



NÁRODNÍ
MUZEUM

Metodika správy a evidence tkáňové zoologické sbírky a determinace zoologického sbírkového materiálu na základě analýzy DNA

Tatiana Aghová, Petr Benda, Jindřich Brejcha, Petr Dolejš,
Eva Kyralová, Jiří Mlíkovský, Jiří Moravec, Radek Šanda,
Jan Štundl, Michal Tkoč & Dominik Vondráček



NÁRODNÍ
MUZEUM

Metodika správy a evidence tkáňové zoologické
sbírky a determinace zoologického sbírkového
materiálu na základě analýzy DNA



Metodika správy a evidence tkáňové zoologické sbírky a determinace zoologického sbírkového materiálu na základě analýzy DNA

Tatiana Aghová, Petr Benda, Jindřich Brejcha,
Petr Dolejš, Eva Kýralová, Jiří Mlíkovský, Jiří Moravec,
Radek Šanda, Jan Štundl, Michal Tkoč & Dominik Vondráček

Národní muzeum
Praha 2019

Metodika správy a evidence tkáňové zoologické sbírky a determinace zoologického sbírkového materiálu na základě analýzy DNA

Tatiana Aghová, Petr Benda, Jindřich Brejcha, Petr Dolejš, Eva Kyrlová, Jiří Mlíkovský, Jiří Moravec, Radek Šanda, Jan Štundl, Michal Tkoč & Dominik Vondráček

Recenze: Mgr. Barbora Rolečková, Ph.D. (Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i.); Mgr. Pavel Just (katedra zoologie PřF, Univerzita Karlova)

Dílčí kapitoly lektorovali: Mgr. Martin Fikáček, Ph.D.; RNDr. Jan Hušek, Ph.D.; Mgr. Ondřej Korábek, Ph.D.; prof. RNDr. Adam Petrusek, Ph.D.; Eliška Rolfová; RNDr. Vladimír Vohralík, CSc.

Metodika vznikla jako výstup programu aplikovaného výzkumu a vývoje Národní kulturní identity II (NAKI II), v rámci projektu „Metodika determinace zoologického sbírkového materiálu na základě analýzy DNA a správy a evidence tkáňové zoologické sbírky“ (DG16P02B038, roky 2016–2019), financovaného prostřednictvím Ministerstva kultury ČR.

Text © Mgr. Tatiana Aghová, Ph.D.; doc. RNDr. Petr Benda, Ph.D.; Mgr. Jindřich Brejcha, Ph.D.; RNDr. Petr Dolejš, Ph.D.; Mgr. Eva Kyrlová; Dipl.-Biol. Jiří Mlíkovský, CSc.; RNDr. Jiří Moravec, CSc.; Mgr. Radek Šanda, Ph.D.; Mgr. Jan Štundl, Ph.D.; Mgr. Michal Tkoč & Mgr. Dominik Vondráček; 2019

Foto © Mgr. Tatiana Aghová, Ph.D.; Mgr. Zuzana Šwiderská; Mgr. Dominik Vondráček; Mgr. Michal Tkoč; 2019

Ilustrace © Mgr. Kristýna Eliášová; 2019

Editor: RNDr. Petr Dolejš, Ph.D.

© Národní muzeum, Praha, 2019
1. vydání

ISBN 978-80-7036-625-7

Obsah

1. Úvod a cíle.....	7
2. Sběr a uchovávání genetických vzorků.....	8
2.1. Obecné zásady sběru materiálu	8
2.2. Bezobratlí (vyjma hmyzu)	11
2.3. Hmyz	18
2.4. Rybovití obratlovci	23
2.5. Obojživelníci a plazi	25
2.6. Ptáci	32
2.7. Savci	35
2.8. Právní aspekty sběru zoologického materiálu pro molekulární analýzy	43
3. Laboratoř, vybavení, přístroje a pomůcky	46
3.1. Uspořádání laboratoří	46
3.2. Přístrojové vybavení a materiál	46
4. Zásady pro práci v molekulární laboratoři	50
4.1. Všeobecně platné zásady v molekulární laboratoři	50
4.2. Zásady pro práci s muzejním materiálem	50
5. Izolace DNA.....	52
5.1. Co je izolace DNA a na jakých principech funguje	52
5.2. Genetické vzorky	52
5.3. Vybrané izolační protokoly	57
6. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	66
6.1. Princip PCR reakce	66
6.2. Protokoly vybraných PCR protokolů	68
7. Gelová elektroforéza	71
7.1. Princip gelové elektroforézy	71
7.2. Protokoly vybraných aplikací gelové elektroforézy	72
7.3. Bezpečnost práce s gely a elektroforézou	75
8. Přečišťování produktů PCR	76
8.1. Princip přečišťování produktů PCR	76
8.2. Protokoly vybraných přečišťovacích protokolů	76
9. Sekvenování Sangerovou metodou	80
10. Nové způsoby sekvenování (Next Generation Sequencing)	82
11. DNA barcoding.....	90
12. Analýza sekvencí	91
12.1. Editování sekvencí	91
12.2. Basic local alignment search tool (BLAST)	93
12.3. Jednoduchá fylogenetická analýza	95
13. Seznam zkratk.....	100
14. Literatura	101

Summary

Methods for storing and archiving zoological tissue collections, and identification based on DNA barcoding. Along the advantage of molecular genetic methods within the zoological research an increased need of methodical guide that summarizes all the essential information appeared including instructions about sampling of biological material from different kind of organisms and following molecular analysis.

In the first part of this guide, proper collection of biological material for genetic analysis from different group of organisms is introduced as well as the basic legal collection aspect. Subsequently, information about the fixation of tissues for correct DNA preservation and requested storage conditions of tissues for additional molecular steps in the laboratory are provided.

Second part is mainly focusing in laboratory steps and molecular genetic analysis. Readers will find all kind of information about molecular laboratory, including laboratory workflow and instructions for genetic analysis. For each molecular step (DNA extraction, polymerase chain reaction, gel electrophoresis, sequencing) several different protocols are mentioned. Researchers can choose according to type of their samples as well as difficulty and/or available budget. In addition to the basic protocols, this guide also provides a protocol for analysing historic samples, precisely speaking the protocol for amplicon sequencing using the next generation sequencing.

Authors believe that this unique publication will be a useful source of information not only for colleagues from different Czech and Slovak museums, but also for wider public (e.g. secondary school and university students).

Key words: collecting of animals; depositary conditions; museum material; DNA barcoding; extraction of DNA; Polymerase chain reaction; sequencing

1. Úvod a cíle

Molekulární biologie patří v posledních letech mezi nejrychleji se rozvíjející biologická odvětví. Proto není překvapením, že v posledních desetiletích proniklo studium DNA i do muzejní praxe. Díky rozvoji molekulárních metod dokážeme získat genetické sekvence vzácného typového materiálu, organismů z vyhynulých populací, dokonce i vyhynulých organismů. Díky sekvencím DNA dokážeme zjistit, do kterého druhu (linie nebo populace) nový organismus patří (viz MARIČ a kol. 2019), nebo přiřadit larvální stadia hmyzu k odpovídajícímu dospělému jedinci (viz FIKÁČEK a kol. 2018).

K využití genetických metod v muzejnictví/zoologickém výzkumu je však třeba přizpůsobit i **sběr materiálu** v terénu. Metody odběru, výběr vhodného fixačního média a správné skladování jsou klíčovými faktory pro další molekulární analýzy. Proto se tato část metodiky jistě stane vítaným návodem pro všechny, kteří sice ani nemusí v molekulární laboratoři sami pracovat, ale sbírají vzorky pro molekulární analýzy (dále „genetické vzorky“) v terénu. Popsané techniky sběru vycházejí z dříve publikovaných českých i zahraničních návodů, jsou ale na základě vlastních zkušeností autorů nebo lektorů modifikovány tak, aby byl nasbíraný materiál využitelný pro genetické výzkumy.

Kromě návodů pro sběr materiálu najdete v metodice i popis potřebného přístrojového a materiálového **vybavení** a základy **práce v molekulární laboratoři**. Všechny protokoly (podbarvené žlutě) jsou popsány co nejdětalněji, s jednoduchým teoretickým úvodem, výčtem potřebného materiálu, doplněné o obrázky a schémata. Kromě práce v laboratoři jsme popsali i základy softwarové **analýzy sekvencí**. Metodika se tak může stát pomůckou nejen pro začínající výzkumníky v oblasti genetiky a molekulární fylogeneze, ale užitečné informace si najdou i ti zkušenější. Ti mohou navíc využít návod pro práci s citlivými **muzejními vzorky** včetně ampikonového protokolu s použitím **sekvenování nové generace** (NGS).

Metodika odráží potřeby současného genetického výzkumu. Klade si za cíl 1) poskytnout návod pro správný **odběr** zoologických vzorků, jejich **zpracování** (viz MARTINCOVÁ & AGHOVÁ 2020) a správné **uložení** ve sbírce (viz VONDRÁČEK a kol. 2018) a dále 2) pro **zpracování** vzorků v molekulární laboratoři, při kterém je kladen důraz nejen na standardní metody, ale také na práci s **historickými** vzorky. Takto uceleně pojatá monografie, spojující metody od sběru materiálu po jejich zpracování těmi nejmodernějšími postupy, je publikována vůbec poprvé. Jistým omezením pro uživatele může být finanční náročnost vybudování molekulární laboratoře a její provoz. Nicméně metodika je použitelná pro všechny, kteří materiál pro molekulární analýzy sbírají, bez ohledu na to, zda jej budou zpracovávat sami, nebo ho ke zpracování poskytnou jiné instituci.

Věříme, že tato jedinečná publikace bude přínosným zdrojem informací nejen pro kolegy z jiných českých a slovenských muzeí, ale i pro širší odbornou veřejnost (např. pro amatérské sběratele). Naším přáním je, aby se metody sběru genetických vzorků a genetické identifikace popsané v této metodice staly běžnou praxí, protože genetická identifikace muzejních exponátů významně zvyšuje hodnotu sbírek, a genotypované/digitalizované sbírky se stávají dostupné vědcům z celého světa.

2. Sběr a uchovávání genetických vzorků

2.1. Obecné zásady sběru materiálu

2.1.1. Fixování vzorků

Způsob fixace vzorků závisí na analýzách, které budou na vzorku prováděny. K fixaci a uložení sbírkových jedinců se v současné době používá buď **mražení** přímo v terénu (pevný CO₂, tekutý dusík), nebo nejčastěji ethanol (alkohol), resp. jeho dva typy. Jednak je to tzv. **“čistý ethanol”**, tzn. prostý produkt kvašení a destilace, bez dalších příměsí (tedy **nedenaturovaný**), většinou v přirozené azeotropické koncentraci **96 %**. Ten používáme k ukládání genetického materiálu. Jeho výroba je sice nejlevnější, ale vzhledem k nebezpečí zneužití ke konzumaci je zatížen vysokou daní, a je proto pro běžné muzejní užití velmi drahý. Pro sbírkový materiál, ze kterého neplánujeme odebírat genetické vzorky, se proto nejčastěji používá levnější, tzv. **“denaturovaný ethanol”**, což je ethanol pro konzumaci znehodnocený malou příměsí další látky, většinou páchnoucí, tj. benzinem; dříve se používal i toluen, aceton anebo methanol. Denaturovaný ethanol pro genetické vzorky používat nelze.

Fixace v čistém ethanolu je vhodná zejména pro různé analýzy sekvencí DNA. Pro kvalitní fixaci DNA je důležité použít čistý ethanol o co nejvyšší koncentraci, tedy 96 %. Jeho nevýhodou ale je, že rychlým odebíráním vody z tkáně způsobuje její tvrdnutí a křehnutí. V případě živočichů, zejména některých bezobratlých, u kterých se po fixaci předpokládá manipulace s jejich těly (např. kvůli determinaci), je vhodné pro profixování přemístit živočicha dočasně do čistého ethanolu o nižší koncentraci.

Jiné způsoby analýz, například analýzy RNA (např. vzorky určené ke kvantifikaci míry transkripce DNA v zájmové tkáni) vyžadují vzorek umístit do speciálních roztoků. Nejrozšířenějším komerčně dostupným roztokem pro konzervaci RNA v tkáních je tzv. **RNAlater** (ThermoFisher scientific). RNAlateru podobný roztok se skládá ze síranu amonného, citrnanu sodného a kyseliny ethylendiamin-tetraoctové (EDTA) o pH = 5,2. RNAlater je tedy v zásadě silný solný roztok a je moderní verzí konzervace pomocí kuchyňské soli (chloridem sodným) využívaným v minulosti. RNAlater zachovává DNA i proteiny.

Dříve hojně používaný **formalín** je pro uložení sbírek zcela nevhodný. I když je ve srovnání s alkoholem levný, nevýhody to nevyváží – jednak denaturuje tkáně takovou měrou, že je velmi obtížné je používat pro analýzu DNA (viz Kap. 5.3.5.), jednak v něm na rozdíl od vhodně koncentrovaného alkoholu tkáně tvrdnou, a pozdější preparace jedinců je tím znesnadněna (nikoliv ovšem znemožněna), a jednak je považován za prokázaně rakovinotvorný, a manipulace s ním je proto nebezpečná. Jedinou situací, kde je použití formalínu oprávněné, je cílená fixace nervových tkání, která v alkoholu není možná, neboť alkohol rozpouští myelin, jímž je z hlediska objemu tvořena velká část nervových tkání, zejména její bílé hmoty. Při sběru ve státech, kde běžné užití alkoholu ke konzervaci může být problematické, jelikož jeho držení není povoleno, může být vhodnější uložit malou část tkáně do alkoholu a celý zbytek těla pak konzervovat formalínem. Jedince je pak třeba co nejdříve

převést do 70% alkoholu a pokud možno brzy (v řádu měsíců) preparovat. Takovéto situace však dnes už bývají méně běžné.

Pro detailnější přehled metod fixace vzorků odkazujeme zájemce na přehledovou literaturu, například SRINIVASAN a kol. (2002).

2.1.2. Dokumentace

Každý ulovený jedinec nebo každý sběr (více živočichů stejného druhu sebraných na stejném místě, ve stejný čas, stejným sběratelem a ideálně i stejnou metodou) je nutné označit **lokalitním štítkem**, který vložíme do nádoby s naloženým materiálem. Označujeme jím v nejlepším případě ihned na lokalitě, abychom předešli pozdější záměně sběrů nebo jedinců (EYMANN a kol. 2010). Na lokalitním lístku musí být vždy uvedeno **datum sběru** (výhodné je psát měsíc římskými číslicemi, aby nedošlo k záměně se dnem), **název lokality** a **jméno sběratele**.

Lokalitní štítky píšeme dokumentačním perem (se světlostálým a vodě odolným inkoustem) nebo ořezanou obyčejnou měkkou tužkou či mikrotužkou s měkkou tuhou. Tištěný lokalitní štítek by měl být vytištěn laserovou tiskárnou (přičemž dbáme, aby lístek nebyl silou přitlačen ke skleněné stěně epruvety, protože by mohlo dojít k obtisknutí údajů na sklo) nebo inkoustovou tiskárnou – v tomto případě ale musíme předem vyzkoušet, zda se inkoust ve fixační kapalině nerozpouští. K tisku je vhodný kancelářský papír o vyšší gramáži; dříve hojně používaný pauzovací papír se neosvědčil, protože jak dokumentační inkoust (tuš), tak tisk z laserové tiskárny se z něj v čistém ethanolu otírá.

Každou lokalitu sběru jakýchkoli jedinců je vhodné zaměřit pomocí **globálního pozičního systému (GPS)** a zaznamenat geografické souřadnice a nadmořskou výšku místa. U exotických sběrů je vhodné mít jméno lokality zapsané jak přepisem do latinky, nějakým způsobem kodifikovaným (podle mapy či dle místního zápisu), ale i domorodým písmem, což může být často lépe provedeno gramotným místním obyvatelem. Vhodné je také rovnou v terénu doplnit podrobnosti (např. vzdálenost od nejbližšího místa popsaného v mapě, okres či další správní jednotky, nebo i označením sběrací výpravy). Štítky doporučujeme psát v jednom jazyce, nejlépe v angličtině, kterému porozumí i zahraniční kolegové.

Lokalitní štítek může vypadat např. takto: „SLOVAKIA, Muráňská planina NP, Muráň, NPR Šarkanica, 540 m, 48°42'45.7"N, 19°59'18"E, SW, 15.vi.2017, leg. M. Tkoč“.

Ke sbírce musíme vytvořit **databázi**, ve které budou uvedeny všechny informace z lokalitního štítku a ideálně i pozice ve sbírce (např. místnost, mraznička, krabička, pozice v krabici). Tuto databázi si můžeme vytvořit v tabulkovém programu (Excel). Informace o sběrech je vhodné nahrát do veřejných databází (např. Národní genetická banka živočichů <http://ngbz.cz>, Global biodiversity information facility <https://www.gbif.org>). Sdílení informací o výskytu a případně sdílení materiálu na genetické analýzy umožňuje výzkumníkům jednodušeji získat studijní materiál, což přispívá i k ochraně přírody.

2.1.3. Uskladnění vzorků

Všechny genetické vzorky, které jsou fixovány v čistém ethanolu, by měly být skladovány **v mrazničce** (při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), protože vyšší (i pokojová) teplota způsobuje rychlejší rozpad DNA. Vzorky je nutné průběžně kontrolovat, zda nevysychají, a ethanol v intervalu několika let obměňovat. Při správném zacházení jsou vzorky použitelné pro molekulární analýzy v řádu desetiletí. Ethanol musí být při skladování v nadbytku. Objem ethanolu by měl být alespoň $10\times$ větší než objem vzorku samotného.

Druhou možností je **hluboké zmrazení na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$** (např. BŁĘDZKI & RYBAK 2016), které zajistí delší trvanlivost vzorků, ale vyžaduje vybavenost pracoviště odpovídajícími mrazničkami. Náklady na jejich pořízení, provoz a údržbu jsou v tomto případě vyšší, nehledě na nutnost obsluhy a pravidelné kontroly. Proto lze shromažďování materiálu na molekulární analýzy doporučit jen těm institucím, které mají k této činnosti odpovídající technické zázemí a dlouhodobě stabilní finanční a personální zajištění, aby nehrozil zánik sbírky tím, že se o ni nebude mít kdo starat.

Třetí možností pro trvalé uložení je **vysušení**, které se často využívá u rostlin. To ale musí proběhnout rychle, aby nedošlo ke hnití, zplsnivění a následnému znehodnocení tkáně s DNA. Vysušování vzorků přímo v terénu a následný transport jsou ale problematické. Další nevýhodou je možnost kontaminace vysušeného materiálu např. cizími organismy (kožojedy), či při manipulaci, protože může dojít ke kontaminaci již pouhým dotykem holé ruky výzkumníka. Vysušené vzorky podléhají degradaci pomaleji než nesprávně skladovaný ethanolový materiál.

2.2. Bezobratlí (vyjma hmyzu)

Bezobratlí představují velmi nesourodou skupinu živočichů, většinou malých rozměrů. Obývají nejrozmanitější prostředí, od vody, přes půdu, stromy a jsou i součástí vzdušného planktonu. Způsob jejich sběru se proto často více než od taxonomické skupiny odvíjí od prostředí, které obývají. Zároveň ale některé skupiny bezobratlých vyžadují specifický přístup k jejich odchytu vzhledem ke stavbě jejich těla. Z tohoto důvodu se budeme věnovat jednotlivým typům prostředí a některým specifickým konkrétních skupin bezobratlých.

Již při odchytu bezobratlých pro molekulární analýzy je nutno vědět, jakým způsobem budou ulovení jedinci uchováni, konkrétně jakým způsobem se zajistí jednak zachování vzorku pro získání DNA a zároveň dokladového jedince (voucheru) se zachovanými znaky nutnými pro revizi určení druhu. Tyto dva požadavky jsou v mnoha případech v rozporu kvůli změnám, které vyvolává v tělech organismů fixace v ethanolu. Pro účely některých studií může být prioritou kvalita DNA před spolehlivostí a revidovatelností určení do druhu. U muzejních sbírek, které slouží často jako referenční k ověření identity organismů, je třeba hledat cestu jak zachovat co nejvyšší kvalitu DNA a zároveň znaky potřebné k revizi určení vzorku.

Nejjednodušším způsobem je uchování v čistém ethanolu, případně isopropanolu, který nezpůsobuje tvrdnutí tkání tak jako ethanol, nepodléhá zdanění a ani omezením v muslimských zemích. Druhou možností je uchovávání vysušených vzorků. Konečně lze vzorky zamrazit v tekutém dusíku a uchovávat při -80 °C. Všechny možnosti mají své klady a záporny (viz Kap. 2.1.3.), ale již vlastní sběr bezobratlých je nutno daným možnostem přizpůsobit. Současně je nutno mít na paměti, že bezobratlí na sobě mohou nést pyl, foretiky nebo parazity, a v sobě potravu. To vše může způsobit kontaminace (GIBB & OSETO 2006), proto již při sběru bezobratlých pro účely genetického výzkumu je nutná určitá dávka obezřetnosti a pro vlastní molekulární analýzu je pak třeba použít vhodnou část těla.

2.2.1. Vodní bezobratlí

Sladkovodní prostředí obývá celá plejáda skupin živočichů: houbovci (Porifera), žahavci (Cnidaria), ploštěnci (Platyhelminthes), břichobrvky (Gastrotricha), pásnice (Nemertini), vířníci (Rotifera), hlístice a strunovci (Nematoida), měkkýši (Mollusca), kroužkovci (Annelida), mechovky (Bryozoa), mechovnatci (Entoprocta), želvušky (Tardigrada) a členovci (Arthropoda) (KRISKA 2013; THROP & ROGERS 2015).

Pro sběr vodních bezobratlých se nejčastěji používá např. planktonka, Mayerova láhev, cedník, dredž (vlečná síť) a individuální sběr pomocí pinzety. Metody pro kvantitativní sběry popisuje LELLÁKOVÁ a kol. (1985). Nasbírání jedinci nesmí být v žádném případě fixování ve formalínu, byť jeho použití u mnoha skupin vodních bezobratlých usnadňuje následnou determinaci. V případě zooplanktonu je vhodné mít paralelní vzorky fixované jak v ethanolu, tak ve formalínu. Ostatní vodní bezobratlé je nejvhodnější fixovat rovnou v **čistém ethanolu** (BŁĘDZKI & RYBAK 2016). Pokud těla nasbíraných živočichů obsahují hodně vody nebo pokud vzorek obsahuje hodně živočichů ($\geq \frac{1}{3}$ objemu ethanolu), takže by

se výsledná koncentrace fixačního ethanolu výrazně snížila, je nutno ethanol nejdéle po 24 hodinách vyměnit. Obsahuje-li vzorek organické nečistoty (listí, řasy, kousky dřeva apod.), je nutné vyměnit ethanol po 6 hodinách a pak ještě jednou po 24 hodinách (THROP & ROGERS 2015).

Nejdrobnější zástupce zooplanktonu, zejména některé vířníky, břichobrvky a máloštětnatce, je nutné sbírat jako tzv. **živý vzorek**, který přechováváme a transportujeme v temnu a ideálně při teplotě 2–6 °C. Další možností je živý zooplanktonní vzorek před zpracováním narkotizovat přilítím vody syčené oxidem uhličitým. V každém případě je ale nezbytné takový vzorek zpracovat do 48 hodin (PŘIKRYL 2006). Po určení nasbíraných živočichů, kdy již nepředpokládáme další manipulaci s jejich těly, je trvale uložíme do čistého ethanolu. Jiné způsoby trvalého uložení, např. montování do trvalých preparátů nebo uložení na sucho, se v případě vodních bezobratlých, kteří byli nasbíráni pro genetické studie, nedoporučuje.

2.2.2. Půdní bezobratlí

Půda představuje specifický biotop s více méně stálými podmínkami. Prostředí na pomezí vodního a čistě suchozemského se přizpůsobili ploštěnci (Platyhelminthes), hlístice (Nematoda), vířníci (Rotifera), kroužkovci (Annelida), břichobrvky (Gastrotricha), plži (Gastropoda), želvušky (Tardigrada) a členovci (Arthropoda) (FIEDLER & DUNGER 1989).

Obecné metody

Pro účely genetických studií je možno sbírat půdní bezobratlé přímo v terénu, nebo odebrat **půdní vzorek** či instalovat **návnadové pasti**, ze kterých budou zájmoví živočichové extrahováni později, v laboratoři. Pro sběr půdních bezobratlých přímo v terénu se nejčastěji používá **individuální sběr** za pomoci pinzety nebo exhaustoru, nebo **prosívání** substrátu pomocí prosívadla (TUF 2013). V těchto nejjednodušších případech nalezené živočichy ihned smrtíme a fixujeme v **čistém ethanolu**. Aby se zamezilo tvrdnutí a křehnutí živočichů, což by následně znesnadňovalo jejich determinaci do druhu, je vhodné po prvotním prefixování uložit živočichy do čistého ethanolu o nižší koncentraci (80 %).

Odebereme-li půdní vzorek nebo obsah návnadových pastí, můžeme z něj v laboratoři živočichy opět vybírat manuálně, nebo použít některou z pasivních, automatizovaných metod (TUF 2013). Při ručním vybírání používáme pro vybírání aktivních živočichů pinzetu nebo exhaustor, v případě neaktivních (např. zimujících) živočichů použijeme Hadornovu metodu. Ta spočívá v mírném zahřívání kovové misky, na kterou byl půdní vzorek nebo obsah návnadové pasti vysypán, což způsobí, že se živočichové začnou pohybovat, čímž se jejich sběr usnadní (LELLÁKOVÁ a kol. 1985). Sebraná zvířata ihned fixujeme v čistém ethanolu.

Při použití automatizovaných metod, jakými jsou různé xeroeklektory (Berlese-Tullgren), je opět nutno dbát, aby nedocházelo k přehřívání. Jako fixační kapalinu opět použijeme čistý ethanol. Stejně jako v případě vodních bezobratlých je potřeba dát pozor

na rychlé odpařování ethanolu a na možnost, že se sběrná nádobka brzy zaplní živočichy a detritem, což vede k tomu, že se vzorek nedostatečně profixuje.

Sběr půdních živočichů s měkkým tělem – ploštěnců, hlístic a kroužkovců

Fixování těchto červovitých živočichů je problematické, protože se musí použít takový způsob fixace, který nezpůsobí žádné deformace tělních struktur. Zpravidla se používá formalín nebo formalín obsahující směsi, jako např. často doporučovaná Beauchampova fixáž (LELLÁKOVÁ a kol. 1985), jejichž použití je ale při plánovaných molekulárních analýzách vyloučené. **Ploštěnce** (Platyhelminthes) a **hlístice** (Nematoda) lze fixovat v čistém ethanolu o nižší koncentraci (75 %), případně v isopropanolu (THROP & ROGERS 2015).

Žížaly (Opisthopora) se z půdy extrahují více metodami, které se často kombinují, protože jejich účinnost je v různých prostředích a u různých druhů žížal různá (PIŽL 2002; TUF 2013). Za účelem molekulárních analýz je vhodné sebraným žížalám odstříhnout zadní část těla, kterou uložíme v čistém ethanolu. Zbytek žížaly, podle kterého ji budeme determinovat, pak fixujeme standardním způsobem (ve formalínu nebo Beauchampově fixáži), aby zůstaly patrné všechny podstatné morfologické znaky (např. tvar prostomia). Při fixaci celé žížaly v ethanolu by došlo k nežádoucí deformaci těla (EYMANN a kol. 2010). Naopak roupice (Enchytraeidae), které se determinují za živa po extrakci O'Connorovou metodou, lze po jejich určení uchovat rovnou v čistém ethanolu.

Sběr mnohonožek

Mnohonožky (Diplopoda) se sbírají stejnými metodami jako ostatní půdní bezobratlí – individuálním sběrem, prosevem, odebíráním půdních vzorků a za pomoci padacích zemních či návnadových pastí (TUF 2013; KOCOUREK a kol. 2017). Jejich specifikum (kromě chlupulí a hrbulí) ale oproti stonožkám a stejnonožým korýšům tkví v tom, že jsou v jejich těle umístěné odpudivé žlázy (ozadenes) obsahující různé obranné látky, zejména alkaloidy (chinazoliny), chinony (benzo- a hydro-), aldehydy, fenoly a kyanovodík (MINELLI 2015; KANIA a kol. 2017). Po usmrcení mnohonožek v ethanolu se tyto látky z odpudivých žláz uvolní do fixační kapaliny (způsobí jejich charakteristické zbarvení) a poškozují DNA. Z tohoto důvodu je nezbytné nejpozději do čtyř hodin **vyměnit** znečištěný ethanol za nový (ADIS 2002). Pokud s sebou v terénu nemáme dostatečné množství čistého ethanolu, sbíráme mnohonožky **živé** a transportujeme je do laboratoře ve větších, větratelných nádobkách s vlhkým substrátem z místa odběru. Ať již mnohonožky pro molekulární analýzy fixujeme přímo v terénu nebo až v laboratoři, používáme vždy čistý ethanol (protože ethanol o vyšších koncentracích způsobuje ztvrdnutí těla mnohonožky, což značně ztěžuje její následnou determinaci, můžeme dočasně použít ethanol o nižší koncentraci). Po determinaci ukládáme mnohonožky do čistého ethanolu o koncentraci 96 %, ideálně každý kus do samostatné epruvety (KOCOUREK a kol. 2017).

2.2.3. Suchozemští bezobratlí

Suchozemským prostředím rozumíme prostředí od epigeonu (povrchu půdy), přes vegetaci až po vzduch. Do suchozemského prostředí proniká i mnoho půdních bezobratlých (např. štírci, mnohonožky nebo stejnonoží korýši), a proto se metody sběrů těchto skupin často prolínají. Suchozemští bezobratlí jsou v našich podmínkách zejména hmyz (Insecta), pavoukovci (Arachnida) a plži (Gastropoda). Sběru hmyzu pro uplatnění v molekulárních analýzách je věnována samostatná kapitola (Kap. 2.3.). Mezi pavoukovce (Arachnida) je v současné době řazeno celkem 11 řádů: roztoči (Acariformes a Parasitiformes), bičovci (Amblypygi), pavouci (Araneae), sekáči (Opiliones), štírenky (Palpigradi), štírci (Pseudoscorpiones), roztočovci (Ricinulei), štíři (Scorpiones), solifugy (Solifugae) a bičnatci (Uropygi) (SHARMA a kol. 2014). V této práci se nicméně budeme dále zabývat jen skupinami charakteristickými pro naše území, a to tedy roztoči, pavouky, sekáči a štírky. Suchozemské bezobratlé můžeme sbírat aktivně nebo pasivně – automatizovaně (NOVÁK 1969; WINKLER 1974; UYS & URBAN 1996).

Metody aktivního sběru

Mezi aktivní metody sběru patří **smýkání** bylinného patra (pro sběr epifytických bezobratlých), přímý **individuální sběr** pomocí pinzety, epruvety či exhaustory (JANÁČKOVÁ a kol. 2009). Další možnou metodou individuálního sběru je např. **seškrabávání** šupinek kůry do připravené nádoby (KOSLINSKA 1967) či individuálně pod kůrou stromů a v úlech (kupř. ŠTÁHLAVSKÝ 2011). Nejhojnější aktivní metodou sběru epigeických bezobratlých (štírků a roztočů, ale i drobnějších pavouků a plžů), je **prosívání** opadanky, detritu či substrátu z dutin stromů pomocí profesionálního prosívadla či pomocí kuchyňského cedníku a lze též využít Berlese-Tullgrenovy termoelektory (RŮŽIČKA & ANTUŠ 1990; ŠTÁHLAVSKÝ 2006; JANÁČKOVÁ a kol. 2009; TUF 2013). Velmi dobrých výsledků lze docílit i použitím **vysavače** (např. BALI a kol. 2019), jehož pořizovací náklady jsou ale poněkud vyšší a jeho transport v terénu je znesnadňován jeho velikostí. Aktivní metodou sbírání arborikolních bezobratlých je **sklepávání** jedinců z větví stromů a keřů (JANÁČKOVÁ a kol. 2009) pomocí profesionálního sklepadla. Stejně dobře ale může posloužit starý světlý a jednobarevný deštník, případně malé umyvadlo (RŮŽIČKA & ANTUŠ 1990). Ze stromů lze bezobratlé získat i **fogováním**, pro které ale již potřebujeme nákladnější vybavení (EYMANN a kol. 2010; NIEDOBOVÁ & ŘEZNIČKOVÁ 2014).

Metody pasivního sběru

Mezi nejčastěji používanou pasivní metodu sběru patří padací **zemní pasti**, nejčastěji v podobě po okraj zakopaného plastového kelímku vyplněného fixativem, kterým bývá nejčastěji 4% PFA (paraformaldehyd), různé solné roztoky, ethylenglykol, formalín (JANÁČKOVÁ a kol. 2009). Existuje ale mnoho dalších modifikací (RŮŽIČKA 1982), včetně závěsných skalních pastí (RŮŽIČKA & ANTUŠ 1997) nebo plovoucích pastí (RŮŽIČKA & ANTUŠ 1990). Nicméně u výše zmíněných fixativů dochází k degradaci DNA. Nabízí se tak myšlenka využití čistého ethanolu, který ale velice rychle vyprchává a mohlo by také dojít k jeho postupné-

mu rozředění např. dešťovou přeháňkou, což zásadním způsobem zkracuje dobu, po kterou může být past exponovaná. HÖFER a kol. (2015) doporučují propylenglykol jako vhodné fixační médium pro následný DNA barcoding. Druhou z možných alternativ je použití živočichytných zemních pastí, tedy kelímků nenaplněných žádnou fixační kapalinou, odkud se jedinci vybírají živí (DUFFEY 1972; DOLEJŠ 2014). Jejich nevýhodou je ale možnost jen velmi krátké expozice (po dobu nejvýše dvou dnů) a také to, že chytají jen ty bezobratlé, kteří z nich nejsou schopni vylézt. Potřebujeme-li z jakéhokoliv důvodu zanechat zemní past exponovanou po delší dobu, jeví se jako nejvhodnější řešení použít rampovou zemní past. Tento druh pasti se nezakopává, ale do sběrné nádoby, volně položené na zemi, vede několik šikmých „chodníčků“ (ramp) – dva nebo čtyři, podle tvaru sběrné nádoby (PATRICK & HANSEN 2013). Sběrnou nádobu naplníme čistým ethanolem a uzavřeme víčkem, čímž zabráníme nadměrnému odpařování ethanolu.

Vhodnou pasivní metodou sběru, především sekáčů a pavouků, jsou **kartonové kapsy (pásy)** instalované podél obvodu kmene stromů (NEVORALOVÁ 1997; PEKÁR 1999; JANÁČKOVÁ a kol. 2009; KORENKO a kol. 2010), ve kterých často sekáči a pavouci hledají úkryt nebo zde pečují o kokony. Finální sbírání je pak velice snadné, kdy se celý pás vyjme a posbírají se jedinci ukrytí v kartonu. Nicméně tato metoda se ukázala jako nejvíce efektivní pouze v podzimních měsících, kdy pavouci a sekáči využívají kmeny jako mikrohabitat k zimování (SZINETÁR & HORVÁTH 2005; MACHAČ & TUF 2016). Kartonový pás bývá někdy nahrazen bublinkovou fólií, jež funguje velice obdobně (ISAIA a kol. 2006). Velmi účinnou metodou sběru sekáčů jsou pak **padací pasti** v podobě seříznuté PET lahve s fixativem (MACHAČ & TUF 2016), kterým je v případě odchytu pro genetické výzkumy čistý ethanol. V některých pracích se lze setkat s využitím **lepových pastí**, nicméně jejich využití se při odchytu např. pavoukovců ukázalo jako velmi neúčinné (MACHAČ & TUF 2016). Další vhodnou a používanou metodou je chytání na **fotoeklektor**, který láká za světlem se pohybující bezobratlé. Fotoeklektory se používají v různých úpravách, např. se umísťují okolo větví (kupř. KOPONEN 2004) či kmene (BLICK 2011) a navádějí přitahované živočichy do odchytových nádob s fixativem (80% čistým ethanolem), které jsou periodicky vybírané. Použitelnou metodou odchytu mohou být i **nárazové pasti**, jak uvádí MACHAČ a kol. (2018).

Zpracování suchozemských členovců

Manipulace s nachytanými jedinci pomocí výše uvedených aktivních a pasivních metod se provádí pomocí entomologické pinzety a fixují se ideálně individuálně do čistého ethanolu. Nicméně u větších bezobratlých, jako jsou pavouci a sekáči, je lepší odebrat **třetí pravou končetinu** a zafixovat ji individuálně do zkumavky s čistým ethanolem a zbývající část těla jedince zafixovat do 80% ethanolu, který nezpůsobuje výrazné zkřehnutí vzorku, a lze s ním tak snáze manipulovat při morfologické determinaci či pořizování fotografické dokumentace. Třetí končetina je vhodná k odběru na izolaci DNA, jelikož na rozdíl od čtvrté končetiny nenese klíčové morfologické charakteristiky. Pro izolaci DNA obecně postačuje malé množství odebrané tkáně, např. výše zmíněná končetina, nicméně u malých organismů jako např. u štírků či roztočů je nutné fixovat **celého jedince** přímo do čistého ethanolu. Izolace DNA u štírků a roztočů je poté získána z celého jedince za pouhého použití pro-

teinázy a bez mechanického narušení (BOYER a kol. 2005; MURIENNE a kol. 2008; DABERT a kol. 2008). Po samotné izolaci DNA lze využít vnější kutikulu k následné morfologické determinaci. V případě fixace většího počtu jedinců do jedné nádoby je lepší po několika-minutové prvotní fixaci ethanol vyměnit, což pomůže lepšímu prostoupení fixativa do sebíraného materiálu, a zabrání tak možné maceraci tkání a poškození DNA.

Zpracování suchozemských plžů

Sběr plžů (Gastropoda) má určitá specifika, protože jejich těla obsahují relativně velké množství vody a v případě ulitnatých plžů jsou kryta neprostupnou ulitou. Sbírají se standardně ručním sběrem a prosíváním hrabanky za pomoci síta s velkými oky (velké druhy), dále odebráním hrabankových vzorků a následným prosevem za pomoci síta s menšími oky a plavením (malé druhy) (HORSÁK a kol. 2019).

