

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH
ZDROJOV**

2125254

**VYUŽITIE MTDNA PRI IDENTIFIKÁCI ŽIVOČÍŠNYCH
DRUHOV**

2011

Veronika Jozefíková, Bc.

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH
ZDROJOV**

**VYUŽITIE MTDNA PRI IDENTIFIKÁCI ŽIVOČÍŠNYCH
DRUHOV**

Diplomová práca

Študijný program:	Genetické technológie v agrobiológii
Študijný odbor:	4140800 Všeobecné poľnohospodárstvo
Školiace pracovisko:	Katedra genetiky a plemenárskej biológie
Školiteľ:	Doc. Ing. Anna Trakovická, PhD.
Konzultant:	Ing. Michal Gábor, PhD.

Nitra 2011

Veronika Jozefíková, Bc.

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Veronika Jozefiková vyhlasujem, že som záverečnú prácu na tému „Využitie mtDNA pri identifikáciu živočíšnych druhov“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre dňa 20.4 2011

.....

Pod'akovanie

Ďakujem svojej školiteľke pani Doc. Ing. Anne Trakovickej, PhD. a konzultantovi Ing. Michalovi Gáborovi, PhD. za pomoc, odborné vedenie, rady a pripomienky a všetkým, ktorí sa pomáhali pri vypracovaní mojej diplomovej práce.

ABSTRAKT

Cieľom našej štúdie bolo overiť použitie metódy PCR-RFLP pre rozlíšenie vzoriek DNA jednotlivých živočíšnych druhov na základe rozdielnej sekvencie mitochondriálnej DNA. Pre detekciu vybraných živočíšnych druhov sme použili špecifický úsek génu kódujúceho cytochrómu b. Izoláciu mtDNA sme vykonali z krvných vzoriek piatich živočíšnych druhov – norok americký (*Mustela vison*), fretka domáca (*Mustela putorius vison*), sviňa domáca (*Sus scrofa domesticus*), králik domáci (*Oryctolagus cuniculus*), hus domáca (*Anser anser*). Samotnú identifikáciu vybraných živočíšnych druhov sme vykonali metódou PCR-RFLP. Využitím univerzálnych primerov komplementárnych ku konzervačne uzavretej oblasti génu pre cytochróm b pri stavovcoch sme amplifikovali 359 bp fragment, ktorý v sebe zahŕňa variabilnú oblasť s veľkosťou 307 bp. Polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov bol analyzovaný pomocou reštrikčnej endonukleázy *AluI*. Na základe fragmentov, ktorých veľkosť závisela od prítomnosti alebo absencie reštrikčných miest v amplifikovanom PCR produkte sme dokázali identifikovať vybrané živočíšne druhy (*Mustela vison* – 81 bp, 109 bp, 169 bp, *Mustela putorius vison* – 169 bp, 190 bp, *Sus scrofa domesticus* – 115 bp, 244 bp, *Oryctolagus cuniculus* – 359 bp, *Anser anser* – 130 bp, 229 bp). Naše výsledky potvrdili, že samotná PCR-RFLP analýza mtDNA umožňuje rýchly a jednoduchý spôsob identifikácie živočíšnych druhov.

Kľúčové slová: mtDNA, cytochróm b, PCR – RFLP, reštrikčná endonukleáza *AluI*

ABSTRACT

The aim of study was verification using of PCR-RFLP method for discrimination DNA samples of animal species based on different sequence of mitochondrial DNA. The detection of chosen animal species was used the specific segment of gene for cytochrom b. The mtDNA was isolated from blood samples of five animal species – American mink (*Mustela vison*), Ferret (*Mustela putorius vison*), Pig (*Sus scrofa domesticus*), Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), Goose (*Anser anser*). For the discrimination of chosen animal species was used PCR-RFLP method. We amplified 359 bp fragment of cytochrom b including a variable 307 bp region by using universal primers which are complementary to conserved areas of the vertebrate mitochondrial cytochrome B gene. Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) were analysed by one restriction endonuclease *AluI*. We demonstrate identification of individual animal species on the basis of specific fragments, which sizes were dependent on the presence or absence of a restriction site of restriction endonuclease *AluI* in the PCR products for chosen animal species (*Mustela vison* – 81 bp, 109 bp, 169 bp, *Mustela putorius vison* – 169 bp, 190 bp, *Sus scrofa domesticus* – 115 bp, 244 bp, *Oryctolagus cuniculus* – 359 bp, *Anser anser* – 130 bp, 229 bp). Our results showed that PCR-RFLP analysis provided a rapid and easy method to identification of animal species.

Key words: mtDNA, cytochrom b, PCR – RFLP, restriction endonuclease *AluI*

1 Obsah

Obsah.....	6
Zoznam skratiek a značiek.....	8
Úvod.....	11
1 Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí	13
1.1 Genóm.....	13
1.1.1 Genetické mapy.....	14
1.2 Mitochondriálna DNA.....	14
1.3 Cytochrómy.....	16
1.4 Molekulárne markery.....	17
1.5 Metódy detekcie DNA markerov.....	18
1.5.1 Polymerázová reťazová reakcia.....	18
1.5.1.1 Priebeh PCR reakcie.....	19
1.5.1.2 Faktory ovplyvňujúce PCR reakciu.....	20
1.5.1.3 Variácie PCR.....	20
1.5.2 PCR – RFLP.....	22
1.5.3 RAPD.....	22
1.5.4 AFLP.....	22
1.5.5 Mikrosatelity.....	23
1.5.6 Sekvenovanie.....	23
2 Cieľ práce.....	24
3 Materiál a metódy.....	25
3.1 Biologický materiál.....	25
3.1.1 Biologická charakteristika vybraných živočíšnych druhov.....	25
3.2 Prístrojové vybavenie.....	28
3.3 Použité metódy pri izolácii DNA.....	28
3.3.1 Izolácia DNA vyoľovacou metódou podľa Millera et al. (1987).....	29
3.3.1.1 Zloženie použitých roztokov.....	29
3.3.1.2 Postup izolácie.....	30
3.3.2 Izolácia genómovej DNA z krvi pomocou komerčného kitu Nucleospin Blood (Macherey Nagel).....	31

3.4 Overenie prítomnosti DNA.....	32
3.5 PCR cytochrómu B.....	32
3.5.1 PCR – RFLP cytochrómu B restričným enzýmom <i>AluI</i>	34
3.5.2 Elektroforéza v agarózovom géli.....	34
4 Výsledky práce.....	36
4.1 Materiál.....	36
4.2 Izolácia DNA.....	36
4.3 PCR reakcia.....	36
4.4 PCR – RFLP.....	37
5 Diskusia.....	41
6 Záver.....	43
7 Zoznam použitej literatúry.....	44
Prílohy.....	49

2 Zoznam skratiek a značiek

A	adenín
AFLP	polymorfizmus dĺžky zmnožených fragmentov
ATP	adenozíntrifosfát
bp	bázové páry
C	cytozín
°C	stupeň Celzia
C ₂ H ₇ O ₂ N	octan amónný,
COX	cytochróm oxidáza
Cyt b	cytochróm b
dATP	deoxyadenozín - 5 trifosfát
dCTP	deoxycytidín – 5 trifosfát
DGGE	denaturačná gradientová gélová elektroforéza
FOR	forward - predný
dGTP	deoxyguanozín – 5 trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
dsDNA	dvojláknová DNA
dTTP	deoxytymidín – 5 trifosfát
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
G	guanín
g	gram
HCl	kyselina chlór vodíková
kb	kilo báz (1000 bázových párov)
KHCO ₃	hydrogénuhličitan draselný
M	mol
Mg	horčík
MgCl ₂	chlorid horečnatý
min	minúta

ml	mililiter
Mn	mangán
mmol	milimol
mtDNA	mitochondriálna DNA
N	dusík
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	nanogram
NH ₄ Cl	chlorid amónny
nm	nanometer
PCR	polymerázová reťazová reakcia
pmol	pikomol
RAPD	náhodne zmnožená polymorfna DNA
RFLP	polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov
RNA	ribonukleová kyselina
REV	reverse - opačný
rpm	otáčky za minútu
s	sekunda
SDS	sodná soľ dodecylsulfátu
SSCP	konformačný polymorfizmus jednoreťazovej DNA
ssDNA	jednovláknová DNA
T	thymín
TAE	tlmivý roztok
TBE	tlmivý roztok
TGGE	teplotná gradientová gélová elektroforéza
Tris	hydroximetyl - aminometán
tRNA	transférová RNA
U	unit (jednotka)
UV	ultra fialové
μg	mikrogram

$\mu\text{g.l}^{-1}$	mikrogram na liter
μl	mikroliter
$\mu\text{mol.l}^{-1}$	mikromol na liter

ÚVOD

Pre identifikáciu jedincov je v súčasnosti najviac používaná mitochondriálna DNA (mtDNA). Využitie špecifických úsekov mtDNA pri identifikácii živočíšnych druhov má dva významné dôvody. Prvým dôvodom je fakt, že pomer kópií mitochondriálnej DNA k jadrovej DNA v jednej bunke je približne 2500 : 1, a to najmä v prípade kostrového svalstva, ktoré sa vyznačuje vysokou post-mitotickou aktivitou (Sorenson et al., 1998, Greenwood et al., 1999), čo umožňuje detekovať jednotlivé živočíšnej druhy aj z takých vzoriek akými sú tepelne opracované mäsové výrobky (Pascoal et al., 2004). Druhým dôvodom je vysoká variabilita špecifických úsekov mtDNA najmä v sekvencií génu cytochrómu b, ktorá umožňuje rozlíšenie blízko príbuzných živočíšnych druhov v prípade zmesi rôznych druhov (Hopwood et al., 1999, Momcilovic et al., 2001).

Cytochróm b je bielkovina obsahujúca hemové skupiny a nachádzajúca sa na vnútornej membráne mitochondrií. Je súčasťou elektróny transportujúceho reťazca a nachádzajúca sa vo všetkých organizmoch, ktoré uskutočňujú aerobné dýchanie. Sekvencia mtDNA pre gén cytochróm b je dlhá 1140 bp, je druhovo špecifická a vytvára vhodné podmienky pre využitie restričných endonukleáz (Minarovič 2009).

Jedna z najpoužívanejších techník v molekulárnej biológii a v molekulárnej genetike je polymerázová reťazová reakcia (PCR). Využíva sa na namnoženie špecifických úsekov DNA pomocou striedania teplôt a enzymatickej syntézy *in vitro* (Minarovič, 2009).

Jednou z modifikácií PCR je metóda PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov). Metóda umožňuje zistenie prítomnosti mutácií v amplifikovanej vzorke DNA. Na rozdiel od klasickej RFLP sa vhodným restričným enzýmom štiepi len krátky úsek DNA – PCR produkt. Získané fragmenty sa vizualizujú elektroforézou.

Hlavným cieľom našej práce bolo dokázať účinnosť PCR – RFLP metódy s použitím univerzálnych primerov navrhnutých Kocherom et al., (1989) a následnej RFLP analýzy pomocou restričnej endonukleázy *AluI* pri identifikácii rôznych živočíšnych druhov.

Táto diplomová práca bola podporovaná v rámci riešenia projektu VEGA 1/0061/10.

