



Středoškolská technika 2010

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

MOLEKULÁRNÍ TEST PRO ROZLIŠENÍ VYBRANÝCH DRUHŮ AFRICKÝCH HLODAVCŮ

Dominik Komenda

Vyšší odborná škola a střední škola veterinární, zemědělská a zdravotnická Třebíč
Žižkova 505, 674 23 Třebíč

Prohlášení

Prohlašuji, že předložená práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a jiné zdroje, ze kterých jsem při zpracovávání čerpal, řádně cituji a jsou uvedeny v příloženém seznamu. Při zpracovávání práce jsem postupoval v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

Poděkování

Nejprve bych chtěl poděkovat ředitelství Oddělení populační biologie Ústavu biologie obratlovců AVČR, které mi umožnilo navštěvovat jejich zařízení, se sídlem Studenec 122, a umožnilo mi využívat jejich laboratoře a používat jejich přístroje. Zde mi také byl poskytnut všechn nezbytný materiál, jehož sběr v západní Africe byl finančně podpořen Grantovou agenturou Akademie věd České republiky (projekt s názvem Diverzita a ekologie obratlovců západní Afriky, číslo IAA 6093404). Mé největší díky patří Mgr. Adamu Konečnému, Ph.D., jenž mi po celou dobu mého působení na Oddělení populační biologie intenzivně věnoval svůj drahocenný čas a obětavě mi pomáhal.

Poděkovat bych chtěl také RNDr. Jaroslavě Herzánové a Mgr. Soně Homolové z VOŠ a SŠVZZ Třebíč za jejich podnětné připomínky ke zpracovávání této práce.

Anotace

V této práci bych se rád zabýval problematikou rozlišování některých druhů hlodavců. Největší potíží v rozlišování některých živočišných druhů činí tzv. kryptické druhy. To jsou takové druhy živočichů, které od sebe nelze rozlišit jen na základě morfologických znaků, neboť vizuálně vypadají totožně. V takovémto případě musí na pomoc přistoupit genetika a molekulární testy DNA. A těmito testy, převážně pak jejich optimalizací pro správné fungování, se budu v této práci zabývat. Vystává otázka, proč právě africké a ne zdejší druhy hlodavců. Odpovědí je, že hlodavci v našich podmínkách jsou většinou všichni již popsáni a lze je rozlišovat, kdežto afričtí hlodavci nejsou dosud všichni popsáni a jejich determinace není jednoznačná. Dalším argumentem pro studium afrických hlodavců je jejich působení v zemědělství, kde jsou častými škůdci a dále jsou přenašeči různých nákaz. To může mít pro rozvojové africké státy nedorozumitelné následky. Proto se mou snahou o optimalizaci testů pro jejich zdárné rozlišování budu snažit přispět k dalšímu rozvoji v jejich studiu.

Klíčová slova: kryptický druh, PCR, elektroforéza, primery

Anotation

In this work, I would like to deal with problems of certain rodent species determination. The biggest difficulty in distinguishing some species is the so-called cryptic species. These are kinds of animals, which can not be distinguished solely on the basis of morphological characters, because they look visually identical. In such a case, to help join genetics and molecular DNA tests. And these tests, primarily the optimization of the proper functioning, I will address in this work. The question arises, why African and not the local rodent species. The answer is that the rodent species in our conditions are mostly all well described and can be distinguished, while African rodents are not all described and their determination is ambiguous. Another argument for the study of African rodents is their importance in agriculture, which are frequent pests and are carriers of various diseases. It may have for developing African countries dire consequences. Therefore, my effort to optimize the tests for their successful differentiation try to contribute to further development in their studies.

Key words: cryptic species, PCR, electrophoresis, primers

Obsah

1. Úvod.....	- 4 -
1.1 Druh.....	- 4 -
1.2 Kryptické druhy.....	- 5 -
1.3 Hlodavci a význam výzkumu kryptických druhů	- 6 -
1.4 Principy determinace kryptických druhů	- 7 -
1.5 Principy molekulární determinace druhů pomocí PCR.....	- 8 -
1.6 Cíle práce.....	- 10 -
2. Materiál a metody.....	- 11 -
2.1 Použitý materiál.....	- 11 -
2.2 Metodika optimalizace PCR testů	- 14 -
2.2.1 Izolace DNA	- 14 -
2.2.2 Specifické primery pro PCR testy.....	- 14 -
2.2.3 PCR.....	- 15 -
2.2.4 Agarózová elektroforéza.....	- 16 -
2.3 Metodika ověření funkčnosti zoptimalizovaných PCR testů	- 18 -
3. Výsledky.....	- 19 -
3.1 Optimalizace PCR testu	- 19 -
3.1.1 Test pro odlišení druhů rodu <i>Mastomys</i> a <i>Praomys</i>	- 19 -
3.1.2 Test pro odlišení druhů rodu <i>Arvicanthis</i>	- 19 -
3.2 Funkčnost zoptimalizovaných PCR testů.....	- 21 -
3.2.1 Izolace DNA	- 21 -
3.2.2 Test pro odlišení druhů rodu <i>Mastomys</i> a <i>Praomys</i>	- 21 -
3.2.3 Test pro odlišení druhů rodu <i>Arvicanthis</i>	- 22 -
4. Diskuze.....	- 23 -
5. Závěr.....	- 26 -
6. Použitá literatura	- 27 -
7. Slovníček.....	- 29 -
8. Přílohy	- 30 -

1. Úvod

Při výzkumu živočichů a jejich vztahu k člověku ve všech představitelných oborech je jako jeden ze základních a hlavních předpokladů nutnost správné druhové determinace konkrétních studovaných organismů.

1.1 Druh

Druh (species) představuje nejnižší přirozenou taxonomickou jednotku hierarchického uspořádání organismů. Neexistuje jediná přesná definice, která by jednoznačně určovala druh, nicméně existuje řada podobných definic pro určení druhu. Jedna z takových definic praví, že druh je soubor populací s jedinečným vývojovým původem a historií, tvořený navzájem si podobnými jedinci, kteří se mezi sebou mohou plodně křížit a jsou reprodukčně izolováni od jiných podobných skupin (internetový zdroj **1**). Tato definice samozřejmě postrádá smysl u organismů nerozmnožujících se pohlavně. Dále má tato definice určité nevýhody, např. ztěžuje nalézt shodu na rozlišení příbuzných organismů na druhy (internetový zdroj **1**). Další podobnou definicí druhu je, že druh je charakterizován řadou atributů, a to: 1. jedinečný evoluční původ a historie, 2. soubor jedinečných vlastností fenotypových i genetických (tj. má jedinečný genofond), 3. jedinečnou evoluční *nikou*₁ (tj. souborem nároků a tolerancí vůči vnějšímu prostředí), 4. v daném čase je od jiných druhů oddělen přeryvy a tvoří uzavřené (u prokaryotických organismů a rostlin zčásti otevřené) rozmnožovací společenství, tj. nerozmnožuje se úspěšně s druhy jinými díky specifickým reprodukčním bariérám a zachovává si tak svou integritu (celistvost), 5. rodičovská generace plodí potomstvo patřící ke stejnému druhu (Rosypal a kol. 2003). Stejně tak jako předchozí definice i tato platí pouze pro dvourodičovské (biparentální) organismy množící se obvyklým pohlavním způsobem. Na organismy množící se jednorodičovsky (uniparentálně, např. nepohlavně, partenogeneticky, samooplozením), nelze vztáhnout tzv. rozmnožovací kritéria (každý jedinec totiž zakládá samostatný klon – genetickou linii, která nevyměňuje genetickou informaci s klony jinými), a jejich „druhy“ (často dobře charakterizovatelné např. ekologicky) se nazývají *agamospecies*. Ty nedosáhly reprodukčně charakterizované druhovosti nebo se z ní druhotně vymkly (Rosypal a kol. 2003).

Další teorií druhu je *ekologický druh*. Ten je charakterizován tak, že v prostředí existuje pouze omezený počet potenciálních *nik*, a proto je omezený i počet druhů, které se těmto nikám mohou svým fenotypem přizpůsobit. Jestliže se jedinec vlivem mutací příliš odchýlí od fenotypu, který je optimální pro niku příslušného druhu, je on nebo jeho potomci dříve či později eliminováni z populace (Ehrlich & Raven 1969).

Druh řeší i tzv. *Buffonská definice druhu*. Jedná se patrně o nejstarší koncepci druhu. Podle ní je kritériem příslušnosti ke stejnému druhu schopnost produktivního rozmnožování, tj. schopnost páru jedinců opačného pohlaví zplodit fertilní potomstvo (Mayr 1982). Úskalím této definice je ovšem to, že podle ní jsou dva jedinci, kteří jsou spolu schopni zplodit potomstvo, příslušníci stejného druhu, což ovšem nemusí být tak docela pravda, třeba z hlediska různých fenotypových odlišností.

Další definicí druhu je definice *etologického* druhu, jinak řečeno koncepce vnitrodruhového rozpoznávání (Paterson 1985). Podle ní mají příslušníci určitého druhu schopnost na základě specifických mechanismů rozlišit jedince opačného pohlaví stejného druhu.

Nejobecnější koncepcí druhu je definice *evolučního* druhu. Podle ní je druh příbuzenskou linií, tj. lineární nebo větvící se sekvencí populací, jež mají mezi sebou vztah předeek-potomek, která se vyvíjí odděleně od ostatních podobných linií, a která má své specifické evoluční funkce (role) a specifické evoluční tendence (Simpson 1951). Úskalím této definice je však to, že se zřejmě jedná o tzv. fenomenologickou definici, tj. o definici, která popisuje daný fenomén, nezaobírá se však důvody existence druhu ani mechanismy, které udržují jeho členy pohromadě. Za druh je podle této definice možno považovat skupinu populací vyskytujících se na různých místech v prostoru a v různých okamžicích v čase, které mají v evoluci stejnou funkci, např. které v určitém okamžiku ve svém středu dali vzniknout novému druhu, a které mají stejné evoluční tendence, tj. genotyp jejich příslušníků se v evoluci mění stejným způsobem (Flegr 2005).

Skutečný počet organismů žijících na Zemi se odhaduje na 10 – 100 milionů. Avšak počet známých druhů žijících organismů je pouze 1 413 000 (Rosypal a kol. 2003). Je tomu tak z toho důvodu, že některé druhy nebyly dosud popsány a některé druhy organismů rychlým tempem vymírají. K největšímu vymírání druhů dochází na místech s velkou biodiverzitou – deštné pralesy, korálové útesy a mokřady. Na jejich vymírání se velkou, ať již přímou či nepřímou mírou, podílí člověk. O tom svědčí i fakt, že každoročně ubývá asi 2% z celkové plochy tropických lesů a spolu s nimi i 0,5% světového druhového bohatství (Rosypal a kol. 2003).

Biodiverzita byla v roce 1989 definována jako „bohatství života na Zemi, miliony rostlin, živočichů a mikroorganismů, včetně genů, které obsahují, a složité ekosystémy, které vytvářejí životní prostředí“. Biodiverzita může být trojího typu: genetická (genová variabilita v rámci populace nebo celého druhu), druhová (rozmanitost na úrovni druhů) a ekosystémová (rozmanitost na úrovni společenstev a ekosystémů) (Primack a kol. 2001).

1.2 Kryptické druhy

Kromě toho že zanikají, tak také vznikají nové druhy – ty, které vznikly relativně nedávno, si bývají velmi podobné a morfologicky těžko rozlišitelné. Takové makroskopicky nerozlišitelné druhy nazýváme *kryptickými druhy*. Jedinci kryptického druhu jsou k nerozeznání od jiného podobného známého druhu, přesto se ve spojení s ním nemohou rozmnožovat. Nejčastějšími metodami pro rozlišování kryptických druhů jsou *karyologické*₂ a *molekulární* analýzy, které odhalí, že chromozomy či klíčové geny dvou jedinců se liší natolik, že je nutno je považovat za samostatné druhy. Mezi savci jsou takto „skrytí“ nejčastěji právě hlodavci, kterými se bude tato práce zabývat, poté letouni a kytovci (internetový zdroj 2). Kryptické druhy mohou vznikat i různými mutacemi, např. chromozomů. Pouhá změna počtu chromozomů díky jejich splývání nebo jejich fragmentaci může vést ke *speciaci*₃ lokálních populací, které se stávají reprodukčně izolovanými od svého

mateřského druhu, ale zachovávají si jeho genotyp, protože ke změně genetické informace nedošlo. Tak vznikla např. řada kryptických druhů u myši domácí (*Mus musculus*) v izolovaných alpských údolích a na italských ostrovech (Rosypal a kol. 2003). Mezi kryptické druhy u letounů patří např. *Pipistrellus pygmaeus* (netopýr nejmenší) a *Pipistrellus pipistrellus* (netopýr hvízdavý) (Anděra & Horáček 2005). Tyto druhy se od sebe liší tím, že jejich zkoumaná genetická sekvence DNA je až o 11 procent odlišnější (internetový zdroj 3).