V případě sběru plžů pro molekulární analýzy se obecně nedoporučuje, aby materiál vyschnul, a v žádném případě nesmí dojít k tomu, aby zvíře uhynulo a jeho tělo se začalo rozkládat. Malí plži se fixují **celí zaživa** v čistém ethanolu, plžům s delší (vřetenovitou) nebo celkově větší ulitou je dobré **proděravět** vrchol ulity, aby se ethanol dostal k tělu plže ze dvou stran a řádně jej profixoval. U závornatek (Clausiliidae) a plžů s víčkem je třeba udělat otvor v posledním závitě ulity, aby nedošlo k poškození důležitých taxonomických znaků v oblasti ústí ulity.

U větších plžů (>1 cm v průměru) je obecně nejlepší odebrat **část nohy** a tu fixovat v čistém ethanolu. Odběr lze provést na živém jedinci nebo na jedincích čerstvě usmrčených vroucí vodou. Jelikož při manipulaci se plži obvykle zatáhnou do ulity, pomalé zahřívání ve vodě je nejrychlejší metoda, jak je přimět vysunout nohu pro odebrání vzorku. Po jejím vysunutí lze buď provést odběr za živa, nebo rychlým a krátkým zvýšením teploty k varu plže usmrtit a vzorek odebrat poté. Nelze doporučit topení, při kterém těla plžů nasáknou vodou a při pomalém umírání plže dochází k degradaci DNA.

Při střihání je třeba po každém použití nůžky důkladně **otřít** a ideálně **sterilizovat** (např. opálením v plameni) protože sliz plžů obsahuje jejich DNA. Vedle vzorku tkáně je zapotřebí též uchovat **ulitu** pro konchologická měření a případná pozdější přezkoumání nebo dokonce i jako genetický vzorek (Kap. 5.2.2.). Zbytek těl z ulity nejsnáze vyjmeme po krátkém povaření, využít k tomu lze i mikrovlnnou troubu.

V některých skupinách s málo variabilními ulitami nebo u plžů bez ulity (v západním Palearktu např. Limacoidea, Arionoidea, Hygromiidae) je k určení nezbytné zachovat **tělo s pohlavními orgány**. Proto ulitnatého plže, ze kterého jsme již odebrali vzorek na molekulární analýzu, velice krátce povaříme ve vodě (závisí na velikosti druhu, nesmí dojít k uvaření tkání) a tělo vytáhneme z ulity, kterou očistíme a uložíme. Pokud jsme vzorek odebírali ze živého jedince, lze použít i topení, kde se ale často stává, že tělo nelze dobře vytáhnout. Tělo pak uchováme v denaturovaném 75–80% ethanolu. V krajním případě je možné alespoň vyfotografovat stavbu kopulačního ústrojí, což ale pro budoucí studium nemusí vždy stačit.

Nemůžeme-li z jakéhokoliv důvodu odebrat tkáňový vzorek přímo v terénu, transportujeme živé plže do laboratoře na sucho v silonové **punčoše**, látkovém pytlíku apod., ve které

se plži zavíčkují. Do punčochy vložíme lokalitní lístek, který uzavřeme do zipového igelito-
vého sáčku, aby jej plži neokousali.

Nahé plže před definitivním uložením do ethanolu smrtíme utopením v perlivé nebo horké vodě (HORSÁK a kol. 2019), anebo můžeme nahého plže naložit rovnou do čistého ethanolu. Nevýhodou pak ale je, že tělo plže tvrdne, a hůř se případně pitvá. U větších druhů (např. *Limax*) je proto opět dobré odebrat vzorek tkáně zvlášť.

2.2.4. Značení a uchovávání vzorků

Na lokalitních štítcích, které přikládáme k trvale uloženým jedincům (nebo které máme s sebou již předem předtištěné), je kromě základních tří minimálních údajů (kdy, kde, kdo – viz Kap. 2.1.2.) nutné uvést **geografické souřadnice**, protože se jedná o jediné jednoznačné určení lokality. Dále je nanejvýše doporučením uvést i stát (např. formou MPZ, mezinárodní poznávací značky), oblast (historickou, kraj, okres atd.) (KMENT 2009), biotop, číslo čtverce síťového mapování (BUCHAR 1982; NOVÁK 1989; PRUNER & MÍKA 1996), nadmořskou výšku a odchytkovou metodu (zkratkou, např. in = individuálně/individually, pr/si = prosívání/sieving, sk/be = sklepávání/beating, sm/sw = smýkání/sweeping, sp/ht = skalní past/hanging trap, zp/pt = zemní past/pitfall trap atd., viz Kap. 2.3.). Je-li to zvykem u konkrétních skupin (zooplankton, paraziti, fytofágové, detritofágové ad.), mohou se na druhý štítek doplnit další údaje, např. o počasí, teplotě, hostiteli/hostitelské rostlině, kvetoucích rostlinách, okolních stromech, složení opadu (NIEDOBOVÁ & ŘEZNIČKOVÁ 2014) nebo informace o vodní nádrži, místě a technických detailech způsobu odběru (PŘIKRYL 2006). Často se ale standardně uváděné údaje vejdou na jeden štítek.

Podmínky trvalého uložení bezobratlých, kteří jsou určeni pro genetické zpracování, jsou velmi důležité, protože na nich závisí budoucí použitelnost DNA. Nejjednodušší cestou je konzervace **v čistém ethanolu**. Možnou alternativou, např. při sběru a práci v zemích, kam není možné ethanol z jakýchkoliv důvodů dovážet, je použití isopropanolu. Vzorky skladujeme v ideálním případě roztříděné po jednotlivých druzích (nikoliv ve směsných vzorcích). Vždy totiž dochází k uvolnění (byť malého množství) DNA do fixační tekutiny (ethanolu), zejména je-li tělo živočicha kryto slizem, což by mohlo způsobovat nežádoucí kontaminace.

2.3. Hmyz

Hmyz obývá téměř všechny terestrické ekosystémy, tzn. vyjma moří, oceánů a polárních oblastí lze hmyz sbírat všude. Obývá různorodé biotopy, především jej najdeme v půdní hrabance, na povrchu půdy, pod kameny a spadlými větvemi, v travinách, bylinném patře lesů, luční vegetaci, na polích, kmenech i v korunách stromů. Žije ve dřevě mrtvých i živých stromů, minuje v listech a stoncích rostlin, v houbách a na houbách, v různorodých organických rozkládajících se materiálech (výkaly, mrtvá těla živočichů, odumírající rostliny a houby, odpadky, skládky, hnízda ptáků, nory a doupata savců). Obývá sladkovodní biotopy (potoky, řeky, kaluže, mokřady, rašeliniště, jezera, rybníky, vodní nádrže), vzduch (tzv. aeroplankton) a žije také synantropně, tzn. v lidských obydlích (domy, farmy, stáje, kurníky, zemědělské objekty). Hmyz žije také paraziticky – vši, blechy, štěnice, kloši, střechci. Sběr hmyzu lze provádět mnoha různými metodami, zde si představíme několik nejpoužívanějších metod. Obecně lze tyto metody rozdělit na metody individuální a hromadné. Hromadné metody jsou většinou pasti, které je potřeba vybírat v určitých intervalech. Podrobněji se metodami sběru a preparace hmyzu zabývá NOVÁK (1969).

2.3.1. Individuální metody

Pro všechny individuální metody platí, že nasbírané jedince přímo ukládáme do čistého ethanolu (70–80%). Případně je smrtíme mrazem a preparujeme na sucho (méně vhodné pro DNA výzkum).

Smýkání (SW)

Smýkání je důležitou metodou pro výzkum hmyzu, provádíme jej entomologickou sítíkou či tzv. smýkačkou (sítka je ještě opatřena ochranným rukávem a je určena ke smýkání keřů, stromů a trnité vegetace). Smýkáním sbíráme hmyz z bylinného patra, z travin a vegetace luk a stepí, z keřů, z větviček a listů stromů, z polních plodin, z vegetace vodních břehů, popř. můžeme chytat hmyz volně letící vzduchem.

Sklepávání (BE)

Sklepávání provádíme tyčí a sklepávací bílou plachtou. Větší silou udeříme tyčí do větve a padající hmyz a další živočichy sbíráme na plachtu, kterou držíme těsně pod větví. Na bílé plachtě je hmyz dobře viditelný a musíme jej rychle sbírat, než stačí uletět nebo utéct.

Individuální sběr (IN)

Individuální sběr je přímé sbírání hmyzu rukou, pinzetou nebo exhaustorem z různých substrátů nebo vegetace, květů, plodnic hub apod.

Prosívání (SI)

K prosívání používáme tzv. prosívadlo, což je nástroj ve tvaru válce či tlustého rukávu z jemné a pevné tkaniny, do vrchní třetiny válce nabíráme lesní hrabanku nebo jiný vhodný substrát. Pod substrátem je síto s oky o velikosti cca 1 cm. Síto a vrchní část prosívadla je opatřeno madly – těmi třepáním a pohybem do stran nabraný substrát prosejeme do spodní části, která je zavázaná. Takto získáme jemnější frakci substrátu spolu s hmyzem a bezobratlými živočichy – tzv. prosev. Tento prosev potom můžeme přímo vybírat na bílé podložce anebo jej přeneseme v bavlněném pytlí do laboratoře a potom umístíme do různých typů eklektorů (Obr. 1).



Obr. 1. Příklady tzv. Winklerova eklektoru třech různých konstrukcí. V eklektoru dochází k se-sýchání vzorku prosevu a sběru hmyzu do spodní sběrné nádoby s čistým ethanolem.

Vysávání (Vacuum collecting)

K vysávání hmyzu z epigeonu, trsů trav a jiné vegetace se používá speciální vysavač. Většinou se jedná o upravený fukar na listí, který běží na zpětný chod. V hubici je jemná síťka, kde se zachycuje hmyz. Ten potom vybíráme a vzorek uložíme do čistého ethanolu. Konstrukci takového vysavače popisuje WILSON a kol. (1993).

Sběr vodního hmyzu

Vodní hmyz sbíráme speciálními síťkami pro sběr vodních bezobratlých anebo upraveným kuchyňským cedníkem. Nasbíraný hmyz ukládáme do čistého ethanolu.

Chovy (Rearings)

Hmyz lze vychovat z různých substrátů a organických zbytků. Typicky se chovy realizují ze dřeva (dřevokazní brouci), z hub (brouci, motýli a dvoukřídlí), trsů trav, listů, plodů a květů rostlin, hálek a také ze vzorků půdy a hrabanky. Takovýto živný materiál uzavřeme do větších nádob a uložíme na vhodné stinné místo pokojové teploty. Otvor nádoby je opatřen

jemným sítem, aby nám hmyz neuletěl. Vylíhnuté dospělce potom sbíráme exhaustorem a fixujeme v čistém ethanolu.

2.3.2. Hromadné metody

Malaiseho past (MT)

Malaiseho past je ideální metodou pro odchyt hmyzu za účelem molekulárních analýz. Především je efektivní na sběr dvoukřídlého (Diptera) a blanokřídlého hmyzu (Hymenoptera). Past má konstrukci polootevřeného stanu s jedním vrcholem, který ústí do sběrné lahve (Obr. 2). Past je nutné vybírat po 2–4 týdnech, jako fixační činidlo se používá čistý ethanol (nebo denaturovaný malým množstvím methanolu) o koncentraci 70–80 %. Interval vybírání je nutno přizpůsobit tomu, jak rychle se sběrná nádobka zaplňuje živočichy, aby nedocházelo k degradaci vzorku vlivem nedostatečné fixace. Vzorek je potřeba po výběru roztrždit a studované jedince vyjmout a uložit do čistého ethanolu (70–96%). Pro více informací o konstrukci a použití Malaiseho pasti viz CRESSWELL (1995), DARLING & PACKER (1988) a STEYSKAL a kol. (1986).



Obr. 2. V Malaiseho pasti jedinci padají rovnou do konzervační tekutiny a nedochází tak k žádným rozkladným procesům v jejich tělech.

Nárazová past (FIT)

Nárazová past je tvořena dlouhou vertikálně zavěšenou obdélníkovou sítí (délka 2–3 m, výška 1 m) a sběrnými vaničkami, které jsou umístěny pod touto sítí. Sít' je pro hmyz špatně viditelná a umísťujeme ji do migračních letových koridorů, např. mezi dva stromy na nepoužívaných lesních cestách nebo průsecích v hustější vegetaci. Hmyz, který narazí do natažené sítě, padá do sběrných vaniček, kde je nalita fixační tekutina. Fixační tekutina je roztok vody a kuchyňské soli, popř. s malým množstvím detergentu (mycí prostředek na nádobí). Takto odchycené jedince je nutné vybrat malým čajovým cedníkem, promýt destilovanou vodou a umístit do čistého ethanolu. Vzorek je nutné vybírat v 24 hodinových intervalech, jinak hrozí degradace tkáně odchycených jedinců a pro výzkum DNA by je již nebylo možno použít.

Metoda žlutých misek (YPT)

Žluté misky (nebo také Mörickeho misky) jsou plastové talíře nebo dózy s nízkým okrajem. Většinou se používá jasně žlutá barva, ale v některých výzkumech poslouží i modrá, červená nebo bílá barva misek (PERLÍK & ŠEBEK 2019). Do misek se nalije voda s několika kapkami detergentu, ten odstraní povrchové napětí kapaliny a hmyz, který je lákán jasnou barvou, se do této tekutiny propadne, a je tak chycen. Vzorek je nutné vybrat do 24 hodin po nalití kapaliny do misek. Nachytaný hmyz je nutné zcedit jemným sítkem, promýt vodou a uložit do čistého ethanolu.

Lepové desky (ST)

Většinou žlutě zbarvené desky s lepkavou hmotou na povrchu. Nejedná se o příliš vhodnou metodu výzkumu hmyzu pro molekulární analýzy. Více v Kap. 2.2.3. o sběru bezobratlých.

Světelné pasti (LT)

Světelné pasti jsou nádoby se zdrojem světla (sodíková výbojka, LED diody, různé typy zářivek), které lákají noční hmyz. Kolem zdroje světla jsou plechové nebo skleněné desky, na které přiletující hmyz naráží a padá širokým trychtýřem do láhve se smrticí látkou. Jako smrticí látka se používá většinou ether. Takto nachytaný vzorek se poté většinou preparuje „na sucho“, z jednotlivých jedinců je možno odlomit část těla (nohu) a tu uložit do čistého ethanolu. Takový vzorek je nutné pečlivě označit tak, aby byl jednoznačně přiřaditelný k původnímu jedinci.

Padací pasti (PFT)

Jedná se o plastové kelímky s fixační tekutinou na dně. Kelímek může být opatřen návnadou, ale může chytat i pasivně bez lákadla. Více v Kap. 2.2.3. o sběru bezobratlých.

Emergenční past (ET)

Emergenční past vypadá podobně jako Malaiseho past, ale je uzavřená a chytá pouze jedince, kteří se líhnou ze substrátu, na kterém je past umístěna. Typicky můžeme emergenční past umístit na starý rozkládající se pařez, ze kterého se líhne dřevokazný a mykofágní (živící se houbami) hmyz.

Autosítě (Car-netting)

Jedná se o jemné síť napnuté na konstrukci, která je pevně připnuta na střeše auta nebo na předním nárazníku. Uprostřed sítě je malý sběrný pytel, kam se zachycují jedinci. Pomalou jízdou autem po lesních cestách nebo po nepoužívaných silnicích (max. 40 km/h) chytáme jedince přímo ze vzduchu a vybíráme vždy po několika kilometrech jízdy. Ukládáme je do čistého ethanolu.

2.3.3. Uchování genetických vzorků hmyzu

Tradičně se v muzejních sbírkách uchovává hmyz ve formě exsikátů (vysušených vzorků, Obr. 3 – pro jeho využití k fylogenetické analýze viz Kap. 5.2.2.), ethanolových preparátů nebo trvalých preparátů, kdy je hmyzí tělo nebo jeho části zalito do preparačního média (např. kanadský balzám, Euparal a další). Vzorky hmyzu, ze kterých chceme později vyextrahovat DNA, musíme usmrcovat **mražením** (tzn. minimálně 30 min při $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ u malých druhů, u odolnějších a velkých druhů 24–48 h). Případně lze takovéto jedince vložit živé do **čistého ethanolu**, kde dojde k jejich usmrcení do několika málo minut. Smrcení v octanu ethylnatém, coby nejčastějším prostředku k usmrcování hmyzu, nelze pro genetické vzorky doporučit. Delší expozice (např. ve smrtičce) totiž vede k rychlé degradaci DNA a následné nepoužitelnosti materiálu pro genetické analýzy.

Pro dlouhodobé uchování je velmi vhodné ukládat vzorky separovaně, každý jedinec hmyzu v epruvetě s čistým ethanolem anebo denaturovaný methanolem. Methanolem denaturovaný ethanol se u hmyzu úspěšně používá, na rozdíl od savců. Je podstatně levnější a v případě sběru do Malaisiho pastí, kdy je spotřeba ethanolu celkem velká, jde o rozumnou alternativu. Ethanol denaturovaný benzínem není vhodný, jelikož benzín výrazně znesnadňuje extrakci DNA ze vzorku.

Vzorky je nutné uchovávat v chladu a temnu, ideálně v lednici ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) anebo v mrazicím boxu ($-17\text{ }^{\circ}\text{C}$). Hluboké zmrazení je pro hmyz rovněž vhodné a je možné je použít, nicméně se v praxi příliš nevyužívá.



Obr. 3. Příklad suché sbírky dvoukřídlého hmyzu. I z takto preparovaných exemplářů lze za určitých podmínek vyextrahovat DNA.

2.3.4. Dokumentace genetických vzorků hmyzu

U hmyzu je vzorek tvořen většinou celým tělem daného jedince, někdy je vzorek tvořen i více jedinci různých druhů. Každý vzorek (hromadný či jednotlivý) musí být lokalizován, tzn. opatřen lokální štítkem a štítkem s informacemi o okolnostech sběru. Lokální štítek musí obsahovat lokalitu sběru, datum, metodu a jméno sběratele (blíže viz Kap. 2.1.2.).

Pro genetické analýzy je velmi dobré přidat na další štítek i informaci o metodě smrcení (octanem ethylnatým, etherem, mrazem, přímým vhozením do ethanolu) a o koncentraci fixační tekutiny. U ethanolu je potřeba vědět, zda je čistý, či něčím denaturovaný (methanolem, benzínem).

2.4. Rybovití obratlovci

Recentní rybovití obratlovci jsou řazeni do několika různých tříd – sliznatky (Myxinoidea), mihule (Petromyzontida), paryby (Chondrichthyes), lalokoploutví (Sarcopterygii), dvojdyšní (Dipnoi) a paprskoploutví (Actinopterygii). U rybovitých obratlovců lze podobně jako u jiných živočichů z tkání obsahujících buňky s jádry vyizolovat DNA.

2.4.1. Sběr

Rybovitě obratlovce lze lovit jednak **aktivními** metodami (různé aktivně ovládané sítě, elektrolov a lov na udici) nebo **pasivně** (různé sítě, především typu tenat, a dále vrše a pasti rozmanitých konstrukcí) (ZALE a kol. 2012). Pro odběr tkání s ohledem na využití pro molekulární analýzy je však vždy důležité, aby byl zpracováván materiál maximálně čerstvý. To je zaručeno u aktivních metod lovu a většiny pastí a vrší, avšak u pasivních sítí typu tenat je nutné sledovat stav odebíraných jedinců. Tenatní sítě se často nechávají ve vodě delší dobu, v závislosti na účelu odlovu, a ryby zapletené v sítích mohou uhynout a před odběrem být mrtvé delší dobu. V závislosti na podmínkách prostředí, především teplotě, tak může dojít v odebrané tkáni déle uhynulého jedince k degradaci obsažené tkáně, včetně DNA, jejíž další zpracování je pak při použití běžných technik problematické (EYMANN a kol. 2010).

2.4.2. Odběr a uchování tkáňových vzorků

Vzorek tkáně odebíráme s ohledem na specifickou tělní stavbu různých skupin rybovitých obratlovců. Pokud má daný organismus ploutve či ploutevní lem, odebírá se obvykle malá část **ploutve** či **lemu** (stačí maximálně do 1 cm²), která se dále uchovává nejčastěji v **čistém ethanolu**. V případě, že jsou ploutve či ploutevní lemy malé, případně chybějí, lze odebrat a k izolaci DNA využít krev (vhodné spíše pro velké jedince, odebírá se maximálně několik ml, pro samotnou izolaci DNA však stačí i několik kapek), šupiny (podle velikosti 1–10 šupin), kůže, svalovinu, kosti či jakékoliv vnitřní orgány (stačí v objemu několika mm³, ale vždy tak, aby bylo fixativum v nadbytku, a tkáň se spolehlivě zakonzervovala; viz Kap. 3.2.2.). Tkáň lze i zmrazit či naopak vysušit (viz též Kap. 2.2.4.). V případě uchování tkáně ve **zmraženém** stavu je ideální uložení v co nejnižší teplotě, přinejmenším v běžných mrazničkách (-18 až -20 °C), ideálně však v tzv. hluboko mrazicích boxech v teplotě kolem -80 °C, případně v nádobách s tekutým dusíkem (teplota kolem -200 °C). Hluboko zmražené tkáň lze uchovávat dlouhodobě. **Vysušení** tkáně je metoda spíše nouzová, kdy není k dispozici ethanol ani mrazicí zařízení. Tkáň je třeba vysušit co nejrychleji a nejúplněji, dehydratací se dosáhne výrazného zpomalení degradace DNA v tkáni. Při nejbližší příležitosti je však vhodné sušené tkáň převést do ethanolu či zmrazit, jak je uvedeno výše.

Nejčastější praxí v muzejním výzkumu je, že se z uloveného jedince v terénu odebere kousek **párové** (prsni či břišní) **ploutve z pravé strany** těla, případně kousek ploutevního lemu, který se uchová v označené zkumavce s čistým ethanolem a dokladový jedinec je

individuálně označen stejným kódem jako tkáň a uchován ve 4% roztoku formalínu pro další výzkum. Dostačující objem odebrané tkáně je několik mm³. Dokladoví jedinci jsou po dostatečném zafixování formalínem (podle velikosti jedince několik dní až týdnů) obvykle převedeni do 70% ethanolu, ve kterém jsou uchováváni trvale (tito dokladoví jedinci již neslouží k odebrání genetických vzorků).

2.5. Obojživelníci a plazi

2.5.1. Sběr

Obojživelníci (Amphibia) a plazi ("Reptilia") představují ve skutečnosti dvě velmi vzdálené evoluční linie. Také jejich způsob života je proto velmi odlišný. Podle nároků na životní prostředí a podle způsobu života zájmových organismů volíme vhodné metody sběru (HEYER a kol. 1994; MCDIARMID a kol. 2012). Obecně lze obojživelníky a plazy jen stěží specificky vábit do odchyťových pastí. Výjimku tvoří vodní želvy a čolci, jež lze chytat do vrší s vhodnou návnadou. Všechny další způsoby odchyty živých jedinců do pastí, jako jsou bariéry na migračních stezkách vybavené odchyťovými nádobami či umělé úkryty, nejsou skupinově specifické a v pastech lze očekávat široké spektrum živočichů obývajících příslušné habitaty. Další metody odchyty živých jedinců jsou přímé odchyty za použití doplňujících nástrojů. Vhodnost těchto metod pro zpracování vzorků molekulárními metodami však opět záleží zejména na správném odběru vzorků, důkladné dokumentaci a vhodnému zpracování vzorků, příhodném množství vzorků pro účely studií a zejména vhodném ukládání a skladování vzorků.

2.5.2. Hygienické předpoklady

Hygienické zásady je nutné dodržovat: (1) vzhledem k šířícím se patogenům v populacích obojživelníků a plazů; (2) vzhledem k chorobám potenciálně přenosným na člověka; (3) vzhledem k toxicitě obojživelníků a plazů; (4) vzhledem k citlivosti molekulárních analýz na případnou kontaminaci zkoumaných vzorků; (5) vzhledem k obecným zásadám bezpečnosti práce v laboratoři.

Patogeny obojživelníků a plazů

V současné době dochází po celém světě k hromadným nákazám a následným vymíráním celých populací obojživelníků v důsledku onemocnění způsobených dvěma typy **hub**, *Batrachochytridium dendrobatidis* a *Batrachochytridium salamandrivorans*. Tato onemocnění se přenáší i na terénních pomůckách a oblečení. Také na území České republiky je potřeba dodržovat striktní hygienické postupy pro snížení rizika přenosu nemocí. Základem je důkladné vysoušení a dezinfekce oblečení i dalšího vybavení. Manipulace s obojživelníky by měla být prováděna pouze pomocí jednorázových ochranných pomůcek (rukavice apod.), které musí být po použití vhodně zlikvidovány. Manipulovat s obojživelníky je navíc možné pouze na základě úřady schválené výjimky ze zákona a pouze v nevyhnutelných případech. Jedinci by neměli přijít do vzájemného kontaktu, dokonce ani do kontaktu s předměty či vodou z jiného výběhu v zajetí. Detailní přehled bezpečnostních hygienických opatření je uveden v literatuře, např. PHILLOTT a kol. (2010).

Také u plazů se objevují patogeny, které mohou mít za následek vymizení celých populací či jejich další oslabení v narušeném životním prostředí. Příkladem takového patogenu

jsou **ranaviry**, vyskytující se například u želv či hadů. Proto i při manipulaci s plazy je potřeba dodržovat hygienická pravidla.

Choroby potenciálně přenosné na člověka

Vzhledem k tomu, že jsou plazi a obojživelníci evolučně vzdáleni od linie vedoucí k člověku, jsou choroby přenosné z herpetofauny na člověka pouze takové, které nejsou specifické k hostiteli. Nejčastějším onemocněním způsobeným kontaktem mezi herpetofaunou a člověkem je **salmonelóza** (důsledek nákazy bakteriemi rodu *Salmonella*). Přenosu chorob ze zvířat na člověka lze bránit dodržováním základních pravidel **hygieny**, jako je dezinfekce rukou po manipulaci, speciálně vyčleněné místnosti pouze pro práci se zvířaty apod.

Toxicita obojživelníků a plazů

Toxiny obojživelníků jsou vylučovány na povrch těla a zůstávají při manipulaci na nástrojích či rukou. Vzhledem k nutnosti používat jednorázové nástroje a ochranné pomůcky při práci s obojživelníky stačí k zamezení intoxikace **zabránit kontaktu** sekretovaných toxinů obojživelníků se sliznicemi člověka, např. neutírat si pot z čela rukou v rukavicích po manipulaci s obojživelníkem. Intoxikaci tedy lze zabránit dodržováním standardních hygienických postupů.

U plazů jsou toxičtí zejména hadi, kteří vpravují jed do těla kořisti pomocí zubů. Při práci s živými jedovatými hady je třeba dbát zvýšené **opatrnosti**. Pro hlubší vhled do principů a zásad práce s toxiny organismů viz FLEMING & HUNT (2006)

Kontaminace genetických vzorků

Pro plazy a obojživelníky platí stejné zásady pro ochranu vzorků proti kontaminaci jako u ostatních skupin živočichů a tato problematika je detailněji rozvedena na jiných místech této publikace (Kap. 2.2.4. a 2.7.4.)

Obecné zásady bezpečnosti práce v laboratoři

Je potřeba dodržovat platné předpisy a obecné zásady práce v laboratoři.

2.5.3. Odběr tkáňových vzorků z nekonzervovaného a nepreparovaného materiálu

Lze rozlišit dvě základní kategorie tohoto materiálu: (1) mrtvá zvířata a (2) živá zvířata.

V případě **mrtvých zvířat** jde o čerstvě usmrcené jedince (např. žáby a plazy usmrcené dopravními prostředky na komunikacích), jedince uhynulé v chovech či v přírodě v důsledku klimatických výkyvů, chemických otrav, infekčních onemocnění atd. a patří sem i jedinci čerstvě ulovení pro výzkumné účely. Kvalita tkání mrtvých zvířat a využitelnost pro genetické studie závisí na stáří příslušných kadaverů.

Do kategorie **živých zvířat** patří především zvířata z chovných zařízení a zvířata dočasně odchycená v přírodě. Pro genetické zpracování představují tkáňové vzorky odebrané

z živých zvířat nejlepší materiál. Získávání těchto vzorků je však třeba provádět správným, co nejméně invazivním, způsobem a musí být náležitě legislativně ošetřeno.

Způsob odběru genetických vzorků

Metoda odběru tkáňových vzorků z mrtvých a živých zvířat se zásadně liší. U mrtvých jedinců můžeme použít různé invazivní metody, u živých obojživelníků a plazů musíme invazivnost odběru minimalizovat na nejmenší možnou míru. Na rozdíl od situace v případě odběru vzorků z muzejního nebo jinak uloženého materiálu je třeba věnovat větší pozornost dokumentaci jedinců, z kterých byly vzorky získány. Zatímco u muzejního nebo jinak uloženého materiálu jsou obvykle údaje o jeho původu a taxonomickém zařazení k dispozici a k danému předmětu se lze vždy vrátit, u nově získaných mrtvých či odchycených zvířat tomu tak není (metody dokumentace dokladového materiálu jsou popsány níže). Na rozdíl od konzervovaného a preparovaného materiálu, kde lze odběry provádět ve vybavených laboratořích, musíme u mrtvého, a především živého materiálu získávat vzorky v terénních podmínkách a jsme zde do značné míry limitováni časem (tkáně mrtvých zvířat se rychle rozkládají, odběry z živých zvířat musí proběhnout rychle, aby se zvířata zbytečně nestresovala).

V případě mrtvých obojživelníků a plazů postupujeme obdobným způsobem jako u tekutinových preparátů (viz níže). U zvířat určených k následnému uložení do muzejních a jiných dokladových sbírek je třeba dbát na minimalizaci poškození dokladových jedinců a na možnost jejich správné preparace a konzervace (Kap. 2.5.4.). U jedinců, u kterých se následné ukládání do sbírek nepředpokládá, lze odebrat větší množství vzorků z různých částí těla a z různých orgánů.

Při získávání tkáňových vzorků z živých zvířat volíme takové metody, abychom co nejméně zasáhli do života příslušného jedince a neohrozili jeho životaschopnost a zdraví. Velmi vhodnou metodou je v tomto směru **stěr z povrchů ústních sliznic**. Lze jej úspěšně provádět u středně velkých a velkých zvířat a při jisté míře zručnosti i u některých skupin menších druhů. Stěr spočívá v jemném otření povrchů ústních sliznic a nabrání slin daného jedince tyčinkou obalenou na konci jemnou vatou. Při tomto úkonu je třeba zvířeti opatrně otevřít tlamu. K fixování otevřených čelistí lze u některých zvířat (např. želv a ještěřů) použít pružný gumový nebo plastový kroužek (např. odštířžený kousek potřebně silné hadičky), který vsuneme do otevřené tlamy zvířete. Jedinec se do kroužku zakousne a my pak zavádíme vytírací tyčinku do tlamy kroužkem.

Dalším neinvazivním přístupem je využití **svleček** zrohovatěle pokožky obojživelníků a plazů. Tyto svlečky lze však jednodušeji získat jen u jedinců držených alespoň krátkodobě v chovu.

V případě obojživelníků žijících ve vodě a u jejich larev lze poměrně neinvazivně odstříhnout malý kousek **ploutevních lemů**. Tyto lemy se vyvíjejí a resorbují v závislosti na přítomnosti obojživelníků ve vodě a mají značnou regenerační schopnost.

U hadů, větších ještěřů, krokodýlů a některých želv bývá s úspěchem využívána metoda odstřihování kousků **šupin či štítů** (zpravidla břišních, viz Kap. 3.2.2.). Zastřihávání šupin

se široce využívá k individuálnímu značení plazů, a lze proto značení i odběr tkáňových vzorků úspěšně kombinovat.

Jako poměrně málo invazivní metody bývá někdy u ještěřů využíváno odštipování **špičky ocasu**. Tuto metodu lze však tolerovat jen u skupin s velmi dobrou regenerací ocasu (např. ještěři čeledi Gekkonidae, Lacertidae, Teiidae) a velikost odebírané části ocasu nesmí překročit několik málo milimetrů. Navíc je třeba si uvědomit, že u dokladových jedinců se tak znehodnocuje informace o délce jejich ocasu.

Za více invazivní, ale obojživelníky a plazy dobře snášenou metodu, lze považovat **odběr krve**. Ten se provádí inzulinovou injekční stříkačkou s tenkou jehlou. Obvykle dostačuje 0,1–0,2 ml krve. Krev se odebírá z žil nacházejících se mělce pod kůží či povrchem těla. U plazů se obvykle napichuje podocasní žíla nebo žíla v podklíčkové oblasti. Při odběru krve je stejně jako při všech ostatních odběrech z živých jedinců třeba věnovat zvýšenou pozornost zachovávání hygienických podmínek a užití čistých nových nebo důkladně dezinfikovaných nástrojů.

2.5.4. Odběr tkáňových vzorků z konzervovaného nebo preparovaného materiálu

Muzejní a jiný dlouhodobě uložený materiál obojživelníků a plazů dělíme na tři základní skupiny: (1) tekutinové preparáty, (2) suché preparáty a (3) dlouhodobě hluboce zmražený materiál.

Tekutinové preparáty představují nejběžnější formu uložení materiálu obojživelníků a plazů. Jedná se o jedince dlouhodobě uložené v 70% ethanolu nebo 4% formalínu. Ethanol se jako fixační látka používá častěji v posledních desetiletích, formalín byl jako fixační a konzervační látka oblíben spíše v minulosti. Dnes se formalín užívá především při sběru větších sérií zvířat v terénu nebo pro fixování a ukládání jemného materiálu (např. larev obojživelníků), který mohou dehydratační účinky ethanolu poškodit.

Pro genetické zpracování jsou tkáně uložené v ethanolu vhodné, kvalita a množství izolované DNA však klesají úměrně délce doby uložení preparátu a jsou závislé na kvalitě a koncentraci použitého ethanolu (preparáty uložené v silně denaturovaném a málo koncentrovaném ethanolu jsou méně vhodné než preparáty uložené v čistém ethanolu). Po zkušenostech z molekulárně-genetické laboratoře Národního muzea lze konstatovat, že použitelnost tkání skladovaných v 70 % ethanolu denaturovaném 1% benzínem pro izolaci DNA po deseti letech výrazně klesá. Tkáně uložené ve formalínu jsou použitelné jen ve velmi omezené míře. Z důvodu maximální využitelnosti tkáňových vzorků doporučujeme vzorky ukládat pouze do čistého ethanolu.

Na kvalitu izolované DNA má rovněž vliv teplota, při které jsou vzorky skladovány. Některá pracoviště doporučují pro dlouhodobé ukládání vzorků hluboko mrazicí boxy (teplota přibližně -18 °C), laboratoř Národního muzea úspěšně využívá běžné potravinářské mrazicí boxy. Pro ukládání fixovaných zvířat, z kterých lze časem odebrat další potřebné tkáňové vzorky, udržujeme v depozitářích teplotu kolem 18 °C.

Suché preparáty představují dermoplastické preparáty (tzv. „vycpaniny“), kůže, krunýře a kostry (případně výrobky z kůží, koster či rohoviny).

Využití suchých preparátů pro genetické zpracování je možné, závisí ale na stáří předmětu a způsobu jeho původního zpracování (typu fixačních a konzervačních činidel) a charakteru uložení (depozitáře se stálými klimatickými podmínkami *versus* materiál volně uložený v expozicích apod.). Obecně platí, že čím starší nebo hůře uložené předměty, tím menší pravděpodobnost zachování genetické informace (viz Kap. 10). Pravidla pro původní fixaci platí stejná jako u tekutinových preparátů. Konzervační činidla používaná na historických sbírkových předmětech jsou většinou neznámého složení, proto lze jen těžko posuzovat jejich vliv na zachování genetické informace. Pro charakter uložení platí, že čím lepší zachování sbírkového předmětu (tedy i vhodnost podmínek, ve kterých je předmět uložen), tím větší pravděpodobnost zachování genetické informace.

Některé instituce nasbíraný materiál uchovávají ve stavu **hlubokého zmrazení** (-70 °C a méně). Po rozmrazení je tento materiál pro genetické zpracování dobře využitelný.

Způsob odběru genetických vzorků

Pro molekulární analýzu obecně stačí odebrat **malé kousky tkáně** dlouhé cca 2–5 mm. Ty se uchovávají v 1,5–2 ml zkumavkách naplněných čistým ethanolem. Je přitom třeba minimalizovat poškození daného předmětu, aby neztratil svoji dokumentační a studijní funkci.

U tekutinových preparátů obojživelníků a plazů odebíráme obvykle vzorky jater, srdce, ledvin, svalů, případně i kůže. Pro potřeby molekulární analýzy lze tyto vzorky vzájemně míchat. **Vnitřní orgány**, jako jsou např. játra a srdce, se obvykle odebírají u malých forem obojživelníků a plazů a zpravidla také u hadů a jiných beznohých forem plazů. Břišní dutinu otevíráme krátkým rovným mediálně vedeným řezem ostrým skalpelem nebo chirurgickou čepelkou. Dbáme na to, aby řez netrhal břišní stěnu a aby po vyjmutí tkáňového vzorku k sobě obě strany řezu těsně přiléhaly. Srdce nebo jaterní tkáň vyjmeme tenkou pinzetou nebo vystříhneme jemnými, tzv. očními nůžkami. U drobných ještěřů lze odebírat také tkáň z jazyka a tím se vyhnout otvírání břišní dutiny a výraznějšímu poškození dokladového jedince. Postupujeme tak, že pootevřeme tlamu příslušného ještěře, uchopíme špičku jeho **jazyka** do pevné pinzety a otáčením pinzety podél její podélné osy část jazyka vykroutíme. Nikdy neodstřihujeme části prstů nebo koncovou část ocasu. U plazů také není vhodné odebírat větší části kůže, s šupinami. Muzejní materiál by tak nenávratně ztratil některé důležité charakteristiky, které se zjišťují a hodnotí při jeho morfologickém studiu.