1 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY DOMA A V ZAHRANIČÍ

1.1 Genóm

Genóm je definovaný ako celok genetickej informácie v konkrétnej bunke alebo organizmu. Vedný odbor štruktúrna genomika má dva ciele: určiť sekvencie každého chromozómu genómu a identifikovať polymorfizmy alebo alelické varianty prítomné v genóme. Podstatou funkčnej genomiky je skúmanie vzťahov medzi génmi genómu a medzi génmi a proteínmi. Genómy organizmov sú odlišné svojou veľkosťou a zložením. Genómy mikroorganizmov a eukaryotov sú v rozpätí od 700 kb, pri jednobunkovom mikrobiálnom chromozóme až po viac ako 3 Gbp, pričom počet chromozómov sa pohybuje v rozmedzí od 6 až do 96 chromozómov. Haploidný genóm človeka obsahuje približne 3 miliardy nukleotidov DNA rozdelený do 23 chromozómov, v ktorých sa nachádza približne 25 000 génov. Významné druhy hospodárskych zvierat majú podobnú veľkosť genómu. Mapovanie genómu je úzko spojené s rozvojom nových technológií, štúdiom modelových organizmov, analýzou variability genómu a vývojom bioinformatiky. DNA sekvenovanie je proces, pri ktorom sa určujú špecifické poradie a identifikácie samostatných molekúl DNA so známou pozíciou na chromozóme. Mapovanie je rozhodujúci proces pre správnu rekonštrukciu genómu (Berg et al., 2006).

Okrem jadra bunky sa DNA nachádza aj v mitochondriách, ktoré obsahujú vlastnú genetickú výbavu v podobe mitochondriálnej DNA (mtDNA). Väčšina bielkovín mitochondrií je kódovaná jadrovou DNA, ale 13 bielkovín je kódovaných mitochondriálnou DNA a sú prekladané vlastným translačným aparátom na mitochondriálnych ribozómoch, čím mitochondrie podliehajú duálnej genetickej kontrole (Taanman, 1999).

1.1.1 Genetické mapy

Genetická mapa je znázornenie distribúcie určitého počtu génov v genómu. Podľa rôznych metodických postupoch rozoznávame:

1. Cytogenetické (chromozómové) mapy – založené na karyotype (fyzickej podobe) chromozómu. Za účelom identifikácie je možné určitým spôsobom vykonať špecifické farbenie chromozómov a porovnávanie so štandardnými ideogramami. Pri druhoch, ktoré majú dobre definovaný karyotyp, ako napr. ošípaná, sa ku konštrukcii cytogenetických máp používa hybridizácia *in situ*. Lokalizácia génu je prevedená pomocou hybridizácie určitého značeného úseku DNA s denaturovanou DNA chromozómu. Podobné metódy sa používajú aj pri mapovaní lokusov kvantitatívnych znakov (QTL).

2. Fyzické mapy – založené na priamej analýze DNA. Vzďialenosti medzi jednotnými lokusmi sú určené pároch báz.

3. Väzbové (rekombinačné) mapy – určujú vzdialenosť a poradie génov na chromozóme. Väzba je detekovaná na základe počtu rekombinácie (crossing – overu) a udáva sa v percentách rekombinácie (1% = 1 cM – centi morgan). Analýza väzby je hlavným princípom pri mapovaní QTL.

4. Komparatívne (porovnávacie) mapy – sú to mapy, na ktorých sú vyznačené homológne úseky génov pri rôznych druhov. Pomocou tejto metódy sa dajú vyhľadávať kandidátne gény pre QTL (Bežo, Bežová, 1998).

1.2 Mitochondriálna DNA

Mitochondriálna DNA je genetická informácia uložená v mitochondriách. Podieľa sa na mimojadrovej dedičnosti. Z celkového množstva DNA v eukaryotickej bunke pripadá na mitochondriálnu DNA obvykle 1 – 0,5 %. Mitochondriálna DNA je väčšinou malá (16 000 – 18 000 bázových párov) dvojitá kruhová dvojzávitnica, ktorá sa replikuje semikonzervatívne a neintegruje sa s chromozomálnymi proteínmi (Klug, Cummings, 1994).

Okrem niektorých výnimiek je živočíšna mtDNA tvorená kontrolnými oblasťami a 37 génmi, ktoré kódujú 22 transférových RNA (tRNA), dve ribozomálne RNA (rRNA) a 13 mediátorových RNA (mRNA) špecifických proteínov, ktoré sú spojené s transportom elektrónov a oxidatívnou fosforyláciou (Avisé, 1994).

Na mitochondriálnej DNA rozlišujeme ľahký (L) a ťažký (H) reťazec líšiaci sa medzi sebou v zastúpení G a T báz. Väčšina génov je lokalizovaná na H reťazci. mtDNA kóduje v respiračnom reťazci 7 podjednotiek (MTND1, MTND2, MTND3, MTND4, MTND4L, MTND5, MTND6) komplexu I (sukcinát CoQ reduktáza), 1 podjednotku (MTCYTb) komplexu III (cytochróm c reduktáza), 3 podjednotky (MTCOI, MTCOII a MTCOIII) komplexu IV (cytochróm c oxidáza) a 2 podjednotky (MTATP6 a MTATP8) komplexu V (ATP syntáza) (Masopust et al., 2003).

Kódujúca časť mtDNA, ktorá tvorí prevažnú časť molekuly, neobsahuje žiadne intróny. Zvláštnou štruktúrou molekuly je trojvláknový úsek reťazca, kedy je H reťazec vytlačený úsekom komplementárnym k L reťazcu formujúceho slučky. Uvedený úsek sa nazýva D-loop (displacement). D-loop je najrozsiahlejším nekódujúcim miestom a tvorí približne 7 % molekuly mtDNA. Keďže obsahuje promótoory pre transkripciu oboch reťazcov a začiatok replikácie H reťazca, predstavuje kontrolnú, alebo tiež regulačnú oblasť mitochondriálneho genómu (Anderson et al., 1981).

V dnešnej dobe poznáme už aj úplnú nukleotidovú sekvenciu mtDNA človeka, ktorá pozostáva z 16 596 párov báz a obsahuje 37 génov. Jej genetická informácia je pre bunku životne dôležitá. Medzi nimi (tak ako medzi génmi mtDNA iných organizmov) sú aj dôležité gény kódujúce podjednotky dýchacích enzýmov: cytochrómy a oxidázy. Mitochondriálna DNA je teda nevyhnutná pre život väčšiny eukaryotických buniek. Pre úspešnú syntézu bielkovín kódovaných v mtDNA zase musí byť do mitochondrie transportovaných množstvo produktov jadrových génov (Taanman, 1999).

Zvláštnosti kódu mtDNA od jadrovej DNA je, že jej gény sú na rozdiel od jadrovej usporiadané veľmi úsporne a dôležitý je v nich každý pár báz. Posledný nukleotid jedného génu môže dokonca v niektorých prípadoch byť zároveň prvým nukleotidom ďalšieho génu. Ďalšou zvláštnosťou je sekvencia UGA, ktorá v jadrovej RNA znamená koniec syntézy peptidového reťazca (stop kodón), ale v mitochondriách táto sekvencia kóduje aminokyselinu tryptofán. Transkripciu mitochondriálnych génov zabezpečuje zvláštna mitochondriová RNA - polymeráza. Mitochondriálna DNA je zaujímavá ešte aj z fylogenetického hľadiska vývoja eukaryotických buniek a vývoja

genómu. Z hľadiska dedičnosti je dôležitá tým, že sa dedí len samičí mitochondriálny genóm, lebo mitochondrie samčej pohlavnej bunky – spermie sú pri oplodnení enzymaticky rozrušené. Mitochondriálna DNA sa na rozdiel od jadrovej, v ktorej sa polovica zdedí po otcovi a polovica po matke, dedí vo väčšine prípadov iba po matke. Takáto dedičnosť sa nazýva materálna (Uhrín et al., 1996).

Množstvo mtDNA sa líši v jednotlivých typoch tkaniva, závisí na energetických požiadavkách daného orgánu. Napríklad veľké množstvo mitochondrií sa nachádza v neurónoch, pečenej bunkách, srdcovom a kostrovom svalstve. Vďaka značnému množstvu molekúl mtDNA je uľahčená izolácia a aj preto stále viac štúdií obracia svoju pozornosť na mitochondriálnu DNA (Holland a Persons, 1999, Prado et al., 2002, Pascoal et al., 2004, Pfeiffer et al., 2004).

Najpoužívanejšie gény pre fylogenetickú analýzu z mitochondriálnych génov spolu s D – LOOP génmi a rRNA génmi sú tieto tri: cytochróm b (Cytb), cytochróm c oxidáza podjednotka I (COI) a cytochróm c oxidáza podjednotka II (COII) (Russo et al., 1996).

1.3 Cytochrómy

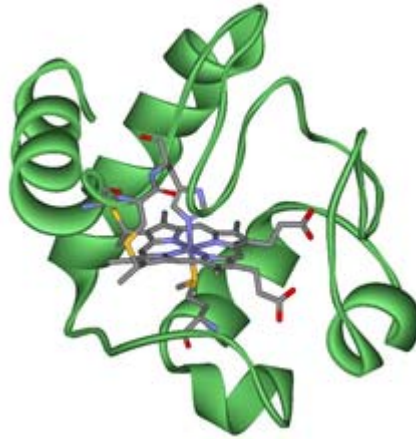
Cytochrómy predstavujú súhrnný názov pre bielkoviny, ktoré sú viazané na membránu a obsahujú vo svojej molekule hémovú skupinu, ktorá zaisťuje prenos elektrónu naviazaním iontov železa a striedavo redukuje a oxiduje z Fe^{2+} na Fe^{3+} a späť. Vyskytujú sa ako monoméne bielkoviny, napr. cytochróm c, alebo ako podjednotky väčších enzymatických komplexov ktoré katalyzujú redoxné reakcie. Nachádzajú sa hlavne vo vnútri membrány mitochondrií eukaryot, chloroplastov rastlín, u fotosyntetizujúcich mikroorganizmov a baktérií (Adkins et al., 1996).

Cytochrómy sa delia podľa typu naviazaných hémových skupín alebo podľa maximálnej absorbanie vlnových dĺžok.

Cytochróm a – obsahuje hem a tvoriaci tzv. formylovým a postranným reťazcom.

Cytochróm b – obsahuje hem b bez formylu, hémová skupina nie je kovalentne naviazaná na proteín.

Cytochróm c – je definovaný na základe chemickej štruktúry, konkrétne hem c je naviazané na proteín kovalentnou väzbou.



Obr. 1: Cytochróm c s hémom c (Bertini et al., 2006).

Cytochróm d – obsahuje tetrapyrolový cyklus s chelátom alebo železom pričom stupeň konjugácie je nižší ako u porfyrínu.

V aerobných prokaryotách a mitochondriách eukaryotov je cytochróm b komponentom komplexu respiračného reťazca III taktiež známeho ako komplex *bc1* alebo ubiquinol - cytochróm c reductáza (Howell, 1989).

Cytochróm c oxidáza je počiatočný enzým reťazca transportu elektrónov a je nepostrádateľný pre dýchanie buniek pri aerobných organizmoch (Palumbi, 1996).

1.4 Molekulárne markery

Génové inžinierstvo umožňuje využívať pre charakterizáciu genómu jednotlivých odrôd rastlín, hospodárskych zvierat i pre získavanie individuálneho profilu jednotlivých osôb molekulárne markery DNA. Pomocou DNA markéru sa dá jednoducho detekovať rozdiely v genetických informáciách, ktoré nesie sledovaný jedinec. Prvé molekulárne markery boli predovšetkým bielkoviny a ich rôzne varianty, tzv. izoenzýmy. V súčasnej dobe sa už využívajú DNA markery, ktoré sú oproti izoenzým viac variabilné a vedú charakterizovať celý genóm. Na rozdiel od proteínových markerov nie sú tak významne ovplyvnené prostredím a nie je narušená ich selektívna neutrálnosť (Branco et al., 2002).