1.3 Hlodavci a význam výzkumu kryptických druhů

Hlodavci (*Rodentia*) představují v životě člověka velmi významnou skupinu živočichů, jelikož jsou častými škůdci v zemědělství a zásobárnách potravin a také jsou významnými přenašeči nakažlivých chorob nebezpečných pro člověka i hospodářská zvířata. Takovou nemocí přenášenou hlodavci je např. leptospiróza. Jedná se o nemoc bakteriálního původu (G- bakterie čeledi *Leptospiraceae*), která se u hospodářských zvířat projevuje horečkami, průjmy, nervovými příznaky. U lidí nastupuje kromě horečky také zánět ledvin a další krváceniny. Další závažnou chorobou, kterou hlodavci přenáší je tularemie. Jedná se o G+ koky čeledi *Neisseriaceae*. Tularemie je z hlodavců přenosná na člověka stykem s nemocným hlodavcem, popřípadě vdechnutím bakterií. Způsobuje horečku, zvětšení mízních uzlin, zápal plic a neléčená způsobuje smrt.

Jednou z nejzávažnějších nemocí přenášovaných hlodavci v Africe je hemoragická (krvácivá) horečka Lassa. Jedná se o akutní onemocnění trvající 1 – 4 týdny. Vyskytuje se převážně v západní Africe. Virus je jednořetězcový RNA virus patřící do čeledi *Arenaviridae*. Nemoc patří mezi zoonózy, což znamená, že se lidé nakazí kontaktem s nakaženým zvířetem. Hostitelem viru *Lassa* je hlodavec rodu *Mastomys* – jeho jedinci ovšem neonemocní, ale stávají se přenašeči a virus vylučují ve výkalech a moči. Lidé se pak nakazí kontaktem s těmito exkrementy a může docházet i k přenosu mezi lidmi navzájem přímým kontaktem (internetový zdroj 4). Nemoc probíhá většinou (asi z 80%) bez klinických příznaků, u ostatních případů postihuje vnitřní orgány a nastávají celkové projevy (horečka, zvracení, průjem, kašel, bolesti). V těžkých případech může vést až k otokům v obličeji, krvácení z tělních otvorů, křeče, šok. Jedná se o velmi vážné onemocnění (podle studií ročně onemocní 300 000 až 500 000 pacientů a dojde k 5 000 úmrtí). Proti viru sice působí přípravek Ribovirin, nejúčinnější je ovšem prevence. Tím se rozumí tzv. „komunitní hygiena“, kdy je zabráněno vstupu hlodavců do obydlí (internetový zdroj 4).

Skupina hlodavců je druhově velmi bohatou skupinou savců. Řád *Rodentia* (hlodavci) zahrnuje 33 čeledí a asi 2277 druhů, přičemž jenom samotná čeleď *Muridae* (myšovití) obsahuje 730 druhů (internetový zdroj 5). Do řádu hlodavců patří většinou středně velcí a převážně malí savci se stejnou anatomickou stavbou. Někdy mají velmi malé ekologické nároky, což jim umožňuje obývat téměř celý svět. Původně nežili pouze na Antarktidě, Novém Zélandu a na některých oceánských souostrovích. Největší druhová diverzita (rozmanitost) hlodavců je nejpravděpodobněji v Jižní Americe (internetový zdroj 6). Rychle se rozmnožují a dokáží se velmi rychle přizpůsobovat novému prostředí. S tím souvisí negativní vlivy na lidskou společnost, jako je přenášání chorob, škody v zemědělství, atd.

Hlodavci jsou z hlediska evoluce mladou skupinou savců. Jejich první fosilní záznamy se datují asi před 37 až 57 miliony lety. Zajímavostí je, že právě čeleď myšovití (*Muridae*) se objevila relativně pozdě – až v pliocénu (před 5 miliony lety). Tato čeleď neustále zvyšuje svoji genetickou diverzitu a po celá tisíciletí zůstala nepříliš specializována (Hanzák 1970). Toto je jedním ze tří faktorů, které se podílí na tom, že hlodavci úspěšně přežívají miliony let. Dalším faktorem je jejich (až na výjimky) malá velikost. Třetím faktorem úspěšnosti hlodavců je jejich vysoká plodnost. Tyto faktory způsobují, že se hlodavci neustále vyvíjí, což souvisí s jejich velkou morfologickou podobností a častým výskytem kryptických druhů (internetový zdroj 7).

Například v západoafrickém Senegalu můžeme najít několik takových kryptických druhů i mezi hospodářsky či medicínsky významnými skupinami. Tato oblast jižně od Sahary je velmi závislá na zemědělství, ve kterém mohou přemnožení hlodavci způsobit nedozírné škody. Dalším hlediskem je také to, že lidé v Senegalu trpí častými infekcemi spojenými s hlodavci, ať už jako přenašeči nebo rezervoáry infekcí. To vše zvyšuje význam výzkumu hlodavců v této oblasti, jejich určení a vyhotovení vhodných preventivních opatření proti nim. Základem výzkumu je druhová determinace, jelikož pro další činnost je nezbytné vědět, o jaký druh se jedná.

1.4 Principy determinace kryptických druhů

V dřívějších dobách, kdy ještě nebyly k dispozici moderní vědecké laboratorní metody a přístroje, sloužily k druhové determinaci (určení) hlodavců hlavně metody založené na porovnávání morfologických znaků (zbarvení, velikost, anatomická stavba těla). Jedním z hlavních rozlišovacích morfologických znaků u hlodavců je porovnávání tvaru a odlišností na lebce. Tato jinak u savců poměrně spolehlivá metoda je velmi špatně použitelná pro rozlišování kryptických druhů hlodavců, u nichž dochází k tomu, že dva geneticky rozdílné druhy např. pískomilů, nemají na lebce žádné odlišnosti. Právě z tohoto důvodu bylo třeba hledat nové spolehlivější metody pro rozlišování druhů hlodavců.

S postupujícím rozvojem laboratorních metod se začalo používat vyšetření počtu a tvaru chromozómů (karyologie). Určování druhů pomocí chromozómů se na dlouhou dobu stalo v podstatě jedinou přesnou metodou, která dokáže rozlišit kryptické druhy. Karyologická vyšetření však mají řadu nevýhod a omezení jako je časová náročnost, potřeba živých zvířat pro získávání chromozómů, zdlouhavý a náročný laboratorní postup – od přípravy vhodného preparátu až po pozorování a barvení chromozómů pod mikroskopem (Zima a kol. 2004).

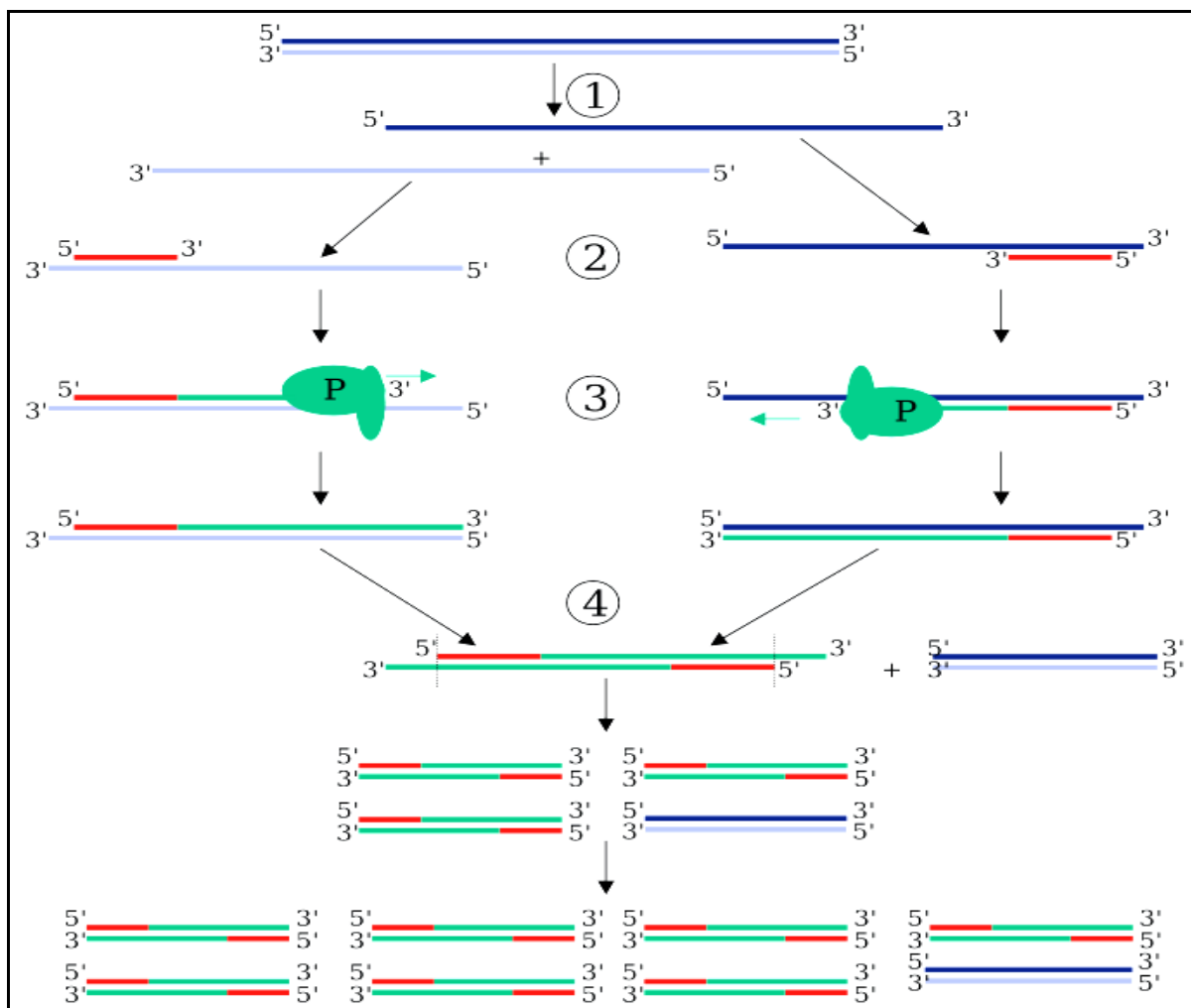
Od vyvinutí polymerázové řetězové reakce (PCR) tato omezení mizí díky používání modernějších a stále se rozvíjejících metod založených na molekulární analýze DNA vhodných genů (Zima a kol. 2004). Takovýmto vhodným genem se v našem případě stal mitochondriální gen pro *cytochrom b*. Cytochrom obecně označuje bílkoviny vázané na membrány a obsahující ve své molekule hemové skupiny, které zajišťují přenos elektronů tak, že se navázané ionty železa střídavě redukují a oxidují na z Fe^{2+} na Fe^{3+} a zpět. Cytochrom b obsahuje hem b (bez formylu), hemová skupina není vázána na protein kovalentně

(internetový zdroj 8). Cytochrom b je součástí dýchacího cyklu. A právě k namnožení a zviditelnění molekuly DNA genu pro cytochrom b nám pomáhají dvě laboratorní metody – PCR a elektroforéza.

1.5 Principy molekulární determinace druhů pomocí PCR

Princip **polymerázové řetězové reakce** (*PCR, Polymerase Chain Reaction*) spočívá v poměrně rychlém namnožení konkrétních úseků DNA na základě zmnožení (replikace) nukleových kyselin pomocí enzymu *polymerázy in vitro*. Ty úseky DNA, jež chceme namnožit (amplifikovat) musí být ohraničeny tzv. *primery* (krátkými oligonukleotidy DNA). Proces PCR spočívá v následujících krocích (Obr. 1): **1. denaturace** – jedná se o proces, při kterém se v důsledku zahřívání na 94 – 98°C dvoušroubovice DNA rozdělí na jednoduchá vlákna. Tento proces trvá 20 – 30 sekund. **2. nasednutí primerů (annealing)** – je proces, při kterém na jednotlivá vlákna DNA nasedají primery. Teplota je snížena na 50 – 65°C – volba správné tzv. annealingové teploty je jedním z klíčových bodů optimalizace celé reakce. **3. fáze prodloužení (elongace)** – syntéza nového řetězce dvoušroubovice DNA, která se uskutečňuje díky DNA polymeráze. Nejčastěji se používá Taq polymeráza (odvozená od bakterie *Thermus aquaticus*) (Zima a kol. 2004). Opakováním těchto kroků počet syntetizovaných molekul DNA ve vzorku narůstá geometrickou řadou, takže můžeme tímto procesem z velmi malého počtu molekul DNA (teoreticky jedné) vytvořit několik tisíc takovýchto molekul. Vzniklé velké množství molekul už můžeme použít k další analýze elektroforézou, získání sekvence DNA namnoženého úseku či jiným molekulárně-biologickým analýzám.