Odběr **svalové tkáně** lze doporučit u větších jedinců. U středně velkých žab a ještěřů se svalová tkáň odebírá zpravidla z ventrální strany stehen. Kůži na stehně je třeba opět proříznout rovným tenkým podélným řezem a po vyjmutí části stehenních svalů k sobě rozřízlou kůži znovu přitlačit. U některých skupin ještěřů např. z čeledi Lacertidae nebo Teiidae či v případě určitých skupin gekonů je třeba dávat pozor, aby se při odběru nepoškodily tzv. stehenní póry (podélné řady mazových žláz), které mají důležitý význam pro morfologická srovnání a determinaci jednotlivých druhů. U velkých obojživelníků a zvláště plazů lze svalovou tkáň odebírat na jakémkoli příhodném místě tak, aby se minimalizovalo

poškození zvířete. Velká zvířata však většinou mají z konzervačních důvodů otevřenou břišní dutinu, a lze se tak snadno dostat k jejich vnitřním orgánům.

V případě suchých preparátů obvykle odebíráme malé povrchové vzorky **kůže** a dbáme při tom na to, abychom příslušný preparát či exponát poškodili na skrytých místech a míra poškození byla co nejmenší.

Z mraženého materiálu se vzorky odebírají podobně jako z tekutinových preparátů. Je však třeba pamatovat na to, že opakované rozmrazování a zmrazování mrtvých obojživelníků a plazů poškozuje mikrostrukturu jejich tkání a taková zvířata se pak obtížně fixují a konzervují, a jsou proto méně vhodná pro dokladování v muzejních sbírkách a k přípravě tekutinových i dermoplastických preparátů.

2.5.5. Dokumentace a popis vzorků

Způsob odběru vzorků určuje i způsob popisu vzorků. Přihlédnout je třeba i k tomu, že muzejní sbírky mohou sestávat z položek s různým způsobem **evidence** (viz ŽALMAN a kol. 2002). Muzejní položky dělíme na: (1) sbírkové položky vysoké kulturní a vědecké hodnoty se speciálním režimem evidence a ochrany, jako jsou například vyhynulé taxony, historické sběry či typové jedinci, které mohou podléhat zvláštním nárokům na evidenci a uložení (vedené v centrální evidenci sbírek – CES); (2) trvalé sbírkové předměty, které jsou evidovány s ohledem na jejich trvalou kulturní a vědeckou hodnotu (vedené v CES); (3) trvalé sbírkové předměty určené především k výzkumným účelům (vedené v tzv. doprovodné dokumentaci); (4) dočasné sbírkové předměty určené pouze k výzkumným účelům, u kterých může dojít k úplnému zpracování tkání jedinců podléhajících muzejní evidenci, například kadavery, tkáňové vzorky apod. (vedené ve vědecké dokumentaci příslušného výzkumného projektu); (5) dočasné vzorky určené k výzkumným účelům nevyžadujícím speciální muzejní evidenci, např. pobytové stopy, exkrementy, výtěry dutiny ústní, stěry pokožky, výplachy trávicího traktu apod. (vedené ve vědecké dokumentaci příslušného výzkumného projektu).

Každý jedinec, který je uchováván v muzejních sbírkách, dostává evidenční číslo jako **dokladový jedinec** (voucher specimen). K dokladovým jedincům je třeba vést protokoly o sběru, uložení a manipulaci – datum sběru nebo odběru, identifikace jedince, pohlaví a stáří jedince (vývojové stadium, dospělost), přesná lokalita, způsob uložení, délka uložení v daném médiu (fixativu), předcházející médium (fixativum), typ tkáně atd. Pro detailní přehled o nakládání s dokladovými jedinci odkazujeme zájemce na MCDIARMID a kol. (2012).

Dočasné vzorky tkání odebrané v muzejních sbírkách ale i vzorky tkání odebrané v terénu je také třeba dokumentovat. Většina údajů dokumentujících tkáňové vzorky je shodná s údaji zaznamenávanými pro dokladové jedince uvedenými výše. Ne vždy je ale možné všechny tyto údaje zaznamenat, zejména u vzorků odebraných z kadaverů. Nejdůležitějšími minimálními údaji o tkáňových vzorcích jsou pak: přesná lokalita (geografické souřadnice místa nálezu), datum sběru, plné jméno sběratele, typ tkáně a jedinečný kód vzorku.

2.5.6. Množství odebíraných vzorků pro analýzu

Počet jedinců z jednotlivých lokalit a množství odebírané tkáně silně závisí na kondici studované populace organismů, kontextu dané studie, stavu odebírané tkáně a metodě výzkumu. Obecně platí, že pro fylogenetické studie může stačit i **jednotlivé** vzorky na lokalitu, stejně tak pro fylogeografické studie, které ale vyžadují hustší pokrytí zájmové oblasti. Pro studie řešící, kromě historických scénářů a fylogenetických topologií, i dynamiky jednotlivých populací a mechanismy speciace je ale vhodné mít z každé lokality **větší množství** jedinců. Množství vzorků potřebné ke genetické analýze určité populace na jedné lokalitě a pro mezipopulační srovnávání je poplatné použitým metodám a v neposlední řadě i početnosti jedinců v daných populacích. Obecně je třeba, aby pro porovnání genetické diverzity byly počty vzorků z jednotlivých lokalit srovnatelné. Při srovnávání početnějších populací by počet vzorků z jedné lokální populace neměl být nižší než 10 jedinců (optimální počet je 20 a výše). Nejsprávnější postup pak je podniknout **pilotní studii** na minimálním počtu jedinců, která poslouží dále k odhadu konečné velikosti vzorku a rozsahu vzorkované oblasti. Vzhledem k tomu, že některé druhy obojživelníků a plazů jsou na pokraji vyhynutí, je třeba pokaždé zvažovat, jestli informační hodnota dokladových jedinců či výsledků molekulárních analýz převyšuje kulturní a environmentální hodnotu studovaných organismů, nebo naopak, zdali je zásah v podobě odběru natolik významný, že by mohl mít potenciál narušit pohodlí ohrožených organismů a organismů obecně.

2.6. Ptáci

2.6.1. Dokladový jedinec

Způsoby odchytu ptáků jsou uvedeny např. v pracích LELLÁKOVÁ a kol. (1985) či EYMANN a kol. (2010). Protože lze takto odchycené ptáky bez problémů použít ke genetickým analýzám, omezíme se zde na situaci, kdy již máme jedince odchyceného. Je-li to technicky a právně možné, je ideální zachovat celého jedince (celého ptáka), z něhož je vzorek pro DNA odebrán. Tento jedinec by měl být uložen v centrálním či spádovém muzeu a v něm zaevidován takovým způsobem, který umožňuje jeho jednoznačnou identifikaci.

Pokud celého jedince nelze z jakéhokoliv důvodu zachovat, je nutné: (a) dokumentaci ke každému vzorku doplnit o údaj/e jednoznačně odkazující k původnímu jedinci (místo, datum a čas odchytu živého nebo nálezů mrtvého ptáka, příp. číslo kroužku, číslo ptáka v terénním deníku; viz Kap. 2.6.6.), a (b) pomocí fotografií, biometrických (délka křídla, délka zobáku apod.) a morfologických (barva oka, zobáku a běháku, tvar letek či rýdovacích per apod.) údajů zaznamenat znaky, které později umožní ověřit, zda bylo taxonomické určení jedince správné.

Pořídít odpovídající dokumentaci je vhodné i v případě odběru vzorku ze separátně nalezených částí těla (např. pero, kost) nebo produktů těla (např. vejce, trus).

2.6.2. Typy vzorků

DNA lze extrahovat prakticky ze všech tkání, byť z některých (zejména krev, kůže) je extrakce relativně jednoduchá a lze získat dlouhé úseky DNA, z jiných je extrakce obtížnější a/nebo z nich lze získat jen kratší úseky DNA, které se obtížněji interpretují.

Kromě částí těla, jako jsou krev, kůže, svaly, játra a jiné vnitřní **orgány, drápy, peří a kosti** (HOYSÁK & WEATHERHEAD 1991; DRUMMOND a kol. 1997; SEGELBACHER 2002; HORVÁTH a kol. 2005; FAIR a kol. 2010; VALLANT a kol. 2018), lze genetické vzorky odebírat i z **vajec** (LEE & PRŮS-JONES 2008; TRIMBOS a kol. 2009; OSKAM a kol. 2010; MARTÍN-GÁLVEZ a kol. 2011; GREALY a kol. 2017; MAIA a kol. 2017), **ústní dutiny** (otěr sterilní vatičkou; HANDEL a kol. 2006), **moči a trusu** (NOTA & TAKENAKA 1999; TABERLET a kol. 1999; EGLOFF a kol. 2009; VALLANT a kol. 2018); pro detailnější informace viz Kap. 3.2.2.

Odebírat genetické vzorky lze z čerstvého materiálu, stejně jako z muzejních jedinců [zpravidla starých desítky až stovky let; HERRMANN & HUMMEL (1994); THOMAS (1994); LEE & PRŮS-JONES (2008); HARTNUP a kol. (2011); BESNARD a kol. (2016)] a ze subfossilních a fossilních nálezů, starých stovky až miliony let (PAXINOS a kol. 2002; OSKAM a kol. 2010; GREALY a kol. 2017; GREEN & SPELLER 2017).

Sbírat lze i tzv. environmentální DNA (eDNA; TABERLET a kol. 2012; BOHMANN a kol. 2014; THOMSEN & WILLERSLEV 2015), například z hnízd (PEARCE a kol. 1997), vody (USHIO a kol. 2018) nebo půdy (ZIELIŇSKA a kol. 2017).

2.6.3. Velikost vzorků

Zpravidla stačí odebrat asi $1 \text{ mm}^3 = 0,001 \text{ ml}$ tkáně, z peří stačí odebrat několik málo větví paporu. Rovněž stačí odebrat stěr vatičkou (např. z vaječné skořápky). Dlužno podotknout, že techniky zpracování materiálu se průběžně zlepšují (např. CHEN a kol. 2018; BILLERMAN & WALSH 2019; GREALY a kol. 2019; TSAI a kol. 2019), takže potřebné množství odebraného materiálu se průběžně zmenšuje.

2.6.4. Uchování vzorků

Měkké tkáně (játra, kůže apod.) je třeba uložit do čistého ethanolu v nádobě odpovídající velikosti (zkumavka, epruveta apod.). Suché tkáně (peří, drápy apod.) je možné uložit do obdobných nádob (stačí bez ethanolu) nebo do igelitových sáčků.

Pokud se vzorky odebírají z již dříve nasbíraného materiálu, je třeba dle možnosti zjistit i chemickou minulost daného jedince (nejen minulost v muzeu, ale i minulost před tím, než se mrtvola dostala do muzea), protože některé způsoby uchování mohou degradovat DNA obsaženou v daných jedincích a tím zhoršovat či dokonce znemožňovat extrakci DNA z takových jedinců. Pro některé aspekty viz např. TÖPFER a kol. (2011) a PAREDES a kol. (2012).

2.6.5. Interpretace nálezů

Z hlediska dalšího použití analyzované DNA je možné rozlišit DNA známého taxonomického původu a DNA neznámého taxonomického původu.

V prvním případě je DNA odebrána z jedince, který byl taxonomicky přesně určen pomocí jiných než molekulárních znaků. Tuto DNA lze později použít jako standard pro určování jiných jedinců.

V druhém případě naopak analyzovaná DNA slouží k taxonomickému určení daného jedince.

2.6.6. Dokumentace

Každý vzorek musí mít údaje o svém původu, tedy o tom, z čeho (exemplář), kdy (datum sběru), kde (lokalita sběru) a kým (sběratel) byl odebrán. Všechny údaje je třeba uvést co nejpresněji. Určitá duplicita údajů slouží ke zpětné kontrole v případě překlepů nebo nejasností všech druhů. Na typu vzorku závisí, zda všechny potřebné údaje budou uvedeny přímo u něho (na jeho obalu či na přiložené etiketě) nebo bude na vzorku uveden pouze unikátní kód a potřebné údaje budou pod tímto kódem uvedené v databázi.

U **exempláře** je třeba zaznamenat jeho taxonomickou identitu (druh, případně i poddruh), jeho biologický stav (stáří a pohlaví), případně další údaje (barevná morfa, stav opeření, onemocnění apod.). U **data** zpravidla postačí den, měsíc a rok sběru. U **lokality** pak geografické koordináty s přesností na setinu stupně (odečteny z GPS) a doplněné ná-

zvem nejbližšího lidského sídliště s jeho administrativní lokalizací (okres, kraj, provincie, stát apod.) a/nebo (podle situace) s jeho geografickou lokalizací (ostrov, pohoří apod.). V horách je dobré přidat údaj o nadmořské výšce. **Sběratel** by měl být uveden plným jménem, včetně afiliace (názvu institutu, kde pracuje) nebo domácí adresy. U jedinců chovaných **v zajetí** je nutné zaznamenat i údaje o tom, zda pochází z volné přírody nebo zda se už vylíhl v zajetí, pokud možno i v kolikáté generaci žije v zajetí. U **muzejních** exemplářů je kromě data a místa jeho sběru (v přírodě) a jména sběratele (z přírody) nutno zaznamenat i název muzea a inventární číslo daného exempláře.

2.6.7. Právní a etické aspekty

Při jakémkoliv odchytu ptáků, odběru vzorků, jejich uchovávání a transportu (v rámci jednoho státu i mezi státy) je nutné dodržovat všechny zákony a související předpisy, které jsou momentálně platné v daném státě či státech – viz Kap. 2.8.

Zároveň je nutné vždy dodržovat etické normy. Z tohoto hlediska je nejlépe provádět neinvazivní odběry vzorků, tj. takové, při nichž není narušena fyzická integrita ptáka (WAITS & PAETKAU 2005). Při invazivních odběrech (např. odběr krve, vytržení pera) je nutné minimalizovat dopad takového odběru na ptáka. Z etického hlediska nejhorší variantou je zabití ptáka. Dlužno ovšem poznamenat, že odběr celého ptáka jako dokladového jedince je jedinou cestou, jak zajistit plnohodnotné ověření správnosti jeho taxonomického určení.

2.7. Savci

2.7.1. Obecné postupy

Dokumentace sbírkového materiálu

Způsoby odchytu savců jsou uvedeny např. v pracích LELLÁKOVÁ a kol. (1985) či EYMANN a kol. (2010). Protože lze takto odchycené savce ve valné míře použít ke genetickým analýzám (detaily viz níže v této kapitole), omezíme se zde na situaci, kdy již máme jedince odchyceného, případně máme k dispozici muzejní materiál.

V muzejní sbírce je každý jedinec dokumentován kromě vlastního dokladového materiálu (jímž je u savců standardně tekutinový preparát a/nebo lebka či celá kostra a/nebo kůže, která může být preparovaná různým způsobem, ať naložená v tekutině, suchá, či vyčiněná natažená na model těla, tzn. „vycpaná“) také souborem **údajů**. Těmi jsou jednak obecné údaje, tzn. co nejpřesněji zaznamenaná lokalita, datum sběru a sběratel, a dále konkrétní údaje o jedinci, tzn. jeho pohlaví, věk a rozměry (viz níže). Tyto údaje musejí být k dispozici, měly by se tedy stát součástí sbírkové evidence. Stejně tak by mělo být evidováno terénní a sbírkové číslo, aby byl jedinec s evidencí nezaměnitelně propojen (např. PHILLIPS a kol. 2019).

Číselnou řadu, kterou se jedinci označují na štítcích při sběru v terénu a která nesouvisí s jasně daným číslováním muzejní evidence, je vhodné opatřit neměnným typem **předpony/zkratky** (prefixem), která by měla být zvolena tak, aby se co nejobtížněji zaměnila a také aby se co nejméně měnila v čase. Prefix by měl sestávat alespoň ze dvou či tří písmen, což opět lépe zamezí záměně. V muzejní sbírce se pak štítek s prvním (nejčastěji terénním) označením doplní na stejném místě (aby neblokoval další část jedince) dalším štítkem s číselným označením inventarizace druhého stupně, resp. vlastní muzejní evidence (ať už jakéhokoliv stupně, viz ŽALMAN a kol. 2002).

Konzervace

Savce lze podle jejich sbírkového předpreparačního zpracování technicky rozdělit do dvou kategorií, na drobné savce a velké savce. Tyto kategorie se sice liší velikostí dotyčných zástupců, svojí systematickou příbuzností se ale mohou překrývat (např. EYMANN a kol. 2010).

Do skupiny **drobných savců** počítáme jedince, jejichž hmotnost se pohybuje maximálně v řádu stovek gramů, čili hmyzožravce v nejširším slova smyslu, dále hlodavce (Rodentia), tany (Scandentia), letuchy (Dermoptera) a netopýry (Chiroptera). Zde popsané techniky ovšem mohou platit i pro menší či drobnější šelmy (Carnivora), primáty (Primates), zajíce (Lagomorpha), chudozubé (Xenarthra), vačnatce (Metatheria), případně i pro drobné jedince či mláďata druhů dalších skupin. Jako **velké savce** pak označujeme druhy zbývajících skupin, resp. jedince, jejichž hmotnost se pohybuje v řádu kilogramů, či jejich desítek až stovek. Hranice mezi kategoriemi tedy není nijak ostrá a jasně vymezená.

2.7.2. Drobní savci

Sběr a dokumentace

Při sběru drobných savců v terénu se těla primárně uchovávají **v ethanolu**, teprve později se rozhoduje o výsledném typu preparace (tj. o extrakci lebky či dalších kostních elementů a preparaci kůže). Provádět preparaci (tzn. stahování a sušení kůže a dělení zbytku kadaveru) přímo v terénu není zcela vhodné, protože je náročná na čas, prostor, klimatické podmínky a může vzbuzovat nežádoucí pozornost, jak příliš zvědavé veřejnosti, tak škůdců. Při možnosti umístit kadaver do mrazicího boxu, tzn. již v prostorách sbírky, je možno jej po úvodním zpracování (měření aj.) zamrazit a do rozhodnutí o typu preparace ponechat ve zmrazeném stavu. Avšak i ve zmrazeném stavu probíhá vysychání tkání a degradace tuku v tkáních, nehledě na energetickou náročnost udržování celých jedinců zmrazených. Mrazení tedy není vhodnou metodou pro trvalou konzervaci savců a využíváme ho jen jako dočasné řešení.

V terénních podmínkách při dostatku fixačního ethanolu se zvířata do hmotnosti ca. 0,5 kg (tzn. převažující většina z kategorie drobných savců) uchovávají **celá**, včetně všech vnitřních orgánů, tzn. i s kompletním trávicím traktem a jeho obsahem. Výjimku tvoří **býložravci** (např. kaloni či hlodavci), jejichž trávicí trakt, zejména žaludek, tlusté a slepé střevo, je silně naplněn nestrávenou hmotou, jež by se mohla začít rozkládat dříve, než by se prosytila a fixovala ethanolem; u nich je třeba po technickém zpracování (dokumentaci) po sběru vyjmout trávicí trakt od konce jícnu po konečník (není-li však jedinec sebrán právě pro prostudování obsahu trávicí trubice). Pokud se však jeví, že má jedinec prázdný či téměř prázdný obsah trávicí trubice (např. v případě kaloňů, kteří ji navíc mají poměrně krátkou), není nutno ji odstraňovat. Při odstraňování trávicí trubice je však třeba ponechat v břišní dutině ledviny a od žaludku oddělit slezinu, která se ukládá samostatně (viz níže). V případě exotických sběrů je nutno zvážit, zda i přesto, že se jedná o býložravce, není přece jen vhodné sebrat jedince kompletního a nezbavovat jej vnitřních částí, neboť větší sbírkovou hodnotu má vždy jedinec kompletní. V takové situaci je nutné otevřít dutinu břišní, aby mohl ethanol fixovat i vnitřní tkáň, případně u menších exemplářů můžeme ethanol vstříknout dovnitř pomocí stříkačky.

Velké jedince (relativně velké hlodavce, šelmy, kaloně, či některé velké netopýry apod.) lze při nedostatku fixačního ethanolu a při velkém počtu jedinců téhož druhu částečně **stáhnout**, tzn. odstranit trup (resp. jen jeho větší část obsahující útrobní orgány) a krk, zatímco v celistvé kůži ponechat, a tedy nestahovat, lebku, ocas a kompletní distální části končetin a z proximálních částí kostry končetin ponechat vše po ramenní kosti a pánev. Takto upravené tělo zabere mnohem menší prostor v nádobě s fixačním ethanolem, a tedy spotřebujeme i méně fixativa, do kterého se navíc uvolní méně tělesných tekutin; úprava ovšem zabere více času.

Každý druh drobného savce z dotyčné lokality, případně i každý kus (to platí zejména v případě exotických sběrů, taxonomicky komplikovanějších skupin anebo identifikační nejistoty), je třeba **fotograficky dokumentovat** tak, aby byl na snímku patrný tvar čenichu a ušního boltce, u netopýrů také nosního lístku, tragu (ušního víčka) a penisu (raději více než jedním snímek pro každý znak a případně i z více pohledů). Při fotografování je však

třeba dbát na to, aby bylo vždy dokumentováno, ze kterého konkrétního jedince pochází která fotografie – nejvhodnějším uspořádáním je, když přímo na snímku je zachycen i štítek s protokolárním číslem dotyčného kusu. Současně by na fotografii mělo být přítomno milimetrové/centimetrové měřítko, dle velikosti fotografovaného objektu (v případě nouze nahrazeno předmětem konstantního rozměru – „krabička od zápalek“). Jako doplnění je vhodné dokumentovat i barevnou variabilitu, tzn. vyfotografovat společně více kusů naaranžovaných podle variační škály ve stejné pozici na jeden srovnávací snímek.

Značení, měření a fixace

Při vlastním zpracování je nutno nejprve **označit** jedince papírovým štítkem s identifikačním číslem/kódem, přivázaným na zadní končetinu nad kotníkem (vhodné je označovat vždy stejnou, např. levou končetinu). Psát na štítky je třeba měkkou tužkou, případně v ethanolu nerozpustným pigmentem; při psaní tužkou s tvrdou tuhou se tuha méně otírá o papír, a tedy se snáze smyje ve fixační tekutině.

Po navázání štítků se jedinci **zváží** – nejčastěji se používají citlivé pružinové váhy, pracující na principu mincíře, dodávané několika výrobci v různé kalibraci (rozsah do 10 g, 30 g, 100 g, 1 kg atp.). Je vhodné mít více různě kalibrovaných vah, menší rozsah kalibrace umožňuje přesnější měření v malých hodnotách. Pro hmotnost těla se nejčastěji používá označení G (*gravitas*) anebo W (*weight*).

Délkové tělesné rozměry drobných savců se měří posuvným měřítkem („šuplerou“), větších savců s rozměry nad 200 mm pásmovým měřítkem.

Délka těla [zkracuje se jako LC (*longitudo corporis*) nebo HBL, případně H+B (head and body length)] se měří tak, že se zvíře položí na pevnou podložku na hřbet a prsty se přitlačí tak, aby byla jeho páteř maximálně natažená; hlava se ohne ve hřbetním směru tak, aby čenich směřoval co nejdále směrem od páteře a jeho špička tvořila nejzazší bod měření směrem od páteře (u většiny zemních savců to zhruba odpovídá přirozenému tělesnému stavu, krk se jen mírně zakloní, u netopýrů je však tento manévr nezbytný, neboť čenich u nich směřuje břišním směrem); pak se změří vzdálenost mezi špičkou čenichu a středem řitního otvoru. Pozor je třeba dát u samic, kde je v blízkosti řiti též vulva, která tomuto měření nepodléhá, ale může zmást, neboť může být v některých životních fázích výraznější.

Délka ocasu [LCd (*longitudo caudalis*), TL (tail length)] se měří ve stejném typu natažení jako při měření délky těla zvířete, a to od středu řiti po špičku ocasu. Pozor je třeba dát u těch skupin netopýrů, kde je kůže na ocase posunlivá (čeledi Emballonuridae, Molossidae), aby byla měřena jen páteřní část ocasu a nikoli „svlečená“ kůže, tj. posunutá mimo vlastní ocas. Taktéž ocasní létací blána (*uropatagium*), do níž je u většiny netopýrů zavzat ocas, musí být při měření přidržena tak, aby mohl být ocas maximálně natažen. U kalonů a dalších „bezocasých“ netopýrů, kteří mají kratičký, avšak patrný ocas, se měří délka ocasu stejně, i když větší část tohoto rozměru může zabrat část od řiti po „kořen“ ocasu.

U pozemních savců se dále měří **délka chodidla** zadní končetiny, tj. nohy [LTp (*longitudo tarsi posterioris*), HFL (hind foot length)]. Tento rozměr se měří od paty po distální okraj bříška nejdelšího prstu bez drápu; při tom je vhodné ohnout kotník tak, aby pata tvořila pravý úhel (tedy do podobného tvaru, jaký má normálně pata u člověka) a tlapku napřímít,

přítom se napřímí i prsty a je možno délku změřit poměrně přesně. U netopýrů není nutno měřit délku zadní tlapky (ačkoliv někteří autoři ji měří), stejně tak jako délku holeně či délku palce přední končetiny; tyto rozměry jsou dobře měřitelné na preparovaném materiálu, jak tekutinovém, tak i suchém, a nepovažují se za standardní rozměry zjišťované u všech druhů.

U netopýrů je však navíc standardním rozměrem (dokonce tím nejpodstatnějším) **délka předloktí** [LA (*longitudo antebrachii*), FAL (forearm length)]. Ta se měří na složeném křídle a při ohnutých kloubech (tzn. lokti a zápěstí), jakožto vzdálenost mezi nejzazšími body na hrotu lokte (okovce [*olekranonu*] kosti loketní [*ulny*]) a hřbetu složeného zápěstí (takto měřená délka bývá v německé literatuře označována UA⁺; zatímco zkratka UA⁻ představuje nestandardní rozměr, délku předloktí měřenou jen na srostlých předloketních kostech [vřetenní a rudimentární loketní] bez kostí zápěstí, která se však měří mnohem obtížněji). Délku předloktí je vhodnější měřit těmi částmi čepelí posuvného měřítka, které mají plošky, mezi které lze předloktí sevřít, a nikoliv úzké či dokonce ostré břity či hroty, jimiž se měří ostatní rozměry.

Délka ušního boltce [LA (*longitudo auris*), EL (ear length)] se měří při nataženém boltci od nejproximálnějšího (nejblíže oku či koutku úst) záhybu báze boltce, kde boltec přechází v kůži tváře, a nejvzdálenějším bodem na boltci od onoho bodu, bez ohledu na tvar boltce a jeho další výrůstky, které bývají výrazné zejména u netopýrů. U netopýrů je navíc ještě standardním rozměrem délka tragu [kozlíku, ušního víčka; LT (*longitudo tragi*), TL (tragus length)], pokud je ovšem přítomen. Ta se měří od nejnižší části tragu (zde často tragus vytváří přídatné lístky, tedy včetně nich) po špičku. Pokud má tragus zahnutý tvar, měří se přímá linie mezi bází a hrotem a tragus se nenapřimuje.

Po změření jedince se **nastříhne** stěna jeho břišní dutiny podélným stříhem střední linií břicha mezi mečovým výběžkem prsní kosti a řití (stříh ukončit několik milimetrů před ní), tak aby byly vidět břišní orgány (tj. ne jenom prostříhnout kůži) a do břišní dutiny mohl vniknout fixační ethanol. V této fázi opět zkontrolujeme určení **pohlaví a věku**, a to nejen podle vnějších znaků, ale i podle stavu pohlavních orgánů patrného v břišní dutině. Pokud se jedná o březí samici, je vhodné změřit velikost zárodků (embryí či plodů) – měří se nejdelší rozměr, který odpovídá délce hlavy a trupu, a poznamenat si jejich počet v každém rohu dělohy. Vzhledem k tomu, že zárodky obsahují velké množství vody, dojde po jejich uložení do ethanolu k vysušení a silné deformaci a původní rozměry již nebude možno změřit.

Následně se jedinec umístí do nádoby s **fixačním roztokem**, nejčastěji a nejvhodněji koncentrovaným roztokem ethanolu ve vodě. V terénních podmínkách, pokud není ethanolu nedostatek, umístíme jedince do čistého ethanolu, aby fixace proběhla rychle (jedinec navíc uvolní do ethanolu množství vody, a tedy jeho koncentraci sníží). Později, může to být i po několika týdnech, jedince umístíme do nového čistého roztoku ethanolu, nejlépe o 70 %. V tomto fixačním roztoku už mohou být jedinci ukládáni do sbírky a mohou tak zůstat natrvalo, nedejde-li později k rozhodnutí o jiném typu preparace dotyčného kusu. Čas od času, zhruba v rozmezí několika let, je vhodné fixační roztok v nádobě s uloženými jedinci zcela vyměnit, neboť se do ethanolu vylučuje rozpuštěný tuk, jenž (velice pomalu)

podléhá degradaci. Nádoby s jedinci musejí být uloženy ve tmě, buďto v místnostech bez oken, anebo ve skříních bez nejmenšího přístupu denního světla, neboť světlo několikanásobně urychluje fyzický rozpad tkání, nemluvě o rozkladu pigmentů a tedy ztrátě barev uchovávaných jedinců.

Pokud to dovoluje čas a zručnost, je vhodné ještě před nastřížením stěny břišní dutiny z jedinců drobných savců odebrat **vnější parazity** (ektoparazity). Pokud jsme schopni určit druh hostitele (a nejedná-li se o specializovaný výzkum), je možno dát všechny jedince parazitů z jednoho jedince hostitele do jedné zkumavky s ethanolem společně s papírovým štítkem s označením hostitele, tzn. se stejným označením, které má savčí hostitel na papírovém štítku na zadní končetině (Kap. 2.2. a 2.3.).

Poznámka

Pro převoz sebraných a fixovaných jedinců, kdy je nouze o prostor a požadavky na nízkou hmotnost zavazadel (typicky pro přepravu letadlem), lze jedince vyjmout z nádoby s ethanolem a přenést je do igelitových sáčků (nikoli mikrotenových, ty propouštějí ethanol). Ovšem to až těsně před cestou a po příjezdu je nutné je hned přenést do nádoby se 70% roztokem ethanolu. Jedince nijak neždíme, jen je necháme okapat a přeneseme tak, aby v srsti zůstal zbytkový ethanol. Sáček hned uzavřeme, aby těla neosychala. Pokud je však jedinců malý objem, je možno je transportovat v původní fixaci a v nádobách, ve kterých byli shromažďováni, pakliže uzávěr náležitě těsní.

2.7.3. Velcí savci

Sběr a dokumentace

Aborty, novorozence a velmi mladá stadia juvenilních jedinců velkých savců ukládáme trvale do **ethanolu**, případně do směsi ethanolu a formalínu (kde formalín tvoří malou příměs v řádu jednotlivých procent – formalín na rozdíl od ethanolu dokáže fixovat nervovou tkáň). Tito jedinci takto naložení v tekutině zůstávají, neboť vesměs nebývá důvod, aby byli preparováni jakkoliv jinak (vyjma speciálních důvodů, např. příprava expozice vývoje orgánů apod.). Kostí nejsou u těchto stadií z velké části ještě osifikovány a srst, pokud je vůbec přítomna, má juvenilní znaky, což obojí neumožňuje klasickou dokladovou preparaci velkých savců. Proto stačí tato stadia naložit do ethanolu, nejprve koncentrovanějšího, do něhož se uvolní tělesné tekutiny, později do 70% roztoku, v němž zůstávají trvale. Před naložením je třeba dokumentovat rozměry jedince a nastříhnout stěnu břišní dutiny, tj. postupovat v souladu s předpreparační přípravou drobných savců popsanou výše.

Ostatní jedince velkých savců je po smrti nutno urychleně připravit k preparaci, nelze počítat s tím, že by ve zmrazeném či dokonce čerstvém stavu mohli být přechovávaní delší dobu nedotčeni. Typickým muzejním dokladovým jedincem velkého savce je kosterní materiál či alespoň lebka a preparovaná kůže, tzn. vyčiněná s minimálním využitím kyselin, jež v dlouhodobém pohledu mohou kůži narušovat a ve výsledku ji znehodnotit. Doplňkově mohou být zachovány další tkáň v podobě tekutinových preparátů.

Předpreparační **dokumentace** velkých savců celkem pochopitelně odpovídá dokumentaci drobných savců, rozdíl je jen v technice měření některých rozměrů. Přestože vzhledem k tomu, že u určitých velkých savců, jež jsou považováni za tzv. zvěř (tedy bývají usmrčováni ve větší míře než jiné druhy v rámci myslivosti a vztahují se na manipulaci s nimi zvláštní pravidla a právní předpisy, viz Kap. 2.8.), bývá častěji zaznamenávána hmotnost po vyvržení, je vhodné zaznamenat jak hmotnost jedince před vyvržením útrobních orgánů, tak i po jejich vyvržení.

Délka autopodia (nohy) zadní končetiny a ušního boltce se měří stejnou technikou jako u drobných savců (viz výše). **Délka těla** a **délka ocasu** velkých savců se neměří v přímé linii a na břišní straně těla, ale podle linie hřbetu (páteře) a s měřítkem přiloženým k hřbetní části hlavy a páteři; měří se tak délka hřbetní povrchové linie od špičky čenichu po kořen ocasu a délka hřbetní strany ocasu od přechodu v trup po distální okraj (hrot) posledního obratle bez koncových chlupů. U kopytníků a větších šelem bývá zvykem měřit i **výšku v kohoutku** [AC (*altitudo corporis*), SH (shoulder height)], tedy největší vzdálenost mezi špičkou nejdelšího prstu přední končetiny bez drápu, resp. včetně kopyta, a nejvyšším bodem lopatkové části hřbetu – ten je tvořen svalovinou na trnových výběžcích hrudní páteře, případně lopatek.

Preparace

Změřeného a zváženého velkého savce je třeba **vyvrhnout**, tzn. zbavit útrobních orgánů, a to proto, aby rychle se rozkládající orgány nezpůsobily znehodnocení kůže a srsti trupu (zapaření). Za tím účelem je třeba proříznout břišní dutinu, podobně jako u drobných savců; řez vedeme od mečového výběžku hrudní kosti po řitní otvor. Pupeční jizvu neprořezáváme, ale kůži obřízneme kolem okrouhlým řezem. Z břišní dutiny pak vyjmeme všechny orgány trávicí soustavy, z hrudní dutiny přes proříznutou bránicí také plíce a srdce a tyto orgány neuchováváme (pakliže je nehodláme využít k dalšímu studiu). Tělo pak buď **zamrazíme** a později předáme k preparaci, vhodnější je však stáhnout kůži a zamrazit zvlášť kůži a zvlášť hrubou kostru, tzn. zbytek těla s odstraněnou volnou svalovinou. Pokud hodláme jedince preparovat jako vycpaninu, vyvržené tělo uložíme do mrazicího boxu, zabalené do igelitové fólie zabraňující vysychání těla (specializovaný preparátor stáhne kůži pro vycpání sám).

Pokud hodláme kůži zařadit do sbírky jako vyčiněný dokladový kus, je třeba ji **stáhnout** z těla a zamrazit, zamrazenou pak předat k vyčinění. Kůže se z těla stahuje postupně od řezu na břišní dutinu, který sloužil k vyvržení. Vedeme od něj pokračující řez střední linií spodní strany těla přes hrudník a hrdlo až po bradu a na opačné straně břicha vedeme řez střední linií přes řitní otvor a na spodní stranu ocasu. Ve středních liniích spodních stran také nařízneme kůži na končetinách a prstech. Kůže se stahuje narušováním či odřezáváním podkožního vaziva od břišní strany ke hřbetu na všech částech těla, včetně končetin, krku, hlavy a ocasu, přičemž kůži zbavujeme také tuku, je-li přítomen. Ušní boltce odřízneme od lebky co nejbližší kosti tak, aby chrupavčité boltce zůstaly součástí sbírkové kůže; stejně tak protneme spojivkové vazivo, aby nebyla porušena oční víčka; podobně se prořízne i nosní chrupavka, aby zůstala neporušena kůže čenichu, a opatrně se odřízne kůže pys-

ků, co nejbližší dásním. Součástí kůže většinou zůstávají drápy či nehty, zatímco kopyta oddělujeme a vysušená se přidávají ke kostře. Není-li možné kůži zamrazit, je vhodné ji silně nasolit (případně natřít směsí kuchyňské soli a kamence), svinout srstí ven a velmi záhy, při první vhodné příležitosti, uložit to mrazicího boxu bez odsolování, kde zůstane až do chvíle, kdy je předána koželuhovi k vyčinění. Pokud nelze nasolenou kůži do několika málo dnů zamrazit, je vhodné ji usušit (nejlépe zavěšenou či vypnutou) na stinném místě s proudícím vzduchem a dále skladovat či přepravovat vysušenou, opět do chvíle, kdy může být předána k vyčinění.

2.7.4. Tkáňové genetické vzorky

Samo odebrání tkáňových vzorků je poměrně prosté. Spíše je potřeba být na ně náležitě **připraven**, což ovšem také není nijak složité. Je nutno mít předem připraveny zkumavky s čistým ethanolem, nejlépe naskládané v k tomu určené uzavíratelné krabičce, kterých existuje několik typů. Také je vhodné mít předem připraveny štítky s předtištěnými (na laserové tiskárně) nebo předepsanými kódy, kterými jsou značeni i jedinci, z nichž je vzorek odebírán. Dále je nutno disponovat kovovými pitevními nástroji (pinzetou, skalpelem, nůžkami), které je vhodné sterilizovat v průběhu odebrání vzorků, aby nedocházelo ke vzájemné kontaminaci genetického materiálu z více jedinců.

