými letci. Rozpětí jejich křídel je 44 – 120 mm (Bělín 2003), největší lišaj (*Cocytius antaeus* Drury, 1773) však může dosahovat rozpětí křídel až 175 mm (Šťourač 2014), největší druh žijící v České republice je lišaj smrtihlav (*Acherontia atropos*) (Pechlát 2007).

Některé druhy se vyznačují typicky dlouhým a tlustým sosákem, zejména kvůli sání nektaru z velkých a hlubokých květů rostlin. Jiné druhy se vyznačují pouze krátkým a tuhým či dokonce zcela redukovaným sosákem. Tykadla bývají zakončena ostrým hrotem a u samců jsou porostlá dvěma řadami štětiček. Přední křídla jsou vždy větší, mají větší plochu a jsou obvykle zbarvena nenápadně, nevýrazně, zatímco zadní křídla bývají velmi barevná. Někdy jsou oba páry křídel téměř celé sklovitě průhledné. V klidu přední křídla překrývají ta zadní, motýl je proto velmi dobře maskován před predátory. Oči mají velké a lysé (Pechlát 2007).

Většina druhů lišajů je aktivní po setmění nebo v noci, ovšem malá část může být aktivní i ve dne. Někteří lišaji jsou tažní, migranti (Bělín 2003).

Celkový počet druhů čeledi lišajovití se pohybuje okolo 1200, z čehož nejvíce druhů se nachází v tropickém podnebném pásu. Na území České republiky můžeme zaznamenat pouze 19, a to zejména v době, kdy k nám přilétají nebo se zde rozmnožují (Pechlát 2007).

Samice kladou vajíčka zpravidla na spodní stranu listu živné rostliny a vylíhlé housenky dorůstají do velikosti i více než 10 cm. Housenky jsou lysé a na osmém článku mohou mít růžek nebo trn. Při vyrušení či v nebezpečí se housenky mohou stavět do výhružné polohy vzpřímením přední části těla, čímž odhalí varovnou kresbu. Ta může svým prokreslením připomínat oči. Tento postoj připomíná tvar sfingy, jenž dal latinský název celé čeledi. Kukly jsou uloženy v komůrce pod zemí, nebo mělce u povrchu v řídkém zámotku. Takto i obvykle přezimují. Než se motýl vylíhne, může ve stádiu kukly setrvat i několik let (Tykač 1963, Hůrka a Čepická 1980, Pechlát 2007).

4.8.1 Lišaj svlačcový (*Agrius convolvuli*)

Lišaj svlačcový (*Agrius convolvuli*) je druhý největší lišaj vyskytující se v České republice. Barevně poměrně snadno rozpoznatelný. Je rozšířen i v tropických a subtropických krajích jižní Evropy, Afriky, Přední Asie a indoaustralské oblasti. Jeho výskyt je podmíněn klimatickými podmínkami a roční době (Šťourač 2014). Nejčastěji je vidět za soumraku, jak přelétá z květu na květ a sají nektar (Bělín 2003). Obvykle je pozorován na volnějším prostranstvích. V hustém lese se téměř nevyskytuje (Šťourač 2014).

U nás patří k největším druhům lišajů, v České republice je druhým největším lišajem po lišaji smrtihlavovi (*Acherontia atropos*). Rozpětí křídel se pohybuje v rozmezí 80 – 120 mm (Carter 1998). Zbarvení křídel připomíná kůru stromů, v klidu je tak motýl na kmeni výborně maskován. Zadeček lemují střídající se pruhy černé a růžové, které jsou ve střední linii přerušeny tmavým podélným pruhem (viz Obrázek 1 a 2) (Tykač 1963). Sosák dosahuje délky až 10 cm, s nímž dokáže sát nektar z dlouhých trubkovitých květů i za letu, tím vzniká typický bzučivý zvuk (Mucha 1962).

Samice klade až 200 vajíček na spodní stranu listu. Páření probíhá nejčastěji v noci nebo před rozedněním (Šťourač 2014).

V České republice se líhnou 2 generace housenek za rok. První od května do konce června, druhá pak nejčastěji od poloviny července do října. Housenky jsou velmi žravé, přijímají potravu ve dne i v noci. Barva housenek je většinou hnědá, někdy i zelená. Na hřbetě má výrazný černý pruh. Přes den bývají ukryté v podrostu nebo jsou ukryté mělce zahrabané v zemině. Stádium housenky trvá v našich podmínkách 35 – 45 dní, dorůstá délky až 12 cm. Kukla je dlouhá okolo 5 – 6 cm, tmavě hnědá a lesklá (Hůrka a Čepická 1980). Motýl první generace zpravidla nezimuje, zatímco motýl druhé generace se opět zakuklí a takto přezimuje (Šťourač 2014).

Nejčastější hostitelskou rostlinou je svlačec rolní (*Convolvulus arvensis* L.) (Mucha 1962).



Obrázek 1 - Lišaj svlačcový (*Agrius convolvuli*) samec (Řezáč 2013)



Obrázek 2 - Lišaj svlačcový (*Agrius convolvuli*) samice (Řezáč 2013)

4.9 Sphingidae museum

Sphingidae museum je muzeum nočních motýlů čeledi lišajovitých, jejíž kolekce je druhou nejucelenější sbírkou lišajů na světě, tou první je Muzeum přírodních věd v Londýně. Nachází se v ekologickém centru Orlov nedaleko Příbrami. Momentálně sbírka čítá na 1 325 druhů lišajů a více než 200 000 exemplářů.

Muzeum a odborná činnost kolem něj vznikla proto, aby přispěla do celosvětového vědeckého monitorování výskytu hmyzu. Snahou je také objevovat a popsat nové druhy hmyzu, poskytnout možnost diskuse odborníkům, ale také informovat širokou veřejnost a pomáhat publikovat výsledky sběratelům, kteří tuto možnost nemají.

Zakladatelem a ředitelem Sphingidae musea v České republice je entomolog Tomáš Melichar (Česká společnost entomologická při Akademii věd České republiky). Kromě něj má muzeum ještě odborné zahraniční poradce. Z Francie je to kurátor Národního muzea přírodních věd v Paříži a výzkumný pracovník montrealského Insectaria Jean Haxaire a z Velké Británie kurátor Muzea přírodních věd v Londýně Ian J. Kitching. O určování druhů lišajů pomocí morfologických znaků se stará kurátor muzea v Orlově u Plzně pro oblast Lepidoptera Michal Řezáč.

Neopomenutelnou aktivitou muzea je také vydávání odborného časopisu *The European Entomologist*, který se zabývá popisem nových druhů hmyzu a to nejen z čeledi Sphingidae a vychází čtvrtletně. Obsahuje také informace o proběhlých expedicích.

Muzeum se zabývá vzděláváním široké veřejnosti a poskytuje odborné přednášky na různá témata. Zájemci se mohou například dozvědět, jaká je metodika sběrů vzorků, jak probíhá jejich DNA analýza, či se seznámit s faunou a florou deštných pralesů Indie.

Sphingidae museum rovněž spolupracuje s projektem Barcode of Life Data System (BOLD) a dává si za cíl obohatit knihovnu moderní vědecké klasifikace o barcody hmyzu. Vědeckému týmu muzea Sphingidae se již podařilo popsat k dnešnímu dni (17.2.2015) více než 25 nových druhů.

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Izolační kity

Izolace probíhala pomocí vybraných, komerčně dostupných, kolonkových izolačních kitů Geneaid (New Taipei, Taiwan), Qiagen (Hilden, Germany), Top-Bio (Praha, Česká republika), Macherey-Nagel (Düren, Germany), Zymo Research (Irvine, USA) a magnetické separace firmy Chemagen (Baesweiler, Germany). Pro účely tohoto experimentu byla inkubace po přidání proteinázy K u všech izolačních kitů standardizována na 1 hodinu, aby bylo možné přesněji stanovit celkový čas izolace.

Pro představu uvádím jednoduché schéma principu izolace DNA pomocí silikátové kolonky (viz Obrázek 3). Upraveno dle oficiálního protokolu izolačního kitu innuPREP DNA Micro Kit (Analytik Jena).



Obrázek 3 - Základní schéma izolace DNA silikátovou kolonkou.

Upraveno dle protokolu izolačního kitu innuPREP DNA Micro Kit (Analytik Jena)

5.1.1 Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Geneaid)

Příprava

Nahřejeme termální blok na 60°C. Eluční pufr (Elution buffer) rovněž nahřejeme na 60°C.

Protokol

Vzorek vložíme do 1,5 ml zkumavky a jemně rozmělníme homogenizační plastovou tyčinkou. Přidáme 200 µl pufru GT. Poté přidáme 20 µl proteinázy K, zvortexujeme a necháme inkubovat v termálním bloku při 60°C hodinu.

Po hodině inkubace přidáme 200 µl pufru GBT, opět zvortexujeme a necháme inkubovat dalších 20 minut v termálním bloku při teplotě 60 °C. Ke vzorku následně přidáme 200 µl ethanolu a vortexujeme 10 sekund. Směs získanou v předešlém kroku přepipetujeme do kolony a centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 8200 rpm. Kolonku vyjmeme z centrifugy a odpad z centrifugační zkumavky vylijeme. Zkumavku vrátíme. Do kolony napipetujeme 400 µl pufru W1, vrátíme do centrifugy a centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 8200 rpm. Vyjmeme kolonku z centrifugy, obsah centrifugační zkumavky vylijeme a vrátíme zpět ke kolonce. Do kolony napipetujeme 600 µl promývacího pufru (Wash buffer) a centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 8200 rpm. Kolonku opět vyjmeme z centrifugy a obsah centrifugační zkumavky vylijeme, vrátíme ke koloně a ještě dodatečně centrifugujeme 3 minuty při otáčkách 13 000 rpm.

Zkumavku s odpadem vyhodíme a kolonku umístíme do nové 1,5 ml zkumavky. Do kolony napipetujeme 100 µl elučního pufru (Elution buffer) a necháme inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Po této době centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 8200 rpm. Kolonku vyhodíme a lyzát přepipetujeme do PCR zkumavky a uchovááme při -20°C k dalším analýzám.

Modifikace

V protokolu od výrobce se uvádí, že inkubace po přidání pufru GT a proteinázy K by měla trvat 30 minut při 60°C. Pro účely tohoto experimentu byla inkubace u všech izolačních kitů standardizována na 1 hodinu, aby bylo možné přesněji stanovit množství extrahované DNA, kvalitu a celkový čas izolace.

5.1.2 QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen)

Příprava

Nahřejeme termální blok na 56°C. Pokud pufr AL a ATL obsahují precipitáty, rozpustíme je zahřátím na 70°C. Pufr AW1 a AW2 připravit dle návodu výrobce.

Protokol

Vzorek vložíme do 1,5 ml zkumavky a jemně rozmělníme homogenizační plastovou tyčinkou. Přidáme pufr ATL na konečný objem 100 µl roztoku ve zkumavce. K směsi přidáme 10 µl preteinázy K. Necháme inkubovat. Po inkubaci přidáme 100 µl pufru AL a vortexujeme 15 sekund. Po dostatečném promíchání necháme vzorky inkubovat ne termálním bloku 10 minut při teplotě 56 °C. Po inkubaci můžeme zkumavky centrifugovat, aby se kondenzovaná voda dostala z víčka zpět do roztoku. Přidáme 50 µl ethanolu (96 – 100%), vortexujeme 15 sekund a necháme inkubovat 3 minuty při laboratorní teplotě. Opět můžeme centrifugovat, aby se kondenzovaná voda dostala zpět do roztoku. Lyzát přepipetujeme do QiaAmp MinElute kolonky s 2 ml zkumavkou a centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 8000 rpm. Kolonku vyjmeme z centrifugy a obsah centrifugační zkumavky vylijeme. Ke kolonce přidáme novou 2 ml zkumavku a do kolonky napipetujeme 500 µl pufru AW1, centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 8000 rpm. Kolonku vyjmeme z centrifugy a obsah centrifugační zkumavky vylijeme. Ke kolonce přidáme novou 2 ml zkumavku a do kolonky napipetujeme 500 µl pufru AW2, centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 8000 rpm. Poté centrifugujeme ještě jednou 3 minuty při otáčkách 13 000 rpm. Kolonku vložíme do 1,5 ml zkumavky a napipetujeme 20 – 100 µl pufru AE. Inkubujeme 1 minutu při laboratorní teplotě a poté centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 13 000 rpm. Kolonku vyhodíme a lyzát přepipetujeme do PCR zkumavky a uchováваме při – 20°C k dalším analýzám.

Modifikace

Pufru ATL bylo přidáno 200 µl a proteinázy K 20 µl z důvodu velikosti vzorku (celá končetina). Objem pufru AL byl optimalizován na 200 µl a konečně, objem pufru AE byl z rozmezí 20 – 100 µl stanoven na 50 µl.

5.1.3 NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel)

Příprava

Nahřejeme termální bloky na 56°, 70°C a 90°C. Připravíme si pufr B5 a proteinázu K.

Protokol

Vzorek vložíme do 1,5 ml zkumavky a jemně rozmělníme homogenizační plastovou tyčinkou. Přidáme 80 µl pufru T1 a 8 µl proteinázy K. Vortexujeme 10 sekund a necháme inkubovat na termálním bloku, dokud se vzorek kompletně nezlyzuje, tj. přes noc nebo 1 – 4 hodiny. Po inkubaci přidáme ke vzorku 80 µl pufru B3 a vortexujeme 10 sekund. Směs inkubujeme 5 minut na termálním bloku při teplotě 70°C. Po inkubaci necháme lyzát zchladnout na laboratorní teplotu. Po zchladnutí směsi přidáme ke vzorku 80 µl ethanolu (96 – 100%) a vortexujeme 10 sekund. Vzorek přepipetujeme do NucleoSpin kolonky s 2 ml sběrnou zkumavkou a vložíme do centrifugy, kde směs centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 11 000 rpm. Zkumavku vyhodíme a nahradíme novou. Do kolonky přidáme 50 µl pufru B5 a centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 11 000 rpm. Zkumavku vyhodíme a nahradíme novou. Do kolonky přidáme 50 µl pufru B5 a centrifugujeme 2 minuty při otáčkách 11 000 rpm. Kolonku vložíme do nové 1,5 ml zkumavky a přidáme 20 µl pufru BE na střed kolonky. Centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 11 000 rpm. Pro odstranění zbývajícího ethanolu ze vzorku výrobce doporučuje umístit zkumavku na termální blok při teplotě 90°C s otevřeným víčkem po dobu 8 minut. Lyzát přepipetujeme do PCR zkumavky a uchovááme při – 20°C k dalším analýzám.

Modifikace

V protokolu od výrobce se uvádí, že inkubace po přidání pufru T1 a proteinázy K by měla trvat přes noc nebo 1 – 4 hodiny. Pro účely tohoto experimentu byla inkubace u všech izolačních kitů standardizována na 1 hodinu, aby bylo možné přesněji stanovit množství extrahované DNA, kvalitu a celkový čas izolace.

5.1.4 ZYMO ZR Tissue & Insect DNA MicroPrep™ (Zymo Research)

Příprava

U izolačního kitu ZYMO ZR Tissue & Insect DNA MicroPrep™ není nutné vzorek nechat inkubovat při vyšších teplotách, než laboratorních. Z toho důvodu není třeba žádná příprava.

Protokol

Vzorek vložíme do zkumavky ZR BashingBead™ Lysis Tube a přidáme 750 µl Lysis Solution. Zkumavku vložíme na třepačku, nastavíme na maximální rychlost a necháme pracovat 10 minut. Poté vložíme do centrifugy a centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 11 000 rpm. Objem 400 µl vzorku z ZR BashingBead™ přepipetujeme do Zymo-Spin™ IV Spin Filter (oranžové víčko) se zkumavkou a centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 7000 rpm. Do takto získaného filtrátu přidáme 1200 µl Genomic Lysis Buffer a promícháme. Z této směsi přeneseme objem 800 µl do Zymo-Spin™ IC kolonky se zkumavkou a centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 11 000 rpm. Obsah zkumavky vylijeme a opět centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 11 000 rpm. Přidáme 200 µl Pre-Wash Buffer do kolonky s novou zkumavkou a centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 11 000 rpm. Po centrifugaci přidáme ke vzorku 500 µl g-DNA Wash Buffer a opět centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 11 000 rpm. Poté přeneseme Zymo-Spin™ IC kolonku do nové 1,5 ml zkumavky a přidáme 30 – 50 µl DNA Elution Buffer. Centrifugujeme 30 sekund při otáčkách 11 000 rpm. Kolonku vyhodíme a lyzát přepipetujeme do PCR zkumavky a uchovááme při – 20°C k dalším analýzám.