Princip **elektroforézy** spočívá v rozdělení různě dlouhých fragmentů DNA v elektrickém poli, což se děje díky rozdílu v tření a tedy rychlosti, kterou putují v médiu (např. v agarózovém gelu). Nejprve se musí namíchat agarózový gel, na který je nanesen PCR produkt smíchaný s barvičkou pro viditelnost pod UV zářením a nanesení tzv. *žebríku* (*ladder*), podle kterého lze snadno odečíst velikosti jednotlivých fragmentů. Gel je ponořen do pufu v elektroforézním přístroji. Čím déle a pomaleji necháme DNA putovat, tím lépe budou od sebe jednotlivé fragmenty lépe rozpoznatelné.



Obr. 1: Schematická kresba PCR cyklu. (1) denaturování při 94-96 ° C. (2) annealing při 68 ° C. (3) prodloužení při 72 ° C (P = polymeráza). (4) první cyklus je kompletní. Dvě výsledné DNA molekuly tvoří šablonu pro příští cyklus, tak se násobí množství DNA při každém novém cyklu geometrickou řadou. Převzato z: internetový zdroj 9

Princip molekulární determinace druhů pomocí testu založeného na PCR spočívá v tom, že PCR nám umožní naamplifikovat (namnožit) konkrétní požadovaný úsek DNA. A to z důvodu, že jsou *nadesignovány* přesně takové primery, které při amplifikaci nasednou pouze na místo, jež je pro konkrétní druh specifické (pro tento druh pak máme výsledný PCR produkt ve formě fragmentu DNA konkrétní délky). Máme tak primery, které jsou specifické pro celou skupinu (rod), v našem případě hlodavců. Ty nasednou tedy na všechny úseky DNA pocházejících od zvířat stejného rodu (jsou specifické pro rod). Zároveň nám také slouží jako tzv. pozitivní kontrola úspěšně proběhlé PCR; pokud kontrolní produkty nejsou naamplifikovány, reakce neproběhla. Příčina však může být také ve špatně vyzolované DNA. Poté máme primery, které jsou specifické pouze pro jeden konkrétní druh a ty nasednou pouze na úsek DNA, který jim odpovídá. Nemohou však nasednout na úsek DNA jiného druhu, protože už jsou zde změny (mutace ve vazebném místě), které neumožňují nasednutí primeru. Na základě tohoto tak můžeme poměrně spolehlivě rozlišit z celého množství testovaných jedinců ty, které patří do stejného rodu a v rámci něho i jednotlivé druhy. To vše pouze na základě kousku vhodné tkáně, ze které vyzolujeme DNA.

1.6 Cíle práce

Celý vývoj testů pro rozlišování kryptických druhů pomocí PCR metody je založen v podstatě na nadesignování vhodných specifických primerů pro konkrétní druhy zvířat a poté na optimalizaci těchto testů. Druhově specifické primery pro hlodavce, na které se zaměřuje tato práce, jsou již nadesignovány a vybrány na základě známých *sekvencí* genů pro cytochrom b u všech studovaných druhů. Tyto primery jsou komerčně vyráběny a dodávány. Mým úkolem tedy bylo podílet se na optimalizaci těchto testů.

Konkrétně se jedná o **optimalizaci testů založených na PCR** pro rozlišení 2 skupin podobných druhů hlodavců pocházejících ze subsaharské Afriky. Konkrétně se jedná o tyto skupiny pravých myší (podčeleď *Murinae*): 1. velmi si podobné druhy *Mastomys erythroleucus*, *Praomys daltoni* a *Praomys rostratus*; 2. kryptické druhy *Arvicanthis niloticus* a *Arvicanthis ansorgei*. Fotografie vybraných jedinců viz příloha 1.

Po zoptimalizování testů musí následovat **vyzkoušení funkčnosti testu** i na ostatních jedincích studovaných druhů (nejlépe pocházejících z co nejdálších oblastí), které byly již dříve druhově určeny podle lebek, karyologicky nebo srovnáním sekvence cytochromu b.

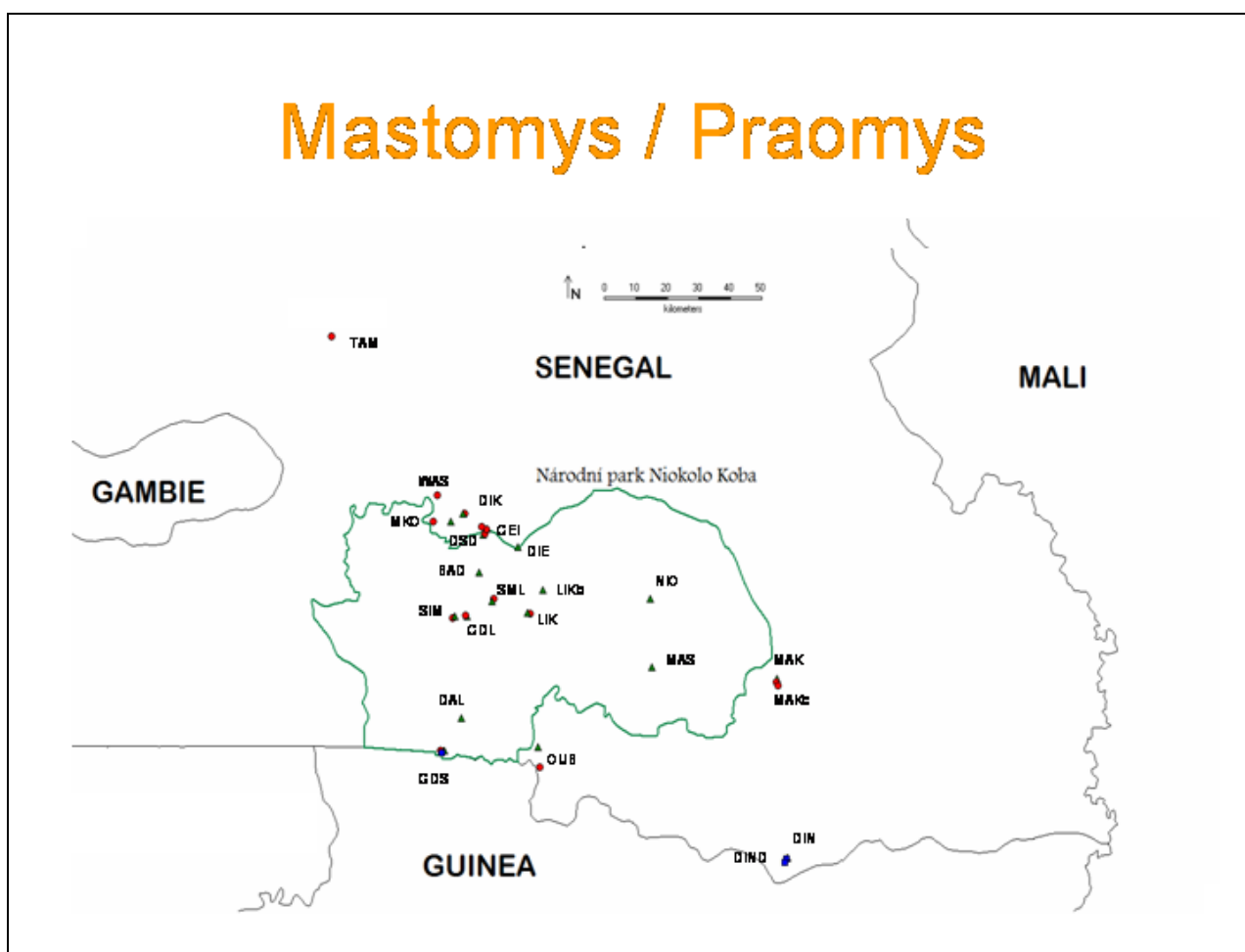
2. Materiál a metody

2.1 Použitý materiál

Pro optimalizaci testu (PCR a elektroforézy) pro *Mastomys/Praomys* byli vybráni 4 jedinci tří druhů (1 *M. erythroleucus*, 2 *P. daltoni* a 1 *P. rostratus*; Tab. 1) z celkového materiálu 78 jedinců, z čehož bylo 34 *M. erythroleucus* (15 lokalit), 35 *P. daltoni* (18 lokalit) a 9 *P. rostratus* (3 lokality) (Příloha 2).

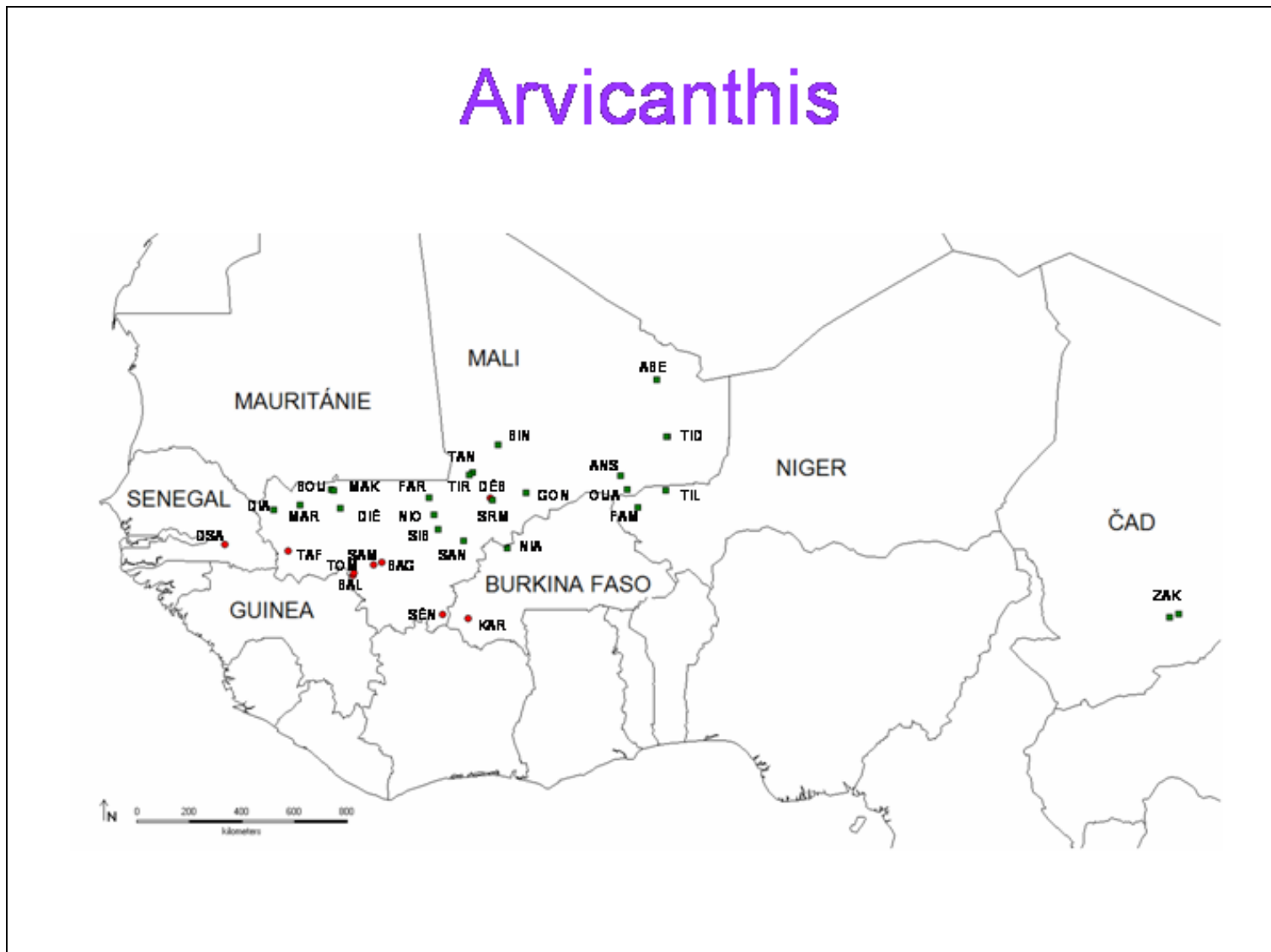
Pro optimalizaci testu (PCR a elektroforézy) pro *Arvicanthis* byli vybráni 4 jedinci dvou druhů (2 *A. niloticus* a 2 *A. ansorgei*; Tab. 2) z celkového materiálu 56 jedinců, z čehož bylo 41 *A. niloticus* (22 lokalit) a 15 *A. ansorgei* (9 lokalit) (Příloha 3).

Lokality, ze kterých pochází materiál použitý v této práci, jsou vyznačeny na mapách odděleně pro druhy rodu *Mastomys* a *Praomys* (Obr. 2) a pro rod *Arvicanthis* (Obr. 3).



Obr. 2: Lokality odchyty zvířat rodů *Mastomys* a *Praomys*. Zelený trojúhelník - *P. daltoni*; červené kolečko - *M. erythroleucus*; modrý čtverec - *P. rostratus*. Názvy lokalit jsou uvedeny ve zkratkách (viz příloha 2). Na mapě je jihovýchodní část Senegalu.