Pokud tedy zpracováváme **větší počet** jedinců, zejména drobných savců, je vhodné postupovat po etapách, nejdříve všem jedincům přivázat štítky (když jsme předtím určili jejich druh, vyfotografovali je atd.), pak jedince zvážit a změřit, odebrat z nich parazity, pak nastříhnout břišní stěnu a zjistit stav pohlavních orgánů, pak postupně ze všech odebrat genetické vzorky a nakonec je uložit do fixativu. Mezi odběry jednotlivých vzorků nástroje krátce sterilizujeme namočením v denaturovaném ethanolu a jeho spálením, je tedy vhodné mít připravenou malou nádobku s ethanolem a zapalovač, přičemž celý postup je velice rychlý a zabere jen několik vteřin. Musí být však činěn s jistou opatrností, aby nedošlo ke vznícení ethanolu v zásobní nádobce či fixativu se zpracovávány a uloženými jedinci.

Dočasně, nikoliv trvale, je možno označit zkumavky popisem na vnější stěnu, tento popis by ale měl být nahrazen štítkem s natištěným či napsaným kódem, neboť z povrchu zkumavky může být nápis setřen nebo smyt – stačí, aby v krabičce jedna zkumavka nebyla dobře uzavřena, a její obsah dokonale omyje nápisy ze všech ostatních, a použitelnost vzorků tak sníží či znemožní. Na zkumavky je také možno lepit nálepky, které mohou být předem potištěné, nebo se na ně píše obyčejnou tužkou, kterou ethanol nesmyje.

Jako tkáňový vzorek pro molekulární analýzu z jedince většinou slouží **kombinace** menších vzorků více tkání, a to takových, kde lze předpokládat relativně větší hustotu buněk (resp. mitochondrií a buněčných jader). Primárně nevhodné tkáně (i když v nouzi použitelné) jsou tedy tkáně kostní, vazivové, chrupavčité, nervové či parenchymatické, kůže a kožní deriváty, naopak velmi vhodné jsou kosterní a srdeční svalovina a některé útrobní orgány (Kap. 3.2.2.). Nejčastěji se tedy kombinuje kosterní sval a slezina, případně ledvina. Vzhledem k tomu, že trávicí trakt, jehož je slezina součástí, se někdy vyjímá z břišní dutiny, není problém ji najít a uložit (u drobných savců je většinou velmi malá a je možno jí ode-

brat jako vzorek celou). Pokud se trávicí trakt neodebírá, i tak je jednoduché na levé straně žaludku slezinu nalézt a vyjmout. K odběru nejvhodnější kosterní sval je sval prsní, jelikož je nejpřístupnější při zpracování jedinců – pokud se odhalí část hrudní stěny (tj. částečně se z něj stáhne kůže), je možno malý kousek velikosti zhruba $2 \times 2 \times 2$ mm vyříznout a společně se slezinou vložit do zkumavky s připraveným čistým ethanolem. Je ovšem možno odebrat i část jiného svalu, je-li to v dané chvíli praktické (např. u drobných hmyzožravců nebo hlodavců, kterým obvykle otevíráme pouze břišní dutinu, je snadněji dostupné stehenní svalstvo), stejně tak je jako vzorek dobře použitelné srdce či jeho část.

U **velkých savců** je situace jednodušší. Pokud je jedincem manipulováno proto, aby se stal součástí sbírky, není problémem při tom odebrat kousek svaloviny či některého orgánu. Velkých savců se také pro muzejní účely většinou nezpracovává velké množství naráz, takže tolik nehrozí kontaminace jiným genetickým materiálem. Ovšem i tak je nutno zachovat jistou míru opatrnosti, abychom vzorek nekontaminovali vlastním genetickým materiálem či jinou organickou nečistotou.

Zkumavky se vzorky pro analýzu DNA ukládáme v náležitě popsaných krabičkách do chladničky či mrazničky, která je k tomu vyhrazená. Skladování při nízké teplotě zpomaluje odpařování ethanolu i degradaci tkáně.

Poznámka

Ze savců, ať velkých či malých, se pro molekulární analýzy odebírá řada dalších typů vzorků. Jedná se o různé typy **neinvazivních**, či **nedestruktivních** odběrů (více v Kap. 5.2.1.), kdy nedochází k získání vzorku z mrtvého jedince, jenž se tedy nestane sbírkovou položkou, ale bývá navrácen zpět do populace v přírodě či do chovu. V takových případech se odebírá dobře přístupná drobná část živého jedince, která jej příliš nepoškodí a neomezí v dalším životě – u drobných zemních savců se odstříhne špička (poslední článek) prstu, koneček ocasu anebo malý kousek ušního boltce, u netopýrů se kruhovým skalpelem vyřízne drobný terčík křídelní blány (tzv. „wing punch” – kroužek blány o průměru 2–3 mm). Také se u různých velkých savců (včetně lidí) odebírá vzorek (stěr) z povlaku sliznic dásní a zubů.

Další kategorií genetických vzorků jsou vzorky **pobytových stop**, shromažďovaných buď pro inventarizační určení přítomnosti druhů anebo přímo jedinců na lokalitě, takže mohou sloužit i pro specializované populační studie. Jedná se např. o vzorky trusu a srsti nalezené v přírodě, nebo srsti také z tzv. lepových pastí, kdy vrstva lepidla na podložce zachycuje srst savců, kteří se ocitnou v její blízkosti.

V těchto případech se manipuluje se vzorky naprosto shodně jako se vzorky z muzejních jedinců, tj. tkáň, odběrový štěteček či jiný vzorek se umístí do zkumavek (v případě většího objemu do větších kryozkumavek) s čistým ethanolem, a ty pak v krabičkách do mrazicího boxu.

2.8. Právní aspekty sběru zoologického materiálu pro molekulární analýzy

Pro sběr jakéhokoliv zoologického materiálu je nutno postupovat **v souladu s platnými právními národními a mezinárodními předpisy**. Při sběru **na území České republiky (ČR)** se jedná nejčastěji o povolení ke vstupu nebo vjezdu a sběru na chráněných územích a o povolení ke sběru a k manipulaci s chráněnými živočichy (blíže viz zákon č. 114/1992 Sb. o ochraně přírody a krajiny, v platném znění).

Při sběru **v zahraničí** se jedná nejen o povolení ke sběru, ale i k transportu, exportu a importu (EYMANN a kol. 2010). Pokud importujeme biologický materiál do České republiky, ještě před terénním sběrem musíme kontaktovat **Státní veterinární správu, Odbor vnějších vztahů a kontrolu dovozu a vývozu** a informovat je o plánovaném importu genetického materiálu. Žádost musí obsahovat počet a typ vzorků, fixační médium, místo a účel výzkumu, nakládání vzorků po skončení výzkumu a veterinární schvalovací číslo. V případě příletu mimo ČR je vhodné povolení úředně přeložit do angličtiny. Po návratu z terénu je nutné opět kontaktovat Státní veterinární správu, která přijde vzorky zkontrolovat. Při exportním povolení je potřebné dodržovat pravidla dané země. Zároveň je třeba dodržovat i případné další **právní předpisy dané země a související předpisy Evropské unie a ČR**. Vyřízení všech potřebných povolení je nutné řešit s dostatečným časovým předstihem.

2.8.1. CITES

Zvláštní předpisy platí pro druhy chráněné **Úmluvou o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (CITES)** a souvisejícím právem EU v oblasti obchodování s ohroženými druhy. Tyto předpisy regulují mezinárodní obchod s živými i neživými exempláři, jejich částmi i výrobky z nich a vztahují se tedy v případě ohrožených druhů i na přesun zoologického materiálu. Podmínkou k jejich dovozu či vývozu v rámci obchodu mimo EU je získání **povolení CITES**, které vydává MŽP (Ministerstvo životního prostředí České republiky) v souladu se zákonem č. 100/2004 Sb. o obchodování s ohroženými druhy, v platném znění. Při častější výměně zoologického materiálu se doporučuje požádat MŽP o **registraci vědecké instituce** zaregistrované u Sekretariátu CITES, neboť tyto zaregistrované subjekty mají možnost využívat zjednodušených postupů bez nutnosti vyřizování jednotlivých povolení CITES při vzájemné výměně vědeckého materiálu. Podrobnější informace lze nalézt na www.cites.cz.

2.8.2. Nagojský protokol

Další předpisy týkající se **získávání/sběru** zahraničního zoologického materiálu obsahujícího funkční jednotky dědičnosti¹ se mohou vztahovat k Nagojskému protokolu o přístupu ke genetickým zdrojům a spravedlivém a rovnocenném sdílení přínosů plynoucích z jejich využívání. Praktický návod, jak postupovat, je uveden v Metodickém pokynu MŽP ([https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/vestnik_mzp_2019/\\$FILE/SOTPR-Vestnik_cervenec_2019-190801.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/vestnik_mzp_2019/$FILE/SOTPR-Vestnik_cervenec_2019-190801.pdf)).

Před plánovaným sběrem v cizině si nejprve na webových stránkách Access and Benefit Sharing (ABS) Clearing House (<https://absch.cbd.int/countries>) **ověříme**, zda je daná země smluvní stranou Nagojského protokolu a zda zveřejnila právní předpisy týkající se přístupu. Pokud ano, postupujeme dle konkrétních zveřejněných informací o legislativě, v případě nejasností se obrátíme na národní kontaktní místo v dané zemi. Pečlivě si **uchováváme** všechny dokumenty, vč. e-mailové komunikace, dokládající původ materiálu (datum a místo sběru a popis materiálu) a v relevantních případech (viz výše) také to, že byl k využívaným genetickým zdrojům uplatněn přístup v souladu s platnými právními předpisy poskytující země (nejčastěji se jedná o povolení k přístupu).

Výše uvedené dokumenty budou nezbytné v případě, že na materiálu bude probíhat **výzkum**. V takovém případě totiž musí uživatel materiálu postupovat „s náležitou péčí“ podle nařízení (EU) č. 511/2014, což znamená, že musí získávat, uchovávat a předávat dalším uživatelům doklady prokazující, že byl materiál nasbírán v souladu s platnými právními předpisy poskytující země, případně že jsou sdíleny přínosy plynoucí z jeho využívání. Ve fázi, kdy uživatel obdrží finanční prostředky na výzkum, případně ve fázi konečného vývoje produktu (tzn. nejčastěji produktu, který má být uveden na trh; nejedná se tedy např. o zveřejnění vědeckých studií) je v případě genetického materiálu v oblasti působnosti nařízení (EU) č. 511/2014² nutno podat prohlášení o tom, že uživatel postupoval s náležitou péčí, a to prostřednictvím on-line systému **DECLARE** (<https://webgate.ec.europa.eu/declare/>). Toto prohlášení a dokumenty k němu dodané jsou následně zkontrolovány odpovědným orgánem (v ČR jde o Ministerstvo životního prostředí) a po jeho schválení jsou údaje publikovány na webových stránkách Informačního systému ABS, kde jsou dostupné příslušným orgánům zemí, odkud vzorky pocházejí, aby si tyto orgány mohly ověřit legální původ vzorků a to, že jsou využívány v souladu s příslušnými povoleními.

¹ Česká republika přístup ke svým genetickým zdrojům v souvislosti s Nagojským protokolem nereguluje, uvedené požadavky se proto nevztahují na zoologický materiál českého původu.

² Genetické zdroje, které kumulativně splňují tyto podmínky: jsou předmětem výzkumu v EU, byly získány po 12. říjnu 2014 ze země, jež je smluvní stranou Nagojského protokolu, a zároveň se na ně vztahují právní předpisy nebo regulační požadavky týkající se přístupu a sdílení přínosů. Mimo oblast působnosti jsou lidské genetické zdroje.

2.8.3. Důležité odkazy

Zákon České národní rady č. 114/1992 Sb. o ochraně přírody a krajiny:

https://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/58170589E7DC0591C125654B004E91C1/%24file/z114_1992.pdf

Zákon č. 100/2004 Sb. o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi a dalších opatřeních k ochraně těchto druhů a o změně některých zákonů (zákon o obchodování s ohroženými druhy):

<https://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/%24%24OpenDominoDocument.xsp?documentId=140FCFF93EFBFF1AC1256E85004B4646&action=openDocument>

Úmluva CITES – web MŽP:

https://www.mzp.cz/cz/cites_obchod_ohrozenymi_druhy

Nagojský protokol – web MŽP:

https://www.mzp.cz/cz/nagojsky_protokol

Nařízení EU č. 511/2014 o opatřeních pro dodržování pravidel, která vyplývají z Nagojského protokolu o přístupu ke genetickým zdrojům a spravedlivém a rovnocenném sdílení přínosů plynoucích z jejich využívání, ze strany uživatelů v Unii:

<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32014R0511&qid=1473861970022>

Metodický pokyn MŽP k postupu podle zákona č. 93/2018 Sb., o podmínkách využívání genetických zdrojů podle Nagojského protokolu:

[https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/vestnik_mzp_2019/\\$FILE/SOTPR-Vestnik_cervenec_2019-190801.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/vestnik_mzp_2019/$FILE/SOTPR-Vestnik_cervenec_2019-190801.pdf)

Informační systém pro přístup a sdílení přínosů (ABSCH = Access and Benefit Sharing Clearing House) – informace o právních předpisech v jednotlivých státech a kontakty:

<https://absch.cbd.int>

DECLARE – nástroj pro podávání prohlášení o postupu s náležitou péčí:

<https://webgate.ec.europa.eu/declare/>

3. Laboratoř, vybavení, přístroje a pomůcky

Jak správně získávat a skladovat vzorky bylo popsáno v předchozích kapitolách. V následující kapitole je rozebráno, co všechno je potřebné k molekulárním analýzám a jaká cesta vede k získání DNA sekvencí ze vzorků, které máme k dispozici. Pokud chceme vzorky zoologického materiálu zpracovat pomocí molekulárně-genetických postupů, potřebujeme genetické vzorky, laboratorní vybavení a příslušné protokoly.

3.1. Uspořádání laboratoří

K získání DNA sekvencí je zapotřebí molekulární laboratoř s adekvátním přístrojovým vybavením. V laboratoři je zásadní snížit riziko kontaminace na minimum, a proto je důležité mít fyzicky oddělené čtyři pracovní prostory (pre-PCR, post-PCR, ELFO a neinvazivní laboratoř).

V pre-PCR laboratoři se izoluje DNA a připravují se zde PCR reakce. V post-PCR laboratoři probíhá PCR, purifikace PCR produktů a příprava vzorků na sekvenování. Gelová elektroforéza by měla být v samostatné místnosti s nejvyšším stupněm bezpečnosti, protože se při ní pracuje s mutagenními látkami (např. ethidium bromid). Neinvazivní laboratoř s laminárním UV boxem slouží na izolaci DNA z muzejního materiálu a neinvazivních vzorků. U tohoto typu vzorků je kvantita DNA velmi malá a hrozí riziko kontaminace jinými vzorky, a proto je potřebné pracovat s maximální opatrností. Pokud není možné mít uspořádanou laboratoř do čtyř místností, doporučujeme zachovat alespoň rozdělení na pre-PCR (izolace DNA, příprava PCR reakcí) a post-PCR (ELFO, přečišťování PCR produktů, sekvenování) místnost.

3.2. Přístrojové vybavení a materiál

3.2.1. Základní přístrojové vybavení

- **Pipety s nastavitelným objemem.** Nejčastěji se používají pipety s rozsahem 0,5–10 µl, 10–100 µl a 100–1000 µl (Obr. 4).
- **Centrifuga** na 2ml zkumavky s rychlostí 14 000 rpm (revolutions per minute, otáček za minutu).
- **Malá centrifuga** na mikrozkušavky k rychlému stáčení ulpěných tekutin na stěnách a víčku (Obr. 5).
- **Třepačka (vortex)** k protřepávání vzorků a chemikálií (Obr. 6).
- **Inkubátor** s funkcí míchání a zahřívání vzorků.
- **Termocykler** na PCR reakce (Obr. 7).
- **Laboratorní předvážky** k vážení chemikálií s přesností na dvě desetinná místa.
- **Elektroforéza** se zdrojem a příslušenstvím (vana, hřebeny) (Obr. 8).
- **UV transluminátor** na vizualizaci DNA nebo PCR produktů na gelu (Obr. 9).



Obr. 4. Vlevo pipety s nastavitelným objemem, vpravo elektronická pipeta.



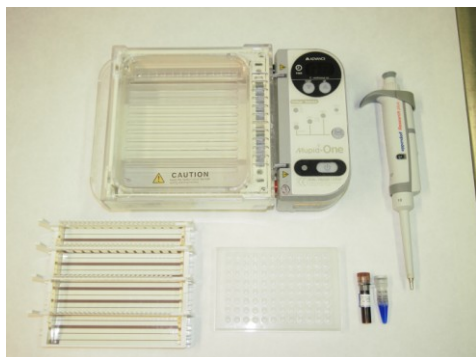
Obr. 5. Malá centrifuga na mikrozkušavky.



Obr. 6. Používání vortexu (třepačky).



Obr. 7. Termocykler.



Obr. 8. Příslušenství na gelovou elektroforézu: elektroforetická vana (nahore), forma s hřebeny (vlevo), 96jamková destička (uprostřed), chemie na vizualizaci PCR produktů a nastavitelná pipeta (vpravo).



Obr. 9. UV transiluminátor (vlevo) s dokumentačním zařízením (vpravo).

3.2.2. Rozšířené přístrojové vybavení

- **Pipety s nastavitelným objemem** 0,1–2,5 µl, 2–20 µl, 20–200 µl.
- **Multikanálová pipeta s nastavitelným objemem** umožňuje pipetování 8–12 vzorků najednou.
- **Elektronická pipeta** je vhodná na rozpipetování např. multimixu nebo čistícího pufru. Pipetou nabereme větší objem a jednoduše dávkujeme do zkumavek.
- **Chlazená centrifuga** na 2ml zkumavky s rychlostí 14 000 rpm.
- **Velká centrifuga** na 96jamkové destičky s rychlostí 14 000 rpm (Obr. 10).
- **Třepačka** slouží na promíchávání roztoků nebo vzorků (např. při izolaci formalinových vzorků, Kap. 5.3.)
- **Destilační kolona** na úpravu čisté (destilované) a ultračisté vody (ddH₂O).
- **Výrobník ledu (ledové tříště)**. U některých protokolů je nutné pracovat na ledu, např. PCR reakce, purifikace PCR reakcí pomocí enzymů apod.
- **Koncentrátor**, tedy centrifuga s možností zahřívání vzorků a vytvořením vakua pro rychlejší odpar chemikálií (Obr. 11).
- **Homogenizátor**, přístroj, který mechanicky rozbije tkáň před samotnou lyzí buněk.
- **Autokláv** sloužící ke sterilizaci spotřebního skla a plastu za pomoci vysoké teploty a tlaku (Obr. 12).
- **UV crosslinker**, přístroj na dezinfekci plastů a chemikálií pomocí UV světla (Obr. 13).
- **Spektrofotometr** (např. Nanodrop) slouží na měření čistoty a koncentrace DNA (Obr. 14).
- **Fluorometr** (např. Qubit ®) je přístroj na měření koncentrace DNA, RNA a proteinů na bázi fluorometrie (Obr. 15).
- **pH metr** na měření pH v roztocích.
- **Laminární box** na práci s muzejní DNA. Protože je muzejní DNA náchylnější na kontaminaci, je třeba historické vzorky zpracovávat odděleně v čistém prostředí laminárního boxu (Obr. 16).
- **Kapilárový sekvenátor** (16 kapilár).



Obr. 10. Veľká centrifuga na 96jamkové destičky.



Obr. 11. Koncentrátor.



Obr. 12. Autokláv na sterilizaci laboratorného materiálu.



Obr. 13. UV crosslinker na sterilizaci spotřebního materiálu pod UV světlem.



Obr. 14. Spektrofotometr Nanodrop.



Obr. 15. Fluorometr Qubit® 4.



Obr. 16. Laminární box s UV světlem.

4. Zásady pro práci v molekulární laboratoři

4.1. Všeobecně platné zásady v molekulární laboratoři

- Všechny osoby pracující v molekulární laboratoři musí být seznámeny s pravidly laboratoře a s bezpečnostními pokyny.
- Všechny místnosti (pracovní místa) by měly mít vlastní přístroje a odpovídající vybavení.
- Chemikálie, izolační kity apod. musejí mít jasné označení a zapsané datum otevření.
- Je důležité používat jednosměrný pohyb materiálu a přenášet ho pouze směrem z pre-PCR do post-PCR laboratoře (nikdy ne naopak!!!). Nepřenášet pipety, špičky, rukavice apod.
- Pravidelně čistit pracovní stoly 10% bělidlem/savem a následně denaturovaným ethanolem.
- Při práci v laboratoři používat rukavice, laboratorní plášť a v některých případech (např. při vyřezávání z gelu) i ochranný štít.
- Pipety s nastavitelným objemem nastavovat jen v předepsaných objemech a používat příslušné špičky.
- Čistit pitevní nástroje, nůžky a pinzety po každém použití. Namočit je do technického ethanolu, vypálit nad plamenem z kahanu a nechat vychladnout (resp. používat jednorázové skalpely).
- Laboratorní odpad z elektroforézy označit a likvidovat jako nebezpečný.
- Při práci s centrifugou rovnoměrně rozložit vzorky tak, aby byla centrifuga vyvážená.
- Přípravu PCR reakcí a přečišťování PCR produktů vykonávat na chlazených stojácích, případně v nádobě s ledem.
- Po skončení práce uklidit pracovní místo, vysypat odpadní nádobu na špičky, uklidit stojánky, zarovnat krabičky se špičkami a utřít stůl.

4.2. Zásady pro práci s muzejním materiálem

- Odběr vzorků (nejen) v muzeu – důkladně vyčistit nůžky a pinzety mezi každým použitím (namočit do technického ethanolu, vypálit nad plamenem z kahanu a nechat vychladnout).
- Pracovat v laboratoři určené pro práci s neinvazivními vzorky, abychom zamezili kontaminaci od okolní DNA.
- Pracovat v rukavicích a laboratorním plášti.
- Materiál na izolaci DNA (kolonky, zkumavky, stojánky) před použitím ozářit pod UV světlem v UV crosslinkeru, čímž se zabrání kontaminaci DNA z okolí.
- Izolace a PCR připravujeme v laminárním boxu, který před prací vysvítíme UV světlem.
- Používat špičky s filtrem.

- Používat izolační kity specializované na izolaci DNA z malého množství tkání (např. Invisorb Forensic Kit, Stratec).
- Používat negativní kontrolu (při celé izolaci pracovat s jedním vzorkem navíc, do kterého nevstoupí žádná tkáň, při PCR pak nahradíme DNA izolát ultra čistou vodou). Díky negativní kontrole si ověříme, jestli pracujeme v čistém prostředí a zda vzorky nepřišly do styku s kontaminací, která by se v kontrolním vzorku projevila.
- Každý vzorek sekvenovat v duplikátech pro případ, že by později byla odhalena kontaminace.
- Při izolaci DNA pracovat se vzorky opatrně a dodržovat protokoly pro daný typ vzorku.

5. Izolace DNA

5.1. Co je izolace DNA a na jakých principech funguje

Izolace DNA je proces získání DNA z biologického materiálu pomocí kombinace fyzikálních a chemických metod. V současné době se jedná o rutinní techniku molekulární biologie. Jako první uskutečnil izolaci DNA Friedrich Miescher v roce 1869 (DAHM 2008). V té době ale netušil, že právě v této molekule je uložena dědičná informace, která je pro organismy jedním ze stěžejních prvků.

Samotný proces izolace nukleových kyselin, tedy i DNA, můžeme rozdělit na dva základní kroky:

Lyze buněk. Při lyzi buněk dochází k rozbití jejich buněčných stěn a membrán, a tedy k uvolnění DNA z buněčných jader a z buněk do prostředí. Uvolnění DNA může být docíleno mechanickým rozrušením, např. pomocí mechanického rozbití tkání, homogenizací v homogenizátoru nebo rozrušením za pomoci enzymů (proteináza), které je detailněji popsáno níže. Případně se může jednat o kombinaci obou postupů. Při lyzi se z buněk uvolní celý jejich obsah, tudíž vznikne komplexní směs obsahující zbytky buněčných stěn a membrán, proteinů, nukleových kyselin (včetně DNA), polysacharidů a dalších nízkomolekulových složek.

Přečištění nukleových kyselin. Následně je potřeba DNA přečistit od detergentů, ostatních složek lyzačního roztoku a dále od proteinů, solí a jiných nečistot, které by mohly omezovat další molekulární postupy. Zbytkové proteiny (např. nukleázy) se navazují na DNA, mohou ji degradovat a znemožňovat tak další kroky v molekulární laboratoři (příkladem je štěpení endonukleázami, které rozkládají vazby uvnitř nukleových kyselin).

Pro izolaci DNA můžeme použít několik různých metod s odlišnými protokoly, jakými jsou například fenol-chloroformová extrakce nebo tzv. solná izolace. Použít můžeme i izolační kity, které jsou založené na křemičitých kolonkách (např. Qiagen, Stratec, Geneaid, Macherey-Nagel).

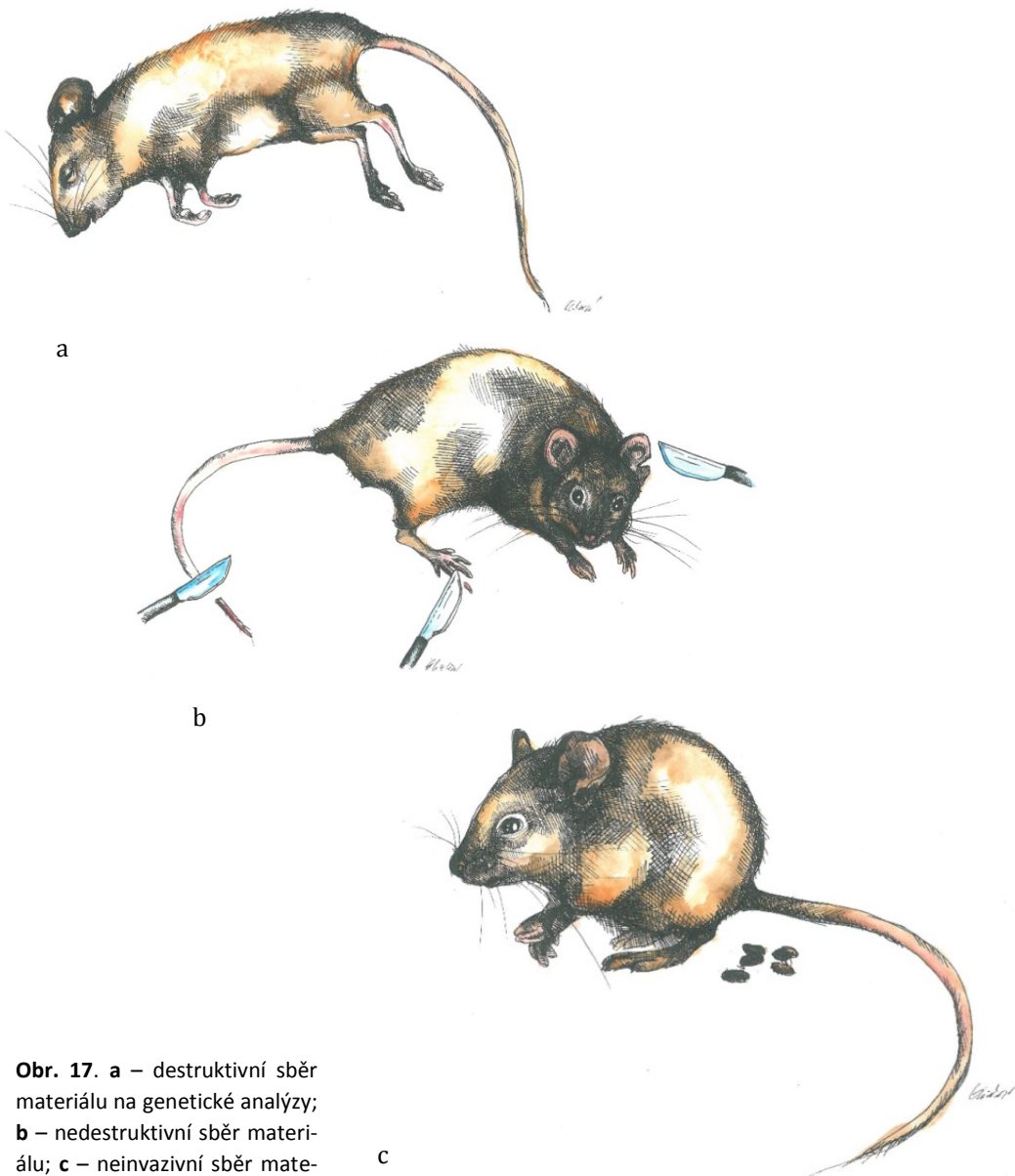
5.2. Genetické vzorky

5.2.1. Získávání vzorků

DNA můžeme získat z jakékoliv tkáně, která obsahuje buňky. U obratlovců získáváme vzorky nejčastěji z krve, svaloviny, celého orgánu, kousku prstu, ocasu, ucha, ploutve nebo z chlupů či per (Kap. 2.4.–2.7.). V případě hmyzu a jiných bezobratlých se často jedná i o celého jedince (Kap. 2.2.–2.3.).

Na získání DNA můžeme použít vzorkování destruktivní, nedestruktivní nebo neinvasivní. Mezi **destruktivní metody** (Obr. 17a) patří chytání do sklapovacích pastí (odchyt drobných savců). Po následné pitvě si na molekulární analýzy vybereme nejvhodnější tkáň (např. slezina, srdce, ledvina, sval). Mezi **nedestruktivní metody** (Obr. 17b) patří odchyt do živolovných pastí nebo sítí (savci, ptáci). Po odchytu odebereme část tkáně (prst, kousek ocasu, ucha) nebo odebereme krev. Vzorkovaného jedince potom vypustíme zpět do příro-

dy. V některých případech (velcí savci, chráněné druhy) není možné využít nedestruktivní vzorkování, a proto využíváme **neinvazivní metody** (Obr. 17c). Jako vzorky sbíráme to, co po sobě zvíře přirozeně zanechá (srst, moč, trus, svlečka, vaječná skořápka). Neinvazivní vzorkování se využívá hlavně v ochranářské genetice, u nás např. při studiu vlka, rysa nebo vydry.



Obr. 17. a – destruktivní sběr materiálu na genetické analýzy; **b** – destruktivní sběr materiálu; **c** – neinvazivní sběr materiálu.

Kromě čerstvého materiálu představují hodnotný zdroj molekulárních informací i muzejní sbírky. Často obsahují typové série, vyhynulé populace organismů nebo jedinců z velmi těžko dostupných území. Práce s muzejním materiálem má však několik nástrah: a) DNA je často fragmentovaná, b) DNA je v nízké kvantitě, c) mnohokrát detekujeme kromě cílové DNA i kontaminace, d) málokdy známe historii vzorků (jestli byly správně skladované v suchu, ve tmě, v čistém ethanolu a zda nebyly v minulosti skladované ve formalínu). Pro práci s takovýmto materiálem proto musíme použít složitější postupy popsané v Kap. 10.

5.2.2. Typy vzorků

K izolaci DNA se používají různé druhy tkání (upraveno podle WANDELER a kol. 2007):

Ethanolové vzorky

Jedním z nejlepších zdrojů materiálu pro fylogenetické analýzy jsou vzorky uchované v 96–100% ethanolu (Obr. 18). Do ethanolu se uvolní veškerá voda ze vzorku, který je tím vysušen a lépe pak odolává degradaci.



Obr. 18. Ukázka ethanolových vzorků bezobratlých; zleva čtyři zkumavky s celým organismem, zprava čtyři zkumavky s nohou bezobratlých.

Na sucho vypreparované vzorky hmyzu

DNA může být izolovaná z celého těla hmyzu (Obr. 19) anebo z jeho částí (HARPER a kol. 2006). Dokonce byly vyvinuty neinvazivní protokoly, při kterých je zachována tělesná schránka jedince, a jsou tak i později možné další morfologické analýzy (GILBERT a kol. 2007). I přesto je ale vhodnější jedince detailně vyfotografovat z potřebných úhlů a následně celého jedince nebo jeho část rozdrtit, aby byla výtěžnost při izolaci vyšší. Rozdílne usmrcovací metody a skladovací podmínky (např. plynování) může taktéž ovlivnit výtěžnost DNA (DEAN & BALLARD 2001). Více informací k této tématice je shrnuto v práci VONDRÁČKA a kol. (2018) a v Kap. 2.3. této publikace.

Kůže a suché tkáně

Epitelové tkáně jsou jedním z nejrozšířenějších typů tkání pro získání DNA z muzejních vzorků, protože poškození exponátu je v jejich případě často nevýrazné/minimální a vzorkování je velmi jednoduché. K uchování kůží se používají různé metody (HALL a kol. 1997), které ovlivňují výtěžnost izolace DNA a její kvalitu. Kromě samotných kůží se dá DNA získat i ze zbytků tkání na lebkách. Seškrabáním těchto zbytků můžeme získat dostatečně kvalitní materiál pro izolaci DNA (viz Kap. 2.4.–2.7.).

Prsty, pařáty, drápy

Kvalitní DNA se izoluje z prstů savců (HEDMARK & ELLEGREN 2005) a pařátů ptáků (MUNDY a kol. 1997). McDONOUGH a kol. (2018) dokázali, že pařáty jsou v případě muzejního materiálu nejkvalitnějším zdrojem DNA (viz Kap. 2.6.–2.7.).

Kosti a zuby

DNA v kostech je lépe chráněná před kontaminacemi a vnějšími vlivy než epitelové tkáně. Po důkladném omytí se musí kost navrtat tak, abychom se dostali k materiálu, který obsahoval živé buňky (WISELY a kol. 2004). Protokoly na izolaci DNA z kostí a zubů si jsou velmi podobné (FLAGSTAD a kol. 2003; WANDELER a kol. 2003; viz Kap. 2.6.–2.7.).

Peří

Byly vyvinuty i protokoly na získávání DNA z peří. Konkrétně z části pera, která je vyživovaná krví (PAYNE & SORENSON 2002; HORVÁTH a kol. 2005; viz Kap. 2.6.).

Šupiny ryb a plazů

I když se šupiny ryb sbírají především za účelem věkové identifikace jedinců, bylo vyvinuto několik protokolů na izolaci DNA právě z nich (NIELSEN a kol. 1997; CIBOROWSKI a kol. 2007; viz Kap. 2.4.). Izolovat DNA lze i ze šupin plazů (MUSILOVÁ a kol. 2010; viz Kap. 2.5.)

Ulity plžů

Přestože jsou ulity mrtvé struktury, je možné izolovat DNA i z takovýchto vzorků, pokud obsahují zbytky tkání či buněk. Podrobné protokoly popisují autoři KORÁBEK a kol. (2015), viz Kap. 2.2.



Obr. 19. Ukázka na sucho vypreparovaného hmyzu.

Vejce

V některých případech nemáme tkáň ze studovaného organismu, ale máme např. vejce anebo část skořápky (Obr. 20). I takový materiál je možné použít na izolaci DNA. Buňky se dají odebírat z povrchu vejce, které je však častokrát velmi kontaminované bakteriemi a DNA z okolního prostředí. Pokud je to možné, tak je výhodnější izolovat DNA z vnitřní strany vejce (LEE & PRYS-JONES 2008; viz Kap. 2.6.).



Obr. 20. Příprava izolace DNA z vaječných skořápek.

5.2.3. Velikost vzorku a jeho příprava na izolaci

Každý izolační kit má v protokolu uvedené optimální množství vstupní tkáně. V případě větší odchylky od této hodnoty může dojít ke snížení efektivity izolace DNA, a tudíž je potřeba velikost tkáně přizpůsobit. Ideální hodnoty se pohybují v řádech několika desítek miligramů tkáně (5–50 mg; kousek o velikosti špendlíkové hlavičky). V případě velkých vzorků je tedy zapotřebí odebrat malou část tkáně a pracovat dále jen s ní. Zbytek vzorku (ať už tkáň či celého jedince) je možné dále uchovávat v mrazu pro potřeby jiných fylogenetických analýz, či přímo pro účely genetické banky.

Při odebírání částí z větších kousků tkání či z celých organismů můžeme používat nůžky, skalpely, pinzety apod. Je však zapotřebí pracovat na čistém stole (otřený detergentem) a s čistými nástroji. Ty je nutné sterilizovat před každým použitím (namočit v denaturovaném ethanolu a vypálit nad plamenem kahanu). Tvrdé části mohou být i rozdrceny speciálními plastovými tyčinkami pasujícími do 1,5ml zkušavek či s využitím homogenizátoru (mechanické rozbítí pomocí tvrdých kuliček a silného třepání).

Pokud máme velmi malý kus tkáně v ethanolu, vzorky zcentrifugujeme při vysokých otáčkách a následně odpipetujeme co nejvíce ethanolu, otevřenou zkušavku vložíme do koncentrátoru s vakuem a během 10–15 minut při teplotě 37–50 °C zbylý ethanol odpaříme. Pokud nemáme koncentrátor, můžeme taktéž použít inkubátor, kam vložíme otevřené zkušavky při 37–50 °C na cca 30 minut.

V případě, že máme suchou tkáň ve zkušavce a chceme ji mechanicky rozbít, můžeme zkušavku vložit na 30 minut do mrazničky (–80 °C) a následně napipetovat lyzační pufr předeřhátý na 37 °C. Tato rychlá změna teploty zabezpečí rozpad buněk a izolace bude

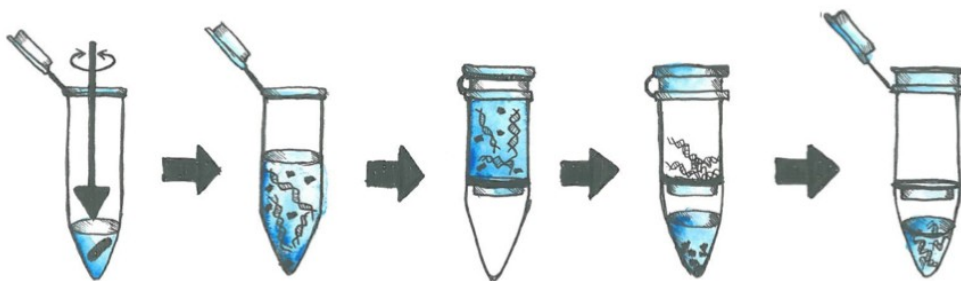
účinnější (BISWAS & BISWAS 2011). Tato metoda je vhodná především pro izolaci DNA z bakterií, rostlinných pletiv nebo hlenek.