Modifikace

V protokolu od výrobce se uvádí, že do Zymo-Spin™ IC kolonky se má přidat 30 – 50 µl DNA Elution Buffer. Pro účely tohoto experimentu byl objem stanoven na 20 µl. Vzorky byly třepány na FastPrep FP120 (Thermo Savant, Carlsbad, USA).

5.1.5 DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio)

Příprava

Nahřejeme termální blok na 95°C.

Protokol

Vzorek tkáně vložíme do 1,5 ml zkumavky a jemně rozmělníme homogenizační plastovou tyčinkou. Ke vzorku přidáme 75 µl DEP-25 START-Blue reagens tak, aby byla tkáň kompletně ponořena. Směs necháme inkubovat na termálním bloku 20 minut při teplotě 95°C. Po inkubaci vzorek ochladíme na laboratorní teplotu a přidáme do zkumavky 75 µl DEP-25 STOP reagens a zvertexujeme. Po přidání STOP činidla se START-Blue činidlo změní na bezbarvý roztok. Tento finální roztok je již možné použít jako zdroj templátové DNA pro následnou PCR reakci.

Modifikace

Výrobce uvádí, že objem DEP-25 START-Blue reagens je možné měnit dle potřeby, je však nutné upravit objem přidané DEP-25 STOP reagens a to v poměru 1:1.

5.1.6 Column DNA Lego Kit (Top-Bio)

Příprava

U izolačního kitu Column DNA Lego Kit, není nutné vzorek nechat inkubovat při vyšších teplotách, než laboratorních. Z toho důvodu není třeba žádná příprava.

Protokol

Vzorek tkáně vložíme do 1,5 ml zkumavky a jemně rozmělníme homogenizační plastovou tyčinkou. Ke vzorku přidáme 3 díly DNA vazebného pufru L1. Směs inkubujeme 1 minutu při laboratorní teplotě za jemného míchání každé 2 minuty. Poté vzorek vložíme do centrifugy a centrifugujeme jej 30 sekund při otáčkách 8000 rpm. Supernatant (<800 µl) přepipetujeme do kolonky na sběrné zkumavce. Tento set umístíme do centrifugy a centrifugujeme jej 1 minutu při otáčkách 13 000 rpm. Kolonku vyjmeme z centrifugy a odpad z centrifugační zkumavky vylijeme. Zkumavku vrátíme. Do kolonky napipetujeme 700 µl Wash buffer L2 a opět centrifugujeme 1 minutu při 13 000 rpm. Kolonku opět vyjmeme z centrifugy a odpad z centrifugační zkumavky vylijeme. Zkumavku vrátíme. Do kolonky napipetujeme 500 µl Wash buffer L2 a znovu centrifugujeme 1 minutu při 13 000 rpm. Odpad vylijeme a kolonku znovu centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 13 000 rpm pro odstranění zbytkového promývacího pufru. Kolonku s navázanou DNA přeneseme do nové 1,5 ml zkumavky a přidáme 50 µl Elution buffer L3. Necháme inkubovat při laboratorní teplotě 2 minuty a směs centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 13 000 rpm. Pro zvýšení eluce je možné ještě jednou tento proces opakovat.

Modifikace

Po diskusi s výrobcem tohoto kitu byla pro zvýšení účinnosti izolace doporučena inkubace s proteinázou K. Inkubace trvala dle standardizace protokolu 1 hodinu.

5.1.7 DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio) přečištěna kolonou Column DNA Lego Kit (Top-Bio)

Příprava

Nahřejeme termální blok na 95°C.

Protokol

Vzorek tkáně vložíme do 1,5 ml zkumavky a jemně rozmělníme homogenizační plastovou tyčinkou. Ke vzorku přidáme 75 µl DEP-25 START-Blue reagens tak, aby byla tkáň kompletně ponořena. Směs necháme inkubovat na termálním bloku 20 minut při teplotě 95°C. Po inkubaci vzorek ochladíme na laboratorní teplotu a přidáme do zkumavky 75 µl DEP-25 STOP reagens a vortexujeme. Po přidání STOP činidla se START-Blue činidlo změní na bezbarvý roztok. Tento roztok přepipetujeme do kolonky na sběrné zkumavce. Tento set umístíme do centrifugy a centrifugujeme jej 1 minutu při otáčkách 13 000 rpm. Kolonku vyjmeme z centrifugy a odpad z centrifugační zkumavky vylijeme. Zkumavku vrátíme. Do kolonky napipetujeme 700 µl Wash buffer L2 a opět centrifugujeme 1 minutu při 13 000 rpm. Kolonku opět vyjmeme z centrifugy a odpad z centrifugační zkumavky vylijeme. Zkumavku vrátíme. Do kolonky napipetujeme 500 µl Wash buffer L2 a znovu centrifugujeme 1 minutu při 13 000 rpm. Odpad vylijeme a kolonku znovu centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 13 000 rpm pro odstranění zbytkového promývacího pufu. Kolonku s navázanou DNA přeneseme do nové 1,5 ml zkumavky a přidáme 50 µl Elution buffer L3. Necháme inkubovat při laboratorní teplotě 2 minuty a směs centrifugujeme 1 minutu při otáčkách 13 000 rpm. Pro zvýšení eluce je možné ještě jednou tento proces opakovat.

Modifikace

Přečištění DNA pomocí Column DNA Lego Kit (Top-Bio) po izolaci kitem DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio) je nestandardním protokolem. Zvolen byl z důvodu neúplné lýzi tvrdých tkání hmyzu. Top-Bio kolona byla zvolena s ohledem na stejného výrobce izolačního kitu DEP-25 DNA Extraction Kit. Tuto modifikace si vyžádal výrobce pro srovnání svých metodicky odlišných kitů, jelikož při použití samotného kitu DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio) nelze určit množství a čistotu extrahované DNA.

5.1.8 Chemagic DNA Tissue10 Kit (Chemagen)

Příprava

Nahřejeme termální blok na 55°C

Protokol

Vzorek tkáně vložíme do 1,5 ml zkumavky a jemně rozmělníme homogenizační plastovou tyčinkou. Přidáme 100 µl Lysis Buffer 1, obsahující proteinázu K. Inkubujeme hodinu při teplotě 56°C. K lyzátu přidáme 75 µl nesuspendovaných magnetických částic, předmíchaných s 263 µl Binding Buffer 2. Promícháme pomocí pipety a necháme inkubovat při laboratorní teplotě 10 minut. Po inkubaci vložíme zkumavky do magnetického separátoru (Chemagic), aby se komplex magnetických částic s DNA separoval ke stěně zkumavky. Necháme působit 2 minuty. Po inkubaci odstraníme supernatant a zkumavky vyjmeme od magnetů. Přidáme 500 µl Wash Buffer 3 a resuspendujeme magnetické částice pomocí pipety. Zkumavky opět vložíme k magnetům a necháme působit 1 minutu. Po inkubaci odstraníme supernatant. Zkumavky vyjmeme od magnetů, přidáme 500 µl Wash Buffer 4, resuspendujeme a inkubujeme 1 minutu na magnetech. Poté odstraníme všechnu pufr a zkumavky necháme na magnetech. Přidáme 1 ml Wash Buffer 5, tak abychom nepoškodili peletku z magnetických částic. Inkubujeme 90 sekund bez resuspendování pelety. Poté opatrně odstraníme veškerý pufr. Přidáme 100 µl Elution Buffer 6, v němž resuspendujeme komplex magnetických částic s DNA pomocí pipety. Inkubujeme 10 minut při teplotě 55°C. Zkumavky umístíme k magnetům a necháme inkubovat 2 minuty, poté přepipetujeme do čisté zkumavky a uchováváme při – 20°C k dalším analýzám.

Modifikace

V rámci metodiky nebyly uplatněny žádné modifikace.

5.2 Analyzovaný soubor vzorků a jejich odběr

Soubor vzorků, z nichž byla extrahována DNA, byl tvořen druhem nočního motýla lišaje svlačcového (*Agrius convolvuli*), které poskytlo Sphingidae Museum Ekologického centra Orlov.

Dle Řezáče (Ekologické centrum Orlov 2015) se vzorky odebírají přímým sběrem, pomocí smýkacího náčiní, nebo pomocí světelných pastí po západu slunce do rozbřesku. K tomuto účelu se používá bílé plátno o velikosti 3×3 metry, které je napnuté ve svislé poloze. V horní části plátna je připevněna rtuťová výbojka o výkonu 125 – 250 W.

K usmrcení exemplářů je použit čpavek, který se injekčně aplikuje do oblastí thoraxu. Po usmrcení se vzorky uloží do hladkých papírových sáčků s popisky obsahující údaje o nadmořské výšce a konkrétní zeměpisné poloze, která je určena pomocí systému GPS. Sáčky s jedinci jsou uloženy do boxů, které jsou pravidelně větrány, dokud vzorky dostatečně neuschnou. Tím se předchází napadení plísní. V této fázi jsou vzorky připraveny k preparaci. Pokud není možné vzorky preparovat bezprostředně po sběru a uschnutí, ukládají se do mrazničky na dobu min. 24 hodin a poté se ukládají do hermeticky uzavřeného boxu mimo dosah světla za stálé teploty a vlhkosti.

Před samotnou preparací se vzorek rozvlhčí v rozvlhčovačce. Rozvlhčovačce je hermeticky uzavřená nádoba s roštem. Pod rošt se nalévá voda a rozvlhčení probíhá pomocí vodních par bez přímého styku vzorku s kapalinou. U velmi starých vzorků je třeba delší doba pro rozvlhčení. Pro zamezení vzniku plísní v tomto období je možné přidat do vody několik kapek dezinfekčního prostředku na bázi chlóru. Standardní doba rozvlhčování trvá 2 – 5 dní. Poté se exempláře napnou na napínadlo a fixují do konečné podoby a nechají opět vyschnout. Tento proces trvá 9 dní.

Po vyschnutí se vzorky připevňují do entomologických krabic a uloží do mrazáku na minimálně 24 hodin. Při předchozím napadení exemplářů, například pisivkami (Psocoptera) či kožojedy (Dermestinae), kteří požírají organické zbytky, je krabice s materiálem ošetřena insekticidem (Biolit).

Po veškerém ošetření jsou exempláře umístěny do sbírkových krabic. Ty jsou vzduchotěsné a uloženy na místě bez přístupu světla při stálé teplotě a vlhkosti.

Z každého jedince byla k laboratorním analýzám odebrána pouze jedna končetina ze zadního páru nohou, sterilně, pomocí rukavic, skalpelu a pinzety.

Vzorky se od sebe lišily dobou sběru v přírodě. K pokusu byly k dispozici vzorky z let 2000, 2004, 2008 a 2012.

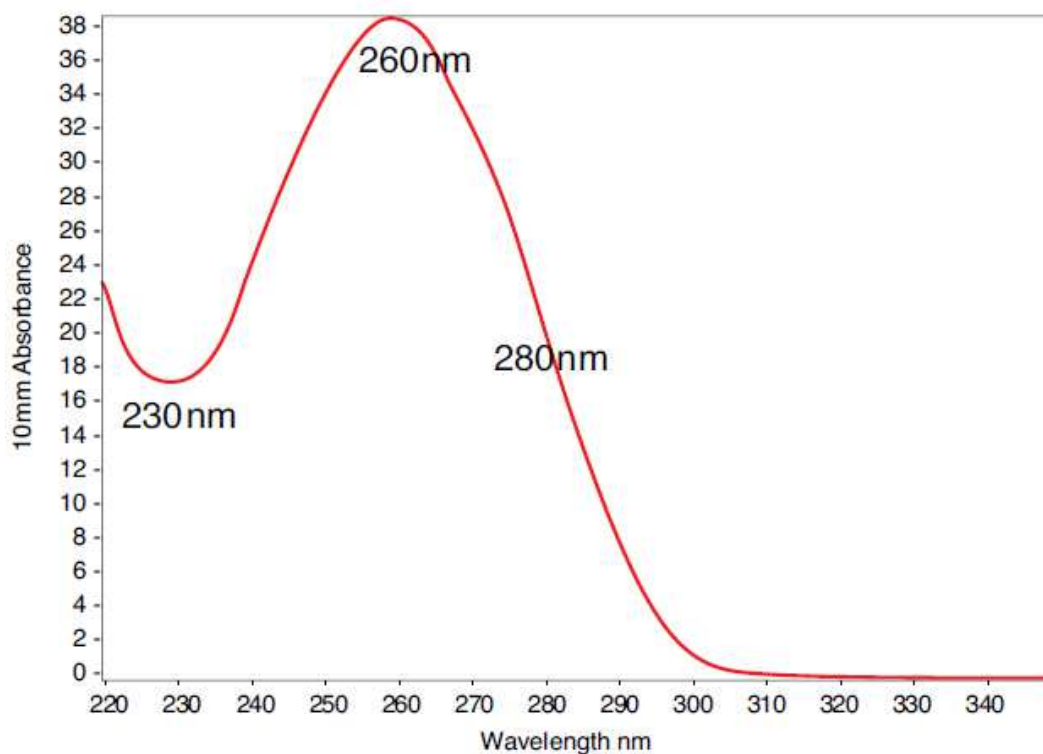
5.3 Izolace DNA

DNA pro analýzu byla extrahována ze zadního páru končetin hmyzu. Tyto vzorky byly rozdrceny pomocí plastového tloučku. Takto upravené biologické vzorky byly vystaveny působení pufru a proteinázy K po dobu 1 hodiny. Izolace genomové DNA byla prováděna pomocí magnetické izolace (Chemagen) a výběru několika komerčně dostupných izolačních kitů (Geneaid, Top-Bio, Qiagen, Macherey-Nagel, Zymo Research). Během izolace se postupovalo dle protokolů výrobců. Modifikace, které byly použity, jsou podrobněji popsány u popisu jednotlivých kitů (viz kapitola 5.1 Izolační kity).

5.4 Ověření kvality a kvantity izolované DNA

Kvalita izolované DNA byla ověřena pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu. Na gel se nanášely 4 μ l DNA s 1 μ l sacharózy, jakožto vizualizační činidlo.

Koncentrace DNA byla měřena pomocí přístroje NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) a poměr absorpance 260/280, který udává čistotu extrahované DNA. Ideální čistota izolované DNA se liší dle výrobce kitu (ideálně 1,8 – 2). Poměr koncentrace a čistoty izolované DNA byl srovnáván s typickou křivkou nukleové kyseliny dle manuálu Nucleid Acid, který je součástí přístroje (viz Obrázek 4).



Obrázek 4 – Typická křivka nukleové kyseliny (Nucleid Acid, zdroj: <http://www.nanodrop.com>)

5.5 PCR

PCR metoda byla použita pro získání dostatečného počtu kopií sekvence genu *COI* pro následné další ověření kvality izolace pomocí sekvenování. Pro amplifikaci genu *COI* byly primery LepF1 a LepR1 převzaty z práce Hebert *et al.* (2004) a primery MLepF1 a MLepR1 byly převzaty z práce Hajibabaei *et al.* (2006b). Jejich sekvence a základní popisné charakteristiky jsou uvedeny v tabulkách 2 a 3.

PCR reakční směs byla připravována na ledu. K reakční směsi se přidával 1 μ l DNA a její výsledný objem byl 10 μ l. Veškeré koncentrace a objemy jednotlivých reagensů jsou uvedeny v tabulce 1.