Arvicanthis



Obr. 3: Lokality odchyty zvířat rodu *Arvicanthis*. Červené kolečko - *A. ansorgei*; zelený čtverec - *A. niloticus*. Názvy lokalit jsou uvedeny ve zkratkách (viz příloha 3).

Tab. 1: Jedinci vybraní pro optimalizaci PCR testu pro rozlišení pravých myší *Mastomys erythroleucus*, *Praomys daltoni* a *P. rostratus*.

Kód jedince	Rod	Druh	Pohlaví	Země	Lokalita	Kód lokality	Chytali	Měsíc odchyty	Zeměpisné souřadnice
NK91	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	M	Senegal	Simenti	SIM	J. Bryja/P. Koubek	květen 04	13 01 32.46 N, 013 17 41.22 W
NK145	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	F	Senegal	Lingué Kountou	LIK	J. Bryja/P. Koubek	květen 04	13 02 06.78 N, 013 04 52.68 W
NK150	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	F	Senegal	Lingué Kountou - bamboo	LIKb	J. Bryja/P. Koubek	květen 04	13 05 49 N, 013 02 13 W
NK888	<i>Praomys</i>	<i>rostratus</i>	F	Senegal	Dindéfélo	DIN	J. Bryja/A. Konečný	prosinec 05	12 22 20.64 N, 012 19 25.80 W

Tab. 2: Jedinci vybraní pro optimalizaci PCR testu pro rozlišení pravých myší *Arvicanthis niloticus* a *A. ansorgei*.

Kód jedince	Rod	Druh	Pohlaví	Země	Lokalita	Kód lokality	Chytali	Zeměpisné souřadnice
M4169	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	M	Mali	Dialo	DIA	B. Sicard	14 28 00 N, 11 30 00 W
M4251	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	M	Mali	Débaré	DÉB	L. Granjon	14 53 00 N, 04 02 00 W
M5240	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	M	Mali	Abeibara	ABE	L. Granjon / S. Ag Atteynine	19 01 00 N, 01 45 00 E
M4375	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	F	Mali	Tombané	TOM	L. Granjon	12 16 00 N, 08 45 00 W

2.2 Metodika optimalizace PCR testů

2.2.1 Izolace DNA

Pro optimalizování testů je zapotřebí DNA konkrétního zvířete. Pokud ji nemáme připravenou, je nejprve nutné ji vyizolovat. Získáme ji z vhodných orgánů hlodavce (př. játra, slezina) nebo z tkáně svalů. Tento materiál je uchováván ve zkumavkách s 96% etanolem v mrazničce (při -20°C). Z těchto tkání se odstříhnou malinké kousky, které se vloží do *stripůs*. Při práci musíme dbát na důkladnou dezinfekci nástrojů, abychom zabránili vzájemné kontaminaci vzorků. Dezinfekci provádíme namočením nástrojů do lihu a poté opálením nad plamenem.

Existují dva typy nejběžněji používaných izolací. Jedním typem izolace DNA je tzv. dvoukroková izolace, která umožní vyizolovat molekuly DNA do dvou hodin. Spočívá v tom, že se tkáň povaří v PCR cycleru při 95°C v 30 – 100 µl extrahovacího roztoku (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA, pH 12) po dobu 45 minut (Truett a kol. 2000). Do tohoto roztoku pak přidáme stejné množství 40 mM Tris-Cl (pH 5) a 1 µl finálního roztoku pak můžeme použít pro PCR reakci (Reichard a kol. 2008).

Druhým typem izolace DNA je tzv. *izolace přes kolonky*. Ta byla provedena přesně podle protokolu od dodavatele komponentů na její provádění (firma GENOMED GmbH) (viz příloha 4).

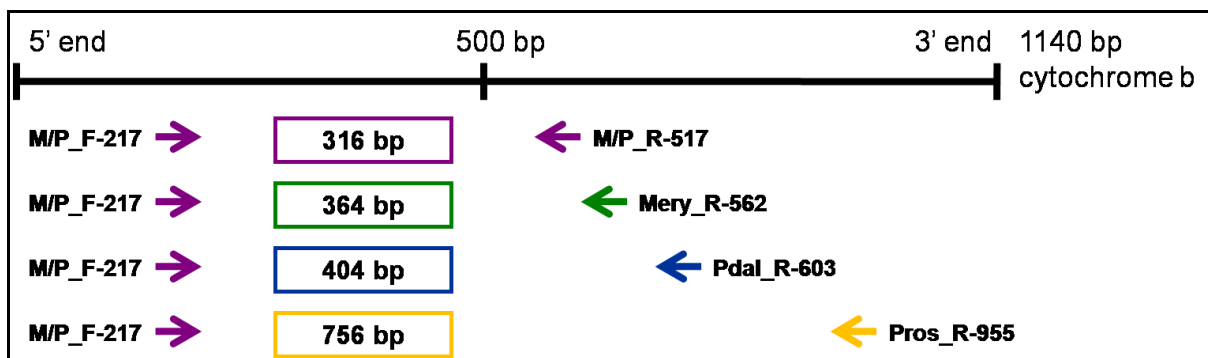
Výběr správné metody izolace DNA je pro úspěšné provádění PCR reakcí pro určování živočišných druhů naprosto nezbytný. Při špatně a nedokonale vyizolované molekule může dojít k různým nepřesnostem v konečném určování druhů.

2.2.2 Specifické primery pro PCR testy

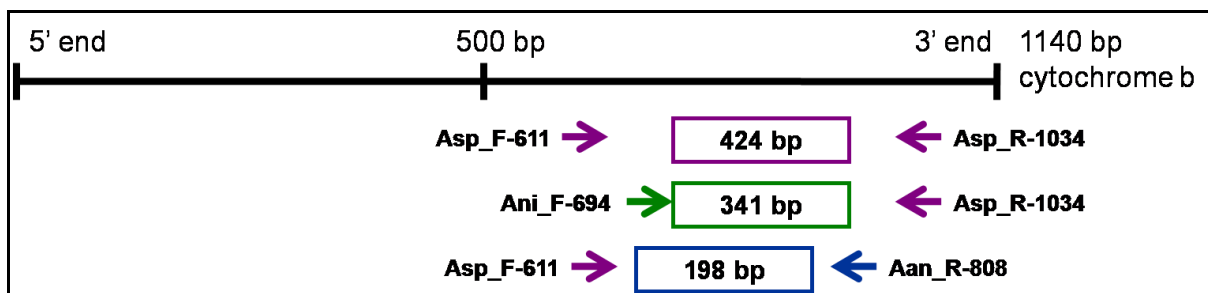
Pro vlastní PCR reakci jsou specifické primery naprosto nezbytnou součástí. Pro první test (dva druhy *Praomys* a *Mastomys erythroleucus*) byly použity primery následující: společné pro všechny tři druhy, a to M/P_F-217 (GTAAACTACGGATGACTAATC) a M/P_R-517 (AGCGTGTTAGTGTTGC). Dále specifické primery: pro *M. erythroleucus* Mery_R-562 (TAACTAGAGCTGCGATAAT), pro *P. daltoni* Pdal_R-603 (TTGT TAGATCCAGTCTC G) a pro *P. rostratus* Pros_R-955 (TAGAGTTTGGGTGATAGG).

Pro test druhů *Arvicanthis* byly použity společné primery pro rod *Arvicanthis*, a to Asp_F-611 (GCTCAAACAACCCAACAGG) a Asp_R-1034 (TGTTCTACTGGTTGAC CTCC). Dále specifické primery pro *A. niloticus*, a to Ani_F 694 (GCCTTAATTAT ATTTATCTCC) a specifické primery pro *A. ansorgei*, a to Aan_R-808 (GTTTGATATGA GGAGGAGTG) (Konečný 2009).

Naamplifikované úseky včetně jejich délek v základních párech ukazují Obr. 4 a 5.



Obr. 4: Schéma produktů PCR testu pro rozlišení dvou druhů rodu *Praomys* (*P. daltoni* a *P. rostratus*) a druhu *Mastomys erythroleucus*. Šipky odpovídají navrženým primerům, jejichž názvy jsou také vyznačeny. Tyto primery amplifikují fragmenty genu pro cytochrom *b*, jejichž délky jsou vyznačeny v rámečcích. Barvy odpovídají specifitě takto: fragment společný pro všechny tři druhy (fialová), specifický fragment pro *M. erythroleucus* (zelená), specifický fragment pro *P. daltoni* (modrá) a specifický fragment pro *P. rostratus* (žlutá). Převzato z: Konečný 2009.



Obr. 5: Schéma produktů PCR testu pro rozlišení dvou druhů rodu *Arvicanthis* (*A. niloticus* a *A. ansorgei*). Šipky odpovídají navrženým primerům, jejichž názvy jsou také vyznačeny. Tyto primery amplifikují fragmenty genu pro cytochrom *b*, jejichž délky jsou vyznačeny v rámečcích. Barvy odpovídají specifitě takto: fragment společný pro oba druhy (fialová), specifický fragment pro *A. niloticus* (zelená) a specifický fragment pro *A. ansorgei* (modrá). Převzato z: Konečný 2009.

2.2.3 PCR

Nejdůležitějším krokem celého testu založeného na PCR a jeho optimalizace je právě zoptimalizování polymerázové řetězové reakce. Prvním bodem je namíchání správného tzv. *master mixu* podle příslušného protokolu (viz příloha 5). Master mix je směs nadesignovaných primerů (a to jak společných pro určitou skupinu, tak specifických pro jeden druh); nukleotidů, což jsou “stavební kameny“ potřebné k nasyntetizování nového řetězce DNA; dále jsou zapotřebí hořčnaté kationty (ve formě $MgCl_2$) a pufr. Všechny tyto složky jsou přimíchávány do redestilované vody (ddH_2O). Nakonec se do master mixu přidá ta nejdůležitější složka, a to je enzym polymeráza (v našem případě Taq polymeráza). Polymeráza je nejdůležitější složkou proto, že zajišťuje nasednutí volných nukleotidů na rozštěpené vlákno DNA a přisyntetizování dalšího vlákna, takže nám vznikne opět dvoušroubovice DNA. Množství všech zmiňovaných složek se pohybuje v řádech několika jednotek až desítek μl . Jakmile máme všechny složky master mixu ve zkumavce, je nutné

zkumavku vložit do odstředivky a nechat odstředit, abychom zabránili ulpění i sebemenších kapiček na stěně zkumavky. Poté si pipetou přeneseme do každé jamky stripu obvykle 9 μ l master mixu a přidáme 1 μ l DNA konkrétního jedince a opět stripy důkladně odstředíme.

Takto připravené stripy vložíme do *cycleru* (Obr. 6), kde probíhá periodický cyklus PCR reakce (viz princip PCR v kap. 1.5).

Celý proces optimalizace těchto testů spočívá v podstatě na zoptimalizování podmínek, za kterých jednotlivé reakce probíhají. Nejprve je nutné správně zoptimalizovat poměr složek master mixu (primerů, Taq polymerázy). Jednou z velmi důležitých složek je $MgCl_2$. Na koncentraci hořčnatých kationtů závisí specifita reakce. Čím více Mg^{2+} použijeme, tím bude PCR reakce probíhat volněji a hrozí nasednutí primerů i na místa, která pro ně nejsou specifická. Dalším takovýmto kritickým faktorem je tzv. *annealingová teplota* (t_a). Je to teplota fáze, při které nasedají primery a vlákno DNA. Čím vyšší tato teplota bude, tím bude PCR reakce přísnější (specifičtější). Pokud se to ovšem se specificitou reakce přežene, hrozí, že primery nenednou ani na dobře komplementární místa na DNA (tzn. bez mutací), na která nasednout mají. Optimalizace spočívá právě v takovémto empirickém zkoušení vhodných poměrů složek a podmínek pro reakci (Mg^{2+} , t_a).