5.3. Vybrané izolační protokoly

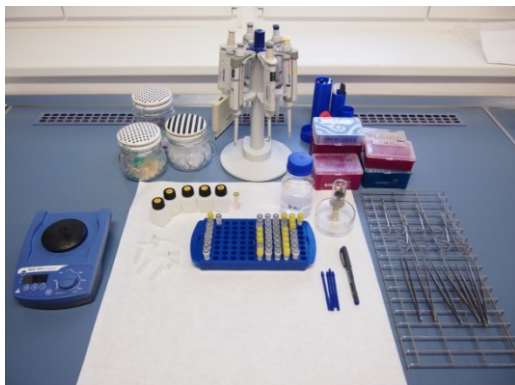
5.3.1. Izolace s použitím křemičitých kolonek

Tento způsob izolace (Obr. 21) je využíván v komerčně dostupných kitech, kde najdete podrobně vysvětlený protokol, který se mezi výrobci liší v různých krocích a objemech používaných chemikálií (níže je postup popsán obecně). V kitu jsou dále kolonky s křemičitým filtrem a veškeré potřebné chemikálie. Navíc budeme potřebovat jen čistý ethanol/isopropanol, který se používá v izolačním procesu a také k ředění některých pufrů, které jsou dodávány v kitech. Pokud je proteináza v suchém stavu, potřebujeme na naředění ultračistou vodu (ddH_2O).

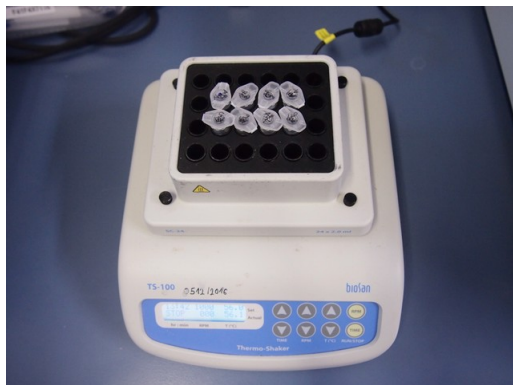
Další materiál nezbytný pro izolaci DNA: pitevní sada (nůžky, pinzeta, skalpel), kahan, stojánek, zkumavky na uskladnění DNA, termoblok s funkcí míchání (nebo inkubátor), centrifuga, vortex, pipety a špičky (Obr. 22).



Obr. 21. Princip izolace DNA. V první zkumavce (zleva) se nachází tkáň v roztoku proteinázy a lyzačního pufru. Po inkubaci dojde k rozpuštění tkáně a k vyplavení DNA z buněk. Tekutý lyzát přepipetujeme do kolonky s filtrem. Při centrifugaci se DNA naváže na filtr (tekutinu pod filtrem vylijeme) a v dalších krocích ji přečistíme. V posledním kroku uvolníme čistou DNA pomocí speciálního (elučního) pufru z filtru a získáme tak DNA izolát pro další molekulární analýzy.



Obr. 22. Příprava pomůcek na izolaci DNA: zleva vzadu vortex, zkumavky (ve sklenicích), izolační pufr, pipety, špičky (v krabičkách); zleva na podložce vzorky, denaturovaný ethanol na opalování nůžek a pinzet, kahan, tyčinky, fix, nůžky a pinzety.



Obr. 23. Lyze vzorků v inkubátoru s funkcí míchání.

- Před zahájením vlastní izolace je potřeba si připravit pracovní místo, izolační kit a vzorky (Obr. 22).
- V prvním kroku musíme připravit vzorek na izolaci; odstříhnout požadované množství materiálu.
- Obvykle izolujeme víc vzorků najednou. Počet vzorků přizpůsobíme velikosti centrifugy, která musí být dobře vyvážená (např. velká centrifuga max. 24 vzorků, min. 2 vzorky). Vzorky ukládáme do centrifugy vždy ve stejném pořadí.
- Po každém vzorku dezinfikujeme nástroje opalováním nad kahanem.
- Dbáme na to, abychom měli v každém kroku dobře popsané zkumavky a vzorky se nám nepomíchaly.
- Pokud je tkáň uskladněna v ethanolu, je potřeba vzorek ethanolu zbavit, protože ten může inhibovat další práci s DNA. Odpaření ethanolu lze docílit několika způsoby: 1) tkáň vyjmeze ze zkumavky s ethanolem a osušíme ji na filtračním papíru; 2) tkáň přeneseme do nové zkumavky a necháme odpařit ethanol, 3) tkáň přemyjeme v malém množství vody a vysušíme; 4) tkáň zcentrifugujeme, odpipetujeme většinu ethanolu a zbytek necháme odpařit v inkubátoru.
- Pokud je tkáň uskladněna ve stabilizačním činidle (RNAlater), potřebujeme se zbavit solí, které mohou inhibovat další práci s DNA. Proto k tkáni ve zkumavce přidáme dostatečné množství (500–1000 μ l) pufru (TE nebo jiného elučního pufru), několikrát v ruce promícháme, vyměníme pufr a opakujeme. Následně necháme tkáň vyschnout a můžeme pokračovat v izolaci.

- Do nových a popsaných zkumavek poté napipetujeme potřebné objemy lyzačního pufru (280–700 μ l) a proteinázy (20–40 μ l). Proteináza je enzym, který při optimálních podmínkách (teplota 52–60 °C) štěpí proteiny a zajišťuje tak praskání buněk, aby se DNA mohla vyplavit ven do roztoku.
- Do zkumavek s pufrém a proteinázou přidáme tkáň a necháme inkubovat v inkubátoru s funkcí míchání při teplotě 52–60 °C několik hodin, případně přes noc (Obr. 23). Doba inkubace závisí na druhu a velikosti tkáně, zpravidla inkubujeme tak dlouho, dokud tkáň není úplně rozložená. Pro zvýšení efektivity proteinázy je doporučeno tkáň mechanicky rozbít/nakrájet pomocí skalpelu, nůžek, paličky nebo speciálních přístrojů, např. MagnaLyser.



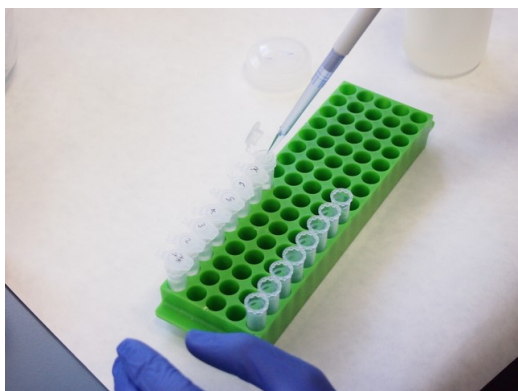
Obr. 24. Vkládání vzorků do centrifugy.



Obr. 25. Pipetování vzorků při izolaci.

- Po inkubaci si vzorky stočíme na centrifuze (1 min, 11 000 rpm, Obr. 24) a tím zajistíme, že všechny nerozložené části (chlupy, kosti apod.) zůstanou na dně zkumavky. Tekutý lyzát si přepipetujeme do nových popsaných zkumavek (pokud se nám tkáň úplně rozložila, můžeme tento krok přeskočit) (Obr. 25).
- Do inkubovaných vzorků přidáme vazebný „binding“ pufr (100–225 μ l) a ihned je protřepeme na vortexu cca 10 s. Tento krok zajistí, že se DNA v dalším kroku naváže na filtr v kolonce.
- V některých izolačních protokolech následuje 10–20 min inkubace při teplotě 56–70 °C.
- Vzorky si krátce zcentrifugujeme, aby na víčku nezůstala žádná kapalina. Tím zabráníme vzájemné kontaminaci vzorků.
- Následně přidáme ethanol (100–220 μ l) a ihned protřepeme na vortexu cca 10 s.

- Následuje přepipetování vzorků do kolonek s filtrem, pro lepší navázání DNA na kolonku inkubujeme 2 min při pokojové teplotě.
- Kolonky zcentrifugujeme při určených rychlostech (1 min, 11 000 rpm), čímž se DNA zachytí na křemičitém filtru v kolonce a tekutinu pod filtrem vylijeme.
- Následuje několik přečišťovacích kroků s promývacími „wash“ pufr (200–700 µl), kdy za pomoci centrifugace promyjeme DNA zachycenou na filtru a zbavíme jí tak nečistot (Obr. 26).
- Po posledním kroku je nutné zbavit filtr a samotnou kolonku jakéhokoliv zbylého ethanolu, čehož docílíme opětovnou centrifugací při nejvyšších otáčkách 14 000 rpm po 4 minuty.



Obr. 26. Promývání DNA zachycené na filtru kolonek pomocí čistícího pufru (Wash Buffer).



Obr. 27. Přenos kolonek do čistých zkumavek, ve kterých bude DNA uložena.

- Kolonky dáme do nových důkladně popsanych 1,5ml zkumavek a následuje poslední krok, uvolnění DNA z kolonky (tzv. eluce). Při eluci dochází k uvolnění čisté DNA z filtru, kterou můžeme po centrifugaci jímat do připravených zkumavek pro izoláty (Obr. 27). Některé protokoly doporučují eluční pufr (TE, Tris, EDTA) nebo ddH₂O předeheat na 52–70 °C. Následně se pipetuje na střed filtru v kolonce a nechá se inkubovat při pokojové teplotě 2–5 minut, tak aby došlo k maximálnímu výtěžku DNA při centrifugaci (3 min, 14 000 rpm). Vlastní objem elučního pufru je vhodné modifikovat podle velikosti vstupní tkáně. Pokud máme standardně velký kus tkáně, můžeme použít větší objem (např. 100–200 µl). V případě menších kusů tkání je lepší objem omezit na 30–50 µl.
- Pro získání maximálního množství DNA můžeme eluční krok opakovat (druhá eluce má většinou nižší koncentraci DNA).

- DNA izoláty uskladňujeme krátkodobě při teplotě 4 °C, dlouhodobě -20 °C. Vzorky, které mají nízkou koncentraci DNA (např. historické muzejní vzorky) uskladňujeme ve speciálních Lo-Bind zkumavkách, které zabraňují vázání DNA na stěny zkumavky.
- DNA používáme na další molekulární analýzy (PCR, mikrosatelity).
- Kvalitu a kvantitu DNA můžeme změřit na přístrojích NanoDrop nebo Qubit.

5.3.2. Solná izolace (ALJANABI & MARTINEZ 1997)

Pro tento způsob izolace DNA potřebujeme tyto chemikálie:

- lyzační pufr (připravený z 0,5M Tris, 0,1M EDTA, 2% SDS; pH 8,0)
- octan amonný (7M, pH 8,0)
- proteináza K (25 mg/ml)
- isopropanol (chlazený v mrazničce)
- 70% ethanol (chlazený v mrazničce)
- ultračistá voda (ddH₂O) nebo pufr AE

Před začátkem izolace si nastavíme inkubátor s funkcí míchání na 56 °C a chlazenou centrifugu na 4 °C. Následuje vlastní postup:

- Malé množství tkáně vložíme do označené 1,5ml zkumavky.
- Přidáme 600 µl lyzačního pufru a 5 µl proteinázy K. Vzorky protřepeme a inkubujeme při 56 °C celou noc.
- Po inkubaci vložíme vzorky na 30 min do mrazničky (-20 °C).
- Následně přidáme 400 µl octanu amonného a obsah zkumavek jemně promícháme v ruce 15–20 s (nevortexujeme, aby nedošlo k fragmentaci DNA).
- Poté centrifugujeme 20 min při 14 000 rpm a teplotě 4 °C. Tento krok zabezpečí vymytí proteinů a zanechá bílou peletu (= DNA) na dně zkumavky.
- Do nové 1,5ml zkumavky přepipetujeme opatrně supernatant (tekutina nad sedimentem) a peletu necháme na dně.
- Přidáme 600 µl vychlazeného isopropanolu a mixujeme převrácením zkumavky v ruce. Vzorky vložíme do mrazničky na 3 hodiny nebo na celou noc.
- Poté vzorky centrifugujeme 30 min při 14 000 rpm a teplotě 4 °C.
- Vylijeme supernatant a necháme zkumavky vyschnout za použití koncentrátoru nebo inkubátoru.
- Přidáme 1000 µl vychlazeného ethanolu (70%) a jemně promícháme. DNA peleta se rozpustí v ethanolu. Tento krok čistí DNA od inhibitorů. Centrifugujeme 15 min

na 14 000 rpm při teplotě 4 °C.

- Vylijeme supernatant a vysušíme zkumavku v koncentrátoru nebo inkubátoru.
- Poté, co odpaříme ethanol, přidáme 50–200 µl ddH₂O a nebo AE pufr a necháme několik minut inkubovat při pokojové teplotě, dokud se peleta nerozpustí. Tím získáme výsledný DNA izolát.
- Kvalitně označené DNA izoláty uskladňujeme krátkodobě při teplotě 4 °C nebo dlouhodobě při -20 °C.

5.3.3. Tepelná izolace HotSHOT (TRUETT a kol. 2000)

Tepelná izolace je rychlá a jednoduchá alternativní metoda izolace DNA, která se může vykonávat v 96jamkových destičkách. Tímto způsobem lze izolovat různé typy vzorků (bukální stěr, krev, spermie, prsty, ocsy, měkké tkáně) pro jednoduchý DNA-barcoding (viz Kap. 9.) nebo mikrosatelity. Tuto metodu však nedoporučujeme pro NGS (MARTINCOVÁ & AGHOVÁ 2020).

Pro tepelnou izolaci si připravíme dva roztoky:

*Příprava 200 ml **roztoku A** (25mM NaOH, 0,2 mM EDTA s pH 12):*

- rozpustíme 0,2 g NaOH ve 180 ml ddH₂O
- přidáme 0,8 ml 0,5M EDTA
- doplníme do 200 ml ddH₂O

*Příprava 200 ml **roztoku B** (40 mM Tris-HCl s pH 5):*

- 8 ml 1M Tris smícháme s 200 ml ddH₂O
- pomocí HCl upravíme pH na hodnotu 5

- Malou část tkáně vložíme do mikrozukavky (stripu nebo 96jamkové destičky).
- Přidáme 40–100 µl roztoku A (do stripu ideálně 75 µl).
- Inkubujeme 50 min při teplotě 95 °C. Na inkubaci můžeme použít inkubátor nebo termocykler.
- Přidáme stejný objem roztoku B (75 µl) a necháme alespoň 1 hod v ledničce.
- Vzniklý lyzát použijeme jako templát do PCR reakcí.
- Lyzát (i s nerozpuštěnou tkání) můžeme skladovat při teplotě -20 °C.

5.3.4. Fenol-chloroformová izolace

Fenol-chloroformová izolace DNA patří k základním metodám molekulární biologie. Výhodou této metody je získání kvalitní molekulární DNA ve vysokých koncentracích za nízkou cenu chemikálií. Nevýhodou je, že používané chemikálie jsou toxické, a proto se doporučuje pracovat v laminárním boxu. Tento protokol je navíc relativně časově, ale i manuálně náročný (v porovnání s předchozími metodami).

Pro tento způsob izolace DNA potřebujeme tyto chemikálie:

- lyzační pufr
- proteináza K
- roztok fenol/chloroform/isoamylalkohol (poměr 25:24:1)
- roztok chloroform/isoamylalkohol (poměr 24:1)
- eluční pufr (např. TE) nebo ddH₂O
- octan sodný (sodium acetate 3M)
- 96% ethanol
- 70% ethanol

Lyze buněk

- Přiměřené množství tkáně (Kap. 5.2.3.) rozpustíme v 200 µl lyzačního pufru a 20 µl proteinázy K.
- Vzorky necháme inkubovat při teplotě 56 °C 3 hodiny až celou noc (inkubátor s funkcí míchání).
- Po inkubaci vzorky zcentrifugujeme, čímž zabezpečíme, že všechny nezlyzované zbytky tkáně zůstanou ve spodní části zkumavky.
- 200 µl lyzátu přepipetujeme do nové zkumavky tak, aniž bychom přepipetovali nerozložené zbytky ze dna původní zkumavky (zkumavka č. 1).

Fenol/chloroform/isoamylalkohol izolace

- Do zkumavky č. 1 (s 200 µl lyzátu) přidáme 200 µl roztoku fenol/chloroform/isoamylalkohol (objem lyzátu a roztoku fenol/chloroform/isoamylalkohol musí být vždy shodný, objemy můžeme eventuálně zvětšit podle potřeby).
- Vzorky následně šetrně několikrát v ruce převrátíme, aby se roztoky promíchaly a zcentrifugujeme 5 min při 14 000 rpm.
- Nyní odpipetujeme zhruba 180 µl z vodné fáze (obvykle na vrchu) roztoku ve zkumavce a tento objem přeneseme do nové zkumavky (zkumavka č. 2).

Chloroformová izolace (pokračujeme se zkumavkou č. 2)

- Do zkumavky přidáme stejné množství (180 µl) chloroform/isoamylalkoholu.
- Vzorky promícháme v ruce a zcentrifugujeme po dobu 5 min při 14 000 rpm.
- Odpipetujeme vrchní (vodnou) fázi roztoku do nové zkumavky (zkumavka č. 3).

Ethanolová precipitace (pokračujeme se zkumavkou č. 3)

- Přidáme octan sodný (1/10 objemu = 36 µl). Vzorky následně promícháme, ale opět pouze v ruce.
- Přidáme 96% ethanol v poměru 1 díl momentálního roztoku (396 µl) a 2,5 dílu ethanolu (990 µl) a opět promícháme.
- Vzorky necháme inkubovat v mrazničce při teplotě -20 °C minimálně 1 hod (ideálně celou noc).
- Poté vzorky zcentrifugujeme při teplotě 4 °C po dobu 10 minut při maximální rychlosti.
- Nyní odpipetujeme supernatant tak, abychom neporušili peletu, která se drží na dně.
- Poté do zkumavek přidáme 500 µl 70% ethanolu a promícháme v ruce.
- Nyní znova odpipetujeme supernatant, bez toho, abychom porušili peletu, která se drží na dně.
- Do zkumavek poté přidáme 500 µl 70% ethanolu a promícháme v ruce.
- Následuje opět centrifugace při teplotě 4 °C po dobu 15 minut.
- Opět opatrně odpipetujeme supernatant, abychom nepoškodili peletu.
- Za pomoci koncentrátoru s vakuem odpaříme z otevřených zkumavek zbylý ethanol (cca 15–20 minut při 37 °C). Zkumavky můžeme vysušit i v inkubátoru při teplotě 37 °C, případně je necháme otevřené 30 min při pokojové teplotě. Pozor, aby se DNA peleta nepřesušila!
- Ve zkumavkách zbudou pelety DNA, na které napipetujeme adekvátní množství elučního pufru předeřhátého na 50 °C (podle velikosti pelety, např. 200–500 µl pufru na velkou peletu a 30-50 µl na malou peletu).
- Promícháme v ruce, čímž se peleta rozpustí.
- DNA izoláty uskladňujeme krátkodobě při teplotě 4 °C, dlouhodobě při -20 °C.

5.3.5. Izolace DNA z formalinových vzorků

Mnohá muzea skladovala (či stále skladují) vzorky ve formalinových blocích nebo v tekutém formalínu, a to především díky jeho výborným fixačním vlastnostem a schopnostem velmi dobře zachovat buněčné struktury a tělní tkáně. Skladování vzorků ve formalínu však způsobuje časté nukleotidové přestavby (WILLIAMS a kol. 1999; TANG 2006) a izolace DNA a PCR amplifikace z formalinových vzorků je velmi náročná, protože časem dochází k degradaci DNA (STUART a kol. 2006; TANG 2006). Čím déle je vzorek ve formalínu fixován, tím více dochází k fragmentaci DNA a celkově nižšímu výtěžku a kvalitě izolované DNA. Během skladování se kvalita formalínu zhoršuje, protože vzniká kyselina mravenčí a dochází ke snižování pH. Tento jev pak vede k uvolňování nukleotidů z molekul DNA

(WILLIAMS a kol. 1999). Dnes existuje již několik protokolů, jak vzorky před izolací DNA formalínu zbavit.

Promytí vzorků v TE9 pufru podle SHIOZAWA a kol. (1992), WIRGIN a kol. (1997)

- Vzorky vložíme do 15ml zkumavek, doplníme 10 ml TE9 pufru (připravený z 500 mM Tris, 20 mM EDTA, 10 mM NaCl; pH 9).
- Připevníme na třepačku nebo inkubátor s funkcí míchání kde vzorky necháme promíchávat 24 hodin, pufr měníme každé dvě hodiny.
- Následně k vzorkům přidáme 10 ml TE9 pufru, 0,1 g SDS ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) a 5 mg proteinázy K.
- Inkubujeme 24 hod při teplotě 55 °C v inkubátoru s funkcí míchání.
- Přidáme dalších 5 mg proteinázy K a 0,1 g SDS a dále inkubujeme 48 hod při stejné teplotě a míchání.
- Následně pokračujeme v izolaci DNA podle standardních postupů popsanych výše.

Promytí vzorků v GTE roztoku (SHEDLOCK a kol. 1997)

- Vzorky vložíme do 15ml zkumavek a přidáme 10 ml 1x GTE roztoku (připraveného ze 100 mM glycinu, 10 mM TrisHCl, mM EDTA, finální pH 8).
- Inkubujeme při pokojové teplotě s funkcí míchání, roztok minimálně třikrát vyměníme.
- Následně vzorky vysušíme při pokojové teplotě.
- Přidáme 500 µl izolačního pufru (připravený z 1% SDS, 25 mM TrisHCl, 100 mM EDTA).
- Vzorky vložíme do termobloku a inkubujeme 24 hod při 65 °C.
- Následně přidáme 20 µl 1M dithiotreitolu (DTT) a 100 µl proteinázy K.
- Inkubujeme 10 hod při 65 °C a pak přidáme dalších 50 µl proteinázy K.
- Následně pokračujeme v izolaci DNA podle standardních postupů popsanych výše.

Invisorb protokol pro formalínové vzorky

- Tkáň vložíme do 1,5ml zkumavky a přidáme 1 ml PBS pufru a 2µl 1M DTT.
- Inkubujeme 20 min při 99 °C v inkubátoru s funkcí míchání.
- Centrifugujeme 1 min při 11 000 rpm.
- Pipetou odstraníme supernatant, přidáme 1 ml PBS a promícháme na vortexu.
- Centrifugujeme 1 min při 11 000 rpm a pipetou odstraníme supernatant.
- Následně pokračujeme v izolaci DNA podle protokolu Invisorb Mini Kit, do lyzačního pufru přidáme 1 µl 1M DTT.

6. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z angl. Polymerase Chain Reaction) je jedna z nejpoužívanějších metod molekulární biologie, která umožňuje namnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA. Tuto metodu vyvinul Kary Mullis v roce 1983 (MULLIS a kol. 1987; BARTLETT & STIRLING 2003), který za tento objev získal Nobelovu cenu za chemii v roce 1993. PCR je metoda, která napomohla obrovskému rozvoji molekulární biologie – dala vzniknout jejím různým odvětvím, např. ochranářské genetice (a možná vůbec studiu volně žijících organismů) a umožnila i sekvenování historického materiálu (nejen muzejního, ale i ancient DNA, tedy pocházející z velmi starého materiálu).

PCR je metoda rychlého a snadného zmnožení úseku DNA založena na principu replikace nukleových kyselin. Organismy využívají pro replikaci DNA speciální bílkovinu (protein), která se jmenuje DNA polymeráza. PCR je založena na opakovaném ohřívání a ochlazování směsi DNA vzorku s DNA polymerázou a dále volnými nukleotidy (stavebními kameny DNA) a primery, což jsou „značky“ umožňující ohraničit konkrétní úsek DNA, který chceme namnožit. Přesněji jde o krátké sekvence DNA, tzv. oligonukleotidy, které komplementárně nasedají na konce námi zvoleného úseku. K syntéze nového vlákna DNA se používá nejčastěji termostabilní DNA polymeráza bakterie *Thermus aquaticus*, odtud označení Taq polymeráza. Polymeráza pak zkopíruje pouze úsek mezi značkami (primery), přičemž k tvorbě nových vláken využije volné nukleotidy. Cyklus reakce se opakuje až 40× a počet kopií námi zvoleného úseku DNA tedy exponenciálně roste (řádově do miliard), jelikož dochází i k množení nově vznikajících úseků z předchozích cyklů. PCR probíhá v zařízení zvaném termocykler (Obr. 28).



Obr. 28. Různé druhy termocyklerů od různých výrobců. Společným znakem je termoblok na 48 nebo 96 mikrozkušavek a počítač, který řídí změny teplot při PCR reakci.

6.1. Princip PCR reakce

PCR probíhá v několika krocích, přičemž se některé z nich pravidelně opakují:

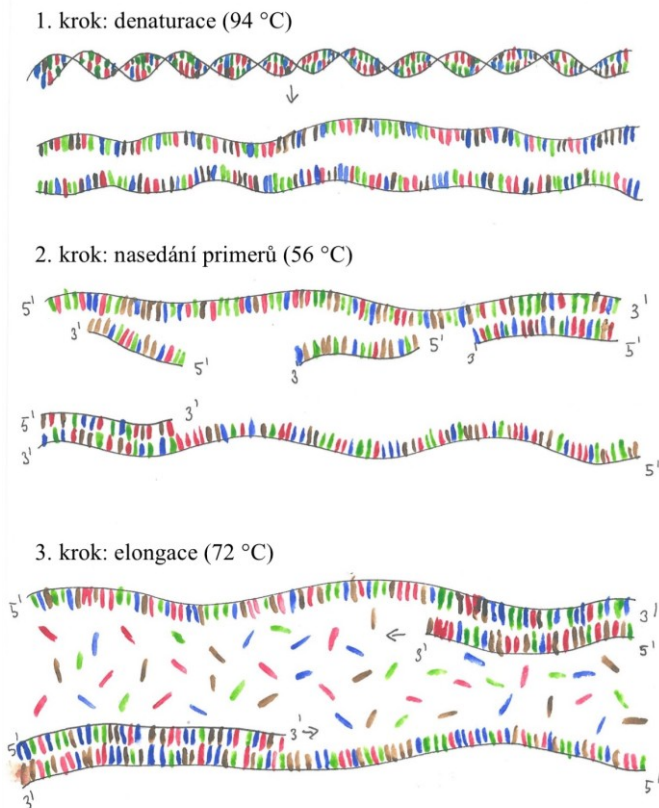
Při **iniciační denaturaci** se DNA po dobu několika minut zahřívá na teplotu 94–98 °C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a k rozvolnění dvoušroubovice.

Další tři kroky se opakují 30–40× (Obr. 29).

Denaturace. DNA se po dobu 20–60 s zahřívá na teplotu 94–98 °C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a k rozvolnění dvoušroubovice. Vzniká tak jednovláknová DNA, na kterou mohou v dalším kroku nasednout primery. Primery nasedají i na nově vzniklé fragmenty.

Nasednutí primerů (annealing) probíhá při teplotě 45–65 °C, při níž primery aktivně nasedají na specifická místa DNA. Tento krok probíhá 20–60 sekund. Ideální teplota annealingu závisí na sekvenci primerů a je dobré ji na začátku každé studie optimalizovat (tj. experimentálně nalézt tu, při které probíhá PCR nejlépe).

Syntéza DNA (elongace) začíná tím, že se DNA polymeráza připojí k nasednutým primerům. Při následné tvorbě nového vlákna DNA, kterou polymeráza řídí, jsou využívány volné nukleotidy a nové (komplementární) vlákno je syntetizováno podle templátu (původního vlákna). Nejběžnější Taq polymeráza má optimum aktivity mezi 72–80 °C. Doba tohoto kroku je závislá na délce fragmentu, který chceme syntetizovat. Pro délku cca 1000 bází postačuje čas cca 1 minuta.



Obr. 29. Princip PCR reakce.

1. krok: denaturace, jednotlivá vlákna DNA se oddělí při teplotě 94 °C.

2. krok: nasedání primerů (annealing) při teplotě 45–65 °C.

3. krok: prodlužování vláken DNA za pomoci Taq polymerázy a volných nukleotidů (elongace) při teplotě 72 °C.

Po ukončení cyklíků se kroků je vhodné ještě pokračovat 5–10 minut v **závěrečné syntéze DNA** (elongaci), aby bylo jisté, že jsou všechny kopie zvoleného úseku dokončené. Následně je PCR zchlazena na 4 °C. Výsledné PCR produkty uchováváme krátkodobě v lednici a při dlouhodobém uskladnění v mrazničce při -20 °C.

6.2. Protokoly vybraných PCR protokolů

6.2.1. PCR protokol s použitím Taq polymerázy

PCR reakci můžeme připravit různými způsoby. Jednou ze základních metod je příprava reakce pomocí Taq polymerázy (Fermentas, New England Biolabs), kdy si namícháme tzv. „master mix“. Kromě Taq polymerázy přidáváme do PCR reakce (master mixu) sadu primerů (forward a reverse), volné nukleotidy (deoxynukleosidtrifosfáty = dNTPs), $MgCl_2$, reakční pufr, jehož složení je závislé na typu Taq polymerázy [např. pufr s KCl, pufr s $(NH_4)_2SO_4$] a ultračistou vodu (ddH_2O).

Při plánování PCR reakce se musíme rozhodnout, v jakém objemu budeme PCR reakci míchat. Některé protokoly počítají s objemem 50 μ l, což může být pro naše účely příliš velká reakce. Z toho důvodu v našich protokolech uvádíme objem 15 μ l, což vystačí na gelovou elektroforézu (5 μ l) a na sekvenování z obou stran (10 μ l). Při optimalizaci stačí dělat PCR reakci v objemu 10 μ l. Pracovat s menšími objemy nedoporučujeme, protože je snadnější udělat pipetovací chybu (malé objemy se hůře pipetují).

- Připravíme si chlazený stojánek (nádobu s ledem), potřebné chemikálie, pipety, zkuševky, stripy (osm spojených mikrozkuševek) a DNA (Obr. 30).
- Připravíme si protokol. Podle Tab. 1 spočítáme množství chemikálií, které budeme potřebovat – hodnoty platící pro jednu reakci násobíme množstvím vzorků a přidáme 0,5–1 reakci jako rezervu (pipetovací chyba).
- Vezmeme si jednu 1,5ml zkuševku a připravíme si master mix, tzn. napipetujeme všechno potřebné na PCR do jedné zkuševky (kromě DNA!!!).
- Jako první vždy pipetujeme ddH_2O , protože má největší objem. Voda doplňuje ostatní chemikálie do finálního objemu PCR reakce.
- Do zkuševky s vodou postupně pipetujeme pufr, $MgCl_2$, dNTP a primery.
- Jako poslední pipetujeme Taq polymerázu, která se musí vyjmout z mrazničky jen na nevyhnutelnou dobu pipetování.
- Master mix jemně protřepeme na vortexu.
- Do připravených mikrozkuševek pipetujeme 13,5 μ l master mixu a následně 1,5 μ l DNA.
- Mikrozkuševky zcentrifugujeme a vložíme do termocykleru.
- Nastavíme požadovaný program (zde jeden na ukázk):

- Iniciační denaturace 94 °C – 5 min
- Denaturace + annealing + elongace (94 °C – 60 sec, 55 °C – 60 sec, 72 °C – 2 min) 30 cyklů
- Finální elongace 72 °C – 10 min
- Chlazení 4 °C



Obr. 30. Mikrozkušavky ve stripech s připravenými vzorky pro PCR reakci.

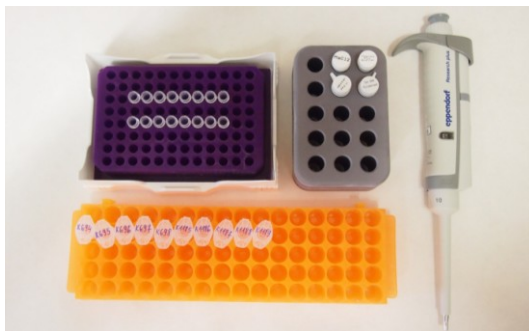
Tab. 1. Příklad PCR protokolu pro gen cytochrom b připraveného v objemu 15 μl na jeden vzorek. V prvním sloupci jsou uvedeny použité chemikálie. Ve druhém sloupci jsou reálné objemy, které se budou vyskytovat v jedné zkumavce (jedna reakce), ve třetím sloupci je objem chemikálií přepočítaný na čtyři reakce (včetně rezervy, tzn. násobeno 4,5 $\times$).

Chemikálie	1 reakce (μl)	4,5 reakce (μl)	Finální koncentrace	Zásobní koncentrace	Jednotky
<i>Fw primer (H15915)</i>	0,6	2,70	0,4	10	μM
<i>Rev primer (L14723)</i>	0,6	2,70	0,4	10	μM
<i>dNTP</i>	0,3	1,35	0,2	10	mM
<i>MgCl₂</i>	1,8	8,10	3	25	mM
<i>PCR pufr</i>	1,5	6,75	1	10	$\times$
<i>Taq polymeráza</i>	0,2	0,90	0,5	5	U/ μl
<i>ddH₂O</i>	8,5	38,25			
<i>Master mix</i>	13,5	60,75			
<i>DNA</i>	1,5				
<i>Celkový objem</i>	15				

6.2.2. PCR protokol s použitím master mixu

V dnešní době lze pro PCR reakci využít i komerčně dostupný master mix (např. PPP Master Mix, Qiagen multiplex PCR Kit), který již obsahuje všechny potřebné chemikálie. Do takového master mixu stačí přidat pouze ddH₂O, primery a DNA.

Obr. 31. Příprava na PCR; mikrozkušavky v chlazeném fialovém platíčku, PCR chemie v chlazeném stojánku, 10μl nastavitelná pipeta, vzorky DNA v oranžovém stojánku.



- Připravíme si chlazený stojánek (nádobu s ledem), potřebné chemikálie, pipety, zkumavky, stripy a DNA (Obr. 31).
- Připravíme si protokol. Podle Tab. 2 spočítáme množství chemikálií, které budeme potřebovat – hodnoty platící pro jednu reakci násobíme množstvím vzorků a přidáme 0,5–1 reakci jako rezervu (pipetovací chyba).
- Vezmeme jednu 1,5ml zkumavku a připravíme si master mix pro vlastní reakci, tzn. napipetujeme vodu, primery a komerčně připravený mix všech ostatních látek, označovaný také jako master mix.
- Master mix jemně protřepeme na třepačce.
- Do připravených mikrozkušavek pipetujeme 13,5 μl master mixu a pak 1,5 μl DNA.
- Mikrozkušavky zcentrifugujeme a vložíme do termocykleru.
- Nastavíme požadovaný program.

Tab. 2. Příklad PCR protokolu pro gen cytochrom b připraveného v objemu 15 μl na jednu zkumavku. V prvním sloupci jsou použité chemikálie. Ve druhém sloupci jsou reálné objemy, které se budou vyskytovat v jedné zkumavce (jedna reakce), ve třetím sloupci je přepočítaný objem chemikálií na čtyři reakce (včetně rezervy, tzn. násobeno 4,5×).

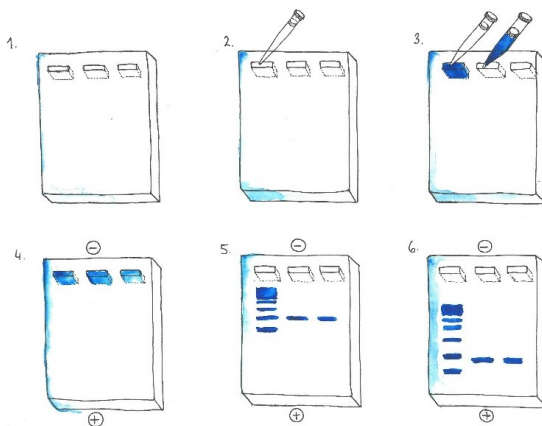
Chemikálie	1 reakce (μl)	4,5 reak- ce (μl)	<i>Finální koncentrace</i>	<i>Zásobní koncentrace</i>	<i>Jednotky</i>
<i>Fw primer (H15915)</i>	0,6	2,70	0,4	10	μM
<i>Rev primer (L14723)</i>	0,6	2,70	0,4	10	μM
<i>PPP Master Mix</i>	7,5	33,75	1	2	×
<i>ddH₂O</i>	4,8	38,25			
<i>Master mix</i>	13,5	60,75			
<i>DNA</i>	1,5				
<i>Celkový objem</i>	15				

7. Gelová elektroforéza

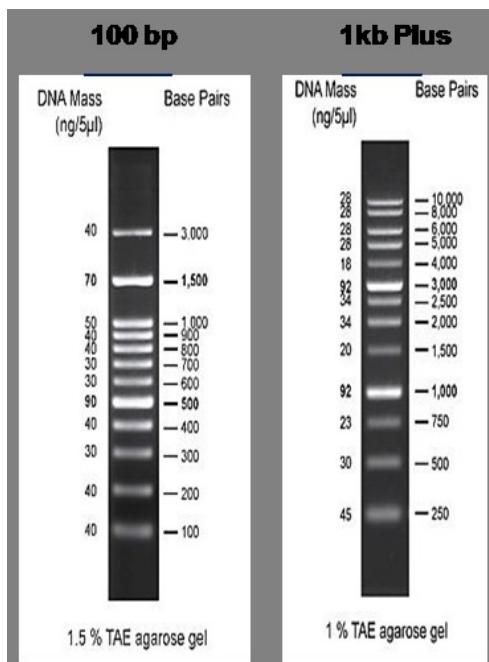
7.1. Princip gelové elektroforézy

Principem gelové elektroforézy je pohyb DNA (nebo PCR produktu) v elektrickém poli (Obr. 32). Záporně nabitě molekuly DNA migrují v prostředí agarózového gelu směrem od záporné katody ke kladné anodě. Délku fragmentu (počet párů bází) a koncentraci PCR produktu můžeme odečítat pomocí velikostního standardu, tzv. DNA ladder nebo žebřík (Obr. 33).