Pro přípravu PCR reakční směsi u genu *COI* byly použity následující reagenty:

- PPP Master Mix (Top-Bio, Praha, ČR) – 150 mM Tris-HCl (pH 8,8), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02 % Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μM každý dNTP, 100 U/ml *Taq* DNA polymeráza, barvivo, stabilizátory a aditiva
- Primery (IDT Inc., Coralville, USA) – zásobní roztok 100 pmol/μl, pracovní roztok 10 pmol/μl
- Ultračistá H₂O (Top-Bio, Praha, Česká republika)

Tabulka 1 - Složení reakční směsi PCR pro 1 vzorek

Reagencie	Množství	Finální koncentrace
dH ₂ O	3,2 μl	
PPP Master mix	5 μl	1x
Mg ²⁺	0,4 μl	1 mM
Přímý primer	0,2 μl	0,2 μM
Zpětný primer	0,2 μl	0,2 μM
DNA	1 μl	20 - 50 ng
Celkové množství	10 μl	

Tabulka 2 - Sekvence použitých přímých a zpětných primerů

Název	Sekvence 5' - 3'	Počet nukleotidů
Lep_F1	ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA TTG G	25
Lep_R1	TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA AAT CA	26
MLep_F1	GCT TTC CCA CGA ATA AAT AAT A	22
MLep_R1	CCT GTT CCA GCT CCA TTT TT	20

Tabulka 3 - Základní popisné charakteristiky použitých primerů

Název	T _m [°C]	T _m [°C]	T _m [°C]	GC [%]
	OLIGO	Primer Expres	ABI calculator	
Lep_F1	63,5	54,5	56,29	28
Lep_R1	68,1	59	60,8	31
MLep_F1	60,9	52,1	53,98	32
MLep_R1	63,8	55,9	58,16	50

PCR probíhala za těchto podmínek:

Úvodní denaturace	95°C	3 min.	} 40×
Denaturace	95°C	40 s.	
Annealing	49°C	40 s.	
Elongace	72°C	1 min.	
Závěrečná elongace	72°C	5 min.	
Chlazení	4°C	∞	

Tabulka 2 znázorňuje sekvence přímých a zpětných primerů dlouhých fragmentů (658 bp, Lep_F1 a LepR1) a krátkých fragmentů (311 bp, Lep_F1 a MLep_R1; 407 bp, MLep_F1 a Lep_R1) pro amplifikaci sekvence genu *COI*.

Rozdíl T_m (°C) mezi přímými a zpětnými primery by neměl být větší než 1°C. V tabulce 3 však pozorujeme rozdíl až 5°C. Je to dáno pravděpodobně nespecifickými primery, které musí pokrýt celý řád Lepidoptera, přes to, že se pravděpodobně nacházejí v konzervativnějších oblastech. Nebylo tedy možné vytvořit vhodnější primery dle správného designu a proto se převzaly z původních vědeckých prací Hebert et al. (2004) a Hajibabaei et al. (2006b). Navrhnout vhodnější design není možné kvůli krátké sekvenci konzervativní oblasti. Rozdílné teploty tání u jednotlivých softwarů (OLIGO, Primer Expres, ABI calculator) jsou dány jejich různými metodami výpočtů.

Procentuální obsah GC (guaninu a cytosinu) se ideálně pohybuje v rozmezí 40 – 60 %. V tabulce 3 však můžeme vidět i obsah pouhých 28 %, to je způsobeno vysokým procentuálním zastoupením AT (adenin, thymin) v mitochondriálním genomu.

Amplifikace úseku genu *COI* byla prováděna na automatických cyklerech ABI Verity 96 Well (Life Technologies Corp., Carlsbad, USA) a na GeneAmp 9700 (Life Technologies Corp., Carlsbad, USA). Po ukončení amplifikace se PCR produkt uchovával při teplotě -20°C, dokud nebyl použit k dalším reakcím. Výsledek PCR reakce byl ověřen na gelové elektroforéze na 3% agarózovém gelu.

5.6 Elektroforéza

Pro ověření výsledků izolace, přítomnosti PCR produktů po amplifikaci a k určení velikosti amplifikovaných fragmentů genu *COI* byla použita horizontální agarózová gelová elektroforéza. Koncentrace agarózového gelu byla 1% (kontrola izolace) nebo 3% (kontrola amplifikace). Byla použita agaróza Agarose SERVA for DNA electrophoresis (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo). K přípravě gelu byl použit 1x TBE pufr (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, USA). Jako vizualizační barvivo byl použit ethidium bromid (Top-Bio, Praha, Česká republika) (zásobní roztok 5 mg/ml, konečná koncentrace v gelu 0,5 µg/ml). Pro aplikaci vzorků, při ověření kvality a kvantity izolované DNA, byl použit nanášecí pufr připravený ze 40% sacharózy, H₂O, bromfenolové modři a 100x TE pufru (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, USA). Při ověřování kvality a kvantity PCR fragmentů, byl použit PPP Master mix ve složení reakční směsi, tudíž nebylo nutné použít nanášecí pufr, jelikož PPP Master mix již obsahuje aditiva pro přímou vizualizaci. Vlastní elektroforéza probíhala v 1x TBE pufru při napětí 4V/cm po dobu 30 minut. Pro zjištění velikostí PCR fragmentů a kontrolu izolace byly použity různé hmotnostní markery (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Velikosti jednotlivých markerů jsou uvedeny v tabulce 4. Pro vizualizaci izolované DNA byl použit Electronic UV Transilluminator (Ultra LUM Inc., Claremont, USA) a pro pořízení fotografií gelů byl použit fotoaparát Canon Power Shot G6. Pro vizualizaci PCR fragmentů byl použit UV transluminátor E-BOX VX5 (SCHOELLER INSTRUMENTS, s.r.o., Praha, Česká republika).

Tabulka 4 - Velikosti hmotnostních markerů

M1kb¹	M100²
10 000	1 000
8 000	900
6 000	800
5 000	700
4 000	600
3 500	500
3 000	400
2 500	300
2 000	200
1 500	100
1 000	
750	
500	
250	

²GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

³GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

5.7 Sekvenování PCR produktů

Pro ověření původu amplifikovaných fragmentů bylo provedeno přímé sekvenování PCR produktů. PCR produkty byly purifikovány pomocí MinElute PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Německo) dle protokolu výrobce a jejich koncentrace byla ověřena pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

Sekvenační reakční směs byla připravena pomocí BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Life Technologies Corp., Carlsbad, USA) dle návodu výrobce na výsledný objem 10 μ l (viz Tabulka 6). Množství DNA potřebné pro sekvenační reakci bylo určeno na základě koncentrace a čistoty PCR produktu (viz Tabulka 5).

Tabulka 5 - Množství PCR produktu (ng) pro přípravu 10 μ l sekvenační reakční směsi

Velikost PCR produktu	Potřebné množství pro sekvenační reakci
100 – 200 bp	1 – 3 ng
200 – 500 bp	3 – 10 ng
500- 1 000 bp	5 – 20 ng
1 000 – 2 000 bp	10 – 40 ng
> 2 000 bp	40 – 100 ng

Tabulka 6 - Složení sekvenační reakční směsi

Reagencie	Množství
Reakční mix	2 μ l
Pufr	1 μ l
Primer	0,16 μ l
dH ₂ O	do 10 μ l
PCR reakce (přečištěná)	dle tab. 5
Celkové množství	10 μl

Po ukončení procesu byla sekvenční směs purifikována pomocí BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Life Technologies Corp., Carlsbad, USA) dle protokolu výrobce. Důvodem bylo odstranění neinkorporovaných terminátorů

(značené dideoxynukleotidy). Vzorke byly poté analyzovány pomocí kapilární elektroforézy, pro níž byl použit genetický analyzátor GA 3500 (Life Technologies Corp., Carlsbad, USA). Pro analyzování získaných dat byl využit software Sequence Analysis Software v5.4., Sequence Scanner v2.0. a SeqScape v2.7.

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

6.1 Délka procesu izolace DNA

Měření délky trvání izolace probíhalo po inkubaci vzorku s proteinázou K (60 minut).

Tabulka 7 - Délka procesu izolace DNA

Název izolačního kitu	Čas (minuty)
Genomic DNA Mini Kit (Geneaid)	68
Column DNA Lego Kit (Top-Bio)	24
QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen)	62
NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel)	60
ZR Tissue & Insect DNA Micro Prep (Zymo Research)	50
DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio)	27
DEP-25 čištěný kolonou Lego Kit (Top-Bio)	51
Chemagic DNA Tissue10 Kit (Chemagen)	81

Délka procesu izolace DNA pomocí izolačních souprav byla měřena v minutách, jak uvádí tabulka 7. Nejméně náročným izolačním kitem byl DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio), což je dáno zejména tím, že se ke vzorku přidávají pouze 2 pufry a není třeba vzorky centrifugovat. Výrazně se tak omezuje nebezpečí způsobení jakékoli chyby v protokolu a omezuje se možnost kontaminace. Dalším kontrolním bodem je změna barvy roztoku po přidání druhého, posledního pufru. Další silnou stránkou tohoto kitu je jeho časová nenáročnost, společně s Column DNA Lego Kit (Top-Bio) patří mezi izolace s nejkratší dobou trvání, čemuž u obou kitů přispívá i minimální, či žádná příprava před samotnou izolací.

Nejnáročnější z časového hlediska, ale i svou pracností, se ukázala magnetická separace pomocí Chemagic DNA Tissue10 Kit (Chemagen). Ačkoliv pracuje na poměrně jednoduchém principu, náročnost spočívá především v počtu promývacích pufrů a jejich opakování a zejména pak v pečlivosti, s níž se pufry musí odpipetovat, aniž by se poškodila peleta komplexu magnetických částic s DNA. Metoda nebyla automatizovaná.

Doba izolace ostatních kolonkových izolačních metod se pohybovala průměrně kolem 58 minut. Dá se říci, že po standardizaci lýzy vzorku s proteinázou K (60 minut) trvaly tyto izolace 1 hodinu.

6.2 Kontrola koncentrace a čistoty DNA

V tabulce 8 jsou uvedena data o koncentraci a čistotě DNA získaná pomocí přístroje NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Izolační kit DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio) bez přečištění nebyl kontrolován, jelikož DNA není v elučním pufru, nýbrž ve směsi i s neúplně lyzovanými tvrdými tkáněmi hmyzu.

Tabulka 8 - Koncentrace a čistota izolované DNA

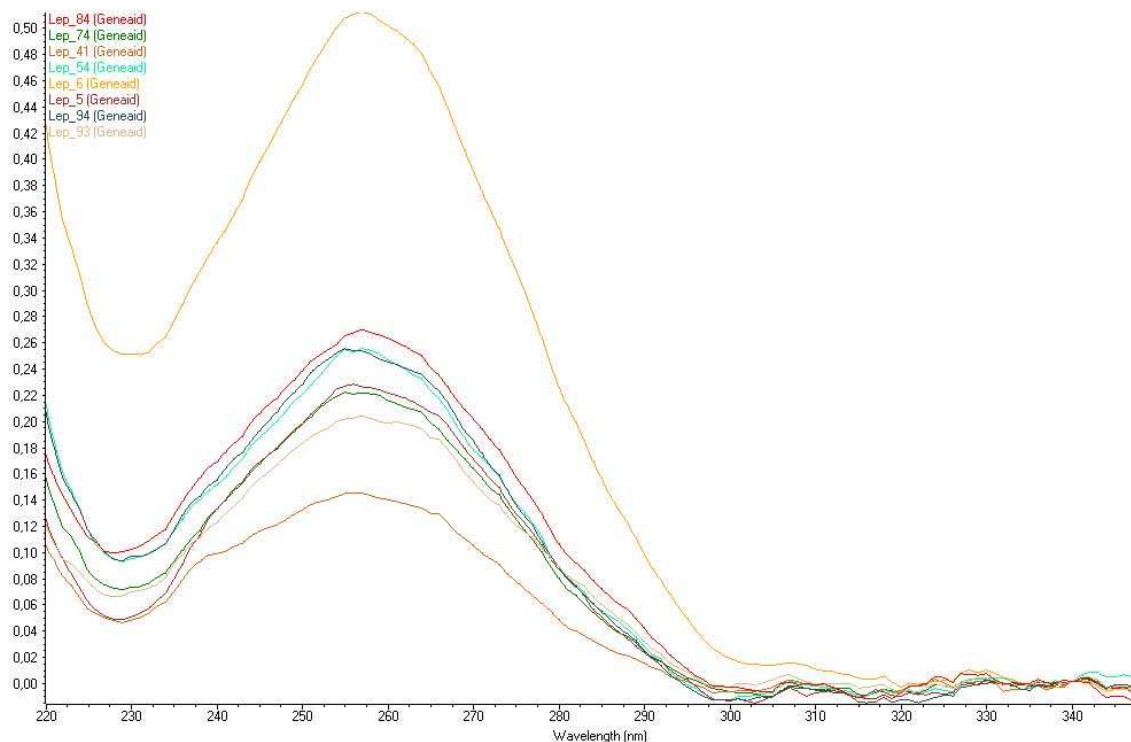
Název vzorku	Koncentrace DNA (ng/μl)	Čistota DNA (260/280)
lep84(Geneaid)	13,1	2,5
lep74(Geneaid)	10,7	2,7
lep41(Geneaid)	7	2,94
lep54(Geneaid)	12,3	2,8
lep6(Geneaid)	25,1	2,22
lep5(Geneaid)	11,9	2,56
lep94(Geneaid)	12,2	2,79
lep93(Geneaid)	9,9	2,25
lep55(Lego Kit;Top-Bio)	14,2	2,04
lep78(Lego Kit;Top-Bio)	30,5	1,91
lep50(Lego Kit;Top-Bio)	27,9	1,76
lep35(Lego Kit;Top-Bio)	30,1	1,8
lep10(Lego Kit;Top-Bio)	24,5	1,95
lep3(Lego Kit;Top-Bio)	21,1	1,89
lep86(Lego Kit;Top-Bio)	23	1,92
lep92(Lego Kit;Top-Bio)	27,7	1,89
lep76(Qiagen)	16,6	1,85
lep70(Qiagen)	19,3	1,83
lep52(Qiagen)	9,5	1,65
lep46(Qiagen)	10,5	1,95
lep25(Qiagen)	29,5	1,74
lep32(Qiagen)	32	1,83
lep104(Qiagen)	37,9	1,79
lep101(Qiagen)	31,2	1,84

lep66(Macherey-Nagel)	45,6	1,7
lep69(Macherey-Nagel)	30,7	1,53
lep37(Macherey-Nagel)	46,5	1,74
lep49(Macherey-Nagel)	31,6	1,17
lep7(Macherey-Nagel)	31,7	1,49
lep23(Macherey-Nagel)	87,2	1,95
lep90(Macherey-Nagel)	17,8	1,56
lep100(Macherey-Nagel)	77,1	1,75
lep62(Zymo Research)	7,4	1,75
lep77(Zymo Research)	5,2	1,5
lep44(Zymo Research)	11,4	1,26
lep45(Zymo Research)	4,7	1,33
lep2(Zymo Research)	1,7	1,9
lep19(Zymo Research)	3,3	1,66
lep105(Zymo Research)	5,5	1,58
lep107(Zymo Research)	5,3	1,6
lep60(DEP-25+kolony;Top-Bio)	3,6	1,25
lep61(DEP-25+kolony;Top-Bio)	5,5	1,85
lep40(DEP-25+kolony;Top-Bio)	2,5	1,69
lep42(DEP-25+kolony;Top-Bio)	2,9	1,45
lep1(DEP-25+kolony;Top-Bio)	7,9	1,7
lep30(DEP-25+kolony;Top-Bio)	7,6	1,8
lep87(DEP-25+kolony;Top-Bio)	7,8	1,87
lep96(DEP-25+kolony;Top-Bio)	6,8	2,15
lep51(Chemagen)	90,3	1,32
lep88(Chemagen)	76,8	1,6
lep38(Chemagen)	86	1,32
lep79(Chemagen)	37	1,27
lep98(Chemagen)	38	1,25
lep80(Chemagen)	29,2	1,24
lep26(Chemagen)	38,5	1,21
lep16(Chemagen)	33,1	1,23