Obr. 6: Cycler – přístroj pro PCR reakci (EPPENDORF Mastercycler ep Gradient 5341) (internetový zdroj č. 10)

2.2.4 Agarózová elektroforéza

Výsledný PCR produkt smícháme obvykle se 2 μ l speciální barvičky pro viditelnost na gelu a naši optickou kontrolu, abychom viděli, které jamky již máme zaplněny a které nikoli. Následně PCR produkt nanese na agarózový gel, který připravíme následovně: smícháme v příslušném poměru práškovou agarózu s roztokem TBE (jedná se vlastně o pufr, který je zároveň roztokem v elektroforézním přístroji). Vzniklý agarózový roztok krátce povaříme a lehce zchladíme, aby se neznehodnotila barvička GoldView, kterou přidáme. Jedná se o barvičku, jež se naváže na dvouřetězcovou DNA. Po ozáření UV zářením je fluorescenční,

zviditelní úseky DNA, na nichž je navázána, a můžeme pak gel s fragmenty vyfotit. GoldView je nový nekarcinogenní způsob barvení molekuly DNA. Dříve se k barvení DNA používal ethidium bromid (EtBr), který je však silným mutagenem pro organismus a při jeho používání se musí dbát vysokých nároků na ochranu zdraví pracovníků. Gel po přidání GoldView důkladně promícháme a nalijeme do formy s příslušným hřebenem, který nám vytvoří požadované jamky pro nanesení PCR produktu. Gel přikryjeme kartónem, alobalem či jiným neprůsvitným materiálem, jelikož barvička světlem degraduje, a ponecháme asi 20 minut ztuhnout. Do každé jamky pipetujeme obvykle 5 μ l PCR produktu a do krajní jamky nanese taktéž 5 μ l žebříku (ladder), který je komerčně vyráběn a umožní nám pohodlné odečtení velikosti jednotlivých fragmentů na výstupním snímku elektroforézového gelu. Jakmile máme gel takto připravený, přiklopíme elektroforézni přístroj a spustíme elektroforézu (Obr. 7). Po skončení elektroforézy vyjmeme gel a dáme ho do přístroje, ve kterém je ozářen UV zářením, vyfocen a můžeme jeho obraz vytisknout. Tímto získáme výsledný výstupní materiál, ze kterého odečteme velikosti jednotlivých fragmentů. Jelikož velikosti fragmentů pro jednotlivé druhy hlodavců jsou již známé, protože jsou ohraničeny známými konkrétně nadesignovanými primery, můžeme od sebe rozlišit jednotlivé porovnávané druhy hlodavců.

Pro jasné a nezaměnitelné odečtení fragmentů DNA z gelu, musí být od sebe dostatečně dobře odděleny. Je tedy potřeba správně optimalizovat i nastavení elektroforézy. Jde konkrétně o rychlost, kterou jednotlivé fragmenty v elektrickém poli putují, což se reguluje **hustotou gelu**, velikostí **napětí** a **časem**, po který se elektrické pole nechá působit. Čím pomaleji naamplifikované PCR produkty gelem putují (hustší gel, nižší napětí a přiměřeně delší čas), tím výrazněji se rozdělí.



Obr. 7: Přístroj pro elektroforézu (internetový zdroj č. 11)

2.3 Metodika ověření funkčnosti zoptimalizovaných PCR testů

Jakmile jsou podmínky testů již zoptimalizované, je nezbytné odzkoušet jejich funkčnost. To provedeme tak, že za stejných (optimálních) podmínek provedeme test znovu, tentokrát však na jiných, dosud netestovaných zvířatech, nejlépe z co nejširší geografické oblasti, aby se zahrnuli i jedinci dostatečně vzdálení, a tudíž s vyšší pravděpodobností mutace na vazebných místech pro druhově specifické primery na cytochromu b. Čtyři jedinci použité při optimalizaci testu zde vystupují jako kontrola. Pokud vyjdou výsledky dobře, je jisté, že tyto testy jsou již zoptimalizované, a že je lze takto využívat v praxi.

Druhá příslušnost materiálu použitého pro odzkoušení funkčnosti testu byla již dříve co nejpřesněji určena pomocí morfologických odlišností na lebce (v případě myši rodu *Mastomys* a *Praomys* – 78 jedinců; Příloha 2), nebo pomocí karyologického vyšetření (v případě dvou kryptických druhů rodu *Arvicanthis* – 56 jedinců; Příloha 3).

3. Výsledky

3.1 Optimalizace PCR testu

3.1.1 Test pro odlišení druhů rodu *Mastomys* a *Praomys*

Pro optimalizaci testu pro rozlišení druhů rodu *Mastomys* a *Praomys* bylo provedeno celkem 14 PCR. Po všech těchto reakcích, ve kterých se zkoušely různé reakční podmínky, vzešel test s následujícími optimálními koncentracemi složek: primer MastoPrao F217 (0,30 μM), primery MastoPrao R517, Mery R562, Pdaltoni R603 a Prostratus R955 (0,15 μM), nukleotidy dNTPs (0,30 mM), pufr (1x), MgCl_2 (3,00 mM), 1 jednotka Taq polymerázy a 1 μl DNA.

Pro samotnou PCR reakci jsou nejvhodnější tyto parametry: 3 min při 94°C, 33 cyklů (30 s při 94°C, 30 s při 56°C a 45 s při 72°C) a 10 min při 72°C.

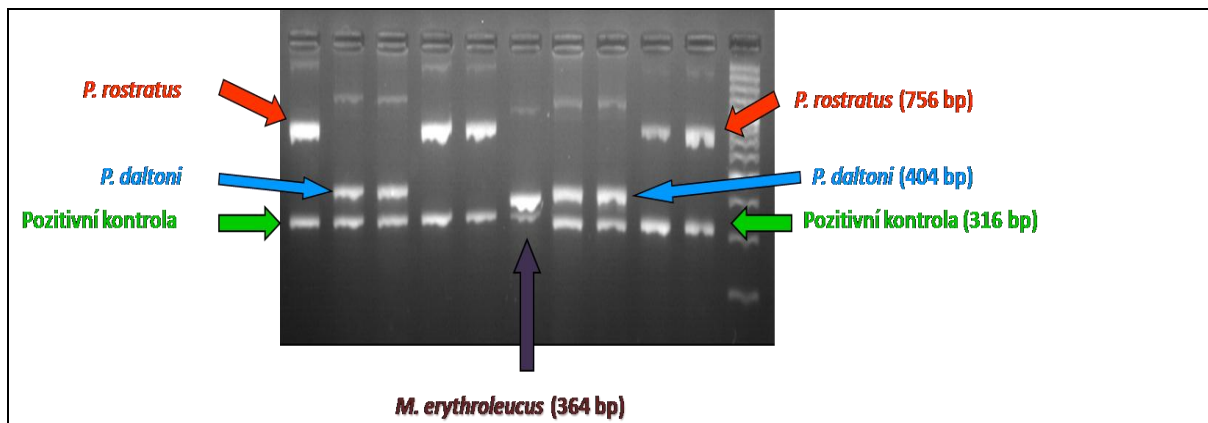
Finální PCR produkt byl přenesen na elektroforézový gel (4%) a elektroforéza probíhala 150 min pod napětím 50 V. Na gel bylo do každé jamky nanášeno 5 μl PCR produktu. Výsledný snímek viz Obr. 8.

3.1.2 Test pro odlišení druhů rodu *Arvicanthis*

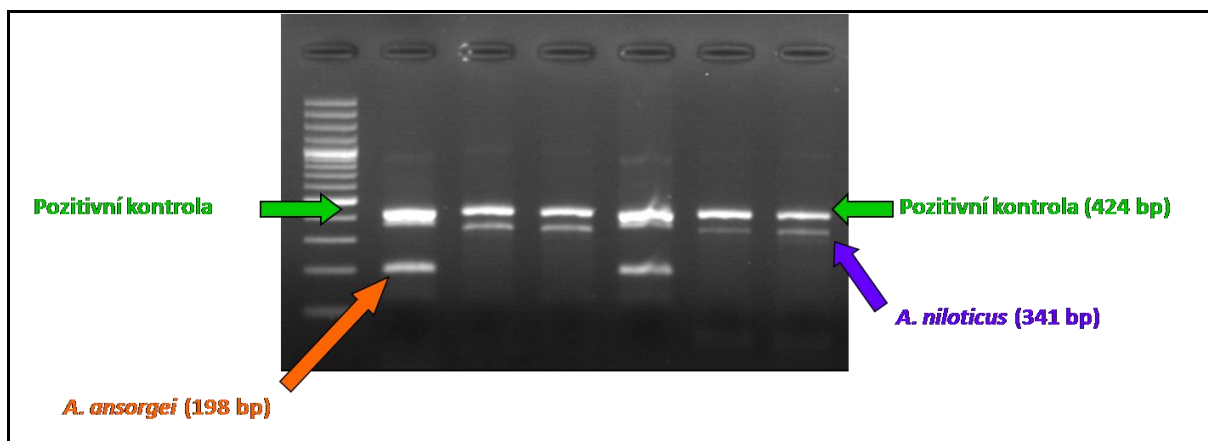
Pro optimalizaci testu pro rozlišení druhů rodu *Arvicanthis* bylo provedeno celkem 16 PCR. Jako vyhovující koncentrace složek vyšly následující: primery Asp F611 a Asp R1034 (0,30 μM), primer Ani F694 (0,40 μM), Aan R808 (0,20 μM), nukleotidy dNTPs (0,30 mM), pufr (1x), MgCl_2 (3,00 mM), Taq polymeráza (0,75 jednotky) a 1 μl DNA.

Pro samotnou PCR reakci jsou nejvhodnější tyto parametry: 3 min při 94°C, 33 cyklů (30 s při 94°C, 30 s při 54°C a 45 s při 72°C) a 10 min při 72°C.

Finální PCR produkt byl přenesen na elektroforézový gel (2%) a elektroforéza probíhala 60 min pod napětím 70 V. Na gel bylo do každé jamky nanášeno 5 μl PCR produktu. Výsledný snímek viz Obr. 9.



Obr. 8: Výsledný snímek z elektroforézového gelu pro rody *Mastomys* a *Praomys*. U všech jedinců je naamplifikovaná pozitivní kontrola, což značí úspěšný průběh PCR reakce. Dále jsou zde specifické fragmenty pro *P. rostratus*, *P. daltoni* a *M. erythroleucus*. Všechny vzdálenosti jsou uvedené v jednotce bp, neboli base-pairs (párů bází). Sloupec úplně napravo je tzv. žebřík (ladder), který slouží k pohodlnému odečtení jednotlivých vzdáleností. Zleva doprava: NK814, NK815, NK816, NK828, NK851, NK922, NK765, NK800, NK812, NK813.



Obr. 9: Výsledný snímek z elektroforézového gelu pro rod *Arvicanthis*. U všech jedinců je úspěšně naamplifikovaná pozitivní kontrola. Dále jsou zde specifické fragmenty pro *A. niloticus* a *A. ansorgei*. Všechny vzdálenosti jsou v jednotce bp, neboli base-pairs (párů bází), a úplně vlevo je žebřík. Zleva doprava: M4174, DIA41, DIA47, M4397, DIA42, DIA40.

3.2 Funkčnost zoptimalizovaných PCR testů

3.2.1 Izolace DNA

Při zpracovávání této práce byly použity 2 různé metody izolace DNA. Prvním, jednodušším způsobem, je tzv. dvoukroková izolace (viz kap. 2.2.1). Touto metodou bylo z celkového počtu 234 izolací provedeno 123 izolací (Tab. 3).

Druhým typem prováděné izolace byla tzv. izolace přes kolonky (viz příloha 4). Z celkového počtu izolací bylo touto metodou provedeno 111 izolací (Tab. 3).

Tab. 3: Proporce provedených izolací DNA

Typ izolace	Počet izolací	Proporce ze všech izolací
dvoukroková	123	52,6 %
přes kolonky	111	47,4 %
celkem	234	100,0 %

Při izolaci 52 vzorků pro rod *Arvicanthis* dvoukrokovou metodou vycházely z takto izolovaných DNA opakovaně nezřetelné výsledky PCR testu.

3.2.2 Test pro odlišení druhů rodu *Mastomys* a *Praomys*

Test pro rozlišení druhů rodu *Mastomys* a *Praomys* byl proveden celkem na 74 zvířatech (bez pozitivní kontroly). Z tohoto počtu vzešlo 8 zvířat určených odlišně od původního určení podle morfologických znaků (zejm. lebečních). Faktem je, že *P. rostratus* byl určen vždy bezchybně, ale 5 *P. daltoni* bylo určeno jako *M. erythroleucus* a 3 *M. erythroleucus* bylo určeno naopak jako *P. daltoni*. Přehled počtu zvířat určených testem ve srovnání s předešlým určením podle morfologických znaků ukazuje Tab. 4.

Tab. 4: Srovnání morfologického určení s určením PCR testem u rodů *Mastomys* a *Praomys*. Tabulka zobrazuje počty jedinců příslušného druhu ve srovnání s určením druhu dle PCR testu. Na spojnici dvou druhů vidíme, kolik jedinců jako tento druh určil PCR test a jakými příslušníky druhu jsou ve skutečnosti.

Druh	Druhovú příslušnost dle PCR testu		
	<i>M. erythroleucus</i>	<i>P. daltoni</i>	<i>P. rostratus</i>
<i>M. erythroleucus</i>	30	3	0
<i>P. daltoni</i>	5	28	0
<i>P. rostratus</i>	0	0	8
celkem	35	31	8

3.2.3 Test pro odlišení druhů rodu *Arvicanthis*

Test pro rozlišení druhů rodu *Arvicanthis* byl proveden celkem na 55 zvířatech (bez pozitivní kontroly) tohoto rodu. Žádné zvíře nebylo chybně určeno, pouze dva jedinci pocházející z Čadu nebyli určeni vůbec. Ta nejsou započítána do Tab. 5, která opět ukazuje na počty zvířat určených testem ve srovnání s předešlým určením pomocí chromozomálních znaků.