Pri rozdelenie markerov podľa využitií pri mapovanie genómu poznáme tri typy:

1. typ – kódujúce exprimované gény, môžu byť kandidátnymi gény pre QTL (Quantitative Trait Loci). Majú nízku hladinu polymorfizmu, sú málo použiteľné pre diverzity rodín a populácií. Využívajú sa pri komparatívnom (porovnávacom) mapovaní.

2. typ – vysoko variabilná sekvencia DNA. Predovšetkým sa využívajú mikrosatelity a minisatelity. Vplyvom vysokého stupňa polymorfizmu sú mikrosatelity vysoko informatívne v populačných štúdiách a pri určovaní rodičovstva a sú základom pre väzbové mapovanie genómu. Tieto markery nemajú priamy vplyv na variabilitu znaku, ale môžu byť vo väzbe s QTL.

3. typ – sú to jednonukleotidové polymorfizmy (SNP) nachádzajúce sa vo vnútri kódujúceho génu, v nekódujúcich intrónoch alebo integrovaných oblastiach. Využívajú sa pri populačných a rodinných štúdiách. Vyskytujú sa v genóme každých 500 – 1000 báz párov. Význam získavajú s rozvojom automatických metód skríningu (micro arrays) (Knoll, Vykoukalová, 2002).

1.5 Metódy detekcie DNA markerov

1.5.1 Polymerázová reťazová reakcia

Polymerázová reťazová reakcia (*angl.* polymerase chain reaction, skratka PCR) je metóda molekulárnej biológie, ktorá slúži na amplifikáciu (zmnoženie) DNA molekúl v laboratórnych podmienkach využívajúc enzým DNA-polymerázu. PCR je exponenciálna reakcia a teoreticky je možné aj z jedinej molekuly DNA amplifikovať dostatočné množstvo molekúl pre ďalšie analýzy. Táto metóda bola revolučným objavom Američana Karyho Mullisa v roku 1983, ktorý za tento objava získal v roku 1993 Nobelovu cenu za chémiu. V súčasnosti predstavuje nevyhnutný krok pri práci s DNA. Používa sa v molekulárnej biológii, genetike, mikrobiológii, fyziológii, v medicíne a aj v mnohých iných oblastiach biologického výskumu (Ihlak, 2007).

Polymerázová reťazová reakcia umožňuje selektívne namnožiť - naamplifikovať požadovaný úsek DNA v skúmavke *in vitro* do miliónového počtu kópií. Autor PCR metódy Mullis uvádza, že keď začneme pracovať s jedinou molekulou DNA, môžeme

pomocou PCR za niekoľko hodín získať milión jej kópií. K amplifikácii potrebujeme skúmavku, potrebné chemikálie a vodný kúpeľ. Analyzovaná DNA môže pochádzať z rôznych zdrojov : z jedného ľudského vlasu, kvapky zaschnutej krvi, z mozgu múmie alebo 40 tisíc rokov starého mamuta zmrznutého v ľadovci. Metóda napodobňuje replikačný systém, ktorý existuje v každej bunke a realizuje sa pred bunkovým delením, keď dochádza ku zdvojeniu genetického materiálu. Zatiaľ čo pri replikácii *in vitro* sa replikuje celý chromozóm za vzniku dvoch identických kópií, pri PCR *in vitro* sa replikuje špecifický úsek DNA, ktorý vymedzujú krátke oligonukleotidy - primery, do miliónov kópií (Mullis, 1987).

Základné zložky PCR pre úspešnú amplifikáciu:

- ↗ templátová DNA
- ↗ oligonukleotidové primery
- ↗ *Taq* polymeráza
- ↗ zmes štyroch voľných deoxynukleotidov (dNTP)
- ↗ tlmivý roztok
- ↗ horčíkové ióny
- ↗ ultračistá voda

1.5.1.1 *Priebeh PCR reakcie*

Denaturácia - tepelná denaturácia templátovej DNA zahriatím reakčnej zmesi na teplotu > 90°C.

Hybridizácia - za poklesu teploty na cca 37-65°C (závisí od dĺžky a sekvencie primerov) nastáva hybridizácia primerov s templátovou DNA na komplementárnych miestach. K úspešnej amplifikácii DNA je potrebné, aby vzdialenosť medzi priamym a reverzným primerom (100-5000 nukleotidov) bola dostačujúca z hľadiska času potrebného na polymerizáciu (príliš dlhé alebo naopak príliš krátke fragmenty sa nedajú amplifikovať).

Polymerizácia - zvýšením teploty na 72°C začína *Taq*-polymeráza syntetizovať komplementárne vlákno DNA z voľných dNTP.

Tieto tri kroky sa cyklicky opakujú 20 až 40-krát a výsledkom je syntéza mnohých kópií fragmentu DNA ohraničeného použitými primermi. Množstvo PCR produktu v jednej reakcii môže dosiahnuť hodnoty 0,2-1 µg DNA, čo postačuje na analýzu štandardnými metódami molekulárnej biológie ako je elektroforéza v agarózovom géli.

Záverečná polymerizácia - tento krok prebehne počas PCR reakcie len raz a to na konci PCR programu. Slúži na "dobehtie" všetkých polymerizačných reakcií, ktoré ešte prebiehajú (Eckert,1991).

1.5.1.2 Faktory ovplyvňujúce PCR reakciu

Špecifická - schopnosť amplifikovať len úseky s presnou homológiou sekvencií v oblasti primerov. Nižšie hybridizačné teploty a vyššia koncentrácia Mg²⁺ spravidla špecifickosť znižujú, takže dochádza k amplifikácii tzv. nešpecifických fragmentov.

Citlivosť - počet kópií templátu, ktoré je možné dokázať metódou PCR. Teoreticky možno amplifikovať aj jednu jediná kópiu, prakticky je to číslo vyššie, takže citlivosť je nižšia.

Efektívnosť - aké množstvo molekúl templátu sa kopíruje v jednotlivom cykle. Teoreticky sa kopírujú všetky molekuly, prakticky je toto množstvo nižšie.

Fidelita - miera presnosti sekvencie PCR produktu v porovnaní s templátom, do akej miery je výsledný PCR produkt (DNA fragment) sekvenčne identický s "originálom" - pôvodným templátom. Závisí hlavne od chybovosti enzýmu a pomeru jednotlivých dNTP. Je nepriamo úmerná počtu zle inkorporovaných - mutovaných nukleotidov (Namakura et. al.,1993)

1.5.1.3 Variácie PCR

Jedná sa o zloženia reakčnej zmesi a nastavenia PCR programu. Medzi najdôležitejšie varianty PCR patria:

Hot start PCR – pri reakcii sa využíva rekombinantná DNA polymeráza, ktorá na iniciáciu polymerizácie vyžaduje vysokú aktivačnú teplotu okolo 95 °C – po dobu 3 až

5 minút v závislosti od typu výrobcu. Využitie hotstart polymerázy znižuje tvorbu nešpecifických produktov za nízkych teplôt počas prípravy mastermixu.

Touchdown PCR - počiatočné cykly majú vysokú hybridizačnú teplotu, ktorá sa postupne v ďalších cykloch znižuje - vysoká teplota zabráni nešpecifickým väzbám primerov s templátovou DNA a neskoršia nižšia teplota namnoží už len špecifické PCR produkty.

Nested PCR – obsahuje dva kroky:

1. krok: amplifikuje sa dlhší DNA fragment pomocou jednej sady primerov;
2. krok: druhá sada primerov amplifikuje špecifický vnútorný (kratší) DNA fragment, pričom ako templát je použitá vzorka z 1. PCR reakcie - zvyšuje sa špecifickosť a citlivosť diagnostických PCR reakcií

Multiplex PCR - v jednej reakčnej zmesi je viac primerových párov, takže prebieha amplifikácia viacerých úsekov DNA v rovnakom čase - urýchľuje celkový čas analýzy a znižuje celkové použité financie.

PCR v reálnom čase (Real-time PCR) - po každom cykle sa spektrofotometricky meria množstvo DNA v real-time termocykléroch s využitím fluorescenčných interkalačných farbičiek ako SYBR Green I, Syto 9, Evagreen, LC Green.

RT-PCR - dvojkroková procedúra na amplifikáciu PCR produktu z izolovanej mRNA;

1. krok: mRNA sa prepíše reverznou transkriptázou využitím dNTP do jednovláknovej komplementárnej DNA (cDNA);
2. krok: nasleduje štandardná PCR reakcia na amplifikáciu DNA - detekcia exprimujúcej sa DNA vo vzorkách.

Alelovo-špecifická PCR - použijú sa primery s odlišnou sekvenciou na 3'-koncoch a maximálna špecifita PCR reakcie; reakcia neprebehne, ak miesto na templátovej DNA nie je komplementárne k 3'-koncu primeru (t.j. je mutované) - detekcia konkrétnych mutácií v prípade genetických ochorení.

Mutagenéza prostredníctvom PCR - na amplifikáciu sa používajú dlhé primery, ktoré majú cielene mutovaný(é) nukleotid(y) v strednej časti primeru, ktorá neovplyvní hybridizáciu s templátovou DNA, pričom výsledkom je tvorba PCR produktu s mutovanou sekvenciou DNA (Mullis, 1990).

1.5.2 PCR – RFLP

Je to kombinácia dvoch metód. Pomocou PCR sa na základe genómovej DNA amplifikuje špecifická sekvencia ako napr. úsek génu. Tento fragment DNA sa štiepi požadovanou restričnou endonukleázou. V prípade bodovej mutácie (SNP) v restričnom mieste toto miesto zaniká alebo opačne, vzniká nové štiepne miesto. To má za následok vznik rôzne veľkých štiepných fragmentov DNA, ktoré sú separované na agarózovom géle (Mullis, 1990). Vizualizácia DNA fragmentov sa uskutočňuje pomocou interkalačných látok ako etídium bromid respektíve jeho novších a bezpečnejších náhrad ako GelRed alebo GoldView. Výhodou tejto metódy je jej nenáročnosť a možnosť určenia miesta mutácie. Medzi nevýhody patrí, že pravdepodobnosť detekcia mutácie (polymorfizmu) je relatívne nízka a závisí na počtu použitých enzýmov. Metóda je vhodná pri využívaní na analýzu genetických chorôb v medicíne, na detekciu nádorových génov, pri mapovaní génov a pri štúdiu asociačných vzťahov kandidátskych génov k ukazovateľom úžitkovosti (Sambrook et al., 1989).

1.5.3 RAPD

Je to polymorfizmus náhodnej amplifikovanej DNA (Random Amplified Polymorphic DNA) je jednou z metód založených na PCR. Používa sa to tak, že do amplifikácie vstupuje viac primerov o dĺžke desiatich nukleotidov (dekanukleotid). Princíp metódy je v tom, že sa niekoľkokrát v celom úseku študovanej DNA stane, že primery nasadnú na protibežných reťazoch DNA v amplifikovateľnom vzdialenosti od sebe (do cca 4 kb). V tomto chvíli je umožnená amplifikácia časti DNA medzi nimi (Sheffield et. al., 1993).

1.5.4 AFLP

Metóda AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) kombinuje postupy RFLP a PCR. Uskutočňuje sa v niekoľkých krokoch a je založená na detekcii fragmentu

DNA získaných štiepením restričných endonukleázami prostredníctvom PCR amplifikácie. Je to pomerne jednoduchá metóda, ktorou je možné bez znalosti sekvencie stanoviť veľké množstvo markérov (Rasler et. al.,2006).