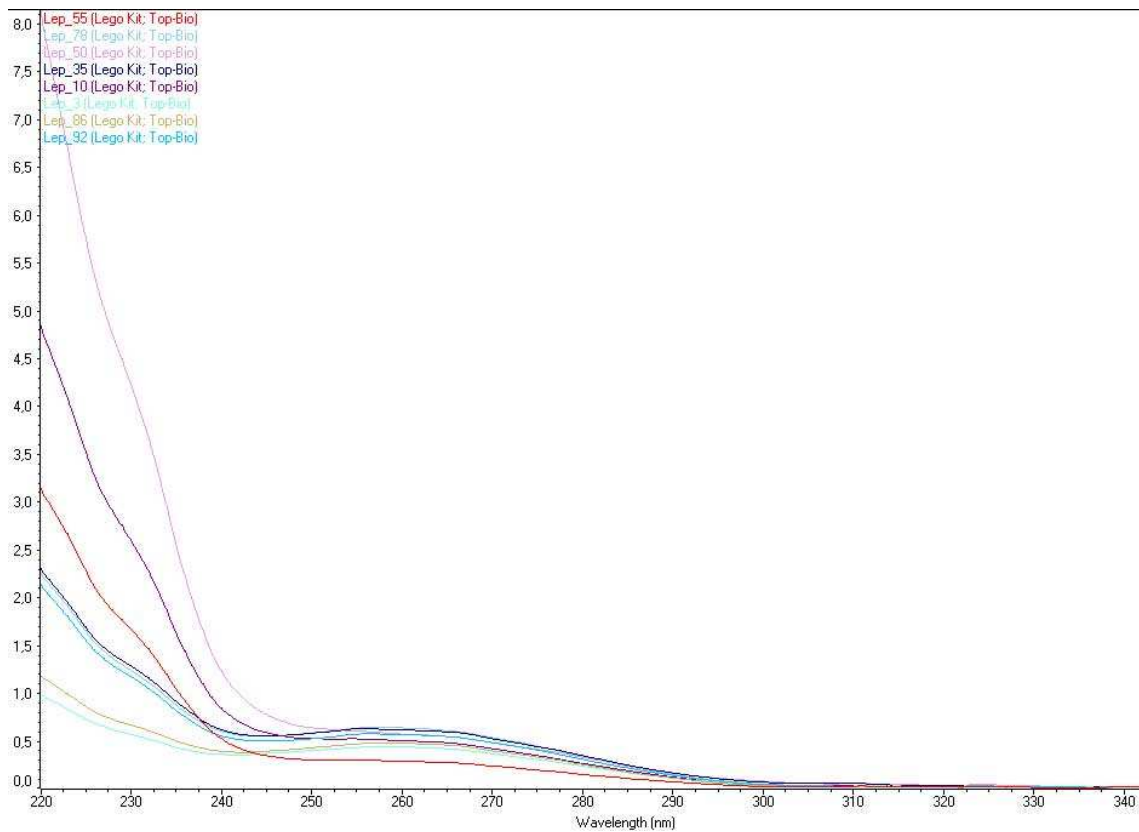
Tabulka 9 - Průměrné koncentrace a čistota DNA izolačních kitů

Název izolačního kitu	Koncentrace DNA (ng/μl)*	Čistota DNA (260/280)*
Genomic DNA Mini Kit (Geneaid)	12,8	2,6
Column DNA Lego Kit (Top-Bio)	24,9	1,9
QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen)	23,3	1,8
NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel)	46	1,6
ZR Tissue & Insect DNA Micro Prep (Zymo Research)	5,6	1,6
DEP-25 čištěný kolonou Lego Kit (Top-Bio)	5,6	1,7
Chemagic DNA Tissue10 Kit (Chemagen)	53,6	1,3

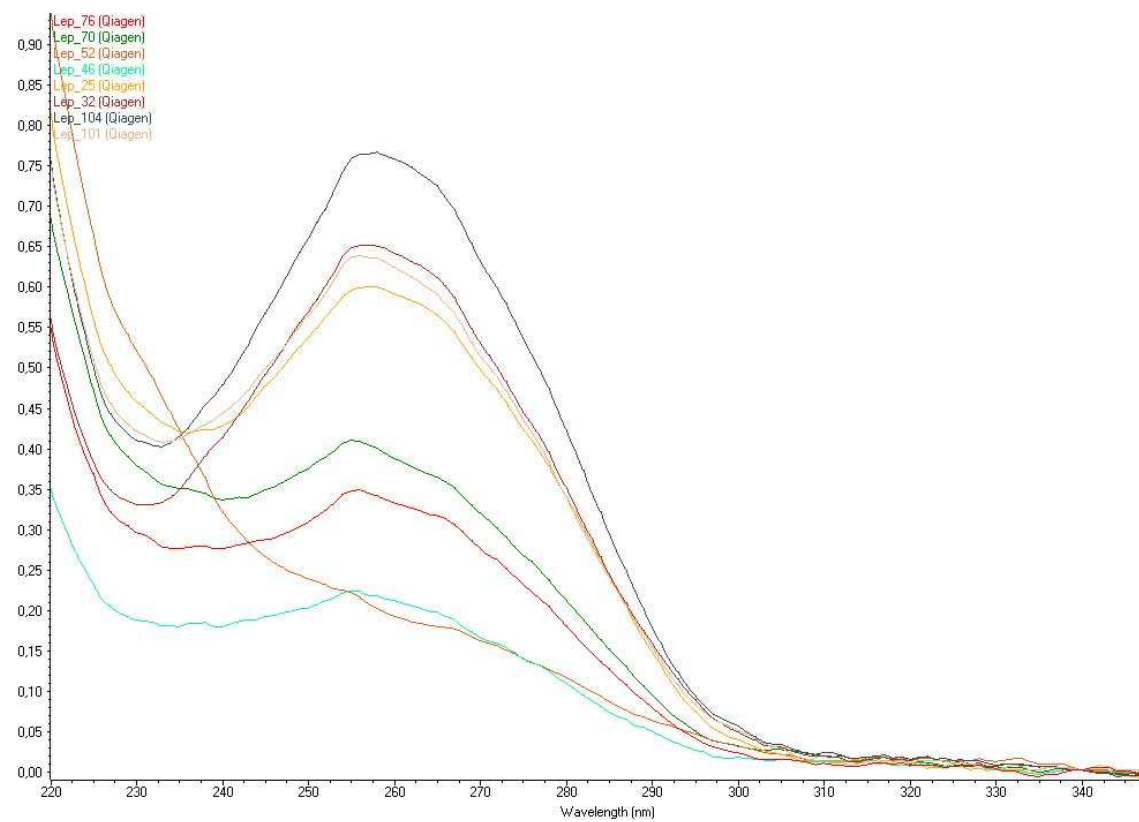
* Počítáno aritmetickým průměrem



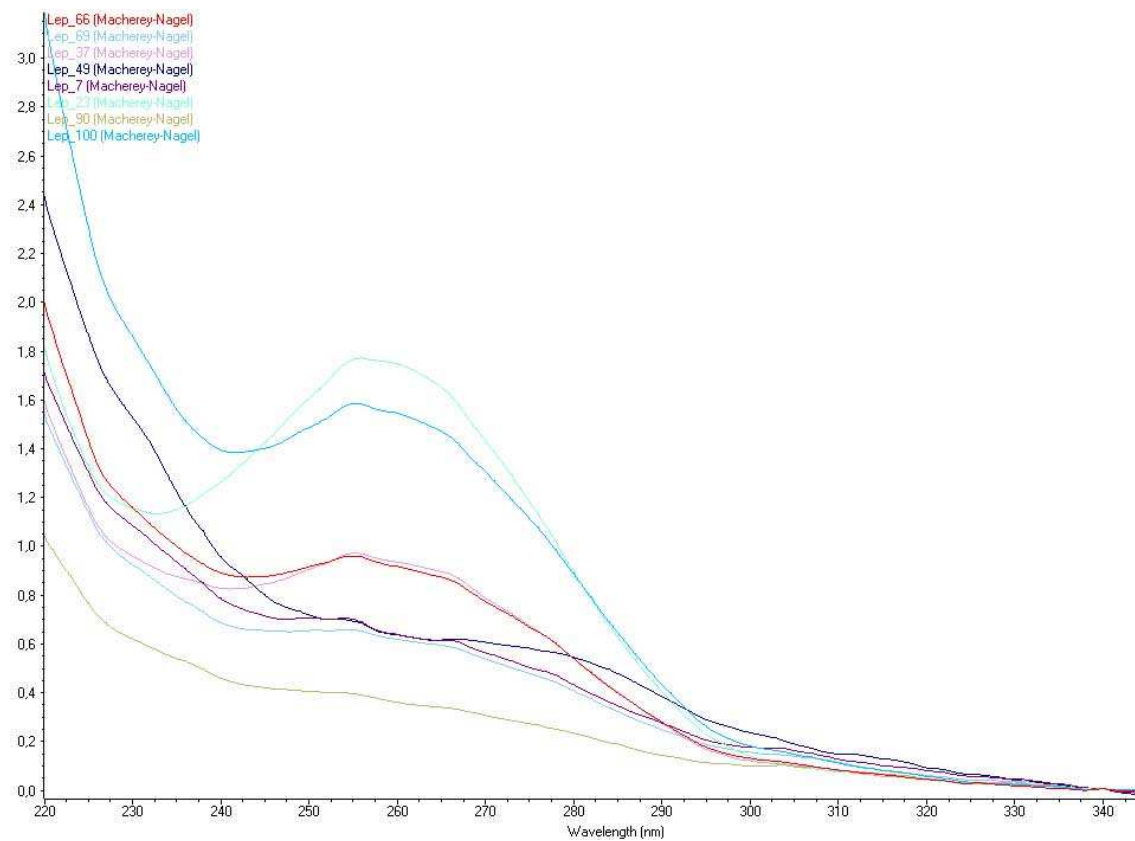
Obrázek 5 - Křivky čistoty a koncentrace Genomic DNA Mini Kit (Geneaid)



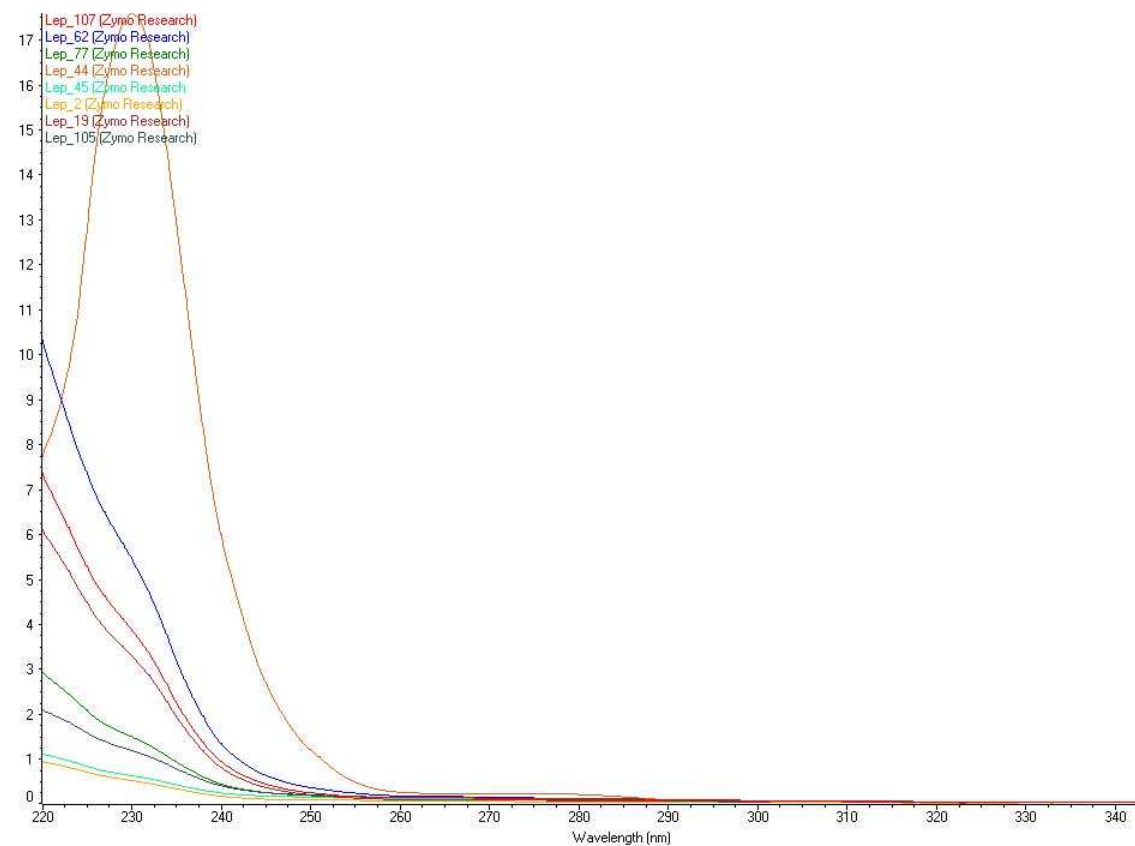
Obrázek 6 - Křivky čistoty a koncentrace Column DNA Lego Kit (Top-Bio)



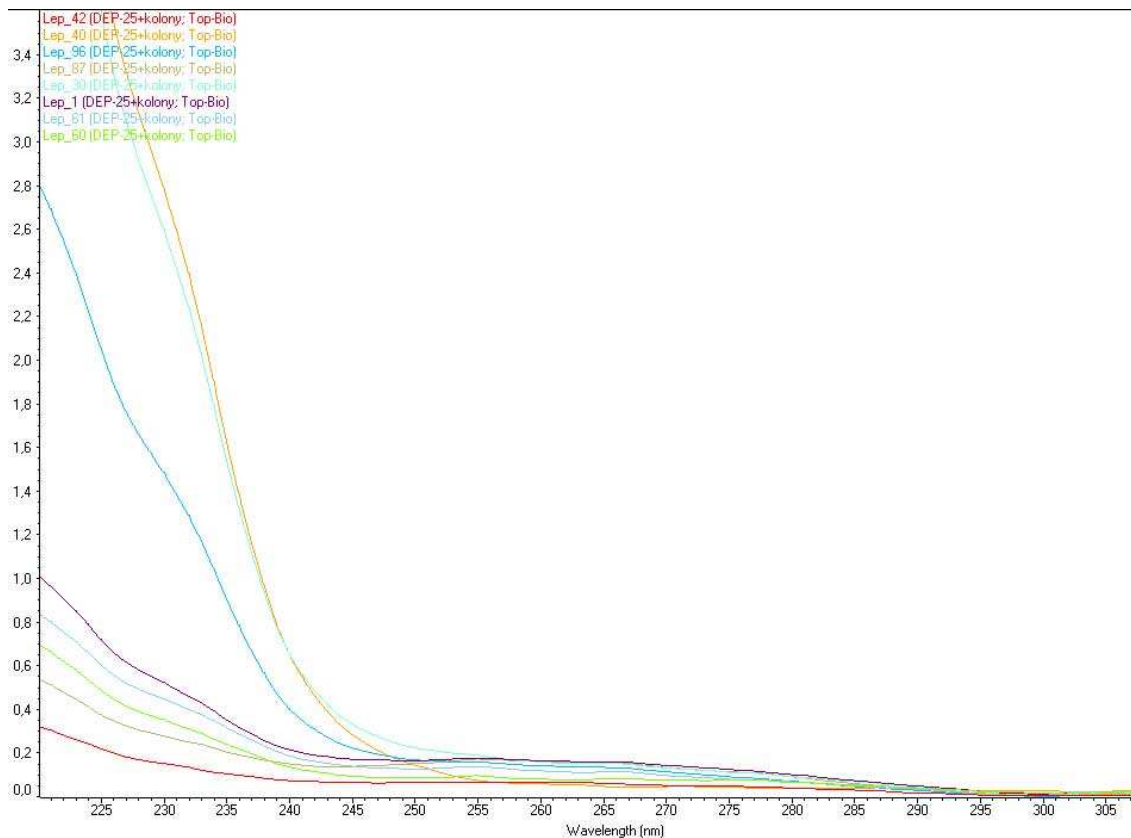
Obrázek 7 - Křivky čistoty a koncentrace QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen)



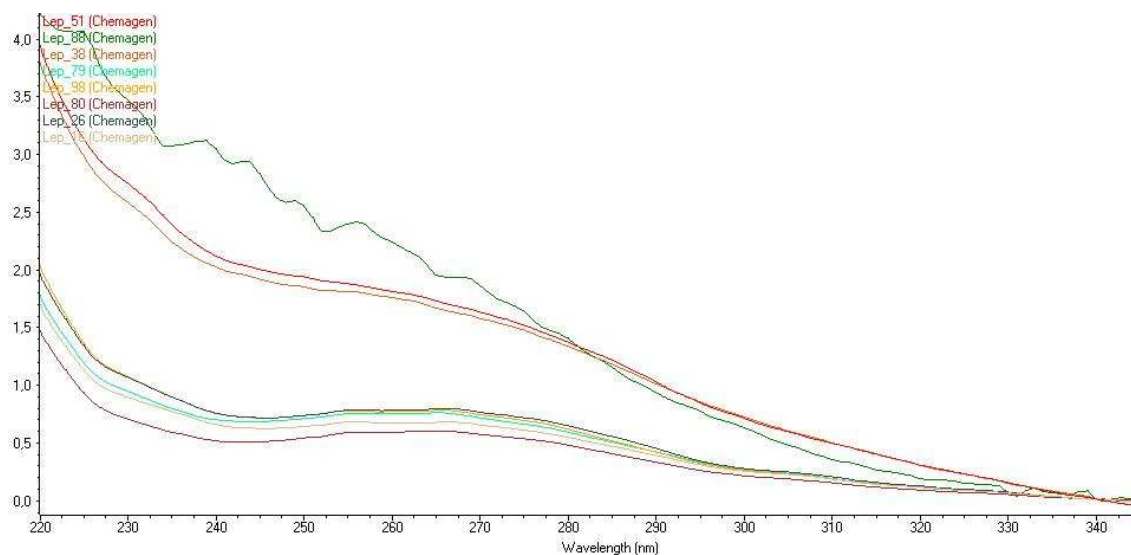
Obrázek 8 - Křivky čistoty a koncentrace NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel)