Tab. 5: Srovnání karyologického určení s určením PCR testem u rodu *Arvicanthis*. Tabulka zobrazuje počty jedinců příslušného druhu ve srovnání s určením druhu dle PCR testu. Na spojnici dvou druhů vidíme, kolik jedinců jako tento druh určil PCR test a jakými příslušníky druhu jsou ve skutečnosti.

Druh	Druhovú příslušnost dle PCR testu	
	<i>A. ansorgei</i>	<i>A. niloticus</i>
<i>A. ansorgei</i>	14	0
<i>A. niloticus</i>	0	39
celkem	14	39

4. Diskuze

Především je nutné říci, že při vyzkoušení PCR testu byly použity dva nejběžněji používané typy izolace DNA. Při optimalizování testů se zjistilo, že mnohem lepší a výhodnější je používat metodu izolace přes kolonky. A to nejpravděpodobněji z toho důvodu, že PCR reakce je velice citlivou a specifickou reakcí, na niž může mít vliv i sebemenší množství odpadních látek, které zůstanou v roztoku vyzolované DNA při méně přesné a kvalitní izolaci (Zima a kol. 2004). Metoda dvoukrokové izolace je obvykle používána při PCR reakcích, kdy jde o naamplifikování jen jednoho PCR produktu, nebo pokud pro víc, tak jsou použity velmi specifické a přesné primery pro jednotlivé lokusy (např. Reichard a kol. 2008). V mém případě však jde o PCR reakci, kdy je v každé konkrétní reakci přítomno více primerů a ty nasedají (popřípadě nenesedají) na konkrétní místo DNA v závislosti na druhu, ze kterého DNA pochází. Také se v jednotlivých reakcích liší specifita primerů mezi jedinci jednotlivých druhů v závislosti na regionu, ze kterého pocházejí, neboť se zde může vyskytovat více či méně mutací ve vazebných místech primerů. Proto je tedy nutná přesná a kvalitní izolace DNA. Tu provedeme metodou přes kolonky podle přílohy 4.

Obdobných testů pro rozlišení afrických hlodavců existuje velice málo, přestože pro studium ekologie této ekonomicky důležité skupiny mají velký význam. Například 4 nejběžnější druhy rodu *Mastomys*, které patří mezi nejdominantnější a tím pádem nejvýznamnější myšovitě hlodavce v subsaharské Africe (*M. coucha*, *M. erythroleucus*, *M. huberti* a *M. natalensis*) lze molekulárně rozlišit díky nedávno vyvinutému PCR testu (Lecompte a kol. 2005). Nicméně pro další, nemálo hospodářsky důležité druhy takový test chybí, přestože se často jedná o velmi si podobné nebo kryptické druhy. Test vyvíjený v rámci této studie tuto mezeru zaplňuje. Pro 3 velmi si podobné druhy vyskytující se v oblastech západní Afriky v lesnatějších savanách a lesích galeriového typu (*Mastomys erythroleucus*, *Praomys daltoni* a *P. rostratus*) žádný test dosud neexistoval a konkrétní druhy se od sebe museli rozlišovat pomocí morfologických znaků na celém těle a lebce. Při takovém určování hrozí poměrně velké riziko nechybné determinace, zejména pokud člověk nemá s takovýmto určováním dlouholeté zkušenosti, jen velmi těžko tyto druhy na základě morfologických znaků rozliší. Což je ještě komplikovanější v případě, když se jedná o nedospělé (juvenilní a subadultní) jedince. Mnohem komplikovanější je situace u dvou kryptických druhů rodu *Arvicanthis*, které patří k největším škůdcům na polích v subsaharské Africe (Ducroz a kol. 1998). Tyto druhy (*A. niloticus* a *A. ansorgei*) se v jižním a centrálním Senegalu a Mali vyskytují na stejných stanovištích, přičemž jejich rozlišení bez karyologického či molekulárního přístupu prakticky nemožné. Proto je velmi užitečné, že takovýto nový test založený na analýze molekuly DNA pro tyto druhy vznikl.

Při testování funkčnosti 1. testu na 74 zvířatech rodu *Mastomys* a *Praomys* se zjistilo, že některé druhy byly testem určeny jinak, než bylo určeno dříve (Tab. 4). Všechna tato zvířata byla totiž již dříve určena pomocí morfologických znaků, především podle tvaru lebky. Takovýchto zvířat, která byla testem určena jinak, je celkem 8. Tato nestejná determinace může pramenit z několika příčin. Zprvu: příčinou odlišného určení by mohla být také špatně vyzolovaná molekula DNA, která by neumožnila amplifikace žádného, tedy ani kontrolního fragmentu, při PCR reakci. Kontrolní proužek se však na výsledném

elektroforézovém gelu objevil a reakce s vyizolovanou DNA tedy v pořádku proběhla, a toto vysvětlení můžeme odmítnout. Další možnou příčinou je, že PCR test pro tyto jedince nefungoval, a to z toho důvodu, že právě ve vazebném místě konkrétního specifického primeru došlo k mutaci. To by se mohlo projevovat zejména u jedinců z geograficky vzdálenějších oblastí, než pocházejí čtyři zvířata, na kterých byl test optimalizován, protože čím je tato vzdálenost větší (čím odlišnější jsou vzdálenější populace), tím vyšší je pravděpodobnost mutace ve vazebném místě. Tito PCR testem odlišně určení jedinci však pocházejí ze stejných nebo blízkých lokalit jako ostatní jedinci a tím je pravděpodobnost této příčiny snížena, nicméně vyloučit ji nemohu. Také zjištění, že tyto problematictí jedinci jsou určeni jako druhý druh (tedy že se amplifikuje DNA fragment specifický pro druhý druh) podporuje spíše následující vysvětlení, než že by došlo k mutaci ve vazebném místě pro primer specifický pro první původně navržený druh (to by na výsledném gelu nebyl spíše žádný specifický fragment DNA). Třetím možným vysvětlením odlišné determinace těchto osmi jedinců je, že podle morfologických znaků byli původně chybně determinováni a jejich druh je správně určen PCR testem. Tuto možnost by podpořilo i zjištění, že se toto chybné přiřazení druhu nikdy neudálo pro druh *P. rostratus*, ten je totiž od ostatních testovaných o něco lépe rozlišitelný na základě morfologie (Tab. 4), na rozdíl od druhů *M. erythroleucus* a *P. daltoni*, které jsou velmi obtížně odlišitelní i podle lebečních kritérií, a tudíž lehce zaměnitelní (A. Konečný, ústní sdělení). Jediným skutečně věrohodným řešením, jak rozhodnout mezi dvěma naposledy zmíněnými možnostmi je *osekvenování*₁₀ části cytochromu b a porovnání se sekvencemi u známých druhů (zejména vazebných oblastí pro druhově specifické primery).

Při zjišťování funkčnosti 2. testu na 55 zvířatech rodu *Arvicanthis* nedošlo ke stejné situaci jako u předešlého testu, tedy že by pomocí testu byla zvířata určena jinak než byla stanovena dříve. V tomto případě byla totiž jejich druhová příslušnost stanovena karyologicky, tedy na základě odlišností v počtu a tvaru chromozomů, což výrazně snižuje chybu při druhové determinaci. Nicméně i zde došlo k zajímavé situaci, kdy u dvou jedinců (M4134 a M4159) z národního parku Zakouma (z Čadu, tedy z geograficky dosti vzdálené oblasti, než pocházejí jedinci, na kterých byl test optimalizován; Obr. 3) nebylo ani po několika opakovaných testech možno rozlišit, o jaký druh se jedná. Při PCR reakci se totiž naamplifikoval pouze úsek specifický pro rod *Arvicanthis* (kontrola), avšak žádný další specifický fragment pro některý z obou testovaných druhů. Může jít o mutaci ve vazebném místě pro specifické primery a druhově specifický fragment se tak při PCR nenaamplifikoval, čemuž by nasvědčovala i výrazná geografická vzdálenost lokalit, kde byli tyto jedinci odchyceni. Nebo také o zcela jiný druh rodu *Arvicanthis*, který se v této oblasti (centrální Afrika) může vyskytovat. Kromě *A. niloticus* je totiž z této oblasti znám jiný dosud nepopsaný druh tohoto rodu, který byl rozlišen na základě velmi rozdílného karyotypu u jedince pocházejícího ze Středoafričké republiky (Ducroz a kol. 1998, Volobouev a kol. 2002). Vzhledem k tomu, že čadská populace není daleko od Středoafričké republiky, je možné, že se jedná o tento „záhadný“ druh. Karyologické vyšetření, které u těchto dvou jedinců bylo provedeno by ovšem mělo potvrdit, o který druh se jedná, když je známý karyotyp i u zmíněného dosud nepopsaného druhu. U těchto dvou problematických jedinců však nebylo možné karyologické vyšetření kvalitně učinit a z nejasných chromozomových fragmentů nebylo možné jednoznačně určit jejich druh (A. Konečný & L. Granjon, ústní

sdělení). Jedinou možností jak tento problém vyřešit zůstává částečné nebo ještě lépe kompletní osekvenování cytochromu b u těchto dvou nejasných jedinců a následné porovnání jejich sekvencí se známými sekvencemi pro *A. niloticus*, kteří v tomto středoafrickém regionu žijí.

Přestože se u obou testů založených na PCR objevily problémy, které však budou v nejbližší době osekvenováním cytochromu b vyřešeny, jsou oba testy funkční a umožňují odlišení velmi podobných či kryptických druhů ekonomicky a zdravotnický významných hlodavců (přínejmenším v oblasti západní Afriky). Výrazným přínosem tohoto testu je jeho jednoduchá funkčnost a možnost určení druhů z kousku tkáně (není tedy třeba zvíře usmrtit jako v případě karyologického či morfologického vyšetření lebky), a tedy i u dobře zachovalých muzejních exponátů.

5. Závěr

Tématem této práce bylo optimalizovat nový molekulární test založený na PCR (polymerázová řetězová reakce) pro rozlišování vybraných, převážně kryptických, druhů západoafrických hlodavců. Ti se dosud mohli rozlišovat jen pomocí morfologických (zejména lebečních) a karyologických znaků, což je komplikované a ne vždy stoprocentní. Proto je velmi užitečné, když takové nové testy založené na moderních laboratorních metodách vznikají; obzvláště když se jedná o ekonomicky či medicínsky významné druhy.

Při zpracovávání této práce byly použity dva typy izolace, z čehož vyplynulo, že pro tak specifickou reakci, jako je PCR, je nutné používat pouze kvalitně vyizolovanou DNA bez vedlejších příměsí, čehož docílíme izolací „přes kolonky“.

Optimalizace testů byla provedena několika opakujícími se PCR reakcemi s různými koncentracemi jednotlivých složek a za různých reakčních podmínek (zejména teplota nasedání primerů na matricovou molekulu DNA). Nakonec byla odzkoušena účinnost testu na větším počtu dříve určených (morfologicky nebo karyologicky) zvířatech z různých lokalit západní Afriky.

Výsledkem jsou dva optimalizované PCR testy pro rozlišení jednak druhů rodu *Mastomys* a *Praomys* (*M. erythroleucus*, *P. daltoni* a *P. rostratus*) a pak také dvou kryptických druhů rodu *Arvicanthis* (*A. ansorgei*, *A. niloticus*). Účinnost testů byla téměř stoprocentní, přičemž u několika málo odlišně určených jedinců šlo pravděpodobně o chybnou determinaci pomocí morfologických znaků, případně o mutace v oblasti navázání specifických primerů u geograficky vzdálených populací. Proto jsou tyto testy vhodné zejména na odlišení jedinců ze západní Afriky (zejména států Senegal a Mali) a každá další aplikace na vzdálenější populace musí být pečlivě ověřena, nejlépe osekvenováním genu pro cytochrom b u několika jedinců.

Hlodavci rodů *Mastomys*, *Praomys* a *Arvicanthis* patří mezi nejběžnější původní druhy v zemích západní Afriky, což s sebou nese řadu negativních důsledků pro lidskou společnost (významné škody v zemědělství a při uskladnění potravin, ohniska a přenos nemocí nebezpečných pro člověka). Tyto PCR testy jsou proto vhodným základem a zjednodušením veškerého dalšího výzkumu těchto pro člověka důležitých živočichů.