Obr. 32. Schematické znázornění gelové elektroforézy. Do první jamky v gelu napietujeme DNA žebřík, do dalších jamek PCR produkty/DNA. DNA molekuly migrují od záporného náboje ke kladnému. Čím kratší je fragment PCR produktu, tím rychleji se molekuly pohybují a doputují tedy gelem dál. Vzorky nanesené na agarózovém gelu poté vizualizujeme pod UV světlem.

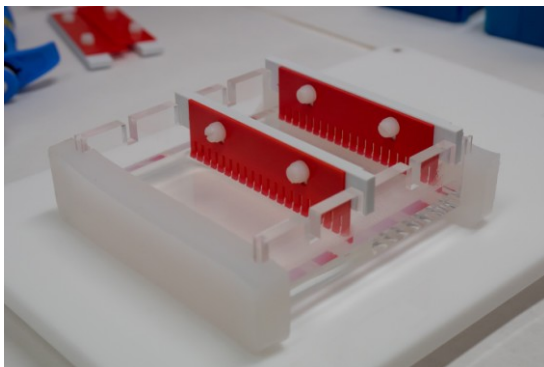
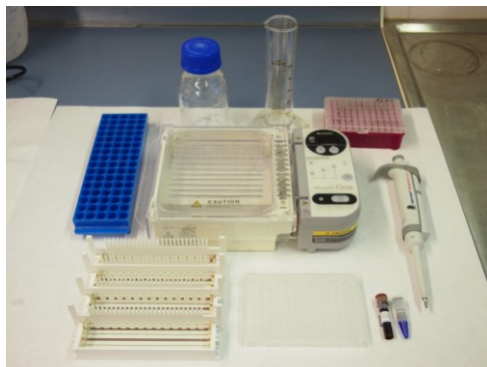


Obr. 33. Porovnání 100bp a 1kb DNA žebříku. Na levé straně je množství DNA ve zkoumaném vzorku (platné při použití správného množství DNA/PCR produktu, hustoty gelu apod.). Na pravé straně je délka DNA/PCR produktu (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™).



7.2. Protokoly vybraných aplikací gelové elektroforézy

7.2.1. Kontrola PCR produktů na gelu



Obr. 34. Pomůcky na gelovou elektroforézu. Elektroforetická vana, forma na gel, vizualizační barva (GoodView), nanášecí barva (loading dye) a 10 µl pipeta.

Obr. 35. Forma na gel s červenými hřebeny.

- Připravíme si pomůcky na gelovou elektroforézu (Obr. 34).
- Připravíme 0,5M pufr TBE nebo TAE (100 ml 10M TAE nebo TBE pufru a 1900 ml destilované H_2O).
- Do elektroforetické vany nalijeme pufr TBE nebo TAE tak, aby hladina dosahovala 1–1,5 cm (resp. po rysku).
- Na přípravu 1,5% gelu (pro PCR produkty) potřebujeme 100 ml TBE/TAE pufru a 1,5 g agarózy v prášku, které rozmícháme v kádince či ve skleněné lahvi s víčkem.
- Roztok zahříváme v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza nerozpustí (tj. tekutina se stane čirou).
- V bodě varu roztok vyjme z mikrovlnné trouby a ochlazujeme ho (v uzavřené nádobě pomocí studené vody, v otevřené nádobě pouze na vzduchu, pomocí magnetického míchadla).
- Po ochlazení na cca 55 °C (dokážeme udržet na kádince ruku) přidáme fluorescenční barvivo (ethidium bromid, GoldView, GelRed, SybrSafe, GoodView), které umožní vizualizaci PCR produktu pod UV světlem.
- Promícháme a roztok nalijeme do připravené formy (podle druhu elektroforézy) a vložíme hřebeny (množství a velikost závisí na počtu vzorků). Hřebeny nám vytvoří jamky, do kterých budeme pipetovat PCR produkty (Obr. 35).
- Tekutinu necháme asi 20 min tuhnout, čímž vznikne gel.
- Následně gel vložíme do elektroforetické vaničky (musí být ponořený v pufru).
- Do nového platíčka/stripu napipetujeme 3,5–5 µl PCR produktu a 1 µl nanášecí



Obr. 36. Pipetování vzorků do gelu.

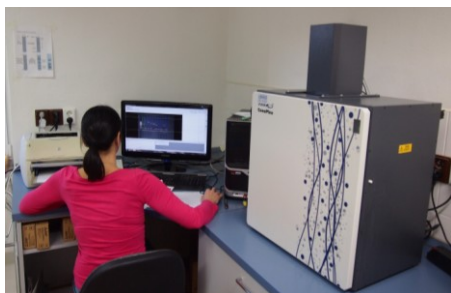


Obr. 37. Gel po elektroforéze.

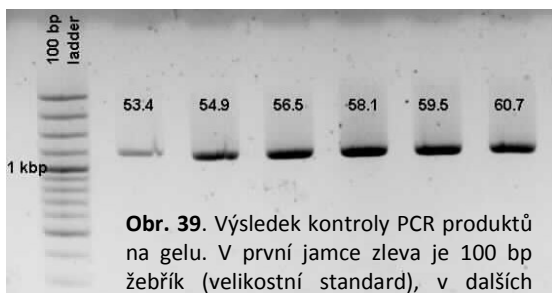
barvy (loading dye). Několikrát obě tekutiny promícháme pomocí pipety, aby se nám barva spojila s PCR produktem. Loading dye má dvě funkce:

1) obarví PCR produkt, a my tak vidíme, co pipetujeme, 2) udrží PCR produkt na dně jamek. Pozor, při použití předem namíchaného master mixu, který je již obarvený, loading dye nepoužijeme.

- Postupně pipetujeme PCR produkty s nanášecím pufrem do jamek v gelu. Dáváme pozor, abychom gel nepropíchlí a aby nám produkt nevytekl mimo jamku (Obr. 36).
- Do jedné jamky napipetujeme velikostní standard, tedy DNA žebřík. Pro PCR produkty používáme 100 bp Plus DNA ladder (rozsah 100 bp až 3000 bp).
- Elektroforézu zapneme na 20–30 min při napětí 100 V.
- Po uplynutí času vypneme elektroforézu a gel (Obr. 37) prohlédneme pod UV světlem. Tak zjistíme, zda PCR úspěšně proběhla (Obr. 38). Pokud vidíme u každého vzorku jeden proužek správné velikosti, získali jsme žádoucí PCR produkty (Obr. 39). Pokud nevidíme žádný proužek, nebo několik proužků u jednoho vzorku, musíme PCR protokol upravit tak, aby PCR proběhla (v případě absence proužku), nebo aby se amplifikovaly jen specifické PCR produkty (vidíme-li několik proužků). V případě, že máme dva proužky a jeden z nich chceme osekvenovat, můžeme ho z gelu vyřezat a přečistit pomocí kolonek (viz Kap. 8.2.3).



Obr. 38. Kontrola PCR produktů na gelu pomocí UV transluminátoru.



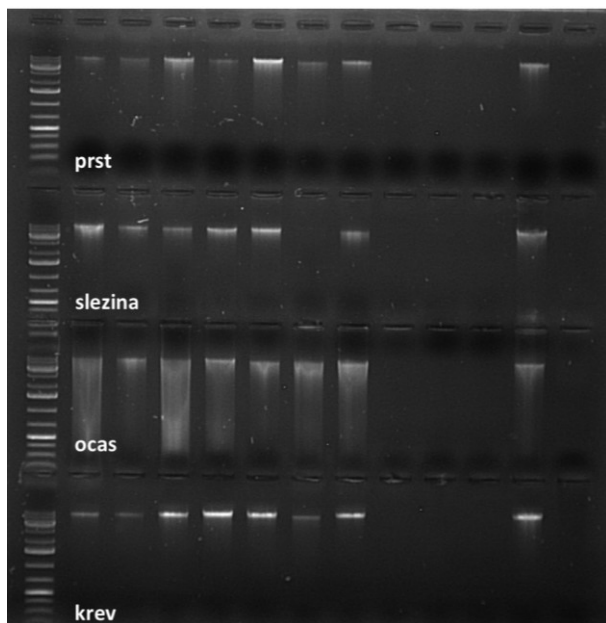
Obr. 39. Výsledek kontroly PCR produktů na gelu. V první jamce zleva je 100 bp žebřík (velikostní standard), v dalších jamkách jsou vzorky. Hodnoty nad vzorky reprezentují koncentrace DNA (ng/μl), odhadnuté pomocí žebříku.

7.2.2. Kontrola DNA na gelu

Kromě PCR reakcí můžeme na gelové elektroforéze zkontrolovat i kvalitu DNA v izolátu. Protokol je velmi podobný s předešlým:

- Připravíme 0,5M pufr TBE/TAE.
- Do elektroforetické vaničky nalijeme pufr TBE nebo TAE tak, aby hladina dosahovala do výšky 1–1,5 cm (resp. po rysku).
- Na přípravu 1% gelu (pro DNA) potřebujeme 100 ml TBE/TAE pufru a 1 g agarózy v prášku, které rozmícháme v kádince nebo ve skleněné lahvi s víčkem.
- Roztok zahříváme v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza nerozpustí (tj. tekutina se stane čirou).
- V bodě varu roztok vyjmeme z mikrovlnné trouby a ochlazujeme ho (v uzavřené nádobě pomocí studené vody, v otevřené nádobě pouze na vzduchu, pomocí magnetického míchadla).
- Po ochlazení na cca 55 °C (dokážeme udržet na kádince ruku) přidáme fluorescenční barvivo (ethidium bromid, GoldView, GelRed, SybrSafe, GoodView), které nám umožní vizualizaci DNA pod UV světlem.
- Promícháme a roztok nalijeme do připravené formy a vložíme hřebeny (množství a velikost závisí na počtu vzorků). Hřebeny nám vytvoří jamky, do kterých budeme pipetovat DNA.
- Tekutinu necháme asi 20 min tuhnout, čímž vznikne gel.
- Následně gel vložíme do elektroforetické vany (musí být ponořený v pufru).
- Do nového platíčka/stripu napipetujeme 3,5–5 µl DNA a 1 µl nanášecí barvy (loading dye). Několikrát obě tekutiny promícháme pomocí pipety, aby se spojily dohromady. Loading dye má dvě funkce: 1) obarví DNA izolát, a my tak vidíme, co pipetujeme, 2) udrží DNA na dně jamek.
- Postupně pipetujeme DNA do jamek v gelu. Dáváme pozor, abychom gel nepropíchl a aby nám produkt nevytekl mimo jamku.
- Do jedné jamky napipetujeme velikostní standard (DNA žebřík). Pro kontrolu DNA kvality používáme 1kb DNA ladder (250–10000 bp).
- Elektroforézu zapneme na 20 min při 100 V.
- Po skončení vypneme elektroforézu a gel umístíme pod UV světlo. Následně bychom měli vidět, jak vypadá naše DNA. Silný proužek znamená kvalitní DNA s velkou koncentrací, slabý proužek je malá koncentrace a nejasný proužek je degradovaná/fragmentovaná DNA (Obr. 40).

Obr. 40. Kontrola DNA na gelu. Testování 12 izolačních kitů na čtyřech různých typech vzorků. Odshora: **1. řada** – prst myši domácí (*Mus musculus*), **2. řada** – slezina *M. musculus*, **3. řada** – ocas *M. musculus*, **4. řada** – krev koroptve polní (*Perdix perdix*). Použit byl 1 kb žebřík. Zřetelný proužek znamená vysoce koncentrovanou DNA, rozmazaný proužek je fragmentovaná DNA a pozice bez proužku značí nízkou koncentraci DNA. Vizualizováno v UV transluminátoru s vestavěným fotoaparátem (MARTINCOVÁ & AGHOVÁ 2020).



7.3. Bezpečnost práce s gely a elektroforézou

Při detekci DNA nebo PCR produktů je zapotřebí použít k vizualizaci speciální tzv. interkalční barviva (ethidium bromid, GelRed, GoodView, Sybr Safe). Tyto látky mají schopnost vázat se na DNA, čímž ji obarví. Viditelnost těchto barev je však možná pouze pod UV světlem. Jelikož se tyto látky váží na DNA, hrozí potenciální nebezpečí navázání se na DNA v buňkách člověka, který s nimi manipuluje. Z tohoto důvodu je nutné dodržovat přísná bezpečnostní pravidla v laboratořích, kde se připravují gely (používat rukavice, plášť, udržovat pracovní místo čisté). Vzhledem k mutagenitě ethidium bromidu jsou preferované bezpečnější alternativy (např. GelRed, GoodView, Sybr Safe), které mají kratší dobu rozkladu než ethidium bromid.

Dalším úsekem, kde je potřeba větší obezřetnosti, je proces prosvěcování gelu UV světlem. Tato činnost je nebezpečná především pro lidskou pokožku a oči. Při klasické kontrole PCR produktu na gelu je gel uzavřený ve speciálním boxu nebo za speciálním sklem s UV filtrem. Výsledky jsou vizualizované na displeji UV-transluminátoru nebo počítači. V některých případech však musíme PCR produkty vyřezat přímo z gelu pod UV světlem a tehdy kromě běžných ochranných pomůcek (rukavice a plášť) používáme i speciální kryty na obličej, abychom se ochránili před UV světlem. V současnosti jsou v nabídce i transluminátory, které místo UV světla používají bezpečnější LED světlo.

8. Přečišťování produktů PCR

8.1. Princip přečišťování produktů PCR

Výsledné produkty PCR mohou obsahovat nežádoucí kontaminanty, a proto je nutné je před sekvenováním přechistit (purifikovat). Purifikací PCR produktu odstraníme z nukleových kyselin zbylé primery, neinkorporované nukleotidy či soli. Pro purifikaci nukleových kyselin produktů PCR se může využít klasická metoda čištění ethanolovou precipitací, enzymatická purifikace (ExoSAP), přečišťování v kolonkách nebo s použitím magnetického stojanu. Některá sekvenační pracoviště nabízejí přečišťování PCR produktů před sekvenováním jako samostatnou službu a v tom případě můžeme poslat produkt nepřechištěný.

8.2. Protokoly vybraných přečišťovacích protokolů

8.2.1. Ethanolová precipitace

- K produktu PCR přidáme ultračistou vodu (doplnění celkového objemu do 100 μ l) a vzorky přepipetujeme do 1,5ml zkumavek.
- Přidáme octan sodný; 1/10 objemu zředěného produktu, tzn. 10 μ l.
- Přidáme 2 $\times$ objem 99% vymraženého ethanolu (tzn. 200 μ l); předběžné mrazení ethanolu (minimálně hodinu v -20 °C) zvyšuje jeho účinnost.
- Vzorky dobře promícháme v ruce a centrifugujeme při pokojové teplotě na 14 000 rpm po dobu 10 min.
- Odstraníme supernatant pipetou tak, aby se špička nedotýkala dna zkumavky, kde je usazená peleta.
- Přidáme 100 μ l 75% vychlazeného ethanolu a vzorky již nemícháme!
- Centrifugujeme při pokojové teplotě a 14 000 rpm po dobu 10 min.
- Odstraníme supernatant, otevřeme zkumavky a zbytky ethanolu necháme odpařit ve vakuové centrifuze při teplotě 40 °C po dobu 15–20 min.
- Získaný sediment rozpustíme v odpovídajícím množství ddH₂O (15–25 μ l, podle výsledků elektroforézy).

8.2.2. Purifikace Exo-SAP (protokol podle Thermofisher scientific)

Při enzymatické purifikaci Exo-SAP se využívá kombinace dvou enzymů; Exo 1 (Exonukleáza 1), která štěpí jednovláknovou DNA (zbytkové neinkorporované primery) a SAP (z angl. Shrimp Alkaline Phosphatase), který odstraňuje zbytky nukleotidů. Tento způsob čištění je velmi rychlý a efektivní.

- Exo-SAP během celého postupu udržujeme na ledě.
- Do zkumavky s 5 μ l PCR produktu přidáme 2 μ l Exo-SAP (uchovávaný v mrazničce při -20 °C), při větším objemu produktu zvýšíme úměrně i množství Exo-SAP.
- Zkumavky promícháme na vortexu.
- Vzorky umístíme do termocykleru a spustíme program s následujícími kroky: 37 °C na 15 min (degradace zbývajících primerů a nukleotidů) a 80 °C na 15 min (inaktivace enzymů).
- Přechištěný PCR produkt pošleme na sekvenování do specializované firmy, použijeme na sekvenační reakci nebo skladujeme při -20 °C.

8.2.3. Kolonková extrakce DNA z gelu

V určitých případech potřebujeme DNA extrahovat přímo z gelu po elektroforéze (např. separace specifického DNA fragmentu). DNA extrahujeme pomocí některého z komerčně dostupných protokolů, které jsou založeny na bezkolonkové extrakci nebo využijeme protokol na extrakci pomocí kolonek s filtrem, který DNA zachytí.

Protokol Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid)

- Připravíme si 1,5% agarózový gel (Kap. 7.2.1.) a použijeme hřeben s co největšími jamkami.
- Po ztuhnutí gelu napipetujeme do jamek velký objem PCR produktu (5–7 μ l).
- Elektroforézu zapneme na dobu 20 min a napětí 100 V.
- Pod UV světlem vyřízneme skalpelem proužek gelu s fragmentem DNA správné délky (ten, který nás zajímá) a skalpelem odstraníme přebytek agarózy. Pracujeme s ochranným štítem nebo brýlemi proti UV (Kap. 7.3.).
- Vyříznutý bloček gelu zvážíme a vložíme do 1,5ml zkumavky.
- K 300 mg gelu přidáme 500 μ l DF pufru (bez detergentů) a promícháme na vortexu.
- Vzorek inkubujeme při 55–60 °C po dobu 10–15 min, dokud se gel nerozpustí, a následně necháme vzorek vychladnout na pokojovou teplotu.
- Do 2ml sběrací zkumavky vložíme kolonku s filtrem, přepipetujeme do ní vzorek (800 μ l) a centrifugujeme ho 30 s při 14 000 rpm.
- Ze zkumavky vylijeme eluát (výluh) a kolonku vrátíme zpět do sběrací zkumavky (pokud je vstupní tekutiny více než 800 μ l, centrifugujeme na vícekrát).
- Přidáme 600 μ l promývacího pufru (wash buffer), necháme 1 min odstát a centrifugujeme 30 s na 14 000 rpm, poté vylijeme eluát a celý krok opakujeme ještě jednou.

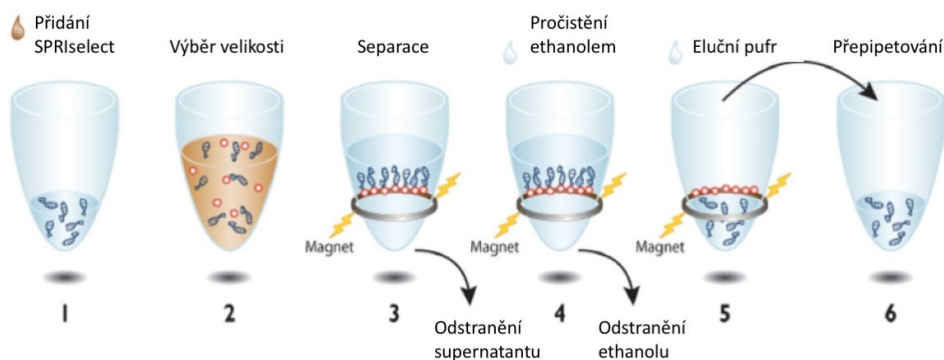
- Kolonku vrátíme do sběrací zkumavky a centrifugujeme 3 min při 14 000 rpm.
- Kolonku přemístíme do nové 1,5ml zkumavky a přidáme do středu kolonky 20–50 µl elučního pufru (elution buffer) předeřátého na 60 °C.
- Necháme 2–3 min odstát a centrifugujeme 2 min při 14 000 rpm.
- Přečištěný PCR produkt pošleme na sekvenování do specializované firmy, použijeme na sekvenační reakci nebo skladujeme při -20 °C.

8.2.4. Přečišťování pomocí magnetického separátoru

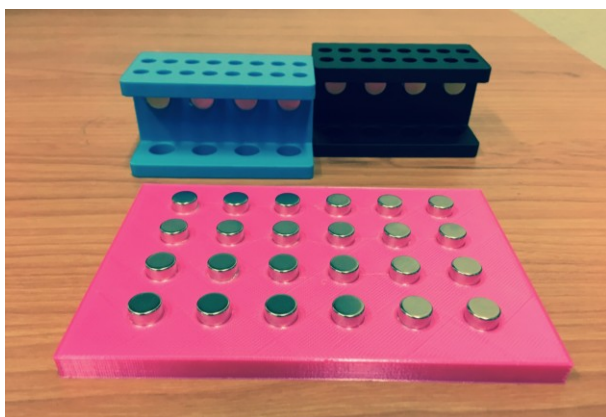
Protokol SPRIselect for Size selection (Beckman coulter)

- Jemně promícháme nádobu s roztokem SPRIselect, aby se magnetické kuličky rovnoměrně rozložily.
- Do 1,5ml zkumavky, mikrozukavky nebo 96jamkového plata napipetujeme PCR produkt s potřebným objemem SPRIselect kuliček (0,4–1,2 násobek objemu PCR produktu; ke krátkému PCR produktu přidáváme víc SPRIselect kuliček, k dlouhému méně). Např. 50 µl PCR produktu * 0,8 kuliček = 40 µl SPRIselect kuliček v případě 500 bp dlouhého produktu (Obr. 41).
- Pipetou 10× promícháme roztok (nasáváním a vytlačováním tekutiny) a inkubujeme při pokojové teplotě 1 min (můžeme použít i vortex 1 min).
- Zkumavku vložíme do magnetického separátoru a počkáme, až se magnetické kuličky usadí (Obr. 42).
- Odstraníme supernatant (čistý roztok) tak, abychom špičkou neporušili peletu, která je díky magnetickým kuličkám usazená na dně.
- Necháme zkumavku v magnetickém platu a přidáme 180 µl 85% ethanolu.
- Inkubujeme při pokojové teplotě 30 s a následně odstraníme supernatant (ethanol).
- Opět přidáme 180 µl 85% ethanolu.
- Inkubujeme při pokojové teplotě 30 s a následně odstraníme supernatant (ethanol).
- Inkubujeme peletu magnetických kuliček cca 2 min v otevřené zkumavce, aby se odpařil zbytkový ethanol.
- Vyjmeme zkumavku z magnetického stojanu a přidáme >20 µl elučního pufru (ddH₂O, Tris, TE pufr). Množstvím elučního pufru můžeme ovlivnit výslednou koncentraci přečištěného PCR produktu. Pokud byla koncentrace PCR produktu na začátku nízká, snížením objemu elučního pufru ji můžeme zvýšit.

- Pipetou 10× promícháme roztok (nebo zvortexujeme) a inkubujeme 1 min při pokojové teplotě.
- Zkumavku vložíme do magnetického separátoru a počkáme, až se kuličky naváží na stěnu zkumavky.
- Výsledný eluát přepipetujeme do nové 1,5ml zkumavky.
- Přečištěný PCR produkt pošleme na sekvenování, použijeme na sekvenační reakci nebo skladujeme při -20 °C.



Obr. 41. Princip přečišťování pomocí magnetického separátoru. 1) Do PCR produktu přidáme přiměřené množství SPRIselect magnetických kuliček (množství závisí na velikosti PCR produktu). 2) PCR produkt s kuličkami inkubujeme 1 min, aby se nám PCR produkty navázaly na kuličky. 3) Zkumavku umístíme na magnetický separátor a odpipetujeme supernatant. 4) Přidáme ethanol a následně ho odpipetujeme (tento krok opakujeme 2x). 5) Napipetujeme eluční pufr a umístíme zkumavku zpět na magnetický separátor. 6) Odpipetujeme přečištěný PCR produkt (upraveno podle *Agencourt SPRIselect protocol, Beckman Coulter*).

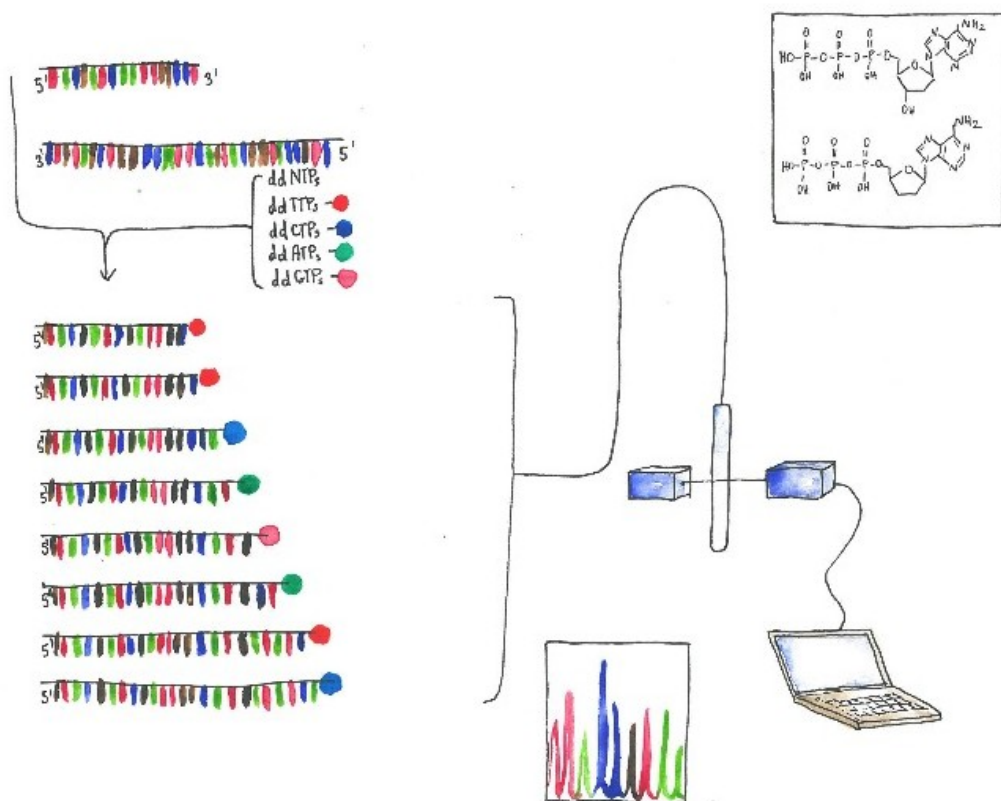


Obr. 42. Příklady magnetických separátorů. Růžový je na 96-jamkové plato. Modrý a černý je na osm 1,5ml zkumavek nebo na dva stripy.

9. Sekvenování Sangerovou metodou

Po přečištění PCR produktu následuje samotné sekvenování DNA. Nejpoužívanější metodou pro stanovení sekvence DNA je enzymatická (Sangerova) metoda (Obr. 43), která využívá modifikovanou, tzv. asymetrickou, PCR k syntéze kopií DNA. Tato modifikovaná PCR využívá na rozdíl od „klasické“ PCR pouze jeden primer. Amplifikace PCR produktu tedy probíhá pouze na jednom řetězci DNA, na který se tento primer specificky váže, a kopie molekul DNA nepřibývají exponenciální řadou.

Kromě deoxynukleosidtrifosfátů (dNTP) jsou do PCR reakce použity i dideoxynukleosidtrifosfáty (ddNTP), které postrádají na svém 3' konci hydroxylovou skupinu, na kterou by se mohl navázat další nukleotid v nově vznikajícím řetězci. Díky použití ddNTP se tedy syntéza ukončí.

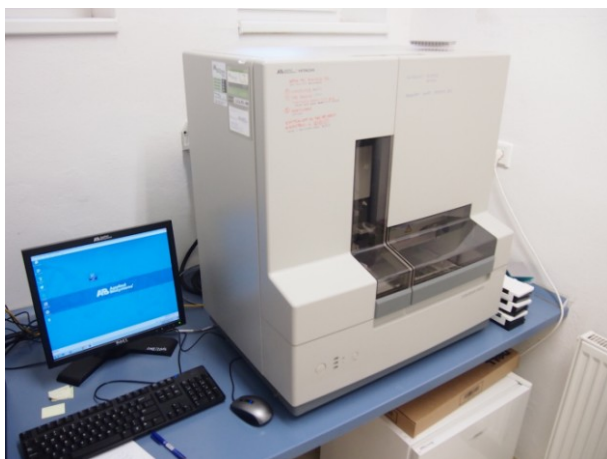


Obr. 43. Princip sekvenování Sangerovou metodou. Zleva: při sekvenační reakci se naamplifikují (namnoží) různě dlouhé DNA fragmenty, které mají na svém konci barevně značený dideoxynukleosidtrifosfát (ddNTP). V sekvenátoru procházejí tyto fragmenty tenkou kapilárou s polymerem, a podobně jako při elektroforéze putují polymerem nejdříve krátké a potom dlouhé fragmenty. Na konci kapiláry je laser a detektor, který snímá signál barevně značených ddNTP a určí pořadí nukleotidů, které počítač zaznamená jako chromatograf.

Syntéza DNA probíhá v jedné PCR reakci, kdy každý ddNTP je značen jinou fluorescenční značkou (4 typy = 4 různé barvy). Postupem času tedy vznikají různé dlouhé PCR produkty (různě dlouhé úseky jednořetězcové DNA), jež jsou označeny různými fluorescenčními značkami podle toho, jakým ddNTP jsou zakončeny. Pokud je tento proces úspěšně dokončen, dojde ke kompletnímu pokrytí celé délky našeho fragmentu ve formě různých dlouhých úseků (pro úsek dlouhý 1000 bp fragmenty o délce 1–1000 bp).

K následnému stanovení sekvence DNA (pořadí nukleotidů) se využívá genetický analyzátor – kapilárový sekvenátor. Detekce PCR produktů probíhá během kapilární elektroforézy pomocí laserového detektoru napojeného na počítač (Obr. 43 a 44). Elektroforéza probíhá v tenké kapiláře naplněné polymerem (obdoba elektroforetického gelu). PCR produkty prochází polymerem různou rychlostí, v závislosti na své délce (stejný princip jako u gelové elektroforézy), s rozlišením délky na jednu bázi. Laser zachycuje fluorescenci ddNTP navázaných na konce jednotlivých PCR produktů a následně dochází ke stanovení pořadí nukleotidů.

Sekvenování se může vykonávat přímo v laboratoři, která má kapilárový sekvenátor. V dnešní době však velká část výzkumníků nechává svoje vzorky sekvenovat servisně. Na trhu je několik společností, které sekvenují rychle a kvalitně (např. Biogen, Macrogen). Před odesláním PCR produktů k sekvenování je potřeba je přechistit (Kap. 8.) a přidat sekvenační primery podle instrukcí sekvenačního pracoviště.



Obr. 44. Šestnácti kapilárový sekvenátor.

10. Nové způsoby sekvenování (Next Generation Sequencing)

Sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing, NGS) je založeno na relativně levném a efektivním paralelním sekvenování, které produkuje tisíce až milióny sekvencí současně (CHURCH 2006; HALL 2007; GRADA & WEINBRECHT 2013). Momentálně je dostupných několik NGS technologií např. Illumina, Ion Torrent, Nanopore, SMRT PacBio, SOLiD. Výsledkem NGS je velké množství výstupních dat použitelných k dalším analýzám.

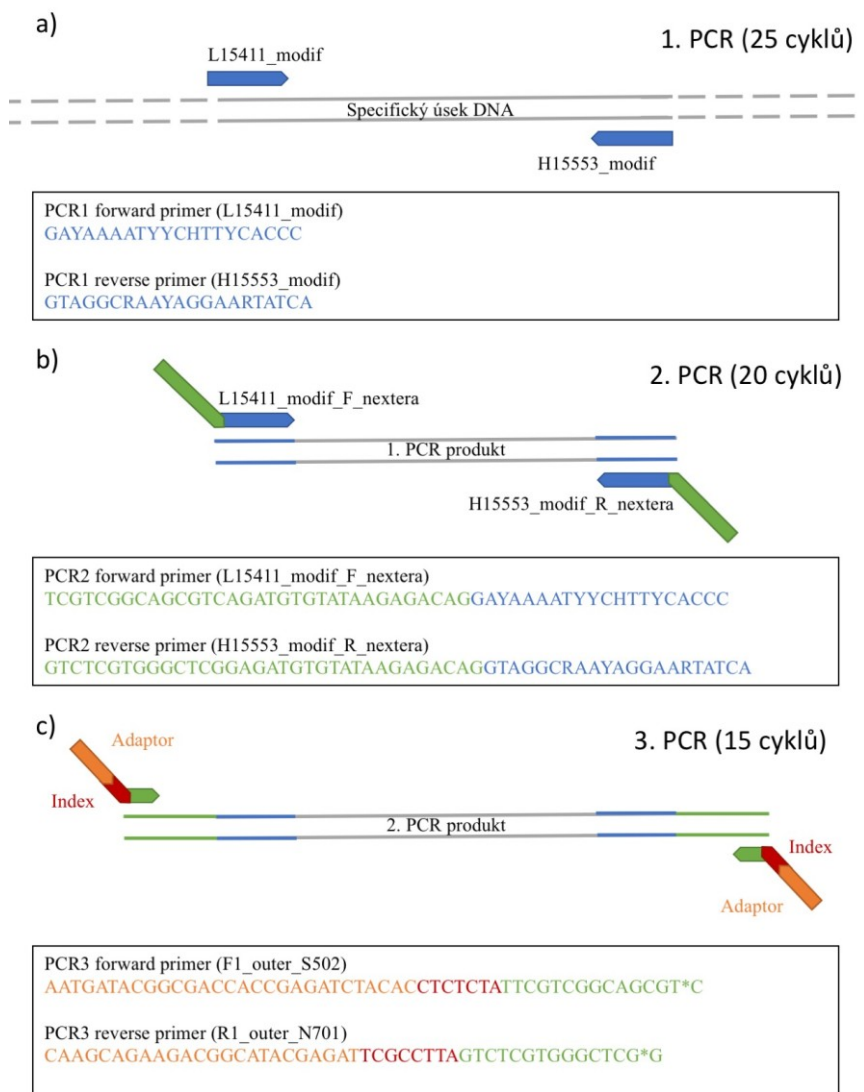
Sekvenování nové generace poskytuje řadu výhod i při sekvenování muzejních vzorků. Muzea uchovávají typové kolekce, které jsou velmi důležité pro taxonomický výzkum. Podmínky v muzeích jsou optimalizovány pro dlouhou životnost vzorků, ale ne (vždy) pro molekulární stabilitu, proto je práce s muzejní DNA velkou výzvou (DNA je např. fragmentovaná, degradovaná nebo obsahuje kontaminace). Starší studie poukazují na vztah mezi věkem vzorků a kvalitou DNA, tzn. čím je DNA starší, tím je její kvalita horší (PÄÄBO a kol. 1990; HERRMANN & HUMMEL 1994). Novější pozorování však poukazují, že správné skladování vzorků hraje snad ještě větší roli při uchování kvality DNA (WILLERSLEV & COOPER 2005; WANDELER a kol. 2007; MASON a kol. 2011; MCCORMACK a kol. 2016). V posledních letech bylo navrženo několik metod práce s muzejní DNA: a) **amplikonové** sekvenování (HAJIBABAEI a kol. 2007; GALAN a kol. 2012, 2018); b) **celogenomové** „shotgun“ sekvenování (TILAK a kol. 2015); c) **cílené obohacení** „target enrichment“ (MASON a kol. 2011); jehož specifickou variantu představuje: d) sekvenování **ultrakonservativních elementů** (MCCORMACK a kol. 2016).

Následující protokol popisuje DNA mini-barcoding **muzejních vzorků**, tzn. získání krátkého fragmentu (148 bp) cytochromu b pro genetickou identifikaci historických vzorků. Protokol je přizpůsobený široké škále organismů (savci, ptáci, plazi, ryby a bezobratlí). Na přípravu NGS knihoven (= soubor vzorků, které mají být sekvenovány současně a kde je každý vzorek unikátně označen pro pozdější identifikaci) jsme použili tříkrokovou PCR a následně sekvenovali pomocí NGS platformy MiSeq Illumina.

- Izolace a PCR probíhají v neinvazivní laboratoři, protože hrozí vysoké riziko kontaminace.
- DNA izolujeme s optimálním protokolem na daný typ vzorku (např. malé vzorky s Invisorb® Forensic Kit, u formalinových vzorků odstraňujeme před samotnou izolací formalin promýváním).
- DNA po izolaci změříme na fluorometru Qubit® s kitem High Sensitivity. Očekávaná je nízká koncentrace DNA (0,1–10 ng/μl) v závislosti na použitých vzorcích.
- Pro PCR používáme kvalitní polymerázu/master mix (např. Qiagen Multiplex Plus PCR Kit).
- Všechny PCR provádíme ve dvou nezávislých kopiích a v každé 96jamkové destičce máme alespoň jednu negativní kontrolu (jamka, která obsahuje PCR master mix,

primery, vodu, ale žádnou DNA).

- Na DNA mini-barcoding používáme tříkrokovou PCR (Obr. 45).



Obr. 45. Schematické zobrazení přípravy NGS knihovny s použitím tříkrokové PCR. **a)** Během první PCR se amplifikuje fragment cytochromu b pomocí krátkých specifických primerů. **b)** Během druhé PCR se amplifikuje totožný fragment se stejnými, ale delšími primery, jejichž konce se překrývají s Illumina sekvenáčnickými primery (zelené). **c)** Třetí PCR slouží na přidání Illumina adaptorů (oranžové) a indexů (červené), na základě kterých vzorky rozpoznáme i po sekvenování.

Tab. 3. Seznam použitých primerů na DNA mini-barcoding dvou 96jamkových plat muzejních vzorků. Primery začínající L/F jsou forward primery. Primery začínající H/R jsou reverse primery.

* znamená modifikaci primerů na 3' konci.