1.5.5 Mikrosatelity

Medzi najpoužívanejšie markéry patria nekódujúce extragénové segmenty DNA – mikrosatelity, ktoré sú dostačujúce pre detekciu lokusov ekonomicky významných znakov (Čepica, 2002). Sú to sekvencie DNA zložené z mnohokrát sa opakujúcich úsekov o dĺžke 1 – 6 nukleotidov tvoriacich súčasť kódujúcich aj nekódujúcich oblastí genómu. Tieto vysoko polymorfné markéry sa vyskytujú vo všetkých eukaryotických genómoch a v niektorých genómoch prokaryotov. Použitelnosť mikrosatelitov ako genetických markerov je čiastočne limitovaná ich špecifitou pre určené taxóny, ale bolo preukázané, že podobné markery môžu byť niekedy používané pre príbuzné druhy. Mikrosatelity sú dobrým nástrojom pre konštrukciu génových máp a majú veľké využitie v oblastiach populačnej genetiky a v molekulárnej evolúcie. Napriek mnohým snahám o získanie mikrosatelitov, ktoré by boli vhodné na genetické mapovanie, mikrosatelitová genetická mapa celého genómu stále nebola zostavená (Korstanje et. al.,2003)

1.5.6 Sekvenovanie

Táto metóda slúži k presnému určeniu nukleotidových sekvencií akéhokoľvek izolovaného fragmentu DNA alebo RNA. Je najpresnejšia, ale pritom aj najnáročnejšia, najdrahšia a najzložitejšia spôsob, pri ktorom sa určuje presné poradie bázov v určitom úseku DNA. Pri sekvenovaní boli vyvinuté dva metódy:

- Sangerova metóda – táto metóda využíva syntézu komplementárneho reťazca DNA polymerázami *in vitro*, ukončené náhodne v mieste jednotlivých bázov.

- Maxam – Gilbertova metóda – pri tejto metóde dochádza k chemickému štiepeniu DNA na určitých miestach.

Najčastejšie sa používa Sangerova metóda (Dvořák, Vrtková, 2001).

2 CIEĽ

Sekvenovaním mitochondriálnej DNA bola zistená vysoká variabilita v sekvencii génu kódujúceho cytochróm b, ktorý je považovaný za významný markér pri identifikácii živočíšnych druhov s využitím DNA analýz .

Práca bola riešená v nasledovných krokoch:

1. Sumarizácia poznatkov o význame mitochondriálnej DNA pri identifikácii živočíšnych druhov.
2. Izolácia DNA z krvi piatich druhov zvierat a optimalizácia PCR metódy.
3. Druhovú identifikáciu zvierat pomocou metódy RFLP s využitím restriktívnej endonukleázy *AluI*.

3 MATERIÁL A METÓDY

3.1 Biologický materiál

Pre overenie identifikácie živočíšnych druhov pomocou PCR-RFLP analýzy sme použili krv nasledovných živočíšnych druhov:

- a. Sviňa domáca (*Sus scrofa domesticus*)
- b. Králik domáci (*Oryctolagus cuniculus*)
- c. Fretka domáca (*Mustela putorius furo*)
- d. Norok americký (*Mustela vison*)
- e. Hus domáca (*Anser anser*)

3.1.1 Biologická charakteristika vybraných živočíšnych druhov

Sviňa domáca (*Sus scrofa domesticus*)

Sviňa domáca sa nazýva v poľnohospodárstve ošípaná, patrí do triedy cicavce, do podtriedy živorodé, rad párnokopytníky, podrad neprežúvavce, a čeľaď sviňovité (*suidae*), Rod *Sus* má dva poľnohospodársky významné druhy: divá ošípaná (*Sus scrofa*) a domáca ošípaná (*Sus scrofa domestica*). Dnešné plemená ošípaných vznikli zrejme z viacerých foriem divej ošípanej: divá európska ošípaná (*Sus scrofa ferus* L.), divá ázijská pásikovaná ošípaná (*Sus vittatus*) a divá stredomorská ošípaná (*Sus mediterraneus*). Tieto formy sa od seba líšia hlavne tvarom slznej kosti. Domáca ošípaná bola domestikovaná asi 4000 rokov pred Kr. v Číne. Chov ošípaných sa písomne spomína asi 2500 rokov pred Kr. v Asýrii a Babylone v Hamarubisovom zákonníku. V Európe sa ošípaná objavuje v staroveku. Domáca ošípaná mala minimálne tri domestikačné centrá. Dve v Európe, jedno v oblasti Baltického mora, druhé v oblasti Stredozemného mora. Tretie domestikačné centrum bolo v oblasti východnej Ázii. Ošípaná je významným hospodárskym zvierat'om v poľnohospodárstve. Na Slovensku prevláda spotreba mäsa práve bravčové mäso. Okrem mäsa poskytuje aj kožu a maštal'ný hnoj (Da Fonesca et al., 2008).

Hus domáca (*Anser anser*)

Hydina je súhrnný názov viacerých druhov malých pernatých hospodárskych zvierat, zoologicky patria do triedy vtákov (*Aves*), do radu hrabavcov (*Galliformes*) patria kury, morky, a do radu zúbkozobcov (*Anseriformes*) kačice a husy. Tieto zvieratá poskytujú hlavne vysokokvalitné hydínové mäso, znáškové hybridy kury domácej vajcia. Plemená kačíc a husí sú chované v špecializovaných výkrmniach na produkciu mäsa a pečienky.

Hus domáca – Hus domáca sa pochádza od viacerých predkov z viacerých kontinentov – z Európy, Ázie, Afriky a z Ameriky). Chová sa hlavne pre produkcia mäsa a pečienky, niektorých miestach aj pre peria (Gibson, 2007).

Králik domáci (*Oryctolagus cuniculus*)

Králik domáci je malý bylinožravec z čeľade zajacovité (*Leporidae*), radu zajacotvaré (*Lagomorpha*) a triedy cicavce (*Mammalia*).

Prvý výskyt európskych králikov divých bol pôvodne v oblastiach Pyrenejského ostrova. Od staroveku až do súčasnosti šíril prirodzeným spôsobom postupne ďalej po Európe. Rimania priniesli prvé divé králiky zo Španielska do Talianska, kde boli chovaní a rozmnožovaní takzvaných „leporáriách“. V strednej Európe sa získal chov a pestovanie domácich králikov veľký význam až v roku 1870.

Králiky divé žijú vo väčších skupinách a preto sa zaraďujú medzi spoločenské zvieratá. Zdržujú sa zväčša na jednom mieste, kde si budujú rozvetvený systém nôr. Každý králik má vlastnú noru. Život králičej skupinách má prísnu hierarchickú štruktúru, vzájomné vzťahy sa riadia komplexným systémom sociálneho chovania. Často ich považujú za hlodavce, i napriek tomu zo zoologického hľadiska k hlodavcom nepatria. Dôvodom sú pravdepodobne ich neustále dorastajúce zuby (Rogel – Galliard et al., 2009). V súčasnom dobe králiky sa chovajú ako domáce miláčikovia, predtým chov bolo zamerané viac na mäsový úžitkovosť. Králik domáci od králika divého rozlišuje s tým, že králik domáci je ťažší a väčší. Plemená domáceho králika sa odlišujú s hmotnosťou, srst'ou a tvarom ušnic (Belhady, 2004).

Norok americký (*Mustela vison*)

Norky sú mäsožravé cicavce, patriace do rodu lasicovité (*Mustelidae*). Norok európsky sa vznikol z norky amerického pri chove, keď ich doniesli do európy a z chovu utiekli a prispôbili k prostrediu. Norok americký je väčší od norky európskeho a dá sa ich rozlíšiť podľa bieleho ťaku pod bradou, čo máva norok európsky. Všetky druhy norky sú tmavohnedej farby. Norky boli v minulosti ako hospodárske zvieratá viac cenné kvôli kožušine, teraz ich chovajú len na málo miestach a hlavne pre norkový olej, čo využívajú v zdravotníctve a v kozmetike (Gibson, 2007).

Fretka domáca (*Mustela putorius furo*)

Fretka (*Putorius putorius furo*) vznikla domestikáciou tchora tmavého (*Putorius putorius*), patrí medzi šelmy kunovité - lasicovité (rad *šelmy*, čeľaď *kunovité*). Fretky boli ešte v nedávnej minulosti používané poľovníkmi na lov divokých králikov - fretkovanie. Fretky chovali najmä na kožušinu a ako náhradné matky noriek. V dnešnej dobe sa fretky chovajú pre radosť ako domáci miláčikovia, zvlášť v mestách rastie ich obľúbenosť pre ich nenáročnosť. Sú uvádzané ako tretie najrozšírenejšie domáce ziera hneď po psovi a mačke (Ullrich, 2003).

3.2 Prístrojové vybavenie

Pri izolácii DNA a PCR-RFLP metóde sme použili nasledovné prístroje:

1. centrifúga Z 233 MK-2 (HERMLE),
2. horizontálna elektroforéza MINI-PLUS HU 10 (SCIE-PLAS),
3. zdroj napätia EV 243 (CONSORT),
4. pipety (NICHIRIO),
5. spektrofotometer NanoPhotometerTM (IMPLEN),
6. vortex (IKA WORKS, INC, MS1),
7. termocykler MJ MiniTM (BIORAD),
8. UV transiluminátor (UVP – M 15),
9. trepačka MR - 1 (BIOSAN)
10. fotodokumentačná jednotka C 7070 (OLYMPUS)

3.3 Použité metódy izolácie DNA

3.3.1 Izolácia DNA vysol'ovacou metódou podľa Millera et al. (1987)

3.3.1.1 Zloženie použitých roztokov

Roztok na lýzu červených krviniek - 5x RBC roztok

Zloženie:

770 mM NH₄Cl 1

46 mM KHCO₃

10 mM EDTA pH 8.0

Sterilizované filtráciou.

Lyzačný roztok

Zloženie:

50 mM Tris-HCl pH 8,0

100 mM EDTA pH 8,0

100 mM NaCl

1% SDS

Roztok na precipitáciu proteínov:

Zloženie:

10M octan amónny

Roztok na rozpúšťanie DNA:

Zloženie:

10mM Tris- HCl pH 8,5

3.3.1.2 Postup izolácie

Táto metóda izolácie DNA sa skladá z lýzy buniek a odstránenia hemoglobínu zo vzorky, precipitácia DNA, premývania DNA, sušenia a rozpustenia DNA v evolučnom roztoku. Izolácia bola vykonaná z 500 μ l celkovej krvi použitých druhov. Očakávané množstvo je 7-23 μ l DNA.

Lýza buniek:

1. 500 μ l krvi + 1000 μ l RBC sme inkubovali 1 – 3 minúty pri laboratórnej teplote
2. Centrifugovali sme pri 13 000 g 2 minúty a odstránili supernatant.
3. Vzorky sme vortexovali 10 – 20 sekúnd, kým sme nezískali homogénny roztok.
4. Pridali sme 600 μ l lyzačného roztoku a pipetovaním lyzovali.

Precipitácia (zrážanie) proteínov:

1. Pridali sme 200 μ l roztoku na precipitáciu proteínov a vortexovali.
2. Centrifugovali sme vzorky 13 000 g pri teplote 20 – 25 $^{\circ}$ C, po dobu 20 minút, čím precipitované proteíny vytvorili na dne pevný tmavohnedý pelet.

Precipitácia DNA:

1. Supernatant s DNA odliali do čistej skúmavky, v ktorej bolo 600 μ l 100% izopropanolu a premiešali sme obrátením epedorfky.
2. Vzorky sme centrifugovali 5 minút pri 13 000 g, DNA bola viditeľná ako malý biely pelet.
3. Odpipetovali sme supernatant a pridali 600 μ l 70% etanolu.
4. Po 5 minút centrifugovaní pri 13 000 g sme odpipetovali etanol.
5. Vzorky sme vysušili v termostate pri 37 $^{\circ}$ C po dobu 10 – 15 minút.

Rozpustenie DNA:

Pridali sme 30 μ l 10 mM Tris – HCl pH 8,5 a následne sme inkubovali po dobu 30 – 60 minút pri 65 $^{\circ}$ C.