Obrázek 9 - Křivky čistoty a koncentrace ZR Tissue & Insect DNA Micro Prep (Zymo Research)



Obrázek 10 - Křivky čistoty a koncentrace DEP-25 čištěný kolonou Lego Kit (Top-Bio)



Obrázek 11 - Křivky čistoty a koncentrace Chemagic DNA Tissue10 Kit (Chemagen)

Soubor křivek (viz Obrázek 5 až 11) čistoty a koncentrací je součástí softwaru přístroje NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

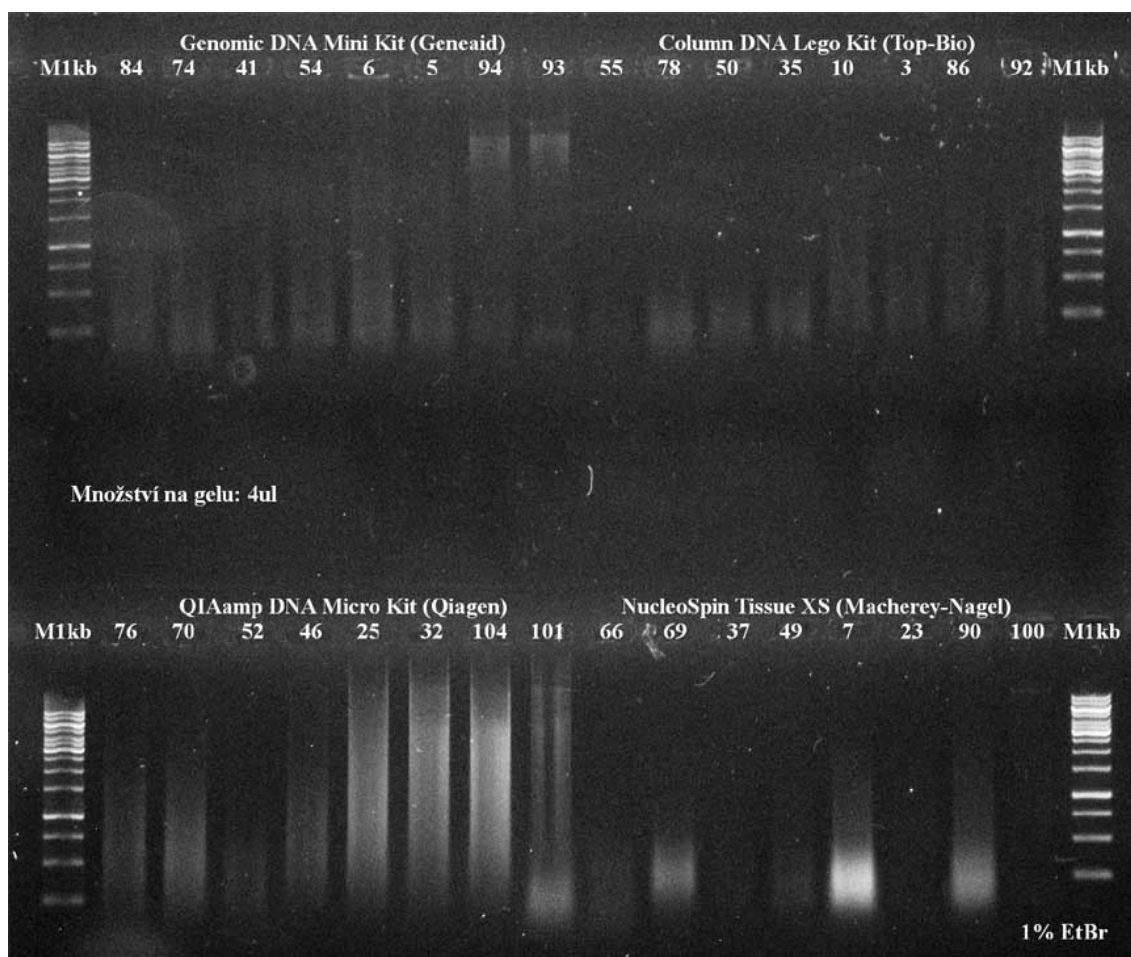
Izolační kity QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen), jehož čistota je dle tabulky 9 průměrně 1,8, spolu s Column DNA Lego Kit (Top-Bio), jehož čistota je dle tabulky 9 průměrně 1,9, se vyznačují nejčistší DNA ze všech zkoušených souprav. Dokazuje to i graf na obrázku 7, kdy můžeme u 7 vzorků, izolovaných pomocí soupravy od firmy Qiagen, pozorovat při vlnové délce 260 nm vrchol signálu, který je typickým znakem pro nukleové kyseliny (viz Obrázek 4). U vzorku LEP_52(Qiagen) (viz Obrázek 7) však můžeme zaznamenat netypickou křivku pro nukleové kyseliny. Její tvar indikuje potenciální kontaminaci pufrům EDTA (Nucleid Acid, dostupné z <http://www.nanodrop.com>). Znečištění dokazuje i poměr 260/280 (viz Tabulka 8), který udává hodnotu 1,65.

U Genomic DNA Mini Kit (Geneaid) a NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel) (viz Obrázek 5 a 8) můžeme rovněž pozorovat typickou křivku pro nukleové kyseliny, která by nasvědčovala ideální čistotě DNA. Průměrná hodnota čistoty (viz Tabulka 9) je však 2,6 (Geneaid) a 1,6 (Macherey-Nagel), která je spíše známkou kontaminace, například proteiny.

U ostatní vzorků, u nichž můžeme pozorovat vysokou absorbanci při vlnové délce 230 nm, je možné předpokládat kontaminaci například karbohydráty, peptidy či GITC (Guanidinium thiocyanate) (Nucleid Acid, dostupné z <http://www.nanodrop.com>).

6.3 Kontrola izolace a kvalita DNA

Kontrola izolace DNA ze vzorků lišaje svlačcového (*Agrius convolvuli*) byla provedena dle postupů popsaných v kapitole 5 Materiál a metodika. Na obrázcích 12 a 13 jsou výsledky izolace DNA vizualizovány pomocí gelové agaróзовé elektroforézy. Koncentrace a čistoty DNA jednotlivých dílčích vzorků jsou uvedeny v tabulce 8.

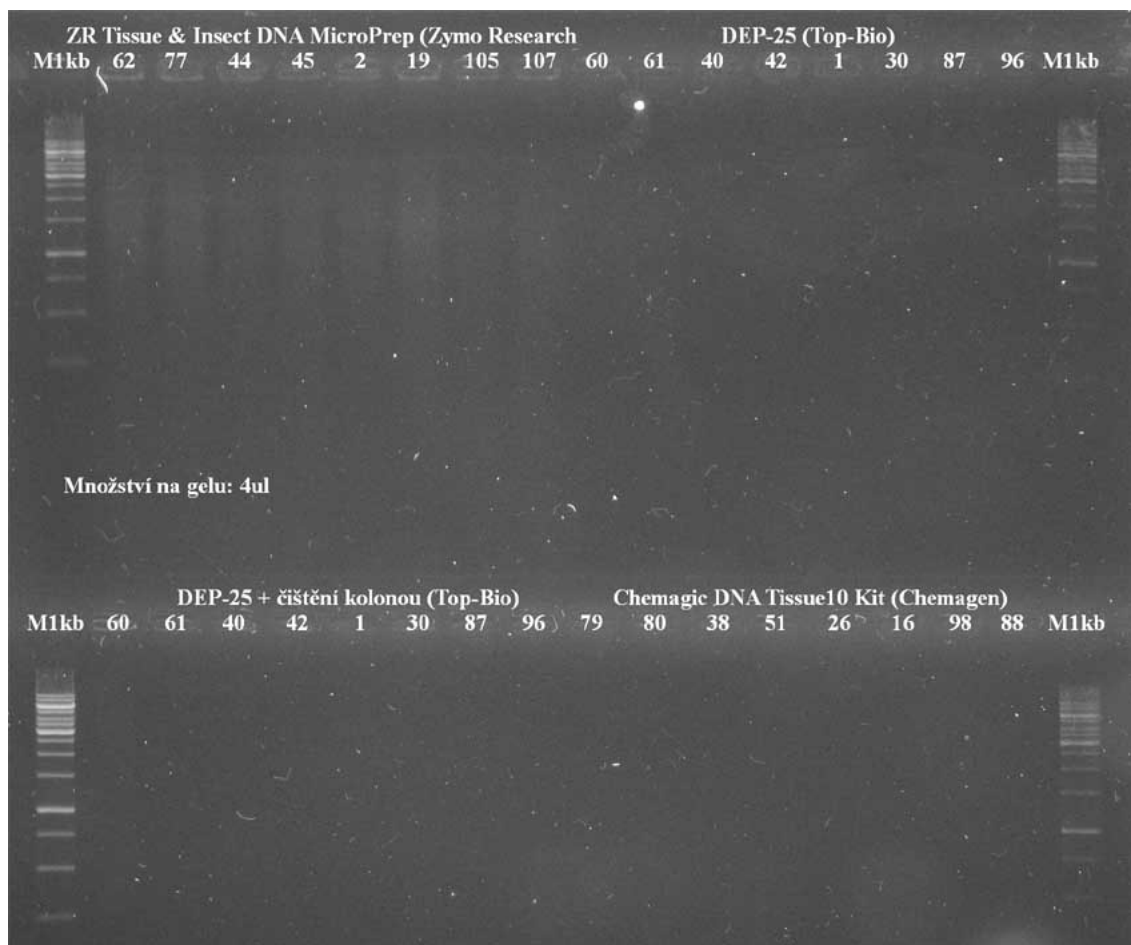


Obrázek 12 - DNA izolovaná z končetin *Agrius convolvuli* pomocí izolačních kitů

U vzorků číslo 25, 32, 104 a 101 (Qiagen), na obrázku 12, můžeme pozorovat smír, který by nasvědčoval degradaci DNA. Ta mohla být zapříčiněna například nešetrným zacházením při sběru a následným nedokonalým ošetřením před uskladněním, z čehož mohou vyplývat nedostatečné skladovací podmínky. Může se jednat zejména o zaplísnění vzorků, či dlouhodobé vystavení UV záření. Pro další analýzy však kvalita výše zmíněných vzorků postačovala. Potvrzuje to zejména koncentrace DNA (ng/μl), která byla naměřena a jejíž průměr těchto 4 vzorků je 32,7 a čistota DNA (260/280) jejíž průměr těchto 4 vzorků je 1,8, počítáno dle tabulky 8.

Vzorky číslo 93 a 94 (Geneaid) na obrázku 12 disponují silným signálem genomové, nedegradované DNA.

U izolačních kitů Geneaid, Qiagen a Macherey-Nagel můžeme zaznamenat markantní signál genomové DNA. Může to být způsobeno velikostí kolony. U těchto kitů se jednalo o malé kolony, které disponují výraznějším záchytem i menších, degradovaných fragmentů DNA.



Obrázek 13 - DNA izolovaná z končetin *Agrius convolvuli* pomocí izolačních kitů a magnetické izolace (Chemagen)

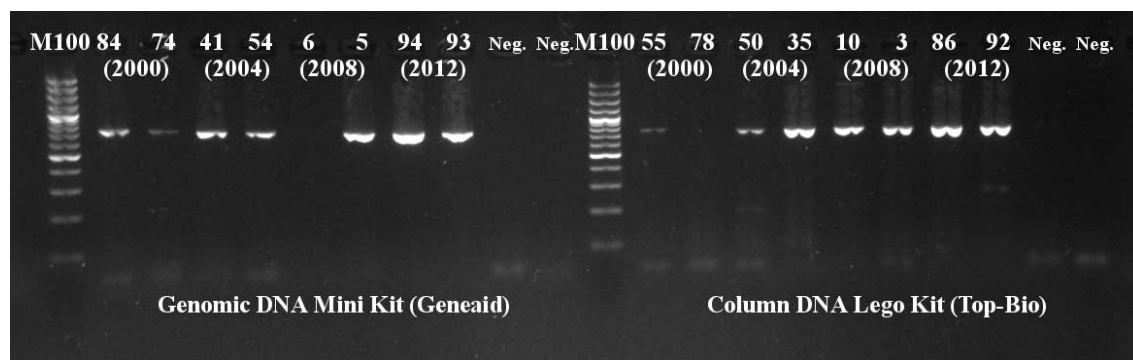
Na obrázku 13 můžeme pozorovat vizualizaci izolované DNA pouze u vzorků izolačního kitu firmy Zymo-Research. Tento kit je primárně určen na izolaci DNA z hmyzu, přesto je jeho úspěšnost nízká. Důvodem může být jak nepřítomnost proteinázy K v procesu izolace, tak vystavení vzorku silnému třepání v médiu s kuličkami, které podstatně zvyšuje teplotu celé směsi a může mít za následek silnou

degradaci DNA. S obrázkem 13 koreluje i koncentrace dle tabulky 9, která se pohybuje průměrně kolem hodnoty 5,5 a čistota 1,6, což jsou nízké hodnoty.

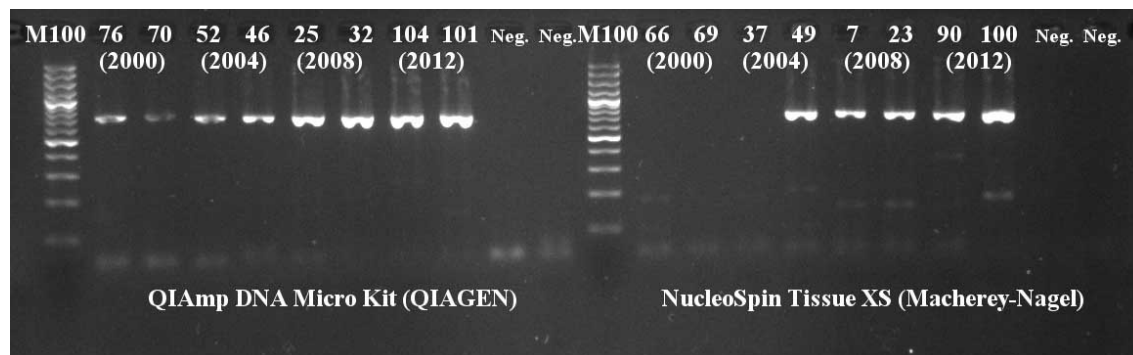
Problematika velikosti kolon se týká i vzorků izolovaných pomocí kitu DEP-25 a přečištěných kolonou Lego Kit (Top-Bio), zde se však jednalo o klasické kolony.

6.3.1 PCR sekvence genu *COI* – 658 bp

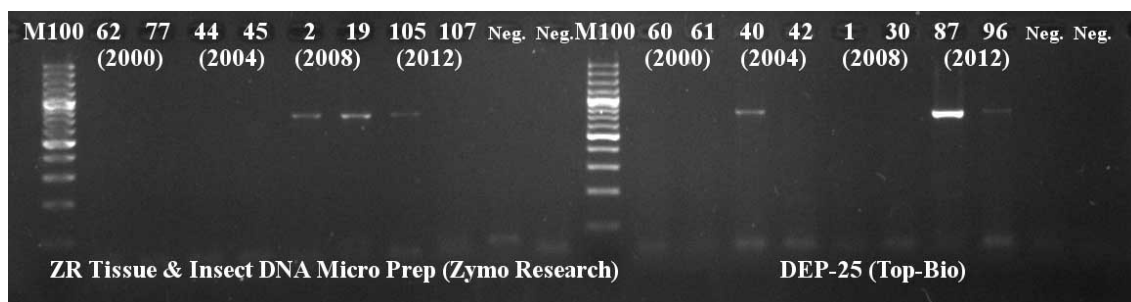
Pro ověření účinnosti polymerázové řetězové reakce byla zvolena vizualizace na 3% agarózovém gelu. Složení reakční směsi viz kapitola 5 Materiál a metodika. Primerový pár Lep_F1 + Lep_R1, teplotní profil lepidoptera – mtDNA (GeneAmp 97000).