PCR	Primer	Sekvence	Délka primeru
1.	L15411_modif	GAYAAAATYYCHTTYCACCC	20
1.	H15553_modif	GTAGGCRAAYAGGAARTATCA	21
2.	L15411_modif_F_nextera	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAYAAAATYYCHTTYCACCC	53
2.	H15553_modif_R_nextera	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTAGGCRAAYAGGAARTATCA	55
3.	F1_outer_S502	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTCTCTATTCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	F2_outer_S503	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATCCTCTTCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	F3_outer_S505	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTAAGGAGTCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	F4_outer_S506	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACTGCATATCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	F5_outer_S507	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAAGGAGTATCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	F6_outer_S508	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTAAGCCTTCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	F7_outer_S517	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCGTAAGATCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	F8_outer_S510	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGTCTAATTCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	F9_outer_S511	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTCCGTCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	F10_outer_S513	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGACTAGTCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	F11_outer_S515	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTTCTAGCTTCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	F12_outer_S516	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTAGAGTTCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	F13_outer_S518	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTATTAAGTCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	F14_outer_S520	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAAGGTATTCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	F15_outer_S521	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGAGCCTTATCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	F16_outer_S522	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTTATGCGATCGTCGGCAGCGT*C	51
3.	R1_outer_N701	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCGCCTTAGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R2_outer_N702	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTAGTACGGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R3_outer_N703	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTCTGCCTGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R4_outer_N704	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCTCAGGAGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R5_outer_N705	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGGAGTCCGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R6_outer_N706	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCATGCCTAGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R7_outer_N707	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTAGAGAGGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R8_outer_N710	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCAGCCTCGGTCTCGTGGGCTCG*G	47

3.	R9_outer_N711	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGCCTCTTGCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R10_outer_N712	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCCTCTACGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R11_outer_N714	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCATGAGCGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R12_outer_N715	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCCTGAGATGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R13_outer_N716	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTAGCGAGTGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R14_outer_N718	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTAGCTCCGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R15_outer_N719	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACTACGCGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R16_outer_N720	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGGCTCCGGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R17_outer_N721	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCAGCGTAGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R18_outer_N722	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGCGCATGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R19_outer_N723	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAGCGCTAGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R20_outer_N724	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGCTCAGTGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R21_outer_N726	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTCTTAGGGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R22_outer_N727	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACTGATCGGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R23_outer_N728	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTAGCTGCAGTCTCGTGGGCTCG*G	47
3.	R24_outer_N729	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGACGTCGAGTCTCGTGGGCTCG*G	47

Tab. 4. Příklad PCR protokolu pro tříkrokovou PCR. V prvním sloupci jsou použité chemikálie. Ve druhém sloupci jsou reálné objemy, které se budou vyskytovat v jedné zkumavce (jedna reakce), ve třetím sloupci je přepočítaný objem chemikálií na 96jamkové plato (včetně rezervy, tzn. násobeno 97×).

1. PCR	1 reakce	97 reakcí	Finální koncentrace	Zásobní koncentrace	Jednot- ky
<i>Primer F (L15411_modif)</i>	0,4	38,80	0,4	10	μM
<i>Primer R (H15553_modif)</i>	0,4	38,80	0,4	10	μM
<i>Qiagen Multiplex plus PCR Kit</i>	5	485,00	1	2	x
<i>ddH₂O</i>	2,2	213,40			
<i>master mix</i>		776,00			
<i>DNA</i>	2	μl			
Celkový objem	10				
2. PCR	1 reakce	97 reakcí	Finální koncentrace	Zásobní koncentrace	Jednot- ky
<i>Primer F (L15411_modif_F_nextera)</i>	0,4	38,80	0,4	10	μM
<i>Primer R (H15553_modif_R_nextera)</i>	0,4	38,80	0,4	10	μM
<i>Qiagen Multiplex plus PCR Kit</i>	5	485,00	1	2	x
<i>ddH₂O</i>	2,2	213,40			
<i>master mix</i>		776,00			
<i>produkt 1. PCR</i>	2	μl			
Celkový objem	10				
3. PCR	1 reakce	97 reak- cí	Finální koncentrace	Zásobní koncentrace	Jednot- ky
<i>Primer F + primer R</i>	1,2	116,4	0,4	10	μM
<i>Qiagen Multiplex plus PCR Kit</i>	7,5	727,50	1	2	x
<i>ddH₂O</i>	3,3	320,10			
<i>master mix</i>		1164,00			
<i>produkt 2. PCR</i>	3	μl			
Celkový objem	15				

- Do první PCR se přidávají krátké specifické primery pro cytochrom b (Tab. 3).
- Připravíme PCR podle protokolu v Tab. 4.
- Nastavíme 25 amplifikačních cyklů a program dle používané polymerázy (např. pro Qiagen Multiplex Plus PCR Kit):
 - Iniciační denaturace 94 °C – 5 min
 - Denaturace + annealing + elongace (94 °C – 60 sec, 45 °C – 60 sec, 72 °C – 2 min) 25 cyklů
 - Finální elongace 72 °C – 10 min
 - Chlazení 4 °C
- Produkty první PCR neaplikujeme na gel, ale použijeme je jako templát pro druhou PCR.
- U druhé PCR se využívají stejné primery pro cytochrom b jako u první PCR, ovšem tyto primery jsou na 5' konci prodlouženy o sekvence, na které budou nasedat primery při třetí PCR (celková délka 53 a 52 bp, Tab. 3).
- Připravíme PCR podle protokolu Tab. 4, ale použijeme produkty první PCR.
- Nastavíme 20 amplifikačních cyklů a program dle použité polymerázy, např.:
 - Iniciační denaturace 94 °C – 5 min
 - Denaturace + annealing + elongace (94 °C – 60 sec, 45 °C – 60 sec, 72 °C – 2 min) 20 cyklů
 - Finální elongace 72 °C – 10 min
 - Chlazení 4 °C
- Produkty druhé PCR neaplikujeme na gel, ale použijeme je jako templát pro třetí PCR.
- Třetí PCR využívá primery s tzv. Illumina adaptéry (nutné k vlastnímu sekvenování) a speciálními barcodes, které označí každý jeden vzorek unikátním TAGem (Tab. 3). Využíváme tzv. „dual barcoding“ přístup, kdy je TAGem označen forward i reverse primer a kombinace těchto dvou TAGů je v datasetu unikátní a označuje právě jeden vzorek.
- Primery si připravíme do samostatného platíčka (Tab. 5).
- Připravíme PCR podle protokolu Tab. 4, do každé jamky napipetujeme unikátní kombinaci forward a reverse primerů a místo DNA použijeme produkty z druhé PCR.
- Nastavíme 15 amplifikačních cyklů a požadovaný program:
 - Iniciační denaturace 94 °C – 5 min
 - Denaturace + annealing + elongace (94 °C – 60 sec, 45 °C – 60 sec, 72 °C – 2 min) 15 cyklů
 - Finální elongace 72 °C – 10 min
 - Chlazení 4 °C

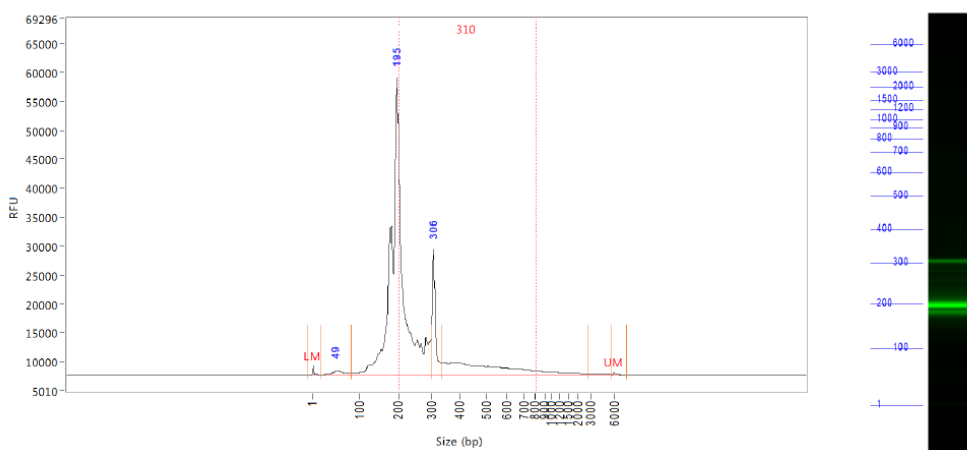
Tab. 5. Kombinace primerů pro třetí PCR trojkrokového PCR postupu si připravíme předem do 96jamkového plata. Odtud pak pipetujeme konkrétní kombinace primerů označující jednotlivé vzorky do plata se vzorky pomocí multikanálové pipety, abychom snížili riziko pipetovací chyby.

Pla- to 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R1 F1	R2 F1	R3 F1	R4 F1	R5 F1	R6 F1	R7 F1	R8 F1	R9 F1	R10 F1	R11 F1	R12 F1
B	R1 F2	R2 F2	R3 F2	R4 F2	R5 F2	R6 F2	R7 F2	R8 F2	R9 F2	R10 F2	R11 F2	R12 F2
C	R1 F3	R2 F3	R3 F3	R4 F3	R5 F3	R6 F3	R7 F3	R8 F3	R9 F3	R10 F3	R11 F3	R12 F3
D	R1 F4	R2 F4	R3 F4	R4 F4	R5 F4	R6 F4	R7 F4	R8 F4	R9 F4	R10 F4	R11 F4	R12 F4
E	R1 F5	R2 F5	R3 F5	R4 F5	R5 F5	R6 F5	R7 F5	R8 F5	R9 F5	R10 F5	R11 F5	R12 F5
F	R1 F6	R2 F6	R3 F6	R4 F6	R5 F6	R6 F6	R7 F6	R8 F6	R9 F6	R10 F6	R11 F6	R12 F6
G	R1 F7	R2 F7	R3 F7	R4 F7	R5 F7	R6 F7	R7 F7	R8 F7	R9 F7	R10 F7	R11 F7	R12 F7
H	R1 F8	R2 F8	R3 F8	R4 F8	R5 F8	R6 F8	R7 F8	R8 F8	R9 F8	R10 F8	R11 F8	R12 F8

- Výsledky třetí PCR můžeme vizualizovat pomocí elektroforézy a změříme koncentraci DNA na gelu, fluorometrem (např. Qubit) nebo spektrofotometrem (např. Nanodrop).
- Podle koncentrace smícháme všechny vzorky dohromady tak, aby od každého vzorku bylo ve směsi relativně stejné množství DNA. Nemusíme však odměřovat přesné množství pro každý vzorek, ale můžeme vytvořit skupiny vzorků o podobné koncentraci na základě gelu a brát stejné množství DNA pro vzorky uvnitř skupiny. Skupiny vytváříme dle rozpětí koncentrací DNA, např. pro dvě skupiny, tj. velmi slabé vs. silné vzorky, bereme 10 µl každého ze slabých vzorků a 1 µl každého ze silných vzorků. Tak vytvoříme NGS knihovnu.
- NGS knihovnu přečistíme na magnetickém stojanu (Kap. 8.2.4.).
- Následuje kontrola NGS knihovny pomocí automatizované elektroforézy (např. Bioanalyzer, Fragment Analyser, TapeStation) (Obr. 46).
- Takto připravenou NGS knihovnu odešleme na sekvenační pracoviště.
- V případě výskytu nespecifických produktů lze vyřezat specifický PCR produkt pomocí přístroje Pippin Prep (Sage Science).
- Následně se NGS knihovna sekvenuje na přístroji Illumina MiSeq (Obr. 47).
- Na základě délky sekvanovaného produktu volíme vhodný sekvenační kit, tj. vhodnou délku sekvenačních čtení, a to tak, aby se sekvenační čtení z jedné a druhé strany překrývala alespoň 25 bp; lepší je však delší překryv (v tomto případě je zcela dostačující Miseq kit s 150 bp dlouhým čtením z každé strany, tj. Miseq Reagent Kit v2 na 300 cyklů, 2 × 150bp).
- Sekvenační běh na přístroji Illumina Miseq má fixní kapacitu, tj. očekáváme vždy

přibližně stejné množství sekvencí. Počet sekvencí na vzorek tedy závisí na počtu vzorků sekvenovaných v jednom sekvenačním běhu. Např. při sekvenování 100 vzorků získáme v průměru cca 60 000 tisíc párových sekvencí na vzorek.

- S využitím specializovaných softwarů si pomocí TAGů přiřadíme výsledné sekvence k jednotlivým vzorkům, vyfiltrujeme sekvence, které mají správnou délku a kvalitu, odstříhneme primery, definujeme si unikátní sekvenční varianty a zaznamenáme jejich zastoupení a četnost v jednotlivých vzorcích.
- Následně můžeme jednotlivé varianty srovnat s globální databází sekvencí pomocí BLASTu (Kap. 12.2.) nebo s vlastní databází a zjistit tak složení jednotlivých vzorků (očekáváme směs cílového organismu, lidské kontaminace a dalších kontaminací).



Obr. 46. Výsledek automatizované elektroforézy Fragment Analyser. NGS knihovna má dva výrazné signály; jeden o velikosti 195 bp, což jsou nespecifické produkty zbytky primerů, a druhý 306 bp, což je náš specifický produkt. Napravo je vyobrazení na gelu, kde nás zajímá vrchní proužek. Před sekvenováním se je nutné zbavit nespecifických produktů a to tak, že vyřízneme specifický 306 bp dlouhý fragment z gelu.



Obr. 47. Illumina MiSeq sekvenátor (zdroj: Wikipedia).

11. DNA barcoding

Základním způsobem genetické identifikace organismů je tzv. DNA barcoding. Zakladatelem barcodingu je Paul Hebert (HEBERT a kol. 2003). DNA barcoding je důležitý pro identifikaci druhů, určení druhové biodiverzity v oblastech, kde je biodiverzita velmi vysoká (tzv. hot-spots), identifikaci zvířat podléhajících CITES, kryptických druhů, typového materiálu a identifikaci invazivních druhů. Využívání DNA barcodingu je podporováno celosvětovou iniciativou Consortium for the Barcode of Life (CBOL). DNA sekvence jsou uloženy v databázi Barcode of Life Data System (BOLD), která je volně přístupná. V září 2019 obsahovala tato databáze 6,5 mil. sekvencí z více než 210 000 druhů zvířat, 68 000 rostlin a 22 000 hub (<http://www.boldsystems.org>).

Metodika DNA barcodingu je velmi jednoduchá. Amplifikuje se krátký úsek mitochondriální DNA. U živočichů je to standardně cytochrom oxidáza I (CO1), případně se používají úseky jiných genů, např. cytochrom b (cyt b) či 16S ribozomální RNA (16S). Tyto DNA barcodové sekvence se porovnávají s dostupnými sekvencemi známých druhů v globální databázi a na základě toho se organismus zařadí do druhu nebo poddruhu.

DNA muzejních vzorků je často degradovaná, a proto není možné použít celý barcodovací gen (655 bp pro CO1 nebo 1140 bp pro cytochrom b). GALAN a kol. (2012) proto navrhli mini-barcoding protokol právě pro problematické muzejní vzorky. Sekvenuje se pouze krátký fragment cytochromu b (136 bp), a protože je tento úsek dostatečně variabilní, lze spolehlivě zařadit organismus do druhu nebo poddruhu. Pomocí tohoto protokolu bylo osekvenováno několik holotypů, paratypů, syntypů nebo organismů z nedostupných lokalit (např. BRYJA a kol. 2014, 2017, 2018; MIKULA a kol. 2016; AGHOVÁ a kol. 2017). Tento protokol byl navržen na vzorky myší, avšak s malými úpravami primerů (Kap. 10.) byl tento přístup úspěšně použit i na sekvenování široké škály organismů (ryby, plazi a ptáci).

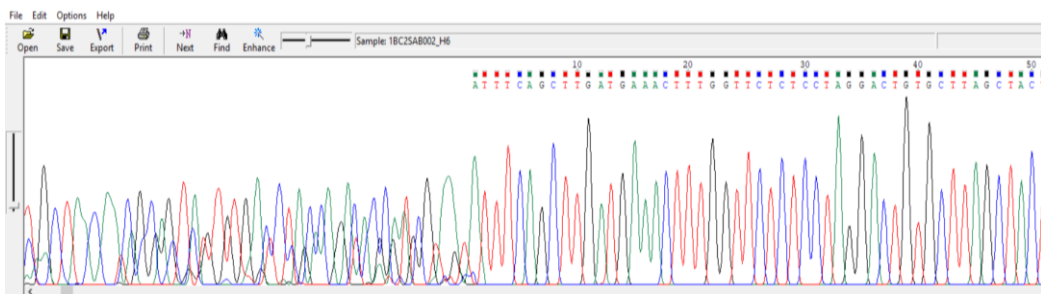
12. Analýza sekvencí

12.1. Editování sekvencí

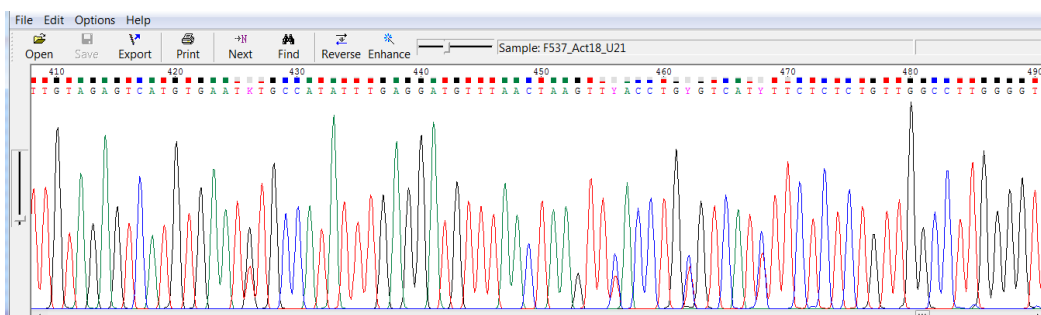
Sekvence si musíme před samotnou analýzou upravit (zeditovat). Pro editaci máme výběr z několika softwarů, např. Chromas, Seqscape, Geneious. Ze sekvenátoru získáme soubory ve formátu *.ab1, které se nazývají chromatogramy a lze si je jednoduše zobrazit např. v programu Chromas, který je volně k dispozici (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>). Manuální editace a kontrola sekvencí je důležitým krokem, protože je nutné odstranit šum z primárních sekvencí (špatná kvalita, vícenásobný signál, kódování tzv. indelů aj.). Pokud se v sekvencích vyskytují indely (inzerce – extra nukleotidy nebo delece – chybějící nukleotidy), došlo k vložení nebo k vynechání jednoho či několika párů nukleotidů v genomu. Pouze kvalitní sekvence s jasným signálem lze dále analyzovat. Špatné sekvence mohou vznikat z mnoha důvodů a je nutné zjistit, zda se jedná např. o problém v PCR, chybavost sekvenační reakce nebo je problematický daný amplifikovaný úsek.

Důležité jsou tyto kroky:

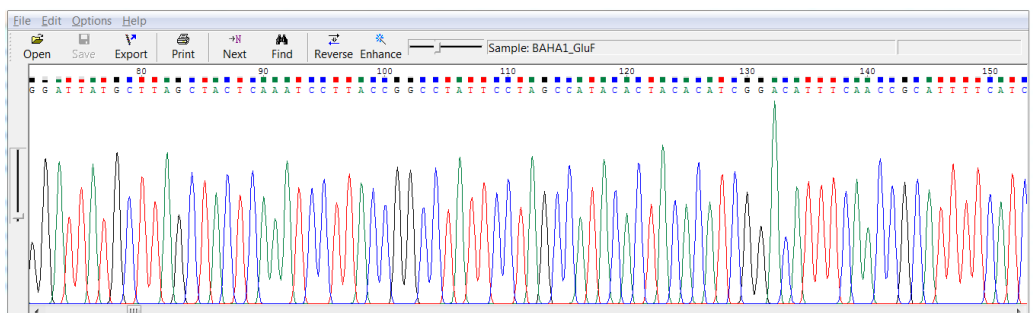
- Sekvence si nahrajeme do programu, který zobrazuje chromatogramy (Chromas, Seqscape, Geneious).
- Zkontrolujeme kvalitu sekvencí a vymažeme nekvalitní začátky a konce (provedeme tzv. zarovnání; Obr. 48).
- Pokud jsme sekvenovali gen z obou stran (využití forward i reverse primeru), spojíme tyto úseky na základě překryvu jednotlivých sekvencí (směr čtení u reverse úseku je nutno otočit, aby korespondoval s forward úsekem), nebo úseky spojíme na základě referenční sekvence (lze stáhnout např. z GenBank).
- Zkontrolujeme kvalitu jednotlivých bází, zda se v sekvenci (ne)vyskytují heterozygotní pozice (tzn. pozice, na kterých je signál dvou nukleotidů; Obr. 49). Pokud sekvenujeme mitochondriální geny, tak by všechny pozice nukleotidů měly být homozygotní (jeden signál na jedné pozici; Obr. 50). Pokud se v sekvencích nukleárních genů vyskytují heterozygotní pozice, je potřeba tyto pozice označit pro další analýzy (IUPAC kódy: **R** = G/A; **Y** = T/C; **M** = A/C; **K** = G/T; **S** = G/C; **W** = A/T; **N** = G/A/T/C).
- Upravené sekvence si můžeme uložit ve formátu FASTA (Obr. 51). Je to jednoduchý formát, který lze otevřít a upravovat v textovém prohlížeči (např. Poznámkový blok, Note++, TextWrangler).



Obr. 48. Chromatogram s nepoužitelným začátkem (nejasné a překrývající se píky). Prvních několik desítek bází bývá nekvalitních a zbytek sekvence je dobře čitelný. Nekvalitní bývá i konec sekvence, který se musí také odstranit (zobrazeno v programu Chromas).



Obr. 49. Chromatogram nukleárního genu se zřetelnými heterozygotními pozicemi – tzv. dvojité píky (zobrazeno v programu Chromas).



Obr. 50. Chromatogram kvalitní sekvence mitochondriálního genu s homozygotními pozicemi (zobrazeno v programu Chromas).

```

1  >AY057807.1 Mus musculus domesticus cytochrome b (Cytb) gene, complete cds; mitochondrial gene for mitochondrial product
2  ATGACAAACATACGAAACACACACCCATTATTTAAATTTATTAACCATCTCATTTGACCTGACCTGCC
3  CATCCAAACATTTTCATCATGATGAACATTTGGGTCCTCTTAGGAGTGTGCCATAGTCCAAATCATTC
4  AGGCTCTTTCTTAGCCATACACTACACATCAGATACAATAACAGCCTTTTCATCAGTAACACACATTTGT
5  CGAGACGTAAATACGGGTGACTAATCCGATATATACACGCAACGGAGCCTCAATATTTTATTTGCT
6  TATTCCTTCATGTCGGACGAGGCTTATATATGGATCATATACATTTATAGAACTGAAACATTTGGAGT
7  ACTTCTACTGTTTCGAGTCATAGCCACGGCATTATAGGCTACGTCCTTCATGAGGACAAATATCATTC
8  TGAGGTGCCAGATTATTAACAACTCTCTATCAGCATCCATATATTGGAACAACTGAGTCAATGAA
9  TTTGAGGAGGCTTCTCAGTAGACAAAGCCCTTGACCCGATTTCCGCTTTCCACTTCATCTTACCAT
10 TATATTCCGCGCTAGCACTGTTCACTCTCTTTCTCCAGCAACAGGATCAACACCCACAGGA
11 CTAACCTCAGATGCAGACAAATTCATTTACCCCTACTATACAATCAAGATATCCTAGGTATCTTAA
12 TCATATTTCTAAATCTCAATACCTAGTATTTTTCAGCAGATACAGGAGCCAGACAACTACAT
13 ACCAGCTAATCCACTAAACACCCACCCCATTTAAACCGAATGATATTTCTATTGCTACGCCATT
14 CTACGCTCTATCCCAATAAATAGGAGGTGCTCAGCCTTAATCTTGCTATCTCAATTTAGCCCTAA
15 TACTCTTCTTCAACCTCAAGCAACGAGCCCTAATATTCGCCCAATCACAAATTTTGTACTGAAT
16 CCTAGTAGCCAACTCTATCTTAACCTGAATGGGGCCAACAGTAGAACACCCATTTATATCAT
17 GGGCACTAGCCTCATCTCACTCTCAATCATCTTAATTTCTTATACCAATCTCAGGAATATCGAAG
18 ACAAACTACTAAAAATATATCCATG
19
20 >AJ298605.1 Apodemus sylvaticus partial mitochondrial cytb gene for cytochrome b, tissue library JRM-101
21 CCAAGACATGAAAATCATCGTTGATTCACTATAGAACTAATGACAAACATTCGAAAACACACCCA
22 CTACTAAAAATATTAATCACTCTTTCATGACCTACCAGCTCCATTAACATTTTCATCATGATGAAC
23 TCGGCTCATTGCTAGGAATCGCTGATGATCCAAATCTCACAGGCTTATTTCTAGCAATACACTACAC
24 ATCAGACACAATAACAGCATATTTCTCAGTGACCCATATCTGTCGAGACGTAAATATGGCTGACTAAT
25 GCATATATACATGCAACGGAGCCTCAATATTTTATTTGGCTATTTCTCAGTAGGACGAGGAATGT
26 ATTACGGATCATATATTTTATAGAAACATGAACATTTGGTGATGTTCTTCTATTGCGAGTAAATAGCCAC
27 AGCATTCATAGGATATGTTCTTCCATGAGGACAAATATCTTCTGAGGAGCTACAGTAATACAAATCTA
28 CTATCAGCAATTCATACATCGGAATACCTAGTAGAATGAATCTGAGGAGGATCTCAGTAGACAAAG
29 CTACATTTGACAGCTTTTTTCGCTTTTCACTTTATCTTCCATTTATTTGCTGCCCTAGTAATTTGTTCA
30 CCTCTGTTTCTCCATGAAATCGGATCTAATAACCCCAACAGGCTTAACTCAGACGCCGATAAATCCCA
31 TTTCACTCTTACTATATCAAGATATTTCTAGGTGACTAATAATAGTTTCTTCTCTAATAACTTAG
32 TCCTTTTCTTTCAGACCTACTAGGTGACCCGGACAACTATATACCTGCCAACCCCTTAAACCCCAAC
33 CCAATTTAAACGAGAATGATCTTCTATTTGCTATGCAATCTACGATCCATCCCCAATAAATAGG
34 GGAGTCTAGCCCTAATCTATCAATCTTAATTTAGCCCTATTACCATTTCTCCACACTTCCAAACAA
35 CGAGTCTAATATTTCGCCCAATCACTCAACCCCTATATTGAATCTGAGTGCACCTCTT
36
37 >AB211039.1 Rattus rattus mitochondrial cytb gene for cytochrome b, partial cds, isolate:HS2343
38 ATGACAAACATTCGAAAATCACACCCCTAATCAAAATTAATCACTCTTCAATGACCTTCCGCCC
39 CATCCAACTCTCATCATGATGAATTTTGGCTCTCTTAGGAGTATGCCCTATAATTCAAATATCATC
40 AGGATATTTCTAGCAATACACTACACATCGACATTTAACAGCATTCATCAGTTACTCATCTGCG
41 CGAGACGTAAATACGGCTGACTAATCCGATACTACATGCCAAGGAGCCTCAATATCTTTATCTGCT
42 TATTCCTCCATGAGGCCGAGGATATACTAGGATCTACACCTTTAGAAACATGAACATTTGGAAT
43 TATCTACTATTTCGAGTCATAGCAACCGCATTCATAGGTTATGATCTCCATGAGGACAAATATCATTC
44 TGAGGGGCCACAGTAATCAAAACCTATTATCAGCATTCCTACATTGGCACCACTCTAGTCGAATGAA
45 TCTGAGGAGGCTTCTCAGTAGACAAAGCAACCTAACACGTTTTTTCGCAATTCCTATCTCCCTCAT
46 CATCTCGCCGCTTGCATTTGATCATCTCTCTTCTCCAGCAACAGGATCAACACCCACAGGA
47 CTAACCTGACGCAGACAAATCCATTTATCTCATCTACACAAATTAAGACTTACTTGGAGTATTC
48 GTTACTCTCTATTTCTAATAACTTAGTATTCTTCCAGACTTACTAGGAGACCCAGACAACTACAC
49

```

Obr. 51. Sekvence v textovém editoru ve formátu FASTA.

12.2. Basic local alignment search tool (BLAST)

Dalším krokem je identifikace sekvencí, a to především jedná-li se o DNA barcoding (viz Kap. 9). Nejjednodušším způsobem je porovnat vybranou sekvenci s referenční databází, např. GenBank.

- Navštívíme stránku BLAST (Obr. 52): https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
- Do horního okna zkopírujeme naši sekvenci, můžeme zvolit nastavení (ve většině případů je vhodné využít defaultní nastavení) a potvrdíme vlevo dole kliknutím na BLAST.
- BLAST porovná naši sekvenci se všemi publikovanými sekvencemi v databázi (Obr. 53).

BLAST® » blastn suite

Standard Nucleotide BLAST

blastnblastpblastxtblastntblastx

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [more...](#)

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [?](#)

Clear

Query subrange [?](#)

From

To

Or, upload file

Choose Fileno file selected [?](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

Align two or more sequences [?](#)

Choose Search Set

Database

☐ Human genomic + transcript
☐ Mouse genomic + transcript
☒ Others (nr etc.):

[?](#)

Organism

☐ Exclude [+](#)

[?](#)

Exclude

☐ Models (XM/XP)
☐ Uncultured/environmental sample sequences

Limit to

☐ Sequences from type material

Entrez Query

[?](#)

Program Selection

Optimize for

☒ Highly similar sequences (megablast)
☐ More dissimilar sequences (discontiguous megablast)
☐ Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm [?](#)

BLAST

Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)

☐ Show results in a new window

Obr. 52. Hlavní stránka programu BLAST.

U.S. National Library of Medicine

NCBI National Center for Biotechnology Information

Sign in to NCBI

BLAST® » blastn suite » RID-0J8480G601R

HomeRecent ResultsSaved StrategiesHelp

BLAST Results

Edit and ResubmitSave Search StrategiesFormatting optionsDownload

YouTubeHow to read this pageBlast report description

Job title: Nova_sekvencia

RID0J8480G601R (Expires on 12-07 20:13 pm)

Query ID

Query Description

Molecule type

Query Length

ic|Query_144931

Nova_sekvencia

nucleic acid

1140

Database Name

Description

Program

nr

Nucleotide collection (nr)

BLASTN 2.8.1+ » Citation

Other reports: » Search Summary (Taxonomy reports)Distance tree of resultsMSA viewer

Graphic Summary

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: AllNoneSelected0

AlignmentsDownloadGenBankGraphicsDistance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Mus musculus MA1-1289 mitochondrial Cytb gene for cytochrome b, partial cds	2106	2106	100%	0.0	100%	LC325158.1
☐ Mus musculus MA1-1290 mitochondrial Cytb gene for cytochrome b, partial cds	2106	2106	100%	0.0	100%	LC325157.1
☐ Mus musculus MA1-1270 mitochondrial Cytb gene for cytochrome b, partial cds	2106	2106	100%	0.0	100%	LC325156.1
☐ Mus musculus MA1-2035 mitochondrial Cytb gene for cytochrome b, partial cds	2106	2106	100%	0.0	100%	LC325083.1
☐ Mus musculus MA1-1843 mitochondrial Cytb gene for cytochrome b, partial cds	2106	2106	100%	0.0	100%	LC325082.1

Obr. 53. Výsledek analýzy v programu BLAST. V sekci Descriptions se zobrazí organismy, které jsou nejpodobnější naší sekvenci. Důležité jsou údaje *Query cover* – nakolik se naše sekvence s danou sekvencí z GenBanku překrývá a *Ident* – nakolik jsou obě sekvence identické. V tomto případě byla porovnávána sekvence, která je nahraná v GenBanku, a proto je zde 100% shoda. Pokud však porovnáváme např. nový druh nebo neznámý organismus, mohou být obě tato čísla významně menší než 100 %.

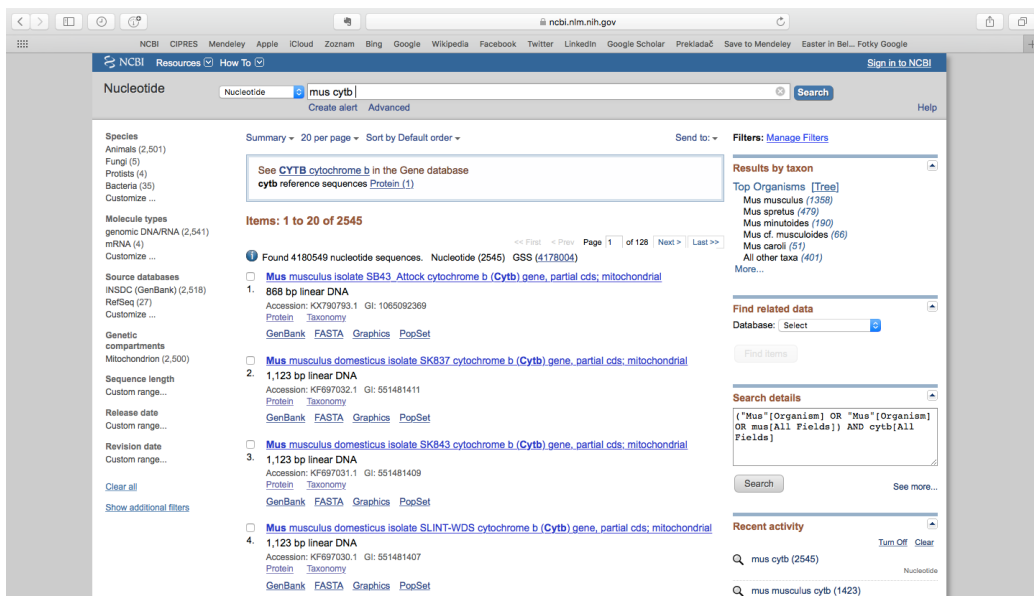
94

12.3. Jednoduchá fylogenetická analýza

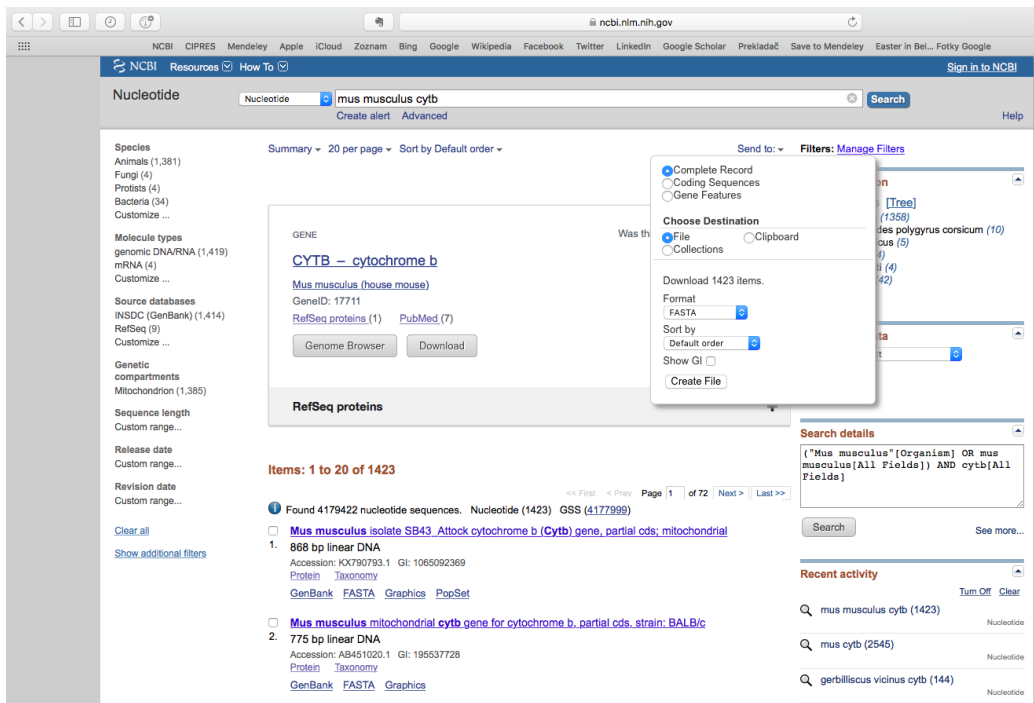
12.3.1. Stažení sekvencí z GenBank-u

Pokud již máme sekvence identifikované v BLASTu a chceme zrekonstruovat fylogenetický strom, je dobré začít na stránkách GenBank a stáhnout si příbuzné sekvence.

- Navštívíme stránku <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Do vyhledávače zadáme jméno organismu a gen, pro který chceme vytvořit fylogenetický strom, např. pro rod myši *Mus* a gen cytochrom b to bude „*Mus* cyt**b**“ (Obr. 54).
- Pokud chceme výběr zúžit, vpravo můžeme vybrat možnost zobrazení pouze myši domácí *Mus musculus*.
- Uložíme si všechny (nebo jen vybrané) záznamy ve FASTA formátu (Obr. 55).
- Z GenBank-u si stáhneme jednu sekvenci jako outgroup, což je organismus či skupina organismů, která by měla být nejpríbuznější se studovanou skupinou a slouží k založení fylogenetického stromu.
- V textovém editoru si otevřeme stáhnuté sekvence a nakopírujeme k nim naše nové sekvence.
- Soubor si uložíme ve formátu FASTA.



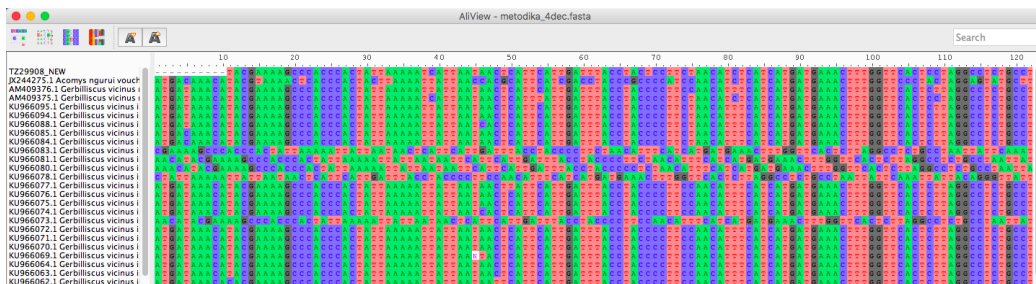
Obr. 54. Výsledek vyhledávání sekvencí genu cyt b pro rod *Mus* (2545 záznamů).