3.3.2 Izolácia genómovej DNA z krvi pomocou komerčného kitu Nucleospin Blood (Macherey Nagel)

1. pred začiatkom izolácie sme nastavili vodný termostat na 70 °C a zohriali tlmivý roztok BE na 70 °C
2. do 1,5 ml mikroskúmavky sme pridali 200 µl krvi a 25 µl proteínázy K
3. pridali sme 200 µl lýzovacieho tlmivého roztoku B3 a vortexovali 10-20 sekúnd
4. inkubovali sme vzorku 10 – 15 minút pri 70 °C a vzorka počas inkubácie zhnedla
5. k vzorke sme pridali 210 µl 96 % etanolu a vortexovali sme vzorku
6. vzorku sme preniesli do separačnej kolónky vloženej do 2 ml centrifugačnej skúmavky
7. centrifugovali sme 1 minútu pri 11 000 g, kolónku sme vybrali a centrifugačnú skúmavku zahodili
8. kolónku sme vložili do novej 2 ml skúmavky, pridali 500 µl tlmivého roztoku BW
9. centrifugovali sme 1 minútu pri 11 000 g, vyliali sme prefiltrovanú tekutinu z centrifugačnej skúmavky a do kolónky sme pridali 600 µl tlmivého roztoku B5
10. centrifugovali sme 1 minútu pri 11 000 g a vyliali obsah centrifugačnej skúmavky
11. centrifugovali sme prázdnu kolónku v centrifugačnej skúmavke 1 minútu pri 11 000 g
12. vložili sme kolónku do 1,5 ml skúmavky a pridali sme 100 µl tlmivého roztoku BE (predhriateho na 70 °C). Tlmivý roztok sme naliali priamo na silikátovú membránu
13. inkubovali sme vzorku 1 minútu pri laboratórnej teplote
14. Centrifugovali sme 1 minútu pri 11 000 g. Kolónku sme odstránili, skúmavku s roztokom DNA sme označili a uschovali pri teplote 4 – 8 °C.

3.4 Overenie prítomnosti DNA

Po skončení izolácie DNA sme úspešnosť izolácie overili spektrofotometricky s použitím prístroja Nanophotomer (Implen). Získanú DNA sme uskladnili pri teplote 4 °C. Pre dlhodobšie uskladnenie sme použili teplotu - 20 °C.

3.5 PCR *cytochrómu B*

PCR reakcie boli uskutočnené použitím konzervačných primerov navrhnutých Kocherom et al. (1989). Polymerázovú reťazovú reakciu sme uskutočnili na termocykléri MJ Mini™ Thermal Cyclor (Biorad).

Primery:

Na amplifikáciu špecifického úseku génu pre *cytochróm B* sme použili nasledovné oligonukleotidové primery FOR a REV prevzaté z práce Kochera et al. (1989).

***cytB* FOR 26-mer:**

5' - CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA - 3'

***cytB* REV 26-mer:**

5' - GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA - 3'

Reakčná zmes:

Na amplifikáciu univerzálneho PCR produktu s veľkosťou 359 bp, ktorý obsahuje variabilnú oblasť cytochrómu B dlhú 307 bp boli pridávané jednotlivé zložky mastermixu.

Tabuľka 1: Zloženie reakčnej zmesi s objemom 25 μ l.

<i>Komponent</i>	<i>Konečná koncentrácia</i>
1. Sterilná voda	-----
2. 10 x Reaction buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	1x
3. MgCl ₂ (25 mM) (<i>Fermentas</i>)	1,7 mM
4. dNTP mix (10 mM) (<i>Fermentas</i>)	2 mM
5. Primery <i>cytB</i> (10 pM) (<i>KRD</i>)	3 pmol
6. Taq DNA polymerase (<i>Fermentas</i>)	1 U
7. Templát DNA	50 ng/ μ l

Tabuľka 2: Teplotný a časový režim PCR reakcie.

Kroky	Cyklus	teplota	čas
1.	„štart“	94 °C	90 s
2.	Denaturácia	94 °C	10 s
3.	Anneling	55 °C	30 s
4.	Polymerizácia	72 °C	40 s
5.	Elongácia	72 °C	10 min
6.	Schladienie	4 °C	uskladnenie

Počet cyklov: 35 (1 cyklus = **2.** + **3.** + **4.**)

3.5.1 PCR - RFLP cytochrómu *B* restriktčným enzýmom *AluI*

Amplifikované PCR produkty boli štiepené restriktčnou endonukleázou FastDigest *AluI* (Fermentas).

Tabuľka 3: Zloženie štiepiacej zmesi RFLP s objemom 15 μ l.

Komponent	Výsledná koncentrácia	Množstvo na 1 vzorku
Sterilná voda (MiliQ)	-----	12 μ l
10X FastDigest Buffer	1x	2 μ l
FastDigest <i>AluI</i>	-----	1 μ l

Postup štiepenia:

Do pripravenej štiepiacej reakčnej zmesi sme pridali PCR produkty.

Cyt B (*AluI*): celkový objem 25 μ l

- štiepiaca zmes 15 μ l

- PCR produkt 10 μ l

Tabuľka 4: Priebeh štiepenie reštriktčným enzýmom *AluI*

Názov	RE miesto	Teplota štiepenia	Doba inkubácie
<i>AluI</i>	AG↓CT	37 °C	5 minút

3.5.2 Elektroforéza v agarózovom géli

Elektroforéza je fyzikálno – chemická metóda na separáciu látok nesúcich elektrické náboje. Sacharidovo-fosfátová kostra nukleových kyselín je príčinou rovnomerného rozloženia negatívnych nábojov v molekulách DNA a RNA. Pohyb týchto vysoko elektronegatívnych molekúl v elektrickom poli vedie k ich separácii podľa molekulovej hmotnosti. Podľa použitého gélu rozlišujeme elektroforézu

agarózovú alebo polyakrylamidovú (PAGE). Najčastejšie sa ako elektroforetické médium používa agaróza (Sambrook et al., 1989)

Elektroforéza v agarózovom gély – používa sa to na separáciu a identifikáciu nukleových kyselín, na delenie fragmentov DNA s veľkosťou od 20 do 20 000 bp s rozlíšením 5 bp, (špeciálne typy agarózy, väčšinou prípadov je rozlíšené viac ako 5 bp). Molekuly DNA sa pohybujú v agarózovom gély od záporne nabitaj katódy ku kladne nabitému pólu (DNA je záporne nabitá). Separácia sa uskutočňuje na základe ich veľkosti – malé molekuly v DNA sa pohybujú rýchlejšie, veľké pomalšie (Brody, Kern, 2004).

Agaróza je lineárny polymér D-galaktózy a galaktózového derivátu (3,6-anhydro-L-galaktózy), ktorý sa získava purifikáciou agaru (výťažok z červených rias). Pri príprave gélu sa agaróza rozpúšťa v horúcich tlmivých roztokoch (napríklad Tris-borátový alebo Tris-acetátový tlmivý roztok), a ak teplota klesne pod 45 °C, vzniká polotuhý gél. Základné zariadenie na elektroforézu sa skladá z elektroforetickej komory a zdroja jednosmerného elektrického prúdu. Elektroforetická komora má katódový a anódový priestor s elektrolytom a priestor na umiestenie nosiča. Vzorku DNA sa do gélu nanášame už zmiešanú s farbivom. Farbivá používame buď brómfenolovú modrú, alebo xyléncyanolovú zelenú. . Vizualizácia fragmentov bola uskutočnená pomocou UV transiluminátora a zdokumentovaná fotodokumentačnou jednotkou Olympus C 7070. Pre presné určenie veľkosti fragmentov sme používali DNA markéry (DNA markér 100 – 1000 bp) (Mínavič, 2009).

4 VÝSLEDKY PRÁCE

4.1 Materiál

Pre overenie prítomnosti špecifických fragmentov po RFLP analýze v PCR produkte sme použili krv vybraných zvierat. Použitá krv bola odobratá do ACD roztoku v pomer (1:5). Kvalitu získanej DNA sme overili spektrofotometrom NanoPhotometer™ (Implen).

4.2 Izolácia DNA

Jadrová DNA spolu s mitochondriálnou DNA jednotlivých živočíšnych druhov bola vyizolovaná vyoľovacou metódou a pomocou komerčného kitu NucleoSpin Blood (Macherey Nagel) tak, ako je podrobne popísané v kapitole Materiál a metódy (3.3.1 resp. 3.3.2).

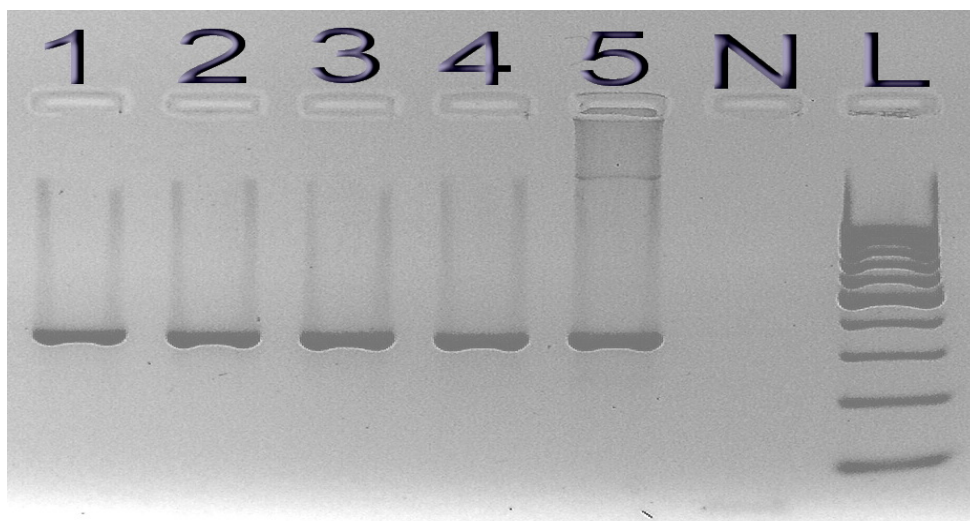
4.3 PCR reakcia

PCR reakcie boli uskutočnené použitím konzervačných primerov navrhnutých Kocherom et al. (1989) a podrobne popísanými v kapitole 3.4.4.

Polymerázovú reťazovú reakciu sme uskutočnili na termocykléri C1000™ Thermal Cycler (Biorad).

Zloženie reakčnej zmesi je uvedené v predchádzajúcej kapitole Materiál a metódy (3.4.5). Reakcia prebiehala v celkovom objeme 25 µl v termocykléri. PCR program obsahoval iniciačný denaturačný krok pri teplote 94 °C trval 90 sekúnd. Každý z 35 cyklov pozostával z denaturácie pri teplote 94 °C počas 10 sekúnd, annealingu pri teplote 55 °C počas 30 sekúnd, polymerizácie pri teplote 72 °C počas 40 sekúnd. Posledný krok polymerizácie – elongácia pri teplote 72 °C trval 10 minút. Po skončení boli vzorky schladené na teplotu 4 °C a uskladnené.

Identifikácia PCR produktu bola vykonaná pomocou elektroforézy s 2 % agarózovým gélom s obsahom interkalačného činidla GelRed (Biotium) v 1 x SB (sodium borátový pufo) pri 180 V po dobu 15 minút. Vizualizácia fragmentov bola uskutočnená pomocou UV transiluminátora (obrázok 2).



Obrázok 3: Reprezentatívne výsledky amplifikácie 359 bp PCR produktu cytochrómu B na 2 % agarózovom géle.