6. Použitá literatura

Seznam použité literatury

- ANDĚRA, M. & HORÁČEK, I. *Poznáváme naše savce*. 2. vyd. Praha: Sobotales, 2005. ISBN 80-86817-08-3
- DUCROZ, J.-F., VOLOBOUEV, V. & GRANJON, L. A molecular perspective on the systematics and evolution of the genus *Arvicanthis* (Rodentia, Muridae): Inferences from complete cytochrome b gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1998, č. 10, str. 104-117
- EHRlich, P. R. & RAVEN, P. H. Differentiation of populations. In FLEGR, J. *Evoluční biologie*. Praha: Academia, 2005, s. 370
- FLEGR, J. *Evoluční biologie*. 1. vyd. Praha: Academia, 2005. ISBN 80-200-1270-2
- HANZÁK, J. *Naši savci*. 1. vyd. Praha: Albatros, 1970. ISBN 859-4-504-2042-7
- KONEČNÝ, A. Consequences of anthropogenic changes on rodent communities and populations: study cases on native and introduced species in Eastern Senegal. *Disertační práce*, Montpellier, 2009, počet stran 245
- LECOMPTE, E. a kol. Molecular identification of four cryptic species of *Mastomys* (Rodentia, Murinae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 2005, č. 33, str. 681-689
- MAYR, E. The growth of biological thought. In FLEGR, J. *Evoluční biologie*. Praha: Academia, 2005, s. 375
- PATERSON, H. E. H. The recognition concept of species. In FLEGR, J. *Evoluční biologie*. Praha: Academia, 2005, s. 378
- PRIMACK, R. B., KINDELMANN, P. & JERSÁKOVÁ, J. *Biologické principy ochrany přírody*. 1. vyd. Praha: Portál, 2001. ISBN 80-7178-552-0
- REICHARD, M., SMITH, C. & BRYJA, J. Seasonal change in the opportunity for sexual selection. *Molecular Ecology*, 2008, č. 17, str. 642-651
- ROSYPAL, S. a kol. *Nový přehled biologie*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2003. ISBN 978-80-86960-23-4
- SIMPSON, G. G. The species complex. In FLEGR, J. *Evoluční biologie*. Praha: Academia, 2005, s. 380
- TRUETT, G.E. a kol. Preparation of PCR quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *BioTechniques*, 2000, č. 29, str. 52-54
- VOLOBOUEV, V. T. a kol. Chromosomal characterization of *Arvicanthis* species (Rodentia, Murinae) from western and central Africa: implications for taxonomy. *Cytogenetic and Genome Research*, 2002, č. 96, str. 250-260
- ZIMA, J. a kol. *Genetické metody v zoologii*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0795-6

Seznam zdrojů z internetu

- 1 http://cs.wikipedia.org/wiki/Druh_%28biologie%29
- 2 <http://www.21stoleti.cz/view.php?cisloclanku=2009031919>
- 3 <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id94943/>
- 4 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs179/en/>
- 5 <http://www.casopis.ochranaprirody.cz/Vyzkum-a-dokumentace/ochrana-hlodavcu-na-okraji-pozornosti.html>
- 6 <http://www.savci.upol.cz/hlodavci.htm>
- 7 <http://cs.wikipedia.org/wiki/Hlodavci>
- 8 <http://cs.wikipedia.org/wiki/Cytochrom>
- 9 <http://polymerase-retezova-reakce.navajo.cz/polymerase-retezova-reakce-2.png>
- 10 http://www.labcommerce.com/labequip_productdesc.php?catid=53&prodid=1563
- 11 <http://www.top-bio.cz/kat-info.asp?kat=9>

7. Slovníček

1. nika – je souhrn všech faktorů prostředí, které na organismus působí a zahrnuje i vztahy, které organismus využívá ke svému životu
2. karyologie – nauka o struktuře a funkci buněčného jádra
3. speciace – je evoluční proces vzniku nových biologických druhů
4. in vitro – z latinského překladu „ve skle“, v přeneseném slova smyslu pak znamená ve zkumavce či jiném laboratorním skle (může zahrnovat i plastové zkumavky)
5. žebřík (ladder) – představuje stupnici různě velkých přesně definovaných DNA fragmentů, které slouží pro pohodlné odečtení vzdáleností na gelu; výrazné jsou 500 bp a 1000 bp
6. nadesignovány – byly již dříve nalezeny a „vyrobeny“ na základě známých sekvencí genů
7. sekvence – sekvence DNA či genetická sekvence je posloupnost písmen představující primární strukturu reálné nebo hypotetické molekuly či vlákna, které mají schopnost nést informaci
8. strip – stripem se v této práci myslí řada (obvykle 8) zkumavek o objemu 200 μ l
9. cycler – je laboratorní zařízení používané pro namnožení přesně definovaných fragmentů DNA pomocí procesu PCR; přístroj je vybaven termálním blokem s otvory, do kterých se vloží stripy. Cycler pak snižuje a zvyšuje teplotu bloku v přesně naprogramovaných krocích
10. osekvenování – znamená použít biochemické metody pro zjištění pořadí nukleových bází (A, C, T, G) v sekvencích DNA

8. Přílohy

1 Fotografie hlodavců



Praomys rostratus, Foto: Jaroslav Červený



Praomys daltoni, Foto: Jaroslav Červený



Mastomys erythroleucus, Foto Jaroslav Červený



Arvicanthis ansorgei, Foto: Jaroslav Červený

2 Použitý materiál *Mastomys/Praomys*

Kód zvířete	Rod	Druh	Lokalita	Kód lokality	Země	Výsledek testu
NK1004	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Wassadou	WAS	Senegal	Mery
NK1035	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Ceiba	CEI	Senegal	Mery
NK1036	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Ceiba	CEI	Senegal	Mery
NK1240	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	SIMLK	SML	Senegal	Pdal
NK1242	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	SIMLK	SML	Senegal	Pdal
NK1244	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	SIMLK	SML	Senegal	Pdal
NK1245	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	SIMLK	SML	Senegal	Mery
NK1246	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	SIMLK	SML	Senegal	Mery
NK127	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Lingué Kountou	LIK	Senegal	Mery
NK1281	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Niokolo	NIO	Senegal	Mery
NK1285	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Niokolo	NIO	Senegal	Pdal
NK1319	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Mako	MAK	Senegal	Pdal
NK1320	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Mako	MAK	Senegal	Pdal
NK1342	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Mako - camp	MAKc	Senegal	Pdal
NK1395	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Dienoudiala	DIE	Senegal	Pdal
NK1407	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	DSDK	DSD	Senegal	Mery
NK1408	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	DSDK	DSD	Senegal	Mery
NK1413	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Ceiba	CEI	Senegal	Mery
NK1430	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Dar Salam	DSA	Senegal	Pdal
NK145	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Lingué Kountou	LIK	Senegal	Pdal - kontrola
NK150	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Lingué Kountou - bamboo	LIKb	Senegal	Pdal - kontrola
NK158	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Madina Kouta	MKO	Senegal	Mery
NK159	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Madina Kouta	MKO	Senegal	Mery
NK160	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Madina Kouta	MKO	Senegal	Mery
NK163	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Madina Kouta	MKO	Senegal	Pdal
NK1790	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Mont Assirik	MAS	Senegal	Pdal
NK1791	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Mont Assirik	MAS	Senegal	Pdal
NK1922	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Ceiba	CEI	Senegal	Mery
NK3	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Mont Assirik	MAS	Senegal	Pdal
NK30	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Lingué Kountou	LIK	Senegal	Mery
NK40	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Simenti	SIM	Senegal	Mery
NK494	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Lingué Kountou	LIK	Senegal	Mery
NK502	<i>Praomys</i>	<i>rostratus</i>	Gué de Sambailo	GDS	Senegal	Pros
NK503	<i>Praomys</i>	<i>rostratus</i>	Gué de Sambailo	GDS	Senegal	Pros
NK504	<i>Praomys</i>	<i>rostratus</i>	Gué de Sambailo	GDS	Senegal	Pros
NK505	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Gué de Sambailo	GDS	Senegal	Pdal
NK507	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Gué de Sambailo	GDS	Senegal	Mery
NK513	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Gué de Sambailo	GDS	Senegal	Mery
NK515	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Oubadji	OUB	Senegal	Pdal
NK516	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Oubadji	OUB	Senegal	Mery

Kód zvířete	Rod	Druh	Lokalita	Kód lokality	Země	Výsledek testu
NK517	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Oubadji	OUB	Senegal	Pdal
NK518	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Oubadji	OUB	Senegal	Pdal
NK519	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Dalaba	DAL	Senegal	Pdal
NK631	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Dar Salam	DSA	Senegal	Mery
NK632	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Dar Salam	DSA	Senegal	Pdal
NK634	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Diala Koto	DIK	Senegal	Pdal
NK635	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Diala Koto	DIK	Senegal	Pdal
NK639	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Dar Salam	DSA	Senegal	Mery
NK640	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Dar Salam	DSA	Senegal	Mery
NK641	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Dar Salam	DSA	Senegal	Mery
NK644	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Dar Salam	DSA	Senegal	Mery
NK647	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Dar Salam	DSA	Senegal	Mery
NK648	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Dar Salam	DSA	Senegal	Mery
NK650	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Dar Salam	DSA	Senegal	Pdal
NK66	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Simenti	SIM	Senegal	Mery
NK67	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Simenti	SIM	Senegal	Pdal
NK691	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Dar Salam	DSA	Senegal	Mery
NK692	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Dar Salam	DSA	Senegal	Mery
NK740	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Diala Koto	DIK	Senegal	Mery
NK749	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Badi	BAD	Senegal	Pdal
NK750	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Badi	BAD	Senegal	Pdal
NK751	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Camp du Lion	CDL	Senegal	Mery
NK752	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Camp du Lion	CDL	Senegal	Mery
NK753	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Camp du Lion	CDL	Senegal	Pdal
NK765	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Simenti	SIM	Senegal	Pdal
NK800	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Lingué Kountou	LIK	Senegal	Pdal
NK812	<i>Praomys</i>	<i>rostratus</i>	Dindéfélo-Dandée	DIND	Senegal	Pros
NK813	<i>Praomys</i>	<i>rostratus</i>	Dindéfélo-Dandée	DIND	Senegal	Pros
NK814	<i>Praomys</i>	<i>rostratus</i>	Dindéfélo-Dandée	DIND	Senegal	Pros
NK815	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Dindéfélo	DIN	Senegal	Pdal
NK816	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Dindéfélo	DIN	Senegal	Pdal
NK828	<i>Praomys</i>	<i>rostratus</i>	Dindéfélo-Dandée	DIND	Senegal	Pros
NK851	<i>Praomys</i>	<i>rostratus</i>	Dindéfélo	DIN	Senegal	Pros
NK888	<i>Praomys</i>	<i>rostratus</i>	Dindéfélo	DIN	Senegal	Pros - kontrola
NK90	<i>Praomys</i>	<i>daltoni</i>	Simenti	SIM	Senegal	Pdal
NK91	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Simenti	SIM	Senegal	Mery - kontrola
NK922	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Tambacounda	TAM	Senegal	Mery
NK923	<i>Mastomys</i>	<i>erythroleucus</i>	Tambacounda	TAM	Senegal	Mery

Tabulka ukazuje stručný přehled nejdůležitějších informací nachytném materiálu rodu *Mastomys* a *Praomys*, který byl použit v této práci. Kódy lokalit odpovídají kódům lokalit v mapě (Obr. 2).

3 Použitý materiál *Arvicanthis*

Kód zvířete	Rod	Druh	Lokalita	Kód lokality	Země	Výsledek testu
M4169	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Dialo	DIA	Mali	Ani - kontrola
M4251	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Débaré	DÉB	Mali	Aan - kontrola
M5240	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Abeibara	ABE	Mali	Ani - kontrola
M4375	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Tombané	TOM	Mali	Aan - kontrola
KM1099	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Famalé	FAM	Niger	Ani
KM1097	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Famalé	FAM	Niger	Ani
KM1100	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Famalé	FAM	Niger	Ani
M5678	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Niassan	NIA	Burkina Faso	Ani
M5659	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Niassan	NIA	Burkina Faso	Ani
BTG59	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Bintagoungou	BIN	Mali	Ani
M5629	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Bintagoungou	BIN	Mali	Ani
NK649	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Dar Salam	DSA	Senegal	Aan
NK687	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Dar Salam	DSA	Senegal	Aan
M5644	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Karfiguéla	KAR	Burkina Faso	Aan
M5662	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Karfiguéla	KAR	Burkina Faso	Aan
M5675	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Karfiguéla	KAR	Burkina Faso	Aan
M5295	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Tilola	TIL	Niger	Ani
M4134	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Zakouma (P.N.)	ZAK	Čad	?
M4159	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Zakouma (P.N.)	ZAK	Čad	?
KM1035	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Ansongo	ANS	Mali	Ani
KM1037	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Ansongo	ANS	Mali	Ani
M4967	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Baguineda	BAG	Mali	Aan
M5173	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Baguineda	BAG	Mali	Aan
M4666	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Balamansala	BAL	Mali	Aan
M5647	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Bintagoungou	BIN	Mali	Ani
M4060	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Boulou	BOU	Mali	Ani
M4249	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Débaré	DÉB	Mali	Aan
M4185	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Dialo	DIA	Mali	Ani
M4188	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Diéma	DIÉ	Mali	Ani
M4626	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Farabougou	FAR	Mali	Ani
M5363	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Farabougou	FAR	Mali	Ani
M4680	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Gono	GON	Mali	Ani
M4771	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Gono	GON	Mali	Ani
M4065	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Makana	MAK	Mali	Ani
M4179	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Maréna	MAR	Mali	Ani
M5367	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Niono	NIO	Mali	Ani
KM1072	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Ouatagouna	OUA	Mali	Ani
KM1075	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Ouatagouna	OUA	Mali	Ani
M3739	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Samaya	SAM	Mali	Aan
M3741	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Samaya	SAM	Mali	Aan

Kód zvířete	Rod	Druh	Lokalita	Kód lokality	Země	Výsledek testu
M5639	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	San	SAN	Mali	Ani
M5660	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	San	SAN	Mali	Ani
M4247	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Sare Mama	SRM	Mali	Ani
M4830	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Sare Mama	SRM	Mali	Ani
M4399	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Sare Mama	SRM	Mali	Ani
M5619	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Séniena	SÉN	Mali	Aan
M5642	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Sibyla	SIB	Mali	Ani
M5686	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Sibyla	SIB	Mali	Ani
M4174	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Tabakoto-fitini	TAF	Mali	Aan
DIA41	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Tanda	TAN	Mali	Ani
DIA47	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Tanda	TAN	Mali	Ani
M5287	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Tidermène	TID	Mali	Ani
M5305	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Tidermène	TID	Mali	Ani
M4589	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Tirna	TIR	Mali	Ani
M4649	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Tirna	TIR	Mali	Ani
M4397	<i>Arvicanthis</i>	<i>ansorgei</i>	Tombané	TOM	Mali	Aan
DIA42	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Tanda	TAN	Mali	Ani
DIA40	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Tanda	TAN	Mali	Ani
BTG58	<i>Arvicanthis</i>	<i>niloticus</i>	Bintagoungou	BIN	Mali	Ani

Tabulka ukazuje stručný přehled nejdůležitějších informací o nachytném materiálu rodu *Arvicanthis*, který byl použit v této práci. Kódy lokalit odpovídají kódům lokalit v mapě (Obr. 3).