Obr. 55. Vpravo nahoře klikneme na tlačítko *Send to* a vybereme, zda chceme uložit ve formátu FASTA všechny, nebo jen vybrané sekvence.

12.3.2. Alignment

- Nainstalujeme si program AliView (příp. Geneious) nebo jiný program, který umožňuje zobrazit sekvence a seřadit pod sebe homologní báze, tzv. alignment (Obr. 56): <http://www.ormbunkar.se/aliview/>.
- Vložíme náš FASTA soubor; *File – Open File*.
- Uspořádáme si sekvence, tzv. alignujeme; *Align – Realign everything* (Obr. 57).
- Alignment uložíme ve formátu FASTA, NEXUS nebo PHYLIP (podle analýzy, kterou chceme dále použít).



Obr. 56. Souboru sekvencí ve formátu FASTA před uspořádáním (zobrazeno v programu AliView).



Obr. 57. Souboru sekvencí ve formátu FASTA, kde jsou sekvence již zarovnané (zobrazeno v programu AliView).

Alignment lze vytvořit také např. v programu BioEdit (Obr. 58). Upravenou sekvenci z programu Chromas zkopírujeme (Ctrl+C) do programu BioEdit (*File – Import from clipboard*). Režim *Edit* umožňuje manipulaci se sekvencemi (mazání bází, přepisování aj.). Znázorněny jsou rozdíly jednotlivých bází vůči označené sekvenci. Pro zvýraznění těchto rozdílů lze použít velkou škálu nastavení. Hotový alignment můžeme uložit např. ve formátu FASTA nebo NEXUS (velmi často používané vstupní formáty pro další analytické programy).



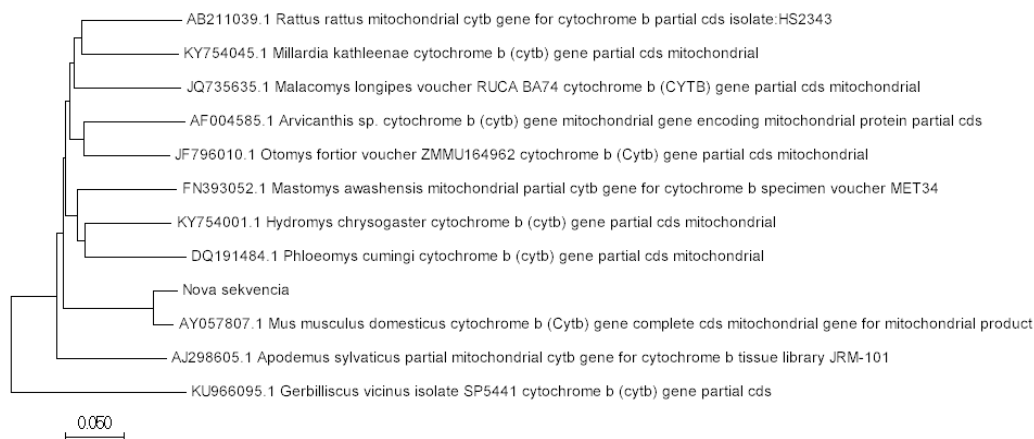
Obr. 58. Zarovnané sekvence – alignment (zobrazeno v programu BioEdit). Zobrazeny jsou pouze variabilní pozice. Pozice, které jsou shodné v celém datasetu, jsou znázorněné barevnou tečkou.

12.3.3. Fylogenetický strom

Pro rekonstrukci fylogenetického stromu můžeme použít celou řadu výpočetních metod. Od těch nejjednodušších, např. Neighbor joining, až po velmi sofistikované metody, jako je Maximum likelihood nebo Bayesian inference. Proto existuje celá řada fylogenetických programů. Nejpoužívanější jsou RAxML, MrBayes, RevBayes, BEAST, GARLI.

Pro naše potřeby použijeme metodu Neighbor joining v programu MEGA. Ta je výpočetně velmi jednoduchá, a tudíž významně nezatíží náš počítač a výsledku se dobereme velmi rychle i na běžném stolním počítači. Zároveň ale musíme počítat s tím, že výsledek nemusí být optimální (tj. co nejlépe popisující skutečnost), jelikož může být zatížen různými zjednodušeními, která sebou tato metoda nese. Neighbor joining však může být plně dostačující např. pro odhalení asociace nových jedinců s těmi, jejichž fylogenetickou pozici již známe. V případě rozsáhlejších souborů dat a řešení složitějších otázek může tato metoda posloužit jako rychlý test toho, jak se „data chovají“, ale poté je nutné přistoupit ke složitějším analýzám.

- Nainstalujeme si software MEGA <https://www.megasoftware.net>
- Nahrajeme si alignment. *File* → *Open File Session* → *Analyze* → *Nucleotide sequences*
- Pokud máme kódující sekvence, zvolíme *Protein coding* a vybereme si z genetického kódu. Záleží, jaký druh organismu studujeme, a zda se jedná o mitochondriální nebo jadernou DNA.
- Klikneme na *Phylogeny – Construct Neighbor Joining tree*.
- Program nám vypočítá jednoduchý fylogenetický strom (Obr. 59).



Obr. 59. Příklad fylogenetického stromu; „Nova sekvencia” je nejbližší příbuzný sekvenci *Mus musculus domesticus*.

13. Seznam zkratek

13.1. Zkratky použitých chemikálií

AE pufr	Tris-Cl/EDTA
DF	pufr bez detergentů (z angl. detergent free)
ddNTP	dideoxynukleosidtrifosfáty
dNTP	deoxynukleosidtrifosfáty
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Exo-SAP	z angl. Exonuclease-Shrimp Alkaline Phosphatase
GTE pufr	glycin/TrisHCl/EDTA
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PFA	paraformaldehyd
SDS	dodecylsírán sodný (z angl. sodium dodecyl sulfate)
TAE pufr	Tris/Acetate/EDTA
TBE pufr	Tris/Borate/EDTA
TE pufr	TRIS/EDTA
TRIS	Tris(hydroxymetyl)aminometan

13.2. Ostatní zkratky

BLAST	z angl. Basic Local Alignment Search Tool
CITES	Úmluva o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (z angl. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
ELFO	elektroforéza
NGS	sekvenování nové generace (z angl. next generation sequencing)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)

14. Literatura

- ADIS J. (ed.) 2002: *Amazonian Arachnida and Myriapoda*. Pensoft, Sofia, 590 pp.
- AGHOVÁ T., ŠUMBERA R., PIÁLEK L., MIKULA O., MCDONOUGH M. M., LAVRENCHENKO L. A., MEHERETU Y., MBAU J. S. & BRYJA J. 2017: Multilocus phylogeny of East African gerbils (Rodentia, *Gerbilliscus*) illuminates the history of the Somali-Masai savanna. *Journal of Biogeography* **44**: 2295–2307.
- ALJANABI S. M. & MARTINEZ I. 1997: Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* **25** (22): 4692–4693.
- BALI L., ANDRÉSI D., TUBA K. & SZINETÁR C. 2019: Comparing pitfall trapping and suction sampling data collection for ground-dwelling spiders in artificial forest gaps. *Arachnologische Mitteilungen* **58**: 23–28.
- BARTLETT J. M. S. & STIRLING D. 2003: A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology* **226** (1): 3–6.
- BESNARD G., BERTRAND J. A. M., DELAHAIE B., BOURGEOIS Y. X. C., LHUILLIER E. & THÉBAUD C. 2016: Valuing museum specimens: high-throughput DNA sequencing on historical collections of New Guinea crowned pigeons (*Goura*). *Biological Journal of the Linnean Society* **117**: 71–82.
- BILLERMAN S. M. & WALSH J. 2019: Historical DNA as a tool to address key questions in avian biology and evolution: A review of methods, challenges, applications, and future directions. *Molecular Ecology Resources* **19** (5): 1115–1130.
- BISWAS K. & BISWAS R. 2011: A modified method to isolate genomic DNA from plants without liquid nitrogen. *Current Science* **100** (11): 1622–1624.
- BŁĘDZKI L. A. & RYBAK J. I. 2016: *Freshwater Crustacean Zooplankton of Europe: Cladocera & Copepoda (Calanoida, Cyclopoida) Key to species identification, with notes on ecology, distribution, methods and introduction to data analysis*. Springer, Switzerland, 918 pp.
- BLICK T. 2011: Abundant and rare spiders on tree trunks in German forests (Arachnida: Araneae). *Arachnologische Mitteilungen* **40**: 5–14.
- BOHMANN K., EVANS A., GILBERT M.T.P., CARVALHO G.R., CREER S., KNAPP M., YU S.W. & BRUYN M. DE 2014: Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* **29**: 358–367.
- BOYER S. L., KARAMAN I. & GIRIBET G. 2005: The genus *Cyphophthalmus* (Arachnida, Opiliones, Cyphophthalmi) in Europe: a phylogenetic approach to Balkan Peninsula biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **36** (3): 554–567.
- BRYJA J., KOSTIN D., MEHERETU Y., ŠUMBERA R., BRYJOVÁ A., KASSO M., MIKULA O. & LAVRENCHENKO L. A. 2018: Reticulate Pleistocene evolution of Ethiopian rodent genus along remarkable altitudinal gradient. *Molecular Phylogenetic Evolution* **118**: 75–87.
- BRYJA J., MIKULA O., ŠUMBERA R., MEHERETU Y., AGHOVÁ T., LAVRENCHENKO L. A., MAZUCH V., OGUGE N., MBAU J. S., WELEGERIMA K., AMUNDALA N., COLYN M., LEIRS H. & VERHEYEN E. 2014: Pan-African phylogeny of *Mus* (subgenus *Nannomys*) reveals one of the most successful mammal radiations in Africa. *BMC Evolutionary Biology* **14**: 256.

- BRYJA J., ŠUMBERA R., KERBIS PETERHANS J. C., AGHOVÁ T., BRYJOVÁ A., MIKULA O., NICOLAS V., DENYS C. & VERHEYEN E. 2017: Evolutionary history of the thicket rats (genus *Grammomys*) mirrors the evolution of African forests since late Miocene. *Journal of Biogeography* **44**: 182–194.
- BUCHAR J. 1982: Způsob publikace lokalit živočichů z území Československa. *Věstník československé Společnosti zoologické* **46** (4): 317–318.
- CIBOROWSKI K. L., CONSUEGRA S., GARCÍA DE LEÁNIZ C., WANG J., BEAUMONT M. A. & JORDAN W. C. 2007: Stocking may increase mitochondrial DNA diversity but fails to halt the decline of endangered Atlantic salmon populations. *Conservation Genetics* **8** (6): 1355–1367.
- CRESSWELL M. J. 1995: Malaise trap: collection attachment modification and collection fluid. *The Weta* **18**: 10–11.
- DABERT J., EHRSBERGER R. & DABERT M. 2008: *Glaucalgae tytonis* sp. n. (Analgoidea, Xolalgidae) from the barn owl *Tyto alba* (Strigiformes, Tytonidae): compiling morphology with DNA barcode data for taxon descriptions in mites (Acari). *Zootaxa* **1719**: 41–52.
- DAHM R. 2008: Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human Genetics* **122** (6): 565–581.
- DARLING D. C. & PACKER L. 1988: Effectiveness in Malaise trap in collecting Hymenoptera. The influence of trap design, mesh size and location. *Canadian entomologist* **120**: 787–796.
- DEAN M. D. & BALLARD J. W. O. 2001: Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **98** (3): 279–283.
- DOLEJŠ P. 2014: Ze života slíd'áka lesostepního – vzácného, nebo málokdy pozorovaného? *Živa* **62** (3): 127–129.
- DRUMMOND P.B., SONG Y., VAUGHN D., GBADAMOSI A., BUTLER K. & SMITH E. J. 1997: Isolation of genomic DNA from claw clippings for genetic analysis in chickens. *BioTechniques* **22**: 874–876.
- DUFFEY E. 1972: Ecological survey and the arachnologist. *Bulletin of the British Arachnological Society* **2** (5): 69–82.
- EGLOFF C., LABROSSE A., HEBERT C. & CRUMP D. 2009: A nondestructive method for obtaining maternal DNA from avian eggshells and its application to embryonic viability determination in herring gulls (*Larus argentatus*). *Molecular Ecology Resources* **9**: 19–27.
- EYMANN J., DEGREEF, J. HÁUSER, CH., MONJE J. C., SAMYN Y. & VANDENSPIEGEL D. (eds.) 2010: Manual on field recording techniques and protocols for All taxa biodiversity inventories and monitoring. *Abc Taxa* **8** (1, 2): 1–330, 331–653.
- FAIR J., PAUL E. & JONES J. (eds) 2010: *Guidelines to the use of wild birds in research*. Ornithological Council, Washington, DC. – www.nmnh.si.edu/BIRDNET/guide
- FIEDLER H. J. & DUNGER W. 1989: *Methoden der Bodenbiologie*. Fischer, Jena, 432 pp.
- FIKÁČEK M., LIANG W.-R., HSIAO Y., JIA F. & VONDRÁČEK D. 2018: Biology and morphology of immature stages of banana-associated *Protosternum* beetles, with comments on the status of Taiwanese endemic *P. abnormale* (Coleoptera: Hydrophilidae). *Zoologischer Anzeiger* **277**: 85–100.

- FLAGSTAD Ø., WALKER C. W., VILÀ C., SUNDQVIST A. K., FERNHOLM B., HUFTHAMMER A. K., WIIG Ø., KOYOLA I. & ELLEGREN H. 2003: Two centuries of the Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. *Molecular Ecology* **12** (4): 869–880.
- FLEMING D. O. & HUNT D. L. 2006: *Biological Safety: Principles and Practices*. American Society of Microbiology, Washington, 622 pp.
- GALAN M., PAGÈS M. & COSSON J. F. 2012: Next-generation sequencing for rodent barcoding: species identification from fresh, degraded and environmental samples. *PLoS ONE* **7** (11).
- GALAN M., PONS J.-B., TOURNAYRE O., PIERRE É., LEUCHTMANN M., PONTIER D. & CHARBONNEL N. 2018: Metabarcoding for the parallel identification of several hundred predators and their prey: Application to bat species diet analysis. *Molecular Ecology Resources* **18** (3): 474–489.
- GIBB T. J., OSETO C. Y. 2006: *Arthropod Collection and Identification Field and Laboratory Techniques*. Elsevier Academic Press, San Diego, 311 pp.
- GILBERT M. T. P., MOORE W., MELCHIOR L. & WOROBEY M. 2007: DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PLoS ONE* **2** (3): 1–4.
- GRADA A. & WEINBRECHT K. 2013: Next-generation sequencing: methodology and application. *The Journal of Investigative Dermatology* **133** (8): 1–4.
- GREALY A., BUNCE M. & HOLLELEY C. E. 2019: Avian mitochondrial genomes retrieved from museum eggshell. *Molecular Ecology Resources* **19**: 1052–1062.
- GREALY A., PHILLIPS M., MILLER G., GILBERT M. T. P., ROUILLARD J.-M., LAMBERT D., BUNCE M. & HAILE J. 2017: Eggshell palaeogenomics: Palaeognath evolutionary history revealed through ancient nuclear and mitochondrial DNA from Madagascan elephant bird (*Aepyornis* sp.) eggshell. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **109**: 151–163.
- GREEN E. J. & SPELLER C. E. 2017: Novel substrates as sources of ancient DNA: prospects and hurdles. *Genes* **8**:180 (nestránkováno).
- HAJIBABAEI M., SINGER G. A. C., CLARE E. L. & HEBERT P. D. N. 2007: Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biology* **5**: 24.
- HALL N. 2007: Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *Journal of Experimental Biology* **210** (9): 1518–1525.
- HALL L. M., WILLCOX M. S. & JONES D. S. 1997: Association of enzyme inhibition with methods of museum skin preparation. *Biotechniques* **22** (5): 928–930, 932–934.
- HANDEL C. M., PAJOT L. M., TALBOT S. L. & SAGE G. K. 2006: Use of buccal swabs for sampling DNA from nestling and adult birds. *Wildlife Society Bulletin* **34**: 1094–1100.
- HARPER G. L., MACLEAN N. & GOULSON D. 2006: Analysis of museum specimens suggests extreme genetic drift in the adonis blue butterfly (*Polyommatus bellargus*). *Biological Journal of the Linnean Society* **88** (3): 447–452.
- HARTNUP K., HUYNEN L., TE KANAWA R., SHEPHERD L. D., MILLAR C. D. & LAMBERT D. M. 2011: Ancient DNA recovers the origins of Maori feather cloaks. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2741–2750.

- HEBERT P. D. N., CYWINSKA A., BALL S. L. & DEWAARD J. R. 2003: Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **270** (1512): 313–321.
- HEDMARK E. & ELLEGREN H. 2005: Microsatellite genotyping of DNA isolated from claws left on tanned carnivore hides. *International Journal of Legal Medicine* **119** (6): 370–373.
- HERRMANN B. & HUMMEL S. (eds) 1994: *Ancient DNA*. Springer, New York, 263 pp.
- HEYER W. R., DONNELLY M. A., MCDIARMID R. W., HAYEK L.-A. C. & FOSTER M. S. 1994: *Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington, London, 364 pp.
- HÖFER H., ASTRIN J., HOLSTEIN J., SPELDA J., MEYER F. & ZARTE N. 2015: Propylene glycol – a useful capture preservative for spiders for DNA barcoding. *Arachnologische Mitteilungen* **50**: 30–36.
- HORSÁK M., BERAN L. & PAVLÍČKO A. 2019: *Metodika mapování a inventarizačních průzkumů měkkýšů*. <http://mollusca.sav.sk/malacology/Horsak/2019-metodika.pdf>
- HORVÁTH M. B., MARTÍNEZ-CRUZ B., NEGRO J. J., KALMÁR L. & GODOY J. A. 2005: An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology* **36** (1): 84–88.
- HOYSACK D. J. & WEATHERHEAD P. J. 1991: Sampling blood from birds: a technique and an assessment of its effect. *Condor* **93**: 746–752.
- CHEN D., BRAUN E. L., FORTHMAN M., KIMBALL R. T. & ZHANG Z. 2018: A simple strategy for recovering ultraconserved elements, exons, and introns from low coverage shotgun sequencing of museum specimens: Placement of the partridge genus *Tropicoperdix* within the galliformes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **129**: 304–314.
- CHURCH G. M. 2006: Genomes for all. *Scientific American* **294** (1): 46–55.
- ISAIA M., BONA F. & BADINO G. 2006: Comparison of polyethylene bubble wrap and corrugated cardboard traps for sampling tree-inhabiting spiders. *Environmental Entomology* **35** (6): 1654–1660.
- JANÁČKOVÁ H., ŠTORKÁNOVÁ A. & VÍTEK O. 2009: *Metodika inventarizačních průzkumů maloplošných zvláště chráněných území*. AOPK ČR, Praha, 223 pp.
- KANIA G., KOWALSKI R. & PIETRAŠ R. 2017: Defensive secretions in millipede species of the order Julida (Diplopoda). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* **80**: 17–20.
- KMENT P. 2009: Čechy a Morava pro potřeby faunistického výzkumu. *Klapalekiana* **45**: 287–291.
- KOCOUŘEK P., TAJOVSKÝ K. & DOLEJŠ P. 2017: *Mnohonožky České republiky. Příručka pro určování našich druhů*. ZO Českého svazu ochránců přírody Vlašim, 256 pp.
- KOPONEN S. 2004: Arthropods from high oak branches – comparison of two trap types, with a special reference to spiders. *Latvijas Entomologs* **41**: 71–75.
- KORÁBEK O., PETRUSEK A., NEUBERT E. & JUŘÍČKOVÁ L. 2015: Molecular phylogeny of the genus *Helix* (Pulmonata: Helicidae). *Zoologica Scripta* **44** (3): 263–280.
- KORENKO S., PEKÁR S. & HONĚK A. 2010: Predation activity of two winter-active spiders (Araneae: Anyphaenidae, Philodromidae). *Journal of Thermal Biology* **35**: 112–116.

- KOSLINSKA M. 1967: Badania nad fauna zimująca pod kora i w korze jabłoni. Cześć II. Badania nad pajęczakami (Arachnida). *Polskie Pismo Entomologiczne* **37**: 587–602.
- KRISKA G. 2013: *Freshwater Invertebrates in Central Europe*. Springer, Wien, 411 pp.
- LEE P. L. M. & PRŮS-JONES R. P. 2008: Extracting DNA from museum bird eggs, and whole genome amplification of archive DNA. *Molecular Ecology Resources* **8** (3): 551–560.
- LELLÁKOVÁ F., ČERNÁ Ž., HABROVÁ V., CHVÁLA M., STOKLASA J. & VOHRALÍK V. 1985: *Zoologická technika*. Univerzita Karlova, Praha, 128 pp.
- MACHAČ O. & CHRISTOPHORYOVÁ J., KRAJČOVIČOVÁ K., BUDKA J. & SCHLAGHAMERSKÝ J. 2018: Spiders and pseudoscorpions (Arachnida: Araneae, Pseudoscorpiones) in old oaks of a Central European floodplain. *Arachnologische Mitteilungen* **56**: 24–31.
- MACHAČ O. & TUF I. H. 2016: Spiders and harvestmen on tree trunks obtained by three sampling methods. *Arachnologische Mitteilungen* **51**: 67–72.
- MAIA T. A., TORRES VILAÇA S., RESENDE DA SILVA L., SANTOS F. R. & PIRES DE MENDONÇA DANTAS G. 2017: DNA sampling from eggshells and microsatellite genotyping in rare tropical birds: case study on Brazilian Merganser. *Genetics and Molecular Biology* **40**: 808–812.
- MARIĆ S., STANKOVIĆ D., ŠANDA R., ČALET A. M., ČOLIĆ S., ŠUKALO G. & SNOJ A. 2019: Genetic characterisation of European mudminnow (*Umbra krameri*) populations from the Sava River system. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **420**: 46.
- MARTÍN-GALVEZ D., PERALTA-SÁNCHEZ J. M., DAWSON D. A., MARTÍN-PLATERO A. M., MARTÍNEZ-BUENO M., BURKE T. & SOLER J. J. 2011: DNA sampling from eggshell swabbing is widely applicable in wild bird populations as demonstrated in 23 species. *Molecular Ecology Resources* **11**: 481–493.
- MARTINCOVÁ I. & AGHOVÁ T. 2020: Comparison of 12 DNA extraction kits for vertebrate samples. *Animal Biodiversity and Conservation* **v tisku**.
- MASON V. C., LI G., HELGEN K. M. & MURPHY W. J. 2011: Efficient cross-species capture hybridization and next-generation sequencing of mitochondrial genomes from noninvasively sampled museum specimens. *Genome Research* **21** (10): 1695–1704.
- MCCORMACK J. E., TSAI W. L. E. & FAIRCLOTH B. C. 2016: Sequence capture of ultraconserved elements from bird museum specimens. *Molecular Ecology Resources* **16** (5): 1189–1203.
- MCDIARMID R. W., FOSTER M. S., GUYER C., CHERNOFF N. & GIBBONS J. W. 2012: *Reptile biodiversity: standard methods for inventory and monitoring*. University of California Press, London, 411 pp.
- MCDONOUGH M. M., PARKER L. D., ROTZEL MCINERNEY N., CAMPANA M. G. & MALDONADO J. E. 2018: Performance of commonly requested destructive museum samples for mammalian genomic studies. *Journal of Mammalogy* **99** (4): 789–802.
- MIKULA O., ŠUMBERA R., AGHOVÁ T., MBAU J. S., KATAKWEB A. S., SABUNI C. A. & BRYJA J. 2016: Evolutionary history and species diversity of African pouched mice (Rodentia: Nesomyidae: *Saccostomus*). *Zoologica Scripta* **45** (6): 595–617.
- MINELLI A. (ed.) 2015: *The Myriapoda. Volume 2*. Brill, Leiden, 482 pp.

- MULLIS K. B., ERLICH H. A., ARNHEIM N., HORN G. T., SAIKI R. K. & SCHARF S. J. 1987: Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequence using a thermostable enzyme. *Patent № 4,683,195*. Washington, DC, U.S. Patent and Trademark Office.
- MUNDY N. I., UNITT P. & WOODRUFF D. S. 1997: Skin from feet of museum specimens as a non-destructive source of DNA for avian genotyping. *The Auk: Ornithological Advanced* **114** (1): 126–129.
- MURIENNE J., HARVEY M. S. & GIRIBET G. 2008: First molecular phylogeny of the major clades of Pseudoscorpiones (Arthropoda: Chelicerata). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49** (1): 170–184.
- MUSILOVÁ R., ZAVADIL V., MARKOVÁ S. & KOTLÍK P. 2010: Relics of the Europe's warm past: phylogeography of the Aesculapian snake. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **57** (3): 1245–52.
- NEVORALOVÁ L. 1997: Sběr pavouků na Velkém Bláníku pomocí papírových pásů. *Živa* **45** (3): 130–131.
- NIEDOBOVÁ J. & ŘEZNÍČKOVÁ P. 2014: *Odchytové a odběrové metody bezobratlých*. Mendelova univerzita v Brně, Brno, 74 pp.
- NIELSEN E. E., HANSEN M. M. & LOESCHCKE V. 1997: Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon *Salmo salar*: a comparison of genetic composition over 60 years. *Molecular Ecology* **6** (5): 487–492.
- NOTA Y. & TAKENAKA O. 1999: DNA extraction from urine and sex identification of birds. *Molecular Ecology* **8**: 1235–1238.
- NOVÁK K. (ed.) 1969: *Metody sběru a preparace hmyzu*. Academia, Praha, 243 pp.
- NOVÁK I. 1989: Seznam lokalit a jejich kódů pro síťové mapování entomofauny Československa. *Zprávy Československé společnosti entomologické při ČSAV* **25** (1–2): 3–84.
- OSKAM C. L., HAILE J., MCLAY E., RIGBY P., ALLENTOF T. M. E., OLSEN M. E., BENG TSSON C., MILLER G. H., SCHWENNINGER J.-L., JACOMB C., WALTER R., BAYNES A., DORTCH J., PARKER-PEARSON M., GILBERT M. T. P., HOLDAWAY R. N., WILLERSLEV E. & BUNCE M. 2010: Fossil avian eggshell preserves ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society (B)* **277**: 1991–2000.
- PÄÄBO S., IRWIN D. M. & WILSON A. C. 1990: DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *The Journal of Biological Chemistry* **265** (8): 4718–4721.
- PAREDES U. M., PRYS-JONES R., ADAMS M., GROOMBRIDGE M., KUNDU S., AGAPOW P.-M. & ABEL R. L. 2012: Micro-CT X-rays do not fragment DNA in preserved bird skins. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **50**: 247–250.
- PATRICK L. B. & HANSEN A. 2013: Comparing ramp and pitfall traps for capturing wandering spiders. *Journal of Arachnology* **41** (3): 404–406.
- PAXINOS E. E., JAMES H. F., OLSON S. L., SORENSON M. D., JACKSON J. & FLEISCHER R. C. 2002: mtDNA from fossils reveals a radiation of Hawaiian geese recently derived from the Canada goose (*Branta canadensis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**: 1399–1404.
- PAYNE R. B. & SORENSON M. D. 2002: Museum collections as sources of genetic data. *Bonner Zoologische Beiträge* **51** (2/3): 97–104.

- PEARCE J. M., FIELDS R. L. & SCRIBNER K. T. 1997: Nest material as a source of genetic data for avian ecological studies. *Journal of Field Ornithology* **68**: 471–481.
- PEKÁR S. 1999: Some observations on overwintering of spiders (Araneae) in two contrasting orchards in the Czech Republic. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **73**: 205–210.
- PERLÍK M. & ŠEBEK P. 2019: Na barvě záleží. O efektivitě barevných misek při sběru florikolního hmyzu. *Živa* **67**: 32–34.
- PHILLIPS C. D., DUNNUM J. L., DOWLER R. C., BRADLEY L. C., GARNER H. J., MACDONALD K. A., LIM B. K., REVELEZ M. A., CAMPBELL M. L., LUTZ H. L., ORDÓÑEZ GARZA N., COOK J. A., BRADLEY R. D. & THE SYSTEMATIC COLLECTIONS COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS 2019: Curatorial guidelines and standards of the American Society of Mammalogists for collections of genetic resources. *Journal of Mammalogy* **100** (5): 1690–1694.
- PHILLOTT A. D., SPEARE R., HINES H. B., SKERRATT L. F., MEYER E., McDONALD K. R., CASHINS S. D., MENDEZ D. & BERGER L. 2010: Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. *Diseases of Aquatic Organisms* **92** (2–3): 175–185.
- PIŽL V. 2002: Žížaly České republiky. *Sborník Přírodovědného klubu v Uherském Hradišti Suppl.* **9**: 1–154.
- PRUNER L. & MÍKA P. 1996: Seznam obcí a jejich částí v České republice s čísly mapových polí pro síťové mapování fauny. *Klapalekiana* **32** (Suppl.): 1–175.
- PŘIKRYL I. 2006: *Metodika odběru a zpracování vzorků zooplanktonu stojatých vod*. Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, Praha, 14 pp.
- RŮŽIČKA V. 1982: Modifications to improve the efficiency of pitfall traps. *Newsletter of the British arachnological Society* **34**: 2–4.
- RŮŽIČKA V. & ANTUŠ M. 1990: Metodické náměty pro sběratele hmyzu a pavouků. *Zprávy Československé společnosti entomologické při ČSAV* **26** (2): 49–54.
- RŮŽIČKA V. & ANTUŠ P. 1997: Collecting spiders from rocky habitats. *Newsletter of the British arachnological Society* **80**: 4–5.
- SEGELBACHER G. 2002: Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples. *Molecular Ecology Notes* **2**: 367–369.
- SHARMA P. P., KALUZIAK S. T., PÉREZ-PORRO A. R., GONZÁLEZ V. L., HORMIGA G., WHEELER W. C. & GIRIBET G. 2014: Phylogenomic interrogation of Arachnida reveals systematic conflicts in phylogenetic signal. *Molecular Biology and Evolution* **31** (11): 2963–2984.
- SHEDLOCK A. M., HAYGOOD M. G., PIETSCH T. W. & BENTZEN P. 1997: Enhanced DNA extraction and PCR amplification of mitochondrial genes from formalin-fixed museum specimens. *Biotechniques* **22** (3): 394–396, 398, 400.
- SHIOZAWA D. K., KUDO J., EVANS R. P., WOODWARD S. R. & WILLIAMS R. N. 1992: DNA extraction from preserved trout tissues. *Great Basin Naturalist* **52** (1): 29–34.
- SRINIVASAN M., SEDMAK D. & JEWELL S. 2002: Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *The American Journal of pathology* **161** (6): 1961–1971.
- STEYSKAL G. C., MURPHY W. L. & HOOVER E. M. (eds) 1986: *Insects and mites: Techniques for collection and preservation*. United States, Department of Agriculture. Miscellaneous Publication 1443, 103 pp.

- STUART B. L., DUGAN K. A., ALLARD M. W. & KEARNEY M. 2006: Extraction of nuclear DNA from bone of skeletonized and fluid-preserved museum specimens. *Systematics and Biodiversity* **4** (2): 133–136.
- SZINETÁR C. & HORVÁTH R. 2005: A review of spiders on tree trunks in Europe (Araneae). *Acta zoologica bulgarica* **Suppl. 1**: 221–257.
- ŠTÁHLAVSKÝ F. 2006: Štírci (Pseudoscorpiones, Arachnida) CHKO Kokořínsko. *Bohemia Centralis* **27**: 161–165.
- ŠTÁHLAVSKÝ F. 2011: Štírci (Arachnida: Pseudoscorpiones) CHKO Třeboňsko a okolí. *Klapalekiana* **47**: 247–258.
- TABERLET P., COISSAC E., HAJIBABAEI M. & RIESEBERG L. H. 2012: Environmental DNA. *Molecular Ecology* **21**: 1789–1793.
- TABERLET P., WAITS L. P. & LUIKART G. 1999: Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* **14**: 323–327.
- TANG E. P. Y. 2006: *Path to effective recovering of DNA from formalin-fixed biological samples in Natural History Collections*. Workshop Summary, The National Academies Press, 64 pp.
- THOMAS R. H. 1994: Analysis of DNA from natural history museum collections. Pp. 311–321 in: Schierwater B., Streit B., Wagner G.P. & DeSalle R. (eds.): *Molecular ecology and evolution: approaches and applications* (Experientia, Supplement 69). Birkhäuser, Basel.
- THOMSEN P. F. & WILLERSLEV E. 2015: Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* **183**: 4–18.
- THROP J. H. & ROGERS D. C. 2015: *Ecology and General Biology. Throp and Covich's Freshwater Invertebrates*. Academic Press, USA, 1118 pp.
- TILAK M. K., JUSTY F., DEBIAIS-THIBAUD M., BOTERO-CASTRO F., DELSUC F. & DOUZERY E. J. P. 2015: A cost-effective straightforward protocol for shotgun Illumina libraries designed to assemble complete mitogenomes from non-model species. *Conservation Genetics Resources* **7** (1): 37–40.
- TÖPFER T., GAMAUF A. & HARING E. 2011: Utility of arsenic-treated bird skins for DNA extraction. *BMC Research Notes* **4** (197): nestránkováno.
- TRIMBOS K. B., BROEKMAN J., KENTIE R., MUSTERS C. J. M. & DE SNOO G. R. 2009: Using eggshell membranes as a DNA source for population genetic research. *Journal of Ornithology* **150**: 915–920.
- TRUETT G. E., HEEGER P., MYNATT R. L., TRUETT A. A., WALKER J. A. & WARMAN M. L. 2000: Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques* **29** (1): 52, 54.
- TSAI W. L. E., SCHEDL M. E., MALEY J. M. & MCCORMACK J. E. 2019: More than skin and bones: comparing extraction methods and alternative sources of DNA from avian museum specimens. *Molecular Ecology Resources* **v tisku**. DOI: 10.1111/1755-0998.13077.
- TUF I. H. 2013: *Praktika z půdní biologie*. Univerzita Palackého, Olomouc, 92 pp.
- USHIO M., MURATA K., SADO T., NISHIUMI I., TAKESHITA M., IWASAKI W. & MIYA M. 2018: Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Scientific Reports* **8**: 4493.

- UYS V. M. & URBAN R. P. 1996: *How to collect and preserve insects and arachnids*. Plant Protection Research Institute, Pretoria, 73 pp.
- VALLANT S., NIEDERSTÄTTER H., BERGER B., LENTNER R. & PARSON W., 2018: Increased DNA typing success for faeces and feathers of capercaillie (*Tetrao urogallus*) and black grouse (*Tetrao tetrix*). *Ecology & Evolution* **8**: 3941–3951.
- VONDRÁČEK D., TKOČ M. & FIKÁČEK M. 2018: Is repeated cypermethrin fumigation dangerous for the mitochondrial DNA in dry insect samples? *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* **58** (2): 609–614.
- WATTS L. P. & PAETKAU D. 2005: Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management* **69**: 1419–1433.
- WANDELER P., HOECK P. E. A. & KELLER L. F. 2007: Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* **22** (12): 634–642.
- WANDELER P., SMITH S., MORIN P. A., PETTIFOR R. A. & FUNK S. M. 2003: Patterns of nuclear DNA degeneration over time - a case study in historic teeth samples. *Molecular Ecology* **12** (4): 1087–1093.
- WILLERSLEV E. & COOPER A. 2005: Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **272** (1558): 3–16.
- WILLIAMS C., PONTÉN F., MOBERG C., SÖDERKVIST P., UHLÉN M., PONTÉN J., SITBON G. & LUNDEBERG J. 1999: A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *The American Journal of Pathology* **155** (5): 1467–1471.
- WILSON S. W., SMITH J. L. & PURCELL A. H. 1993: An inexpensive vacuum collector for insect sampling. *Entomological News* **104**: 203–208.
- WINKLER R. J. 1974: *Sbíráme hmyz a zakládáme entomologickou sbírku*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 211 pp.
- WIRGIN I., MACEDA L., STABILE J. & MESING C. 1997: An evaluation of introgression of Atlantic coast striped bass mitochondrial DNA in a Gulf of Mexico population using formalin-preserved museum collections. *Molecular Ecology* **6** (10): 907–916.
- WISELY S. M., MALDONADO J. E. & FLEISCHER R. C. 2004: A technique for sampling ancient DNA that minimizes damage to museum specimens. *Conservation Genetics* **5** (1): 105–107.
- ZALE A. V., PARRISH, D. L. & SUTTON, T. M. (eds) 2012: *Fisheries techniques, 3rd edition*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 1069 pp.
- ZIELIŃSKA S., KIDAWA D., STEMPNIEWICZ L., ŁOŚ M. & ŁOŚ J. 2017: Environmental DNA as a valuable and unique source of information about ecological networks in Arctic terrestrial ecosystems. *Environmental Reviews* **25**: 282–291.
- ŽALMAN J., JIRÁSEK P. & CHATRNÁ D. 2002: *Příručka muzejníková I. Tvorba, evidence, inventarizace a bezpečnost sbírek v muzeích a galeriích*. Asociace muzeí a galerií ČR, Praha, Brno, 75 pp.

Tatiana Aghová, Petr Benda, Jindřich Brejcha, Petr Dolejš, Eva Kyrálová, Jiří Mlíkovský,
Jiří Moravec, Radek Šanda, Jan Štundl, Michal Tkoč & Dominik Vondráček

**Metodika správy a evidence tkáňové zoologické sbírky a determinace
zoologického sbírkového materiálu na základě analýzy DNA**

Vydalo Národní muzeum, Václavské náměstí 68, Praha 1

1. vydání, Praha, 2019

111 pp.

Tisk: Tisk Centrum s. r. o.

Náklad: 300 ks

Publikace není určena k prodeji.

Návrh obálky: Anna Procházková podle grafického návrhu Lukáše Matouše

Frontispis: pipetování vzorku na kolonku (foto D. Vondráček)

ISBN 978-80-7036-625-7