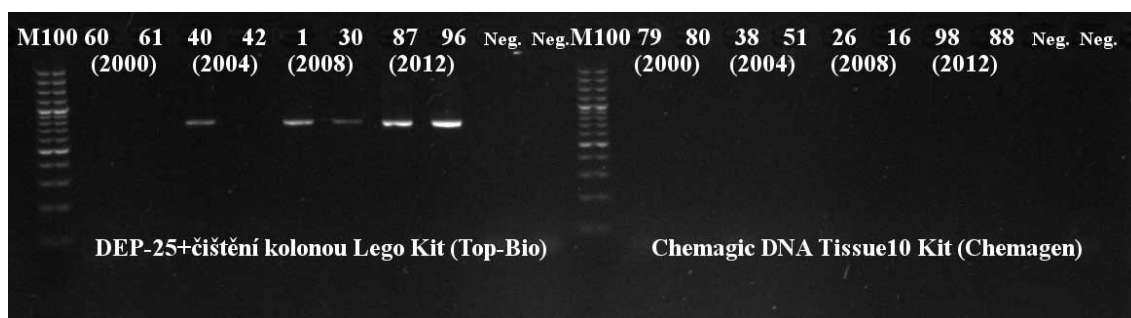
Obrázek 14 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 658 bp



Obrázek 15 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 658 bp



Obrázek 16 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 658 bp



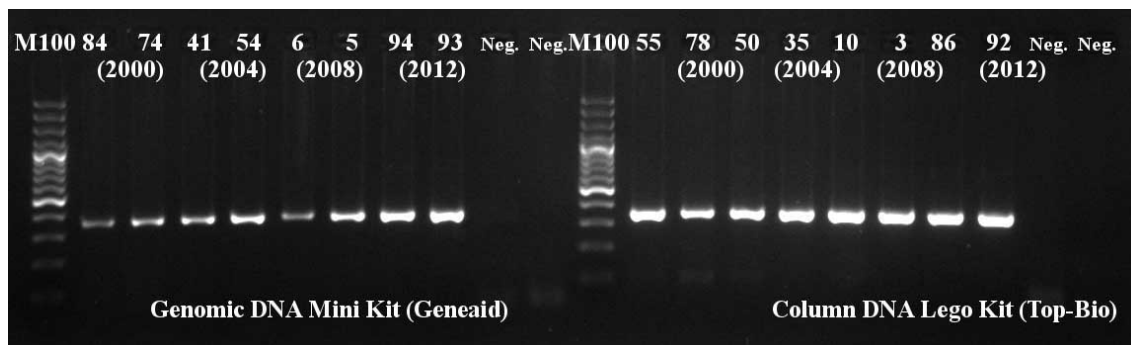
Obrázek 17 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 658 bp

U většiny izolačních kitů můžeme vidět, že sekvence genu *COI* o velikosti 658 bp u vzorků z roku 2000 se nepodařilo amplifikovat. Výjimku tvoří izolační soupravy Genomic DNA Mini Kit (Geneaid), QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) a slabý signál je pozorovatelný i na obrázku 14 u vzorku 55 izolačního kitu Column DNA Lego Kit (Top-Bio). Příčinou nepřítomnosti signálu je pravděpodobně degradace DNA vlivem stáří vzorků. Nasvědčoval by tomu fakt, že vzorky z roku 2012 se podařilo amplifikovat ve všech případech, mimo Chemagic DNA Tissue10 Kit (Chemagen) (viz Obrázek 17). Chyba amplifikace je pravděpodobně dána přítomností inhibitorů PCR, jelikož se podařilo naměřit průměrnou koncentraci DNA 53,6 (viz Tabulka 9). Mezi inhibitory PCR můžeme zařadit například ethanol nebo SDS (dodecylsírán sodný).

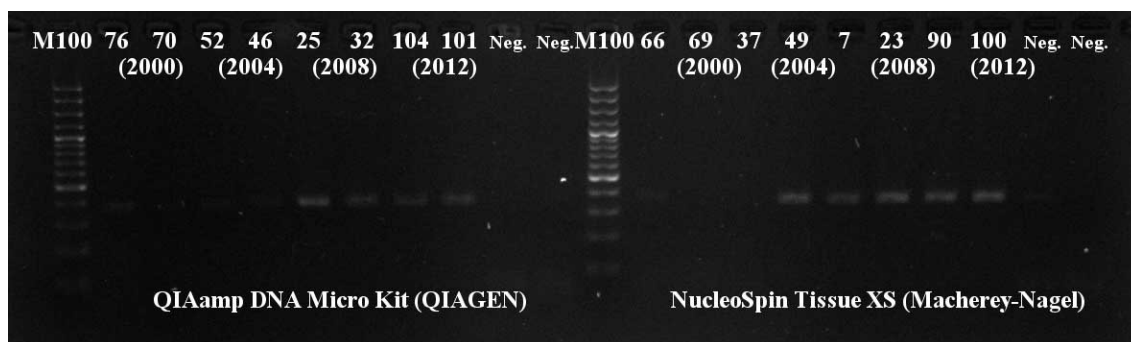
Kontrolní vzorky zůstaly negativní, PCR reakce je tedy prostá kontaminace.

6.3.2 PCR – sekvence fragmentu genu *COI* – 311 bp

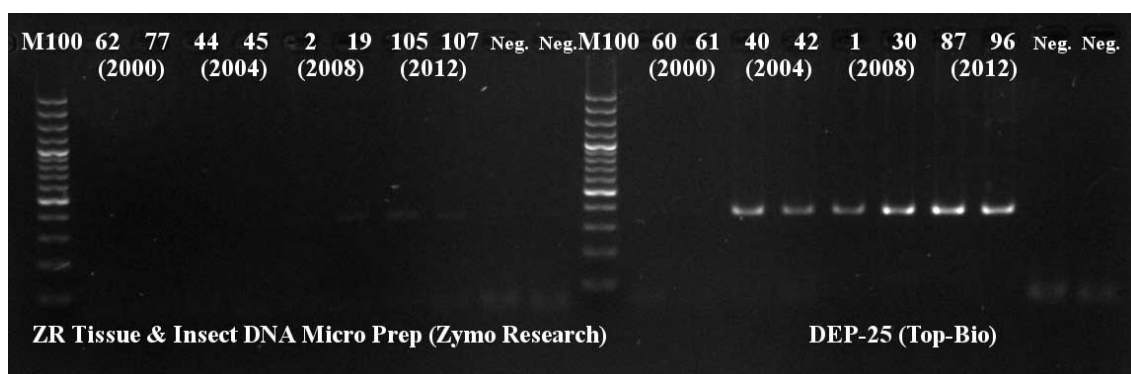
Pro ověření účinnosti polymerázové řetězové reakce byla zvolena vizualizace na 3% agarózovém gelu. Složení reakční směsi viz kapitola 5 Materiál a metodika. Primerový pár Lep_F1 + MLep_R1, teplotní profil Lepidoptera_Lep a MLep (AB Verity 96 Well).



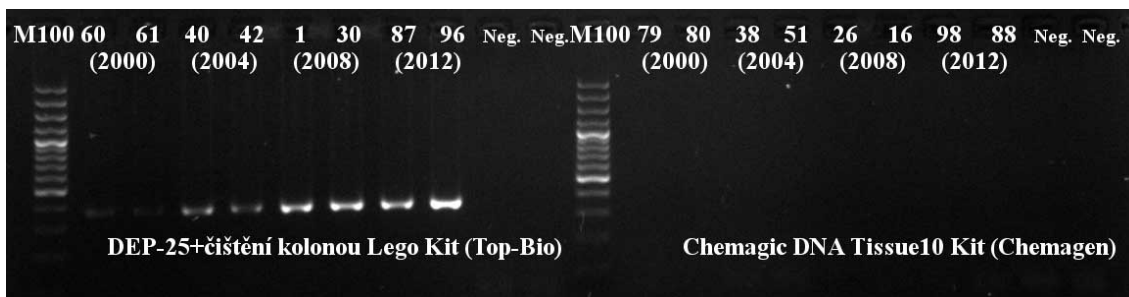
Obrázek 18 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 311 bp



Obrázek 19 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 311 bp



Obrázek 20 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 311 bp



Obrázek 21 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 311 bp

Vizualizace fragmentu genu *COI* o velikosti 311 bp byla úspěšná téměř ve všech případech. Opět se zde ovšem projevuje problém u starších vzorků (rok 2000), kdy je u některých kitů amplifikace velmi obtížná. Například u ZR Tissue & Insect DNA Micro Prep (Zymo Research) (viz Obrázek 20) můžeme vidět velmi slabý signál jen u vzorků z roku 2012 a u 1 z roku 2008, i přes to, že je tato izolační souprava designována primárně na izolaci DNA z hmyzu. Pravděpodobně je to způsobeno nešetrnou izolací, během níž je vzorek třepán v médiu s kuličkami, čímž se zvyšuje teplota a také nepřítomností proteinázy K.

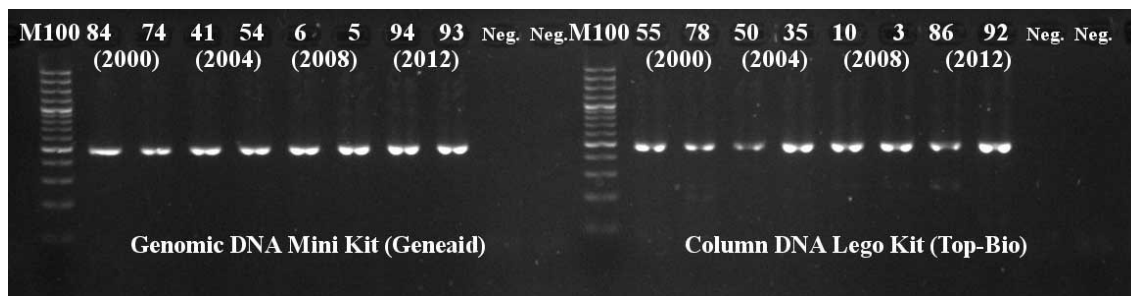
U izolačního kitu QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) (viz Obrázek 19) pozorujeme slabé signály krátkého fragmentu genu *COI* (311 bp). Způsobeno je to pravděpodobně nedokonalou distribucí ethidium bromidu v gelu, čemuž by nasvědčovaly i slabé signály markerů.

Naopak klasické kolony Column DNA Lego Kit (Top-Bio) se pro záchyt krátkých fragmentů (311 bp) osvědčily, jak můžeme vidět na obrázku 18. Silný signál u všech vzorků, nezávisle na stáří.

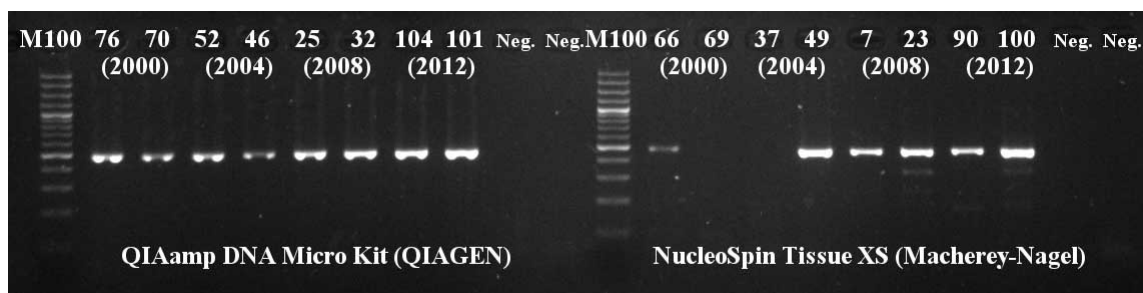
Kontrolní vzorky zůstaly negativní, PCR reakce je tedy prostá kontaminace.

6.3.3 PCR – sekvence fragmentu genu *COI* – 407 bp

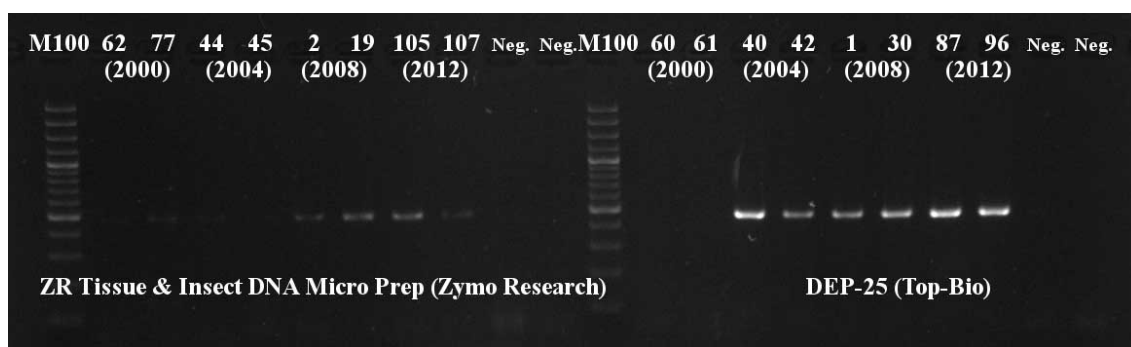
Pro ověření účinnosti polymerázové řetězové reakce byla zvolena vizualizace na 3% agarózovém gelu. Složení reakční směsi viz kapitola 5 Materiál a metodika. Primerový pár MLep_F1 + Lep_R1, teplotní profil Lepidoptera_Lep a MLep (AB Verity 96 Well).



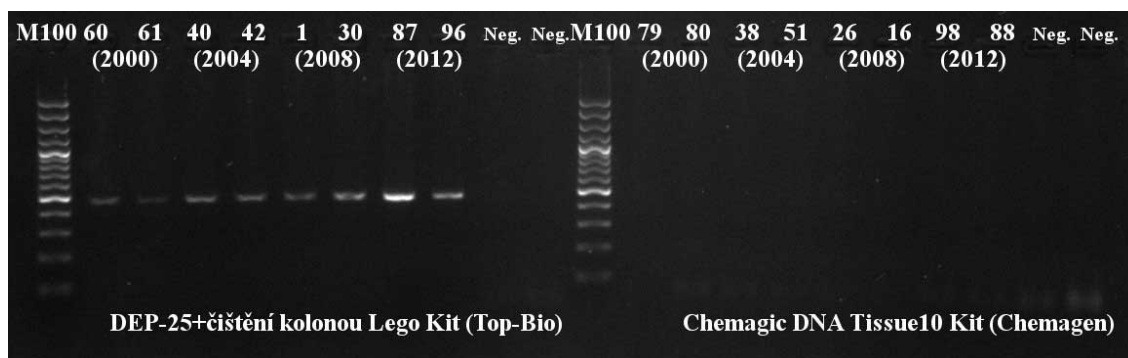
Obrázek 22 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 407 bp



Obrázek 23 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 407 bp



Obrázek 24 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 407 bp



Obrázek 25 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 407 bp

Na kontrolním gelu (viz Obrázek 22 a 23) i u izolačního kitu ZR Tissue & Insect DNA Micro Prep (Zymo Research) (viz Obrázek 24) a DEP-25 čištěný kolonou Lego Kit (Top-Bio) (viz Obrázek 25) můžeme pozorovat pozitivní záchyt krátkých fragmentů (407 bp) u všech vzorků, bez ohledu na stáří.

Rovněž jako v kapitole 6.3.1 (viz Obrázek 17) můžeme na obrázku 25 pozorovat, že se nepodařilo amplifikovat 407 bp fragment pomocí Chemagic DNA Tissue10 Kit (Chemagen), pravděpodobně je to způsobeno inhibitory PCR, například ethanolem nebo SDS.

Kontrolní vzorky zůstaly negativní, PCR reakce je tedy prostá kontaminace.

Ve výzkumu Dittrich-Schröder *et al.* (2012), kdy byly porovnávány různé metody izolace genomové DNA z vos, je uvedeno, že pouze izolační kit NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel) má 100 % účinnost při získávání PCR produktů o velikosti 658 bp.

Rovněž práce Schill (2007), o srovnání odlišných protokolů přípravy DNA a PCR amplifikaci mitochondriálních genů u želvušek hovoří o nejvyšší účinnosti izolace u NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel). V našem případě se toto tvrzení potvrdilo zejména při amplifikaci krátkých fragmentů genu *COI* (407 a 311 bp) (viz Obrázek 19 a 23). Nicméně při amplifikaci sekvence o délce 658 bp (viz Obrázek 15), kdy se nepodařilo získat amplikony u vzorků z roku 2000, můžeme hovořit o účinnosti pouze 75 %. Práce dále hovoří o izolačním kitu ZR Tissue & Insect DNA Micro Prep (Zymo Research), jehož účinnost amplifikace byla stanovena na 0 %. Tvrdí, že vzorek ve většině případů zůstal v celku v médiu s kuličkami a nebyl jimi lyzován. To se potvrdilo i v této práci, nicméně nemůžeme tvrdit, že izolace a následná amplifikace nebyla účinná. Například při amplifikaci sekvence genu *COI* o velikosti

658 bp byla účinnost stanovena na 37 % (viz Obrázek 16), u fragmentu 311 bp (viz Obrázek 20) rovněž 37 % a u fragmentu 407 bp (viz Obrázek 24) dokonce až 63 %.