1 – *Norok americký (Mustela vison)*, 2 – *Fretka domáca (Mustela putorius furo)*, 3 – *Ošípaná (Sus scrofa domesticus)*, 4 – *Králík domáci (Oryctolagus cuniculus)*, 5 – *Hus domáca (Anser anser)*, N – *neutrálna kontrola PCR reakcie*, L – *100 bp ladder (Fermentas)*

Na fotodokumentácia agarózového gélu (obrázok XY) znázorňuje 359 bp PCR produktu cytochrómu b. Dráhy 1 až 5 reprezentujú naamplifikované PCR produkty získané z mitochondriálnej DNA jednotlivých živočíšnych druhov. V dráhe N bola nanosená neutrálna kontrola PCR reakcie, ktorá obsahovalo všetky základné zložke PCR reakcie okrem DNA. V dráhe L bol nanosený komečný DNA ladder od firmy Fermentas s rozsahom 100 bp – 1000 bp.

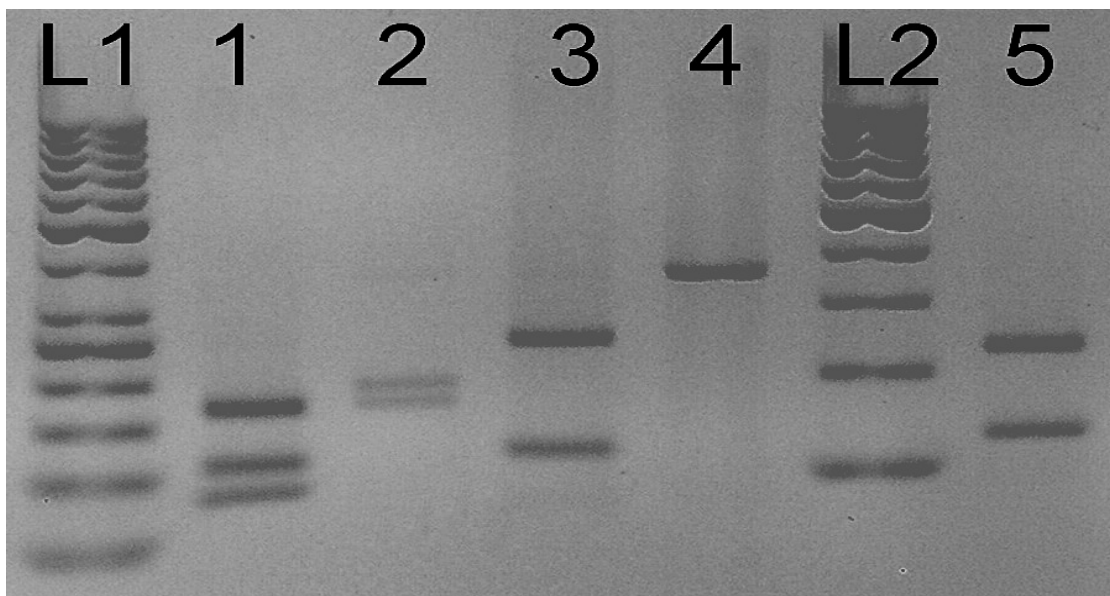
4.4 PCR – RFLP

Amplifikované PCR produkty boli štiepené restriktčnou endonukleázou FastDigest *AluI* (Fermentas).

Do pripravenej štiepiacej reakčnej zmesi (15 μ l) (tabuľka 3 kapitola 3.5.1) sme pridali PCR produkty (10 μ l) a inkubovali 5 minút pri teplote 37 °C.

Identifikácia restričných fragmentov bola vykonaná pomocou elektroforézy s 2,5 % agarózovým gélom s obsahom interkalačnej farbičky GelRed (Biotium) v 1 x SB tlmiacom roztoku pri 180 V po dobu 20 minút.

Vizualizácia fragmentov bola uskutočnená pomocou UV transiluminátora. Pre presné určenie veľkosti fragmentov sme používali 50 bp a 100 bp komerčné DNA markery (Fermentas).



Obrázok 4: Reprezentatívne výsledky štiepenia 359 bp PCR produktu cytochrómu B restričnou endonukleázou *AluI* na 2,5 % agarózovom géle.

L1 – 50 bp ladder (Fermentas), 1 – *Mustela vison*, 2 – *Mustela putorius furo*, 3 – *Sus scrofa domesticus*, 4 – *Oryctolagus cuniculus*, L2 – 100 bp ladder (Fermentas), 5 – *Anser anser*.

Obrázok 4 znázorňuje výsledky štiepenia amplifikovaných PCR produktov vybraných živočíšnych druhov. Dráha označená „L“ je ladder (markér) s veľkosťou 100 bp. V dráhach 1 – 5 sú vizualizované fragmenty, ktoré vznikli po štiepení PCR produktu cytochrómu b dlhého 359 bp restričným enzýmom *AluI*. PCR produkty jednotlivých druhov boli štiepené na charakteristických miestach a vznikli špecifické fragmenty, ktorých veľkosť nám umožnila jednoznačné rozlíšenie vybraných živočíšnych druhov. Presné veľkosti štiepných fragmentov jednotlivých živočíšnych druhov sumarizuje tabuľka 5 a schéma 1.

Tabuľka 5: Vzory restričných fragmentov PCR-RFLP (*AluI*) analýzy 359 bp fragmentu cytochrómu b vybraných živočíšnych druhov vygenerované programom NEBcutter V2.0

Druh	Restričný enzým
	<i>AluI</i>
Norok americký (<i>Mustela vison</i>)	81 bp + 109 bp + 169 bp
Fretka domáca (<i>Mustela putorius furo</i>)	169 bp + 190 bp
Sviňa domáca (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	115 bp + 244 bp
Králi domáci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	359 bp
Hus domáca (<i>Anser anser</i>)	130 bp + 229 bp

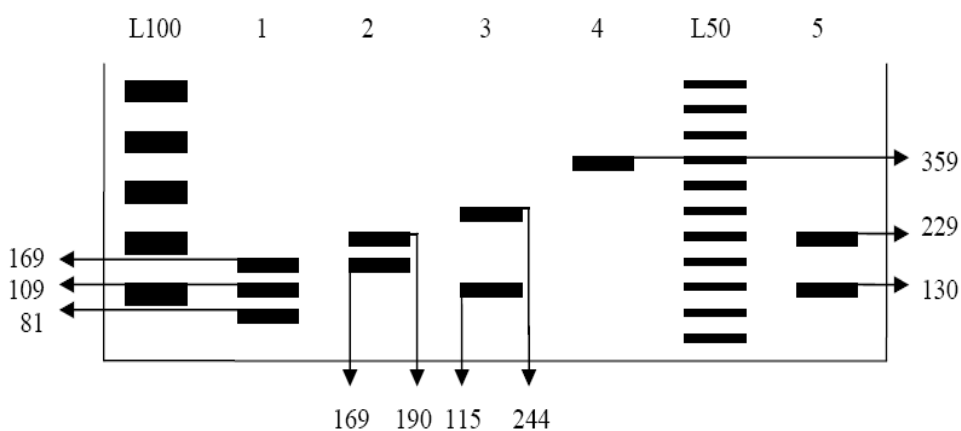


Schéma 1: Identické schematické znázornenie štiepenia 359 bp fragmentu cytochrómu b restričným enzýmom *AluI* podľa obrázku 4 s presným popisom veľkostí štiepných fragmentov.

L1 – 50 bp ladder (Fermentas), 1 – *Mustela vison*, 2 – *Mustela putorius furo*, 3 – *Sus scrofa domesticus*, 4 – *Oryctolagus cuniculus*, L2 – 100 bp ladder (Fermentas), 5 – *Anser anser*.

Elektroforetická separácia PCR produktov a restrikčných fragmentov jednotlivých PCR produktov prebiehala v horizontálnej elektroforéze Mini-Plus HU 10 (SCIE-PLAS). Separačným medium bola agaróza (Invitrogen) a nový sodium-borátový elektrolyt SB (Brody a Kern, 2004).

5 DISKUSIA

Izolácia jadrovej DNA spolu mtDNA bola vykonaná z krvi vybraných živočíšnych druhov. Pre izoláciu mtDNA z krvi cicavcov sme použili komerčný kit NucleospinBlood (Macherey Nagel). Izolácia mtDNA z krvných vzoriek husi domácej (*Anser anser*) bola uskutočnená pomocou vysoľovacej metódy podľa Millera et al. (1987). Koncentrácia a čistota izolovanej DNA bola meraná spektrofotometricky na prístroji NanoPhotometer™ (Implen). Extrakcia DNA pri jednotlivých metódach bola doprevádzaná určitým množstvom proteínov, ktorý určoval čistotu DNA. Avšak vysoký pomer mtDNA ku jadrovej DNA, ktorý je pri kostrovom svalstve až 2500 : 1 (Sorenson et al., 1998, Greenwood et al., 1999, Pascoal et al., 2004) nám umožnilo efektívnu amplifikáciu vybraného úseku mtDNA. Sekvenovaním mtDNA bola detegovaná vysoká variabilita v sekvencii génu kodujúceho cytochróm B, ktorý je považovaný za silný marker pri identifikácii živočíšnych druhov s využitím DNA analýz (Kocher et al., 1989, Kocher et al., 1991, Sorenson et al., 1998). Práve vysoká variabilita špecifických úsekov génu pre cytochróm b umožňuje rozlíšenie blízko príbuzných živočíšnych druhov (Hopwood et al., 1999, Momcilovic et al., 2001, Prado et al., 2002, Pascoal et al., 2004, Pfeiffer et al., 2004). Samotná veľkosť sekvencie génu pre cytochróm b je veľká 1140 bp, pričom je tvorená úsekmi, ktoré si počas evolúcie zachovali stále poradie báz a slúžia pre navrhnutie konzervačných primerov a vysoko variabilnými úsekmi, ktorých poradie báz je druhovo špecifické pričom vytvára vhodné podmienky pre využitie reštrikčných endonukleáz (Kocher et al., 1989, Kocher et al., 1991).

Identifikácia vybraných živočíšnych druhov bola vykonaná pomocou metódy PCR optimalizovanej podľa Kochera et al., (1989) a následnej RFLP analýzy. Výber reštrikčných endonukleáz bol uskutočnený pomocou programu NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003), s ktorým boli vytvorené vzory reštrikčných fragmentov sekvencií špecifického úseku cytochrómu b s veľkosťou 359 bp, ktorý sme amplifikovali pri vybraných druhov zvierat. Doteraz bolo publikovaných niekoľko štúdií, ktoré využili rôzne veľký fragment génu cytochrómu B pre determináciu živočíšnych druhov pomocou metódy PCR-RFLP. Zehner et al., (1998) štiepil pri identifikácii živočíšnych druhov ovce, ošípanej, hovädzieho dobytku, psa, mačky, zajaca, králiku, sliepky a morky PCR produkt s veľkosťou 981 bp. O niečo menší fragment génu cytochrómu B o dĺžke 703 bp použil vo svojej štúdií Chikune et al., (1994). Výhoda takto veľkých PCR produktov spočíva vtom, že pre identifikáciu druhov je pre nasledujúcu RFLP

analýzu potrebný len jeden reštrikčný enzým, avšak nevýhodou je, že pri niektorých druhoch vznikajú veľmi malé rozdiely v dĺžke fragmentov, ktoré je ťažko analyzovať najmä v prípade zmesi vzoriek. Kocher et al., (1991) vo svojej štúdiu popísal ešte jednu nevýhodu veľkých fragmentov cytochrómu B. Príliš veľké PCR produkty nie sú aplikovateľné na väčšinu zástupcov vtákov, ktorých sekvencia je príliš odlišná. Forrest et al., (1994) použili pre PCR-RFLP metódu fragment veľký 307 bp a Kocher et al., (1989) fragment s veľkosťou 359 bp. Rovnako veľký fragment o veľkosti 359 bp použili vo svojej práci aj Gábor et al., (2009) a Minarovič (2009). Pri identifikácií vybraných druhov domestikovaných zvierat (hovädzí dobytok, sviňa domáca, ovca) a divožijúcich druhoch (jeleň hôrny, diviak lesný, zubor európsky) použili paletu 5 reštrikčných endonukleáz *AluI*, *FokI*, *HinfI*, *HaeIII*, *MboI*, pomocou ktorých dokázali jednoznačne oddeliť vzorky jeleňa hôrneho, zubra európskeho, ovcu domácu a hovädzieho dobytku od vzoriek diviaka lesného a svine domácej. Uvedené dva živočíšne druhy nedokázali identifikovať z dôvodu vysokej fylogenetickej príbuznosti. Na rozdiel od nich sme v našej práci použili len jednu reštrikčnú endonukleázu *AluI* a nasledovné živočíšne druhy – norok americký, fretka domáca, sviňa domáca, králik domáci a hus domáca. Sekvencie celého mitochondriálneho genómu králika domáceho (*NC-001913*), alebo časti mtDNA zahrňujúcej cytochróm b pre ošípanú (*AB015079*), hus (*GQ120440*), fretky (*AB010379*) a amerického norka (*EF689073*) boli prevzaté z databázi NCBI.