4 Protokol pro provedení izolace DNA přes kolonky

JETQUICK Tissue DNA Spin Kit

Protocol Handbook

Cat. No.'s: 450 050 (50 preparations)
 450 250 (250 preparations)

GENOMED GmbH

Poststrasse 22

D-32584 Löhne

Germany

Phone: +49 – (0)5732 – 904 700

Fax: +49 – (0)5732 – 904 7010

Email: techservice-genomed@gmx.net

Web: www.genomed-dna.com

Purification of genomic DNA from tissue samples with JETQUICK (Revised Version)

This protocol is a modification of the method published by Bowtell (1987).¹ The procedure was adapted to the JETQUICK system. The major advantages are high speed and the opportunity to process many samples in parallel. A disadvantage is maybe the rather "rough" treatment of the high-molecular weight DNA because of shearing forces occurring during this procedure. Having this in mind, one cannot expect DNA's with a major size of > 200 kb. The average size of the JETQUICK-prepared DNA will be approximately 50 kb. But because a main application for the JETQUICK-purified DNA is its subsequent use in PCR, the partial degradation will be even an advantage, because the DNA will act better as a template.

During the development of the JETQUICK system it became clear that the spin columns are susceptible against overloading. For this reason it is of utmost importance **not to overload** the JETQUICK spin columns. We recommend the following amounts of staining material for different types of tissue:

- Brain, Lung, Heart, Kidney 25 - 30 mg.
- Liver, Spleen 10 - 20 mg.
- Mouse tail 0,8 - 1,2 cm.

This protocol purifies all types of DNA from the respective tissue samples. This includes mitochondrial DNA.

It should be easily possible to adapt this protocol to the isolation of DNA from other animal tissue samples, blood or other body fluids, bacteria, fungi, insects or virus particles.

Part A: Processing of the tissue sample

Prepare the proteinase K and RNase A as stated on the respective labels!

- 1.) Cut the tissue sample into small pieces with a scalpel or freeze the tissue in liquid nitrogen and grind it to a fine powder with a mortar and pestle. The tissue powder should be as fine as possible. Be careful not to spill pieces of your tissue sample on the bench. *The material should be as fine as possible to ensure an optimal lysis during the next step.*
- 2.) Add 200 µl of Buffer T1 to the homogenized sample from step 1 in a 1.5 ml- or 2 ml reaction vessel (i.e. Eppendorf).

Buffer T1: Contains a detergent. Handle with care! Wear protective labwear (lab coat, gloves, safety goggles).

Mix buffer and sample thoroughly by inverting the reaction vessel several times. The mixture should be as homogeneous as possible!

¹Bowtell, D.L., 1987: Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Anal. Biochem.* 162: 463

- 3.) Add 20 µl of proteinase K (20 mg/ml) to the mixture from step 2. Mix thoroughly by inverting the tube several times and incubate for at least 1-2 h at 56°C (if the tissue will not dissolve readily, this incubation can be extended to overnight at 56°C). During the incubation mix several times thoroughly by inverting to get the tissue material dissolved as good as possible. After the proteinase K digest the mixture should appear clear.

The length of the incubation depends on how well the tissue sample was initially homogenized during step 1. If there is still particular material visible after the 1-2 h incubation at 56°C (or the overnight incubation), either extend the incubation time until all material has dissolved or spin down residual material for 5 min at ≥10.000 x g (4°C). Buffer T1 lyses the nuclei and denaturates proteins (i.e. nucleases, histones). The proteinase K digests the denatured proteins into smaller fragments. Buffer T1 and proteinase K, in combination, strip the genomic DNA of all bound proteins, thus facilitating efficient removal during purification.

- 4.) **OPTIONAL** (if you want to remove cellular RNA): Add 20 µl RNase A (DNase-free, 20 mg/ml) to the cleared lysate from step 3 and incubate for a further 5 min at 37°C.

The RNase will degrade the cellular RNA. Residual RNA fragments will be removed during the subsequent JETQUICK spin column procedure.

Part B: JETQUICK Spin Column Procedure

Reconstitute buffers TX and T3 with absolute ethanol as stated on the bottles label!

- 1.) Add 200 µl Buffer T2 to the cleared lysate of the last step and mix thoroughly until you have obtained a homogeneous mixture. Incubate for 10 min at 70°C.
Buffer T2: Contains guanidine hydrochloride and a detergent. These substances are irritants. Use with proper precaution! Wear gloves and safety goggles!
- 2.) Let the mixture cool down for approximately 1 min. Then add 200 µl of absolute ethanol.
Mix quickly and very thoroughly in order to prevent a precipitation of DNA due to too high local alcohol concentrations.
Despite of proper mixing there may occur a precipitate with some tissue types at this step. If there is a visible precipitate, be sure that this is transferred together with the liquid onto the micro-spin column in the next step.
- 3.) Assemble a spin unit by fitting a JETQUICK micro-spin column into the suitable receiver tube (supplied). Transfer the mixture from step 2 into the reservoir of the micro-spin column and centrifuge for 1 min at 10.000 x g (approx. 10.600 rpm)
- 5.) Discard the flowthrough and re-combine the micro-spin column with the used receiver tube. Pipette 500 µl of reconstituted buffer TX into the reservoir of the micro-spin column and centrifuge for 1 min at 10.000 x g (approx. 10.600 rpm).

Buffer TX is a new high-salt buffer being capable of removing residual contaminations which may affect downstream applications. This high-salt wash replaces one of the two low-salt washes in the old protocol and will lead to an improved DNA purity.

- 6.) Discard the flowthrough, re-combine the micro-spin tube and the used receiver tube. Repeat step 4 with 500 µl of reconstituted buffer T3 as described above.
Buffer T3 is a low-salt buffer that changes the high-salt conditions on the silica membrane after step 4 to low-salt conditions, thereby ensuring a low salt content in the final eluate.
- 7.) Discard the flowthrough and again combine the micro-spin tube and the used receiver tube. Centrifuge for 1 min at 13,000 rpm (max. speed) to remove residual buffer T3.
It is vital to remove the ethanol-containing wash buffer as good as possible, because residual ethanol can affect subsequent enzymatic reactions (i.e. Taq DNA polymerase).
- 7.) Discard the receiver tube and insert the JETQUICK micro-spin column into a clean, sterile 1.5 ml reaction tube. To elute the DNA, pipet 200 µl prewarmed (65-70°C) elution buffer (10 mM Tris-HCl [pH 9.0] oder bidistilled water) directly onto the surface of the silica membrane, incubate for 5 min at room temperature, and centrifuge subsequently for 2 min at 13,000 rpm.
OPTIONAL: In order to increase the elution efficiency, repeat this elution step with another 200 µl of elution buffer as described. Pool both eluates.
One can alternatively try to improve the yield by re-using the first eluate for a second elution. After spinning through the first 200 µl of elution buffer, re-heat the eluate to 65-70°C and apply these prewarmed 200 µl onto the silica membrane in the micro-spin tube. Then proceed as described before. This will improve the final yield by about 15%.
IMPORTANT NOTE: Take your time and let the eluate incubate for 5 min after having applied it onto the silica membrane. This will significantly improve DNA yield.
- 8.) The eluted DNA is ready-to-use. The DNA yield is determined spectrophotometrically, where 1 A₂₆₀ unit corresponds to a concentration of 50 µg DNA/ml. The A₂₆₀/A₂₈₀ ratio of pure DNA is within a range of 1.7 and 1.9.

Purification of genomic DNA from paraffin-embedded tissue samples with JETQUICK

The JETQUICK 'Tissue' kit can be used to purify DNA from fixed tissues. The fixatives used have an influence on the yield and quality of the prepared DNA. Fixatives such as alcohols or formalin are easiest to handle. When paraffin has been used, a pre-treatment of the sample is necessary (see below). Fixatives that cause cross-linking (i.e. osmic acid) are not recommended as it can be difficult to obtain amplifiable DNA from tissues fixed with these agents.

Type and age of the sample and the quality of the fixative used have an influence on the length of the prepared DNA. On average the length of DNA isolated from fixed tissues is usually <650 bp.

During the development of the JETQUICK system it became clear that the spin columns are susceptible against overloading. For this reason it is of utmost importance **not to overload** the JETQUICK spin columns. We recommend a maximal amount of 25 – 30 mg starting material for the preparation of DNA with the buffer volumes outlined below.

Part A: Pretreatment of fixed tissues

Protocol A1: Paraffin-embedded tissue

This protocol describes the removal of paraffin by extraction with xylene. After having removed excessive fixative with ethanol, the tissue is processed according to the JETQUICK 'Tissue' protocol (see Part B).

Several customers have reported that it is **not necessary** to remove the paraffin by xylene extraction before processing. The paraffin melts during the 56°C incubation and does not affect the JETQUICK procedure. **This may not work for all types of paraffin-embedded samples**, but one may wish to try omitting the xylene-extraction protocol, since it makes the isolation procedure much simpler.

Lysis time will vary from sample to sample depending on the type of tissue processed. The DNA yields will depend both on the size and the age of the sample processed. Reduced yields compared to fresh or frozen tissues are to be expected. Therefore eluting the DNA in 50 – 100 µl of elution buffer is recommended (see below).

- 1.) Place a small section (25 – 30 mg) of paraffin-embedded tissue into a 2 ml microfuge tube with cap (not provided).
- 2.) Add 1.2 ml xylene. Vortex vigorously!
- 3.) Centrifuge at full speed for 5 min at room temperature.
- 4.) Remove the supernatant by pipetting. **Do not affect the or remove any of the pellet!**
- 5.) Add 1.2 ml of absolute ethanol to the pellet to remove residual xylene and mix gently by vortexing.
- 6.) Centrifuge at full speed for 5 min at room temperature.
- 7.) Remove the supernatant by pipetting. **Do not affect the or remove any of the pellet!**

5 Příklad protokolu pro MASTER MIX (rod *Arvicanthis*)

Arvicanthis

Date: 2010-02-21

	10	for 1 reaction	Final	Stock	Unit	Dilution
Asp_F-611	3.00	0.3	0.3	10	uM	33.33333333
Asp_R-1034	3.00	0.3	0.3	10	uM	33.33333333
Ani_F-694	4.00	0.4	0.4	10	uM	25
Aan_R-808	2.00	0.2	0.2	10	uM	50
dNTPs	3.00	0.3	0.3	10	mM	33.33333333
MgCl ₂	12.00	1.2	3	25	mM	8.333333333
buffer	10.00	1	1	10	x	10
Taq (Fermentas)	1.50	0.15	0.75	5	U/ul	
ddH ₂ O	51.50	5.15				
Master mix	90.00	9.00				
DNA		1			ul	
Total volume		10				
1	2	3	4	5	6	7

Zleva: sloupec 1 – jednotlivé složky Master Mixu, sloupec 2 – množství jednotlivých složek pro konkrétní reakci, sloupec 3 – množství jednotlivých složek pro jednu jamku stripu, sloupec 4 – koncentrace jednotlivých složek pro konkrétní reakci, sloupec 5 – koncentrace složek dodávaných od výrobce, sloupec 6 – jednotka složky, sloupec 7 – ředění složky, abychom získali potřebnou koncentraci