V práci Ditttrich-Schröder *et al.* (2012) je rovněž popsána metoda založená na magnetických částicích Charge Switch gDNA Micro Tissue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), jejíž účinnost byla vyhodnocena na 90 %. V této práci můžeme izolaci (viz Tabulka 8) považovat za úspěšnou, avšak amplifikace genomové DNA, která byla izolovaná pomocí magnetických částic, se v našem případě neosvědčila, efektivnost je 0 %. Příčiny nezdaru můžeme přisuzovat inhibitorům PCR, jako jsou například ethanol či SDS.

Ze studie Caenazzo *et al.* (2009) vyplývá, že izolace a amplifikace pomocí kitu QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) je efektivní i u vzorků skladovaných 15 let při pokojové teplotě. Dokazují to výsledky této práce, kdy se podařilo amplifikovat sekvenci genu *COI* o délce 658 bp u vzorků z roku 2000 (viz Obrázek 15) i fragmenty tohoto genu o délce 407 a 311 bp, rovněž z roku 2000 (viz Obrázek 19 a 23).

6.4 Finanční náročnost izolace

Tabulka 10 ukazuje finanční náročnost jednotlivých izolačních kitů. Cenu s daní i bez daně za celý izolační kit a přepočítané ceny za 1 izolaci. Zaokrouhлено na celé Kč. Ceny byly zjištěny dle aktuální ceníků dodavatelů. Srovnávání cen je však problematické, jelikož se mohou od ceníku lišit z důvodů různých cenových akcí, množstevních slev apod.

Tabulka 10 - Seznam izolačních kitů, jejich dodavatelů a cen

Výrobce	Geneaid	Genomic DNA Mini Kit	
Dodavatel	KRD s.r.o.		
		bez DPH	s DPH
Cena 50 izolací (Kč)		2 700	3 267
Cena 1 izolace (Kč)		54	65
Výrobce	Top-Bio	Column DNA Lego Kit	
Dodavatel	Top-Bio s.r.o.		
		bez DPH	s DPH
Cena 200 izolací (Kč)		2 200	2 662
Cena 1 izolace (Kč)		11	13
Výrobce	Qiagen	QIAamp DNA Micro Kit	
Dodavatel	DYNEX s.r.o.		
		bez DPH	s DPH
Cena 50 izolací (Kč)		6 080	7 357
Cena 1 izolace (Kč)		122	147
Výrobce	Macherey-Nagel	NucleoSpin Tissue XS	
Dodavatel	BioTech a.s.		
		bez DPH	s DPH
Cena 50 izolací (Kč)		4 990	6 038
Cena 1 izolace (Kč)		100	121

Výrobce	Zymo Research	ZR Tissue & Insect DNA Micro Prep	
Dodavatel	Amplion s.r.o.		
		bez DPH	s DPH
Cena 50 izolací (Kč)		4 385	5 306
Cena 1 izolace (Kč)		88	106
Výrobce	Top-Bio	DEP-25 DNA Extraction Kit	
Dodavatel	Top-Bio s.r.o.		
		bez DPH	s DPH
Cena 100 izolací (Kč)		390	472
Cena 1 izolace (Kč)		39	47
Výrobce	Top-Bio	DEP-25 čištěný Column DNA Lego Kit	
Dodavatel	Top-Bio s.r.o.		
		bez DPH	s DPH
Cena 100 izolací (Kč)		1 490	1 803
Cena 1 izolace (Kč)		15	18
Výrobce	Chemagen	Chemagic DNA Tissue10 Kit	
Dodavatel	Elizabeth Pharmacon s.r.o.		
		bez DPH	s DPH
Cena 100 izolací (Kč)		4 481	5 422
Cena 1 izolace (Kč)		45	54

Z tabulky 10 vyplývá, že nejlevnější izolační kity z testovaného souboru produkuje společnost Top-Bio (Praha, Česká republika). Konkrétně pak Column DNA Lego Kit, kde 1 izolace vychází na 13 Kč s DPH a který je vhodný i na amplifikace krátkých fragmentů (viz Obrázek 18 a 22) poskytuje i uspokojivou průměrnou čistotu izolované DNA (viz Tabulka 9). Dle mého názoru se však příliš nehodí na izolaci a amplifikaci dlouhého fragmentu (658 bp) (viz Obrázek 14), jelikož amplifikace u starších vzorků (rok 2000) nedosahuje požadované účinnosti. Můžeme předpokládat, že s rostoucím věkem vzorku se bude účinnost izolace i amplifikace snižovat. Jeho silnou stránkou je ovšem i časová nenáročnost izolace (viz Tabulka 7).

Nejdražší izolační kity z testovaného souboru vyrábí firma Qiagen a distribuuje DYNEX s.r.o. Jedna izolace vychází na 147 Kč s DPH. Kit však poskytuje vysokou účinnost izolace, zejména pak průměrnou čistotu DNA (viz Tabulka 6) a uspokojivou

efektivnost při amplifikaci dlouhých fragmentů (658 bp) (viz Obrázek 15) i krátkých (311 a 407 bp) (viz Obrázek 19 a 23). Levnější alternativou může být izolační kit firmy Geneaid, jehož distributorem je firma KRD s.r.o. Izolace 1 vzorku vychází na 65 Kč s DPH. Amplifikace dlouhých i krátkých fragmentů byla uspokojivá (viz Obrázek 14, 18 a 22), koncentrací a čistotou DNA (viz Tabulka 9) však zaostává za Qiagenem.

Z hlediska efektivity izolace, následné amplifikace, cenové a časové náročnosti, bych doporučoval kombinaci izolačního kitu Column DNA Lego Kit (Top-Bio) a QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) nebo Genomic DNA Mini Kit (Geneaid).

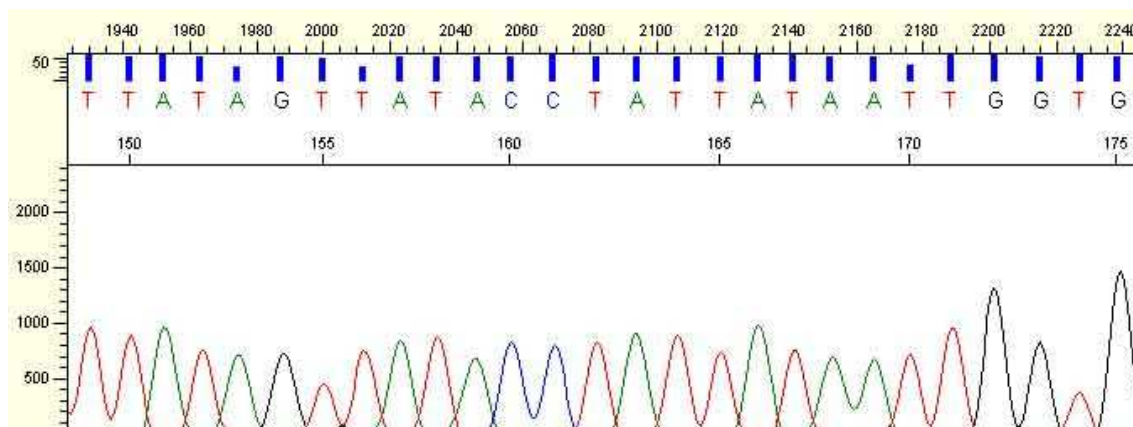
6.5 Sekvenování PCR produktů

Ověření identity amplifikovaných PCR produktů bylo provedeno přímým sekvenováním (viz kapitola 5.7 Sekvenování PCR produktů). K vizualizaci výstupu z automatického analyzátoru byl použit software SeqScape v2.7 (viz Obrázek 26) a Sequence Scanner v2.0 (viz Obrázek 27).

Summary	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
NT Variants	
Index	91 151 163 171 181 191 201 211 221
Reference	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
Reference-Ak	I Y Y N F F Y S Y T Y Y N M W I W K L I S T F M I R S F
▶ 55	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 92	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 40	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 96	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 23	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 84	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 41	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 8	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 94	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 50	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 10	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 96	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 70	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 52	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 25	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 104	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 7	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 90	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 2	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 105	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 60	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 1	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT
▶ 87	TTATTATAATTTTTTTTATAGTTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGAAATTCATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCT

Obrázek 26 – Srovnání částí 658 bp sekvence u jednotlivých vzorků

Na obrázku 26 můžeme vidět srovnání jednotlivých sekvenovaných vzorků. Od referenční sekvence se analyzované vzorky lišily jen v několika nukleotidech, což nemělo vliv na konečnou determinaci v aplikaci BoldSystems a ve všech případech se potvrdil druh *Agrius convolvuli* se 100% jistotou.



Obrázek 27 - Ukázka části osekvenované sekvenční (658 bp) genu *COI* (vzorek lep55Lego Kit;Top-Bio)

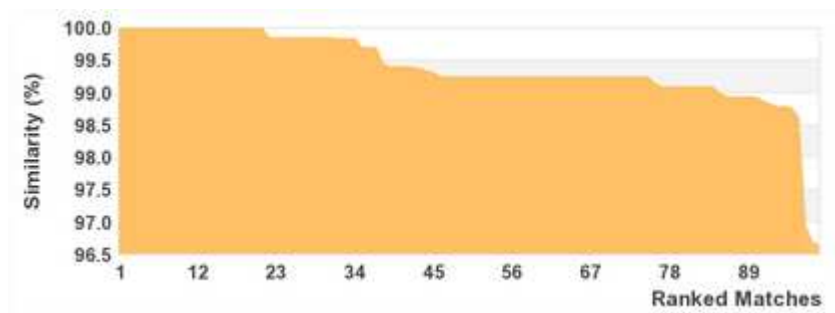
Celá sekvenční 658 nukleotidů sekvenční genu *COI*, na níž je zvýrazněn úsek zobrazený na obrázku 27, sekvenční prímý LepF1:

AACATTATATTTTATTTTTGGAATTTGAGCAGGAATAGTAGGAACTTCTTTA
 AGTTTATTAATTCGAGCAGAATTAGGAAATCCAGGTTCTTTAATTGGAGATG
 ATCAAATTTATAATAACAATTGTCACAGCTCACGCATTTATTATAATTTTTTTT
 ATAGTTATACCTATTATAATTGGTGGATTGGAATTGATTAGTACCTTTAA
 TATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTCCCCCGAATAAATAATATAAGATTTTG
 GTTATTACCTCCTTCTTTAATATTATTAATTTCTAGTAGTATTGTAGAAAATG
 GAGCAGGTACTGGTTGAACAGTATATCCCCCCTCTCATCAAATATTGCTCA
 TAGAGGTAGATCAGTTGATTTAGCTATTTTTTCTCTACATTTAGCAGGTATTT
 CATCTATTTTAGGTGCAATTAATTTTATTACTACAATTATTAATATAACGAGTT
 AATAATATATCTTTTCGATCAAATACCATTATTTGTTTGAGCTGTTGGAATTA
 CAGCATTTTTATTATTATTATCTTTACCAGTATTAGCGGGAGCTATTACAATA
 TTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTTGATCCTGCAGGAGGAG
 GAGATCCGATTTTATATCAACATTTATTT

Po zadání sekvenční do aplikace BoldSystems (<http://www.boldsystems.org>) je možné ověřit a identifikovat testovaný vzorek (viz Obrázek 28 a 29).

Taxonomic Level	Taxon Assignment	Probability of Placement (%)
Phylum	Arthropoda	100
Class	Insecta	100
Order	Lepidoptera	100
Family	Sphingidae	100
Genus	Agrius	100

Obrázek 28 - Tabulka aplikace BoldSystems, 100 % shoda vzorku s referenčními vzorky (zdroj: <http://www.boldsystems.org>)



Obrázek 29 - Graf aplikace BoldSystems, procentuální podobnost s 99 referenčními vzorky *Agrius convolvuli* (zdroj: <http://www.boldsystems.org>)

Z obrázku 29 vyplývá, že prvních 21 již určených referenčních vzorků *Agrius convolvuli* se shoduje s testovaným vzorkem na 100 %. S množstvím referenčních vzorků shoda klesá. U vzorku 99 však podobnost neklesá pod 96 %. Testovaný vzorek je tedy možné prohlásit za identifikovaný jako lišaj svlačcový.

7 ZÁVĚR

Při mapování druhové biodiverzity je nutná správná a bezchybná determinace analyzovaných vzorků. Tam, kde není možné využít morfologický popis, nejčastěji údaje o velikosti a barvě, či mikroskopickou analýzu genitálu, přicházejí na řadu molekulárně genetické metody, které zahrnují izolaci, amplifikaci a sekvenaci DNA.

Cílem bylo získat sekvenci z mitochondriálního genomu, která kóduje gen pro cytochrom oxidázu 1. Ta se v současnosti využívá jako marker taxonomické metody DNA barcoding. Databází, která se zabývá DNA barcoding je BOLD. Pomocí tohoto systému byly ověřovány vzorky i v této práci.

Získání požadované sekvence probíhalo pomocí komerčně dostupných kolonkových izolačních kitů od firem Geneaid, Top-Bio, Qiagen, Macherey-Nagel a Zymo research a magneticky separačním kitem od firmy Chemagen, které byly testovány z hlediska časové a finanční náročnosti, výtěžku a čistoty DNA.

Tabulka 8 ukazuje koncentrace získané DNA. Vyplývá z ní, že se podařilo izolovat DNA pomocí všech metod. Kontrola pomocí PCR, při níž byla snaha amplifikovat sekvenci genu *COI* však ukázala, že ne každý izolační kit je vhodný pro získání celé délky této sekvence (658 bp). Problém nastává, zejména když jsou analyzované vzorky skladovány delší dobu. V této práci se ukázal rok 2000, při němž proběhl sběr vzorků, jako nejproblematictější. Výjimku tvoří izolační soupravy Genomic DNA Mini Kit (Geneaid), QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) a slabý signál můžeme pozorovat také na obrázku 14 u vzorku 55 izolačního kitu Column DNA Lego Kit (Top-Bio). Východiskem může být amplifikace krátkých fragmentů o velikosti 311 a 407 bp, kdy výše uvedené kity vykazovaly opět vysokou efektivnost. To se částečně potvrdilo u kitů NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel) a ZR Tissue & Insect DNA Micro Prep (Zymo Research) (viz Obrázek 23 a 24), které při amplifikaci sekvence 658 bp z roku 2000 nebyly účinné. Nedá se říci, že by izolační kity, u nichž se nepodařilo efektivně amplifikovat, byly obecně nefunkční. Pravděpodobně nevyhovovala stanovená metodika a zejména vzorky hmyzu, které se vyznačují tvrdým exoskeletem a vysušenou tkání.

Co se finanční náročnosti týče, z hlediska efektivity izolace a amplifikace bych doporučoval kombinaci izolačního kitu Column DNA Lego Kit (Top-Bio) na novější vzorky a na analýzu vzorků starších roku 2004 QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) nebo Genomic DNA Mini Kit (Geneaid).

S tímto doporučením koresponduje i časové hledisko izolací. Tabulka 7 ukazuje, že Column DNA Lego Kit (Top-Bio) s délkou izolace 24 minut je izolace, která trvá nejkratší dobu.

Posledním krokem experimentu, kontrolní identifikace amplifikovaných fragmentů, byla sekvenace. Výstupem byla celá sekvence 658 nukleotidů genu *COI*, která se podařila získat u všech sekvenovaných vzorků (viz Obrázek 27). Pomocí programu SeqScape v2.7 byly sekvence vizualizovány a porovnány mezi sebou. Zjistilo se, že se od sebe liší pouze několika nukleotidy, což na konečnou determinaci pomocí aplikace BoldSystems nemá vliv. U všech testovaných vzorků se jednalo o 100% shodu s druhem *Agrius convolvuli*.