Výsledné štiepne fragmenty pre jednotlivé živočíšne druhy získané prostredníctvom reštrikčnej endonukleázy *AluI* sú popísané v tabuľke 5. Pomocou fotodokumentácie štiepenie naamplifikovaného fragmentu génu pre cytochróm b (obrázok 4) sme overili veľkosti štiepných fragmenov (schéma 1), ktoré vygeneroval program NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003) so sekvencií cytochrómu b pre vybrané živočíšne druhy (príloha). Použitie len jedného reštrikčného enzýmu nám výrazne urýchlilo identifikáciu vybraných živočíšnych druhov a pričom sa potvrdila rýchlosť a jednoduchosť identifikácie rozdielnych živočíšnych druhov metódou PCR-RFLP.

6 ZÁVER

V súlade so stanovenými cieľmi diplomovej práci sme izolovali mtDNA z krvných vzoriek piatich živočíšnych druhov – norok americký (*Mustela vison*), fretka domáca (*Mustela putorius vison*), sviňa domáca (*Sus scrofa domesticus*), králik domáci (*Oryctolagus cuniculus*), hus domáca (*Anser anser*). Samotnú identifikáciu vybraných živočíšnych druhov sme vykonali metódou PCR-RFLP. Pre identifikáciu vybraných druhov sme zvolili reštrikčnú endonukleázu *AluI*, ktorá štiepila naamplifikovaný fragment génu pre cytochróm b o veľkosti 359 bp. Na základe špecifických veľkostí štiepných fragmentov sme dokázali prostredníctvom elektroforetickej separácie na agarózovom géle jednoznačne identifikovať vybrané živočíšne druhy (*Mustela vison* – 81 bp, 109 bp, 169 bp, *Mustela putorius vison* – 169 bp, 190 bp, *Sus scrofa domesticus* – 115 bp, 244 bp, *Oryctolagus cuniculus* – 359 bp, *Anser anser* – 130 bp, 229 bp). Naše výsledky rýchlej a jednoduchej identifikácie vybraných živočíšnych druhov s využitím jednej reštrikčnej endonukleázy *AluI* potvrdili účinnosť PCR-RFLP analýzy mtDNA pri identifikácii živočíšnych druhov.

7 Zoznam použitej literatúry

1. ADKINS, R. M. – HONEYCUTT, R. L. – DISOTELL, T. R. 1996. Evolution of the eutherian cytochrome c oxidase subunit II: heterogeneous rates of protein evolution and altered interaction with cytochrome c. In: *Mol. Biol. Evol.* 13, 1996. s. 1393 – 1404.
2. ANDERSON, S. – BANKIER, A. T. – BARREL, B. G. – DE BRUIJN, M. H. L. – COULSON, A. R. – DROUIN, J. – EPERON, I.C. – NIERLICH, D. P. – ROE, B. A. – SANGER, F. – SCHREIER, P. H. – SMITH, A. J. H. – STADEN, R. – YOUNG, I. G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. In: *Nature* 290, 1981. s. 457-465.
3. AVISE, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York, N.Y.
4. BELHADY, S. 2004. Characterisation of local rabbit performances in Algeria: Environmental variation of litter size and weights. In Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, Puebla (Mexico), sept. 2004, WRSA ed., s. 218-223
5. BERG, J. M. - TYMOCZKO, J. L. - STRYER, L. 2006. Biochemistry. 6. vydanie. W. H. Freeman and Company, New York. s. 502-540.
6. BERTINI, I. 2006. Cytochrome c: occurrence and functions. In *Chemical reviews* Bd. 106s. 90 -115. PMID 16402772
7. BEŽO, M. – BEŽOVÁ, K. 1998. Genetický slovník. Nitra: SPU, 1998, s. 152. ISBN: 80-7137-556-x.
8. BIELANSKI, P. 2004. Effect of breed and management system on productive traits of broiler rabbits. In *Rocz Nauk Zoot*, roč. 18, s. 1 – 86.
9. BRANCO, M. – MONNEROT, M. – FERRAND, N. – TEMPLETON, A. 2002. Postglacial dispersal of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) on the Iberian Peninsula reconstructed by nested clade and mismatch analyses of mitochondrial DNA genetic variation. In *Evolution*, roč. 56, 2002, č.4, s. 792-803
10. BRODY, J.R. – KERN, S.E. 2004. Sodium boric acid: a tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. In *Biotechniques*, roč. 36, 2004, č. 2, s. 211 – 215
11. ČEPICA, S. 2002. Současná genomika hospodářských zvířat. In *Sb. XX Genetické dny* Brno: MZLU, 2002, s. 12 -18. ISBN 80 – 7157 – 607 - 7

-
12. DA FONSECA, R. R. – JOHNSON, E. W. – O'BRIEN, J. S. – RAMOS, M. J. – ANTUNES, A. 2008. The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. PubMed Central, 2008. Dostupné na internete: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2375446&tool=pmc-entrez>
 13. DVOŘÁK, J. – VRTKOVÁ, I. 2001. Malá genetika prasat. Brno: MZLU, 2001. 91 s. ISBN 80-7157-521-6.
 14. ECKERT, K. A. – KUNKEL, T. A. 1991. The fidelity of DNA - polymerase and the polymerases used in PCR. In *Polymerase chain reaction I: A practical approach*, IRL Press, Oxford, 1991. s. 17 – 24.
 15. FORREST, A. A. R. - CARNEGIE, P. R., 1994. Identification of gourmet meat using FINS (forensically informative nucleotide sequencing). *Biotechniques* 17:24–26
 16. GÁBOR, M. – TRAKOVICKÁ, A. – MILUCHOVÁ, M. 2009. Využitie variability cytochrómu b pri identifikácii živočíšnych druhov pomocou metód PCR-RFLP. In *Acta fytotechnica et zootechnica – Mimoriadne číslo*, roč.12, s. 185 – 190.
 17. GIBSON, CH. 2007. Zvieratá Európy, Slovart, s. 224. ISBN 9788080855956
 18. GREENWOOD, A.D. - PÄÄBO, S., 1999. Nuclear insertion sequences of mitochondrial DNA predominate in hair but not in blood of elephants. *Molecular Ecology* 8: 133-137.
 19. HOLLAND, M. M. - PERSONS, T. J. 1999. Mitochondrial DNA sequence analysis - Validation and use for forensic casework. In: *Forensic Sci Rev* 11, 1999. s. 21-48.
 20. HOPWOOD, A.J. - FAIRBROTHER, S. K. - LOCKLEY K. A. - BARDSLEY, G. R., 1999. An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. *Meat Sci.*, 53: 227-231.
 21. CHIKUNI, K. - TABATA, T. - KOSUGIYAMA, M. - MOMMA, M. - SAITO, M., 1994. Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. *Meat Science*, 37(3),337–345 .
 22. ILHAK, O. I. – ARSLAN, A. 2007. Identification of meat species by polymerase chain reaction (PCR) technique. 2007. In *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 31, 2007. s. 159 – 163.

-
23. KLUG, W. S. – CUMMINGS, M. R. 1994. Concepts of Genetics, 4th edition. Macmillian College Pub., Cliffs, NJ
 24. KOCHER, T. D. – THOMAS, K. W. – MEYER, A. – EDWARDS, V. S. – PÄÄBO, S. – VILLABLANCA, X. F. – WILSON, C. A. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 86(16), 6196–6200.
 25. KOCHER, T. D. – IRWIN, D. M. – WILSON, A. C., 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J Mol Evol* 32:128–144.
 26. KORSTANJE, R. – O'BRIEN, P. C. – YANG, F. – RENS, W. – BOSMA, A. A. – VAN LITH H. A. – VAN ZUTPHEN, L. F. – FERGUSSON – SMITH, M. A. 1999. Complete homology maps of the rabbit (*Oryctolagus Cuniculus*) and human by reciprocal chromosome painting. In *Cytogenet Cell Genet*, roč. 86, 1999, č. 34, s 317-322.
 27. MASOPUST, J. – BARTUŇKOVÁ, J. – GOETZ, P. – CHROMÝ, V. – JABOR, A. – JIRÁSEK, J. E. – MAREŠ, J. – PALIČKA, V. – PELOUCH, V. – PRŮŠA, R. – ŠTERN, P. – ZIMA, T. 2003. *Patobiochemie buňky*. Praha : Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, ISBN 80-239-1011-6.
 28. MILLER, S. A. – DYKES, D. D. – POLESKY, H. F. 1987. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. In *Nucleic Acids Research*, 16 N3, 1988. s. 1215.
 29. MINAROVIČ, T. 2009. Využitie polymorfizmu Cytochromu b na identifikáciu živočíšnych druhov. Diplomová práca. 2009.
 30. MOMCILOVIC, D. – RASOOLY, A., 2000. Detection and analysis of animal materials in food and feed. *J Food Prot*;63:1602–1609.
 31. MULLIS, K. B. – FALOONA, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Methods Enzymol*, 1987. s. 335-350.
 32. MULLIS, K. B. 1990. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. In *Scientific American*, Roč. 262, 1990, č.4, s. 36 - 43
 33. NAKAMURA, S. – KATAMINE, S. – YAMAMOTO, T. – FOUNG, S. K. H. – KURATA, T. – HIRABAYASHI, Y. – SHIMADA, K. – HINO, S. – MIYAMOTO, T. 1993. Amplification and Detection of a Single Molecule of Human Immunodeficiency Virus RNA. In *Virus Genes* 7,:4, 1993. s. 325 – 338.
-

-
34. PALUMBI, S. R. – BAKER, C. S. 1994. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. In: *Mol. Biol. Evol.* 11, s. 426 – 435.
 35. PASCOAL, A. – PRADO, M. – CASTRO, J. – CEPEDA, A. – VELÁZQUEZ, B. J. 2004. Survey of authenticity of meat species in food product subjected to different technological processes, by means of PCR – RFLP analysis. *Eur Food Res Technol* 218: 306 – 312.
 36. PFEIFFER, I. – BURGER, J. – BRENIG, B., 2004. Diagnostic polymorphism in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP. *BMC Genetics* 2004, 5:30, <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/5/30>
 37. PRADO, M. - FRANCO, M. C. - FENTE, A. C. - CEPEDA, A. - VAZQUEZ, I. B. - BARROS, J. – VELÁZQUEZ, B. J., 2002. Comparison of extraction methods for the recovery, amplification and species-specific analysis of DNA from bone and bone meals. *Electrophoresis* 23:1005-1012.
 38. RASLER, M. – QUERFURTH, R. - WARNATZ, H.J. – LEHRACH, H. – YASPO, M.L. – KROBITSH, S. 2006. An efficient and economic enhancer mix for PCR. In BBRC, 2006.
 39. ROGEL – GALLIARD, C. – FERRAND, N. – HAYES, H. 2009. Rabbit. In. *Genome Mapping and Genomics in Animals*, roč. 3, 2009.
 40. RUSSO, C. A. M. – TAKRZAKI, N. – NIE, M. 1996. Efficiencies of different genes and different tree – building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. *Mol. Biol. Evol.* 133, 1996. s. 525 – 536.
 41. SAMBROOK, J. – FRITZ, E. F. – MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed.*, Cold Spring Harb. Lab. Press, USA, 1989.
 42. SHEFFIELD, V. – BECK, J. – KWITEK, A. - SANDSTROM, D. – STONE, E. 1993. The sensitivity of single - strand conformation polymorphism analysis of the detection of single based substitutions. In *Genomics*, roč. 16, 1993, č.2, s. 325 – 332.
 43. SORENSON, M.D. - QUINN, W. T., 1998. Numts: A challenge for avian systematics and population biology. *The Auk* 115: 214-221.
 44. TAANMAN, J. W. 1999. The mitochondrial genome : structure, transcription, translation and replication. In: *Biochim Biophys* 1410, 1999. s. 103 – 123.