8 POUŽITÁ LITERATURA

BĚLÍN, V., 2003: *Noční motýli České a Slovenské republiky*. Kabourek, Zlín, 260 s. ISBN 80-86447-02-2

BENN, J., 2010: *What is Biodiversity?* [online]. únor 2010 [cit. 28.12.2014]. Dostupné z: <http://www.unep.org>

BENSON, A. D., MIZRACHI, K. I., LIPMAN, J. D., OSTELL, J., 2007: *GenBank*. Nucl. Acids Res. (2007) 35 (suppl 1): D21-D25 doi:10.1093/nar/gkl986

BOLD, 2015: dostupné z <http://www.barcodeoflife.org/content/partners>

CAENAZZO, L., PONZANO, E., CERRI, N., 2009: *Case report of a homicide resolved 15 years later: The robustness of Chelex extraction*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2 (2009) 200–201

CARTER, D., 1998: *Denné a noční motýle*. Vydavatel'stvo Osveta, Martin, 304 s. ISBN: 8088824893

DITTRICH-SCHRÖDER, G., WINGFIELD, J. M., KLEIN, H., SLIPPERS, B., 2012: *DNA extraction techniques for DNA barcoding of minute gall-inhabiting wasps*. Molecular Ecology Resources (2012) 12, 109-115, doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03074.x

DOLEŽAL, T., 2014: *Kde v DNA nalézáme rozdíly, zodpovědné za obrovskou diverzitu života?* [online]. 30.7.2014 [cit. 22.10.2014]. Dostupné z <http://www.prf.jcu.cz/data/files/254/1037zmb6pdf.pdf>

DOUGLAS, J. L., HAYMER, S. D., 2001: *Ribosomal ITS1 Polymorphisms in Ceratitis capitata and Ceratitis rosa (Diptera: Tephritidae)*. Annals of the Entomological Society of America: 94(5):726-731. 2001

FERGUSON-MILLER, S., HISER, C., LIU, J., 2012: *Gating and regulation of the cytochrome c oxidase proton pump*. PubMed.gov, 2012, 1817(4):489-94. doi: 10.1016/j.bbabi.2011.11.018

FRYDRYCHOVÁ, Č., R., SÝKOROVÁ, M., ŠÍCHOVÁ, J., BROŽ, V., 2012: *Kurz základních metod molekulární biologie*. Ekotech. [online]. 19.1.2012 [cit. 12.11.2014]. Dostupné z <http://www.alfa.bc.cas.cz>

GILLER, G., 2014: *Are We Any Closer to Knowing How Many Species There on Earth?* Scientific American [online]. 8.5.2014 [cit. 9.3.2015]. Dostupné z <http://www.scientificamerican.com>

GIRAFFA, G., ROSSETTI, L., NEVIANI, E., 2000: *An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria*. Journal of Microbiological Methods: 42 (2000) 175–184

HAJIBABAEI, M., DEWAARD, J. R., IVANOV, N. V., RATNASINGHAM, S., DOOH, T. R., KIRK, L. S., MACKIE, M. P., HEBERT, D. N. P., 2005: *Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Series B, Biological Sciences, 360, 1959–1967

HAJIBABAEI, M., SMITH, M. A., JANZEN, H. D., RODRIGUEZ, J. J., WHITFIELD, B. J., HEBERT, D. N. P., 2006: *A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded*. Molecular Ecology Notes: (2006)6, 959–964, doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01470.x

HAJIBABAEI, M., JANZEN, H., D., BURNS, M., J., HALLWACHS, W., HEBERT, D., N., P., 2006b: *DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera*. Proceedings of the National Academy of Science, vol. 103, no. 4, 968–971, www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0510466103

HEBERT, D. N. P., CYWINSKA, A., BALL, L. S., DEWAARD, R. J., 2003a: *Biological identifications through DNA barcodes*. Proceedings of the Royal Society: 7.2.2003, 270(1512): 313–321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218

HEBERT, D. N. P., RATNASLNGHAM, S., DEWAARD, R. J., 2003b: *Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species*. Proceedings of the Royal Society: 7.8.2003, 270(Suppl 1): S96–S99. doi: 10.1098/rsbl.2003.0025

HEBERT, D., N., P., PENTON, H., E., BURNS, M., J., JANZEN, H., D., HALLWACHS, W., 2004: *Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator**. Proceedings of the National Academy of Science, vol. 101, no. 41, 14812–14817, www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0406166101

HLAVÁČEK, J., 2004: *Mezinárodní spolupráce při ochraně vody*, Mezinárodní politika, roč. XXVIII., č. 7, 2004, s. 9-11.

HORÁKOVÁ, K., MLEJNKOVÁ, H., MLEJNEK, P., 2008: *Evaluation of methods for isolation of DNA for polymerase chain reaction (PCR)-based identification of pathogenic bacteria from pure cultures and water samples*. Water Science & Technology, 2008;58(5):995-9. doi: 10.2166/wst.2008.453

HSING, I. M., XU, Y., ZHAO, W.T., 2007: *Micro- and nano-magnetic particles for applications in biosensing*. Electroanalysis: 03/2007; 19 (7-8) ISSN 1040-0397

HÚSKA, D., BALOUN, J., TRNKOVÁ, L., ADAM, V., KIZEK, R., 2008: *Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA*, CHEMagazín: č.3, ročník XVIII, 2008, s. 14-15

HŮRKA, K., ČEPICKÁ, A., 1980: *Rozmnožování a vývoj hmyzu*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 224 s.

IP, C. Y. S., LIN, S., LAI, K., 2015: *An evaluation of the performance of five extraction methods: Chelex® 100, QIAamp® DNA Blood Mini Kit, QIAamp® DNA Investigator Kit, QIASymphony® DNA Investigator® Kit and DNA IQ™*. Science & Justice, 28.1.2015, doi:10.1016/j.scijus.2015.01.005

JAMES, K., 2012: *Report on review of iBOL targets and milestones*. [online]. 30.8.2012 [cit. 22.3.2015]. Dostupné z <http://phe.rockefeller.edu/barcode/blog>

KODÍČEK, M. *proteasy*. Biochemické pojmy: výkladový slovník [online]. VŠCHT Praha, 2007 [cit. 22.3.2015] Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=proteasy

LITTLE, F. R. P., 2005: *Structure and function of the human genome*. Genome Research. 2005. 15: 1759-1766, doi: 10.1101/gr.4560905

MAYER, CH., SCHMITZ, K. M., LI, J., GRUMMT, I., 2006: *Integric Transcripts Regulate the State of rRNA Genes*. Molecular Cell: Volume 22, Issue 3, 5 May 2006, Pages 351–361

MORITZ, C., CICERO, C., 2004: *DNA Barcoding: Promise and Pitfalls*. PLoS Biol 2(10): e354. doi:10.1371/journal.pbio.0020354

MUCHA, J., 1962: *Motýly*. Státní nakladatelství dětské knihy, Praha, 143 s.

PECHLÁT, J., 2007: *Lišajovití Sphingidae* [online]. 2007 [cit. 9.11.2014]. Dostupné z <http://www.hmyz.net/322sphingidae.htm>

POREBSKI, S., BAILEY, G. L., BAUM, R. B., 1997: *Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components*. Plant Molecular Biology Reporter Volume 15, Issue 1, pp 8-15, doi: 10.1007/BF02772108

PRIMACK, R. B., KINDLMANN, P., JERSÁKOVÁ, J., 2001: *Biologické principy ochrany přírody*. Portál, Praha, Vydání 1., 349 s. ISBN 80-7178-552-0

RACLAVSKÝ, V., 2003: *Izolace nukleových kyselin* [online]. 20.11.2003 [cit. 4.12.2014]. Dostupné z <http://biologie.upol.cz/metody/>

RATNASINGHAM, S., HEBERT, D. N. P., 2007: *BOLD: The Barcode of Life Data System* (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* (2007)7, 355–364, doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x

RAUP, M. D., SEPKOSKI, J. J., 1982: *Mass Extinction in the Marine Fossil Record*. *Science*, Vol. 215 no. 4539 pp. 1501-1503, DOI: 10.1126/science.215.4539.1501

REINOSO, Z. Á., BENÍTEZ, A. H., 2015: *The overrated use of the morphological cryptic species concept: An example with Nyctelia darkbeetles (Coleoptera: Tenebrionidae) using geometric morphometrics*. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, Volume 255, březem 2015, 47–53

RIVERO, R. C. E., NEVES, C. A., SILVA-VALENZUELA, G. M., SOUSA, O. M. S., NUNES, D. F., 2006: *Simple salting-out Method for DNA extraction from formalin-fixed, parafin-embedded tissues*. *Pathology - Research and Practice*, Volume 202, Issue 7, 10 July 2006, Pages 523–529, doi:10.1016/j.prp.2006.02.007

ŘEZÁČ, M., 2013: www.sphingidae-museum.com [online]. 2003 [cit. 12.1.2015]. Dostupné z <http://en.sphingidae-museum.com/database/>

SHAW, J. K., THAIN, L., DOCKER, T. P., DYER, E. CH., GREENMAN, J., GREENWAY, M. G., HASWELL, J. S., 2009: *The use of carrier RNA to enhance DNA extraction from microfluidic-based silica monoliths*. *Analytica Chimica Acta*, Volume 652, Issues 1–2, 12.10.2009, Pages 231–233, doi:10.1016/j.aca.2009.03.038

SHEARER, T. L., COFFROTH, M. A., 2007: *Barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation*. Molecular ecology resources: 247-55. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01996.x.

SCHILL, O., R., 2007: *Comparison of different protocols for DNA preparation and PCR amplification of mitochondrial gene sof tardigrades*. Proceedings of the Tenth International Symposium on Tardigrada, J. Limnol., 66(Suppl. 1): 164-170, 2007

SLÁDEK, Z., 2002: *Cytologie na webu* [online]. 8.10.2002 [cit. 2.12.2014]. Dostupné z <http://user.mendelu.cz/sladek/cytologie/index.htm>

SMALL, A., 2008: *Land degradation on the rise*. [online]. 2.6.2008 [cit. 12.1.2015]. Dostupné z <http://www.fao.org/newsroom/en/news/2008/1000874/index.html>

SMITH, A. M., WOOD, M. D., JANZEN, H. D., HALLWACHS, W., HEBERT, D. N. P., 2007: *DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA: 20.3.2007 104(12): 4967–4972. doi: 10.1073/pnas.0700050104

ŠÍPEK, A., 2011: *Genetika – biologie*. [online]. 9.5.2011 [cit. 13.2.2015]. Dostupné z <http://www.genetika-biologie.cz>

ŠŤOURAČ, O., 2014: *Lišajovití Sphingidae* [online]. 2014 [cit. 8.9.2014]. Dostupné z <http://www.motyli.estranky.cz>

TYKAČ, J., 1966: *Poznávejme motýly*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 48 s.

URBAN, T., 2008: *Virtuální svět genetiky 3*. [online]. 8.10.2008 [cit. 15.3.2015]. Dostupné z <http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/pop/popul1.html>

VINOD, K. K., 2004: *Total genomic DNA extraction, duality check and quantitation*. [online]. Presented in the training programme on “Classical and modern plant breeding techniques – A hands on training”. Centre for Advanced Studies on Genetics and Plant Breeding, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore. 21.11.2004 [cit. 6.11.2014]. Dostupné z <http://kkvinod.webs.com/share/dnaextr.pdf>

WATERTON, C., ELLIS, R., WYNNE, B., 2013: *Barcoding Nature: Shifting Cultures of Taxonomy in an Age of Biodiversity Loss*. Routledge, New York, 224 s.

WITT, S., NEUMANN, J., HOLGER, Z., GÉBEL, G., RÖSCHEISEN, CH., 2012: *Establishing a novel automated magnetic bead-based method for extraction of DNA from a variety of forensic samples*. *Forensic Science International: Genetics* 6 (2012) 539–547, 4.1.2012

YANG, L., JIA, L., ZOU, H., ZHANG, Y., 1999: *Immobilized iminodiacetic acid (IDA)-type Cu²⁺ -chelating membrane affinity chromatography for purification of bovine liver catalase*. *PubMed.gov*, 13.5.1999, (3):229-34. PMID: 10375124

ZHOU, Z., KADAM, S. U., IRUDAYARAJ, J., 2013: *One-stop genomic DNA extraction by salicylic acid-coated magnetic nanoparticles*. *Analytic Biochemistry*: 442 (2013) 249–252, 17.6.2013

ZUMBO, P., 2012: *Phenol-chloroform extraction* [online]. 3.10.2012 [cit. 2.1.2015]. Dostupné z <http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/files/PHENOL-CHLOROFORM.pdf>

ŽUROVCOVÁ, M., 2008: *Genetické čárové kódy pro živé organismy*. In: *Mozaika* [rozhlisový pořad]. Český Rozhlas – Vltava, 29.10.2008

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Lišaj svlačcový (<i>Agrius convolvuli</i>) samec (Řezáč 2013)	29
Obrázek 2 - Lišaj svlačcový (<i>Agrius convolvuli</i>) samice (Řezáč 2013)	29
Obrázek 3 - Základní schéma izolace DNA silikátovou kolonkou.	31
Obrázek 4 – Typická křivka nukleové kyseliny (Nucleid Acid, zdroj: http://www.nanodrop.com)	42
Obrázek 5 - Křivky čistoty a koncentrace Genomic DNA Mini Kit (Geneaid)	52
Obrázek 6 - Křivky čistoty a koncentrace Column DNA Lego Kit (Top-Bio)	53
Obrázek 7 - Křivky čistoty a koncentrace QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen)	53
Obrázek 8 - Křivky čistoty a koncentrace NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel)	54
Obrázek 9 - Křivky čistoty a koncentrace ZR Tissue & Insect DNA Micro Prep (Zymo Research)	54
Obrázek 10 - Křivky čistoty a koncentrace DEP-25 čištěný kolonou Lego Kit (Top-Bio)	55
Obrázek 11 - Křivky čistoty a koncentrace Chemagic DNA Tissue10 Kit (Chemagen)	55
Obrázek 12 - DNA izolovaná z končetin <i>Agrius convolvuli</i> pomocí izolačních kitů	57
Obrázek 13 - DNA izolovaná z končetin <i>Agrius convolvuli</i> pomocí izolačních kitů a magnetické izolace (Chemagen)	58
Obrázek 14 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 658 bp	59
Obrázek 15 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 658 bp	59
Obrázek 16 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 658 bp	60
Obrázek 17 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 658 bp	60
Obrázek 18 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 311 bp	61
Obrázek 19 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 311 bp	61
Obrázek 20 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 311 bp	61
Obrázek 21 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 311 bp	62
Obrázek 22 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 407 bp	63
Obrázek 23 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 407 bp	63
Obrázek 24 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 407 bp	63
Obrázek 25 - Vizualizace PCR fragmentů o velikosti 407 bp	64
Obrázek 26 – Srovnání částí 658 bp sekvence u jednotlivých vzorků	68

Obrázek 27 - Ukázka části osekvenované sekvence (658 bp) genu <i>COI</i> (vzorek lep55Lego Kit;Top-Bio)	69
Obrázek 28 - Tabulka aplikace BoldSystems, 100 % shoda vzorku s referenčními vzorky (zdroj: http://www.boldsystems.org)	70
Obrázek 29 - Graf aplikace BoldSystems, procentuální podobnost s 99 referenčními vzorky <i>Agrius convolvuli</i> (zdroj: http://www.boldsystems.org)	70

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Složení reakční směsi PCR pro 1 vzorek	43
Tabulka 2 - Sekvence použitých přímých a zpětných primerů	43
Tabulka 3 - Základní popisné charakteristiky použitých primerů	44
Tabulka 4 - Velikosti hmotnostních markerů	46
Tabulka 5 - Množství PCR produktu (ng) pro přípravu 10 µl sekvenační reakční směsi	47
Tabulka 6 - Složení sekvenační reakční směsi	47
Tabulka 7 - Délka procesu izolace DNA	49
Tabulka 8 - Koncentrace a čistota izolované DNA	50
Tabulka 9 - Průměrné koncentrace a čistota DNA izolačních kitů	52
Tabulka 10 - Seznam izolačních kitů, jejich dodavatelů a cen	66

11 SEZNAM ZKRATEK

AT	adenin, thymin
ATP	adenosintrifosfát
bp	páry bází
BOLD	Barcode of Life Data Systems
CTAB	cetyltrimetylamonium bromidem
COI	cytochrom oxidáza 1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPH	daň z přidané hodnoty
GC	guanin, cytosin
GITC	Guanidinium thiocyanate
GPS	globální poziční systém
IDA	kyselina imidoctová
indel	inzerce / delece
ITS	internal transcribed spacer
RNA	ribonukleová kyselina
EDTA	kyselina etylendiaminotetraoctová
PCR	polymerázová řetězová reakce
rpm	otáčky za minutu
rDNA	ribozomální DNA
SDS	dodecylsírán sodný