-
45. UHRÍN, P. – KÚBEK, A. – BULLA, J. 1996. Základy molekulárnej genetiky. Nitra: VŠP, 1996. 250 s. ISBN 80-7137-240-4.
 46. URLLICH, M. 2003. Fretka, Cesty. 2003, ISBN 80718180003
 47. VINCZE, T. - POSFAI, J. - ROBERTS, R.J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes *Nucleic Acids Res.* 31: 3688-3691
 48. ZEHNER, R. - ZIMMERMANN, S. - MEBS, D., 1998. RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *Int J Legal Med*, 111:323-7.

PRÍLOHY

**Sekvence mitochondriálnej DNA vybraných živočíšnych druhov
pre analýzu cytochrómu b**

Sus scrofa domesticus

LOCUS AB015079 1140 bp DNA linear MAM 06-MAR-2001
DEFINITION *Sus scrofa domesticus* mitochondrial cytb gene for
cytochrome b,
complete cds, isolate: Large White 1.
ACCESSION AB015079
VERSION AB015079.1 GI:3241889
KEYWORDS cytochrome b.
SOURCE mitochondrion *Sus scrofa* (pig)
ORGANISM [Sus scrofa](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla;
Suina; Suidae; Sus.
REFERENCE 1
AUTHORS Watanobe, T., Okumura, N., Ishiguro, N., Nakano, M., Matsui, A.,
Sahara, M. and Komatsu, M.
TITLE Genetic relationship and distribution of the Japanese wild
boar
(*Sus scrofa leucomystax*) and Ryukyu wild boar (*Sus scrofa*
riukiuanus) analysed by mitochondrial DNA.

Čiastočná sekvencia:

```
61 ctcccagccc cctcaaacat ctcatcatga tgaaacttcg gttccctctt aggcattctgc
121 ctaatcttgc aaatcctaac aggcctgttc ttagcaatac attacacatc agacacaaca
181 acagctttct catcagttac acacatctgt cgagatgtaa attacggatg agttattcgc
241 tacctacatg caaacggagc atccatgttc tttatttgcc tattcatcca cgtaggccga
301 ggcctatact acggatccta tatattccta gaaacatgaa acattggagt agtcctacta
361 tttaccgtta tagcaacagc cttcataggc tacgtcctgc cctgaggaca aatatcattc
421 tgaggagccta cagtcacac aaatctacta tcagctatcc cttatatcgg aacagacctc
```

Primery:

Forward: 5' - CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA - 3'

Reverse: 5' - GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA - 3'

Zdroj: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/3241889>

Anser anser

LOCUS GQ120440 1143 bp DNA linear VRT 20-JUN-2009
DEFINITION *Anser anser* breed White Roman cytochrome b (cytb) gene, complete
cds; mitochondrial.
ACCESSION GQ120440
VERSION GQ120440.1 GI:239919017
KEYWORDS .
SOURCE mitochondrion *Anser anser* (domestic goose)
ORGANISM [Anser anser](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Archosauria; Dinosauria; Saurischia; Theropoda; Coelurosauria; Aves; Neognathae; Anseriformes; Anatidae; *Anser*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1143)
AUTHORS Wang,C.M., Kao,J.Y. and Hu,C.L.
TITLE cytb gene from purified mtDNA of White Roman goose
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1143)
AUTHORS Wang,C.M., Kao,J.Y. and Hu,C.L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (06-MAY-2009) Changhua Animal Propagation Station,
COA-LRI, 80 Tou-Lung Rd., Peitou, Changhua, Taiwan, R.O.C.

Čiastočná sekvencia:

```
61 aacaatgcat tcatcgacct tccagcccca tcaaacattt catcatgatg aaatttcggt
121 tccctcctgg gaatctgcct aatcctacaa atcctcacag gcctattcct agcaatacac
181 tacacatccg acacaacaac agcattctcc tctggtacct atatctgccg agacgtgaac
241 tacggctgaa tcatccgata catacacgca aacggagctt caatgggtttt tatctgctta
301 tatatgcacg taggacgagg cttatattac gggctttaca cttttctaga aacatgaaat
361 attggagtaa tccttctgct cacagtaata gccacagcat ttataggata cgtcctacca
421 tgaggacaaa taccattctg aggagcaaca gtcacaccca acctcttacc agcaatccca
```

Primery:

Forward: 5' - CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA - 3'

Reverse: 5' - GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA - 3'

Zdroj: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/19919697>

Mustela vison (Neovison vison)

LOCUS EF689073 1140 bp DNA linear MAM 29-APR-2008
DEFINITION Neovison vison isolate 02-0015 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial.
ACCESSION EF689073
VERSION EF689073.1 GI:156752031
KEYWORDS .
SOURCE mitochondrion Neovison vison
ORGANISM [Neovison vison](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia; Mustelidae; Mustelinae; Neovison.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1140)
AUTHORS Fernandes,C.A., Ginja,C., Pereira,I., Tenreiro,R., Bruford,M.W. and Santos Reis,M.
TITLE Species-specific mitochondrial DNA markers for identification of non-invasive samples from sympatric carnivores in the Iberian Peninsula
JOURNAL Conserv. Genet. 9 (3), 681-690 (2008)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1140)
AUTHORS Fernandes,C.A.R.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (20-JUN-2007) Department of Animal Biology, CBA-University of Lisbon, Campo Grande C2, 3rd Floor, Lisbon
1749-016, Portugal

Čiastočná sekvencia:

```
61 cttccagctc catcaaacat ttcatcatga tgaaacttcg gttcctcct gggagtctgc  
121 ttaatcctac aaatcctcac aggcctattc ctagcaatgc actacacatc cgacacaaca  
181 acagcattct cctccgtcac tcatatctgc cgagacgtaa actacggctg aattatccga  
241 tacatacacg ctaacggagc ttcaatgttt ttcatctgct tatatatgca cgtaggacga  
301 ggcctatatt atgggtctta cacttttcta gaaacatgaa acattggagt aattctocta  
361 cttacggtaa tagctacagc attcatagga tacgtgttac catgaggaca aatatcattt  
421 tgaggagcaa cagtcattac caacctccta tcagcaatcc catacatcgg cacaaatcta
```

Primery:

Forward: 5' - CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA - 3'

Reverse: 5' - GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA - 3'

Zdroj: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/2464950>

Mustela putorius vison

LOCUS AB010379 593 bp DNA linear MAM 08-APR-2000
DEFINITION *Mustela putorius furo* mitochondrial DNA,
isolate:MPU-1.
ACCESSION AB010379
VERSION AB010379.1 GI:3550978
KEYWORDS .
SOURCE mitochondrion *Mustela putorius furo* (domestic ferret)
ORGANISM [Mustela putorius furo](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria;
Carnivora; Caniformia; Mustelidae; Mustelinae; *Mustela*.
REFERENCE 1
AUTHORS Kurose,N., Masuda,R. and Yoshida,M.C.
TITLE Phylogeographic variation in two mustelines, the least
weasel *Mustela nivalis* and the ermine *M. erminea* of Japan,
based on mitochondrial DNA control region sequences
JOURNAL Zool. Sci. 16, 971-977 (1999)
REFERENCE 2 (bases 1 to 593)
AUTHORS Masuda,R.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (12-JAN-1998) Ryuichi Masuda, Hokkaido
University,Chromosome Research Unit, Faculty of Science;
North 10, West 8,Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0810, Japan
(E-mail:masudary@ees.hokudai.ac.jp, Tel:81-11-706-3541,
Fax:81-11-736-6304)

Čiastočná sekvencia:

```
61 ctcccagccc catcaaatat ttcattctga tgaatttcg gctcattact aggagtctgc
121 ctaatcctac aaatcctcac aggcctattc cttagcgatac actatacatc tgatacaata
181 acagcattct cctctgtcac ccatatctgt cgagatgtca attatggctg aattattcga
241 tatatacagc caaacggggc atcaatattt ttcattctgc tattcataca tgtagggcga
301 ggctgtact acggatcata tacttttcta gagacgtgaa acatcggagt agttcttcta
361 tttacagtta tagccacagc attcgttaga tatgtcctac catgaggaca aatatcattc
421 tgaggagcaa cagtcacac caaccttctc tcagcaattc catatattgg gacaaaccta
```

Primery:

Forward: 5' - CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA - 3'

Reverse: 5' - GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA - 3'

Zdroj: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/1881395>

Oryctolagus cuniculus

LOCUS NC_001913 17245 bp DNA circular MAM 01-FEB-2010
DEFINITION *Oryctolagus cuniculus* mitochondrion, complete genome.
ACCESSION NC_001913
VERSION NC_001913.1 GI:5835526
DBLINK Project: [11845](#)
KEYWORDS .
SOURCE mitochondrion *Oryctolagus cuniculus* (rabbit)
ORGANISM [Oryctolagus cuniculus](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires;
Lagomorpha; Leporidae; *Oryctolagus*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 17245)
AUTHORS Gissi, C., Gullberg, A. and Arnason, U.
TITLE The complete mitochondrial DNA sequence of the rabbit,
Oryctolagus cuniculus
JOURNAL Genomics 50 (2), 161-169 (1998)
PUBMED [9653643](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 17245)
CONSRM NCBI Genome Project
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (08-SEP-1999) National Center for Biotechnology
Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA
REFERENCE 3 (bases 1 to 17245)
AUTHORS Gissi, C.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (17-SEP-1997) Gissi C., Dept. of Genetics,
Division of Evolutionary Systematics, University of Lund,
Solvegatan 29, Lund, 223 62, SWEDEN

Čiastočná sekvencia:

14221 cccagctccatcaaatatctcatcatgatgaaactttggctctctcctaggcatttgctt
14281 aattttacagattctaacaggcctattcctagcaatacactatacacctgacacaacaac
14341 agcattctcctctgtaaccacatttgccgagacgtaaactatggctgaattatccgata
14401 tatacagcaaacggggcatcaatattttttatctgcctatttatgcatgtaggacgagg
14461 cctatactatggatcatataccttctagaaacatgaaacatcggagtaatcctcctatt
14521 tgcgacaatagccacagcattcataggctatgttttaccatgaggacaaatatcattctg
14581 aggagcaacagttattaccaacctcctttcagcaattccatatattggcacaacactagt

Primery:

Forward: 5' - CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA - 3'

Reverse: 5' - GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA - 3'

Zdroj: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/3445513>