

Česká zemědělská univerzita v Praze

2025

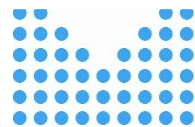
**Forenzně analytické metody pro účely určení živočišného druhu
u biologického materiálu získaného ze zvířat (obratlovců)
nebo jejich částí**

Certifikovaná metodika

Barbora Černá Bolfíková, Divyadharshini Shanthakrishnan, Petr Matějů, Juliana Walterová,
Iva Bernáthová, Miroslav Mulko, Richard Sehnal, Jiří Černý

Metodika byla vypracovaná jako výstup VK01010103-V3 výzkumného projektu VK01010103, Metodologie identifikace a dalších forenzních analýz biologického materiálu a patogenů z volně žijících a exotických živočichů v rámci programu 1.VS OPSEC.

Vydala Česká zemědělská univerzita ve svém nakladatelství
ISBN 978-80-213-3523-3



MINISTERSTVO VNITRA
ČESKÉ REPUBLIKY

Příjemci podpory:

Poskytovatel:

**Metodologie identifikace a dalších forenzních analýz biologického materiálu a patogenů z volně žijících a exotických živočichů
VK 01010103**

Název předkládaného výsledku: Forenzně analytické metody pro účely určení živočišného druhu u biologického materiálu získaného ze zvířat (obratlovců) nebo jejich částí.

Typ výsledku dle Definice druhů výsledků	Evidenční číslo (příjemce)	Rok vzniku
metodika certifikovaná oprávněným orgánem <i>NmetC3</i>	20/2025	2025
ISBN/ISSN (pokud je k dispozici)	Webový odkaz na výsledek (pokud je k dispozici)	Kde a kdy publikováno (v případě publikačních výsledků)
978-80-213-3523-3	metodiky.agrobiologie.cz	Jednoznačný popis publikace, ve které daný výsledek vyšel.

Stručná anotace k výsledku v českém jazyce: (max. 8 řádků)

Hlavním cílem této metodiky je určit sety molekulárně genetických markerů, které je nejvhodnější využít pro analýzu různých vzorků, tak aby bylo dosaženo nejlepší možné taxonomické klasifikace zvířat, ze kterých byl vzorek odebrán (pokud možno až do poddruhu) a to ideálně i s ohledem na geografickou lokalitu, ze které vzorek pochází. Otestovány bude i vliv různých způsobů zpracování zabaveného vzorku na nejlepší způsob extrakce DNA a na citlivost analýzy. Otestována bude i funkčnost těchto metod.

.....

Řešitelský tým:

Barbora Černá Bolfíková, Divyadharshini Shanthakrishnan, Petr Matějů, Juliana Walterová, Iva Bernáthová, Miroslav Mulko, Richard Sehnal, Jiří Černý

Obsah

Úvod.....	1
1. Obecné postupy	2
1.1 Ochranné pracovní pomůcky a bezpečnost	2
1.2 Specifická rizika a bezpečnostní opatření	2
1.3 Rozdělení pracovních prostor v laboratoři a kontrola kontaminace.....	2
2. Kategorizace a úvodní zpracování vzorků	8
3. Extrakce DNA	11
3.1 Vysoké množství DNA: pokyny pro manipulaci a extrakci.....	11
3.2 Nízké množství DNA: zvláštní opatření při manipulaci	11
3.3 Doporučené extrakční kity a alternativy.....	12
3.4 Přehled protokolu	12
4. Kvantifikace DNA.....	15
5. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	18
5.1 Činidla	18
5.2 Výběr primerů.....	18
5.3 Příprava PCR (celkový objem 25 µl)	25
5.4 Nastavení termocykleru (obecné parametry).....	25
5.5 Kontroly.....	26
5.6 Řešení problémů	26
6. Gelová elektroforéza a čištění PCR produktů	28
6.1 Příprava gelu a elektroforéza	28
6.2 Čištění PCR produktů.....	28
6.3 Poznámky a doporučené postupy	29
7. Sekvence DNA a zpracování dat.....	30
7.1 Sekvenační reakce	30
7.2 Kontrola kvality sekvencí a zpracování.....	31
8. Analýza dat a taxonomická identifikace	32
8.1 Nástroje a zdroje.....	32
8.2 Kvalita sekvencí a příprava před BLASTováním.....	32
8.3 Interpretace výsledků BLASTu.....	32
8.4 Potvrzení a křížová kontrola.....	33
8.5 Hodnocení kvality referenční sekvence (podle OSAC 2021-S-0006).....	33

8.6 Doporučení pro zveřejňování výsledků	33
8.7 Další hlediska	34
9. Kontrola kvality a dokumentace	35
Dodatky	36
Alternativní protokoly:	36
Běžné laboratorní roztoky	37
Reference.....	40

Úvod

Tato příručka poskytuje standardizované protokoly pro molekulární identifikaci obratlovců z biologických vzorků, včetně čerstvých tkání, zpracovaných živočišných produktů a stopového biologického materiálu, s využitím metod DNA barcodingu a sekvenace. Zahrnuje postupy pro předzpracování vzorků, extrakci DNA, její kvantifikaci, postupy pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR), sekvenaci a interpretaci výsledků.

Postupy jsou optimalizovány pro:

- Extrakci DNA pomocí soupravy Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit a komerčně dostupných alternativ
- Kvantifikaci DNA pomocí přístrojů NanoDrop, Qubit a dalších fluorimetrických metod
- PCR
- Sangerovu sekvenaci a následnou analýzu dat

1. Obecné postupy

1.1 Ochranné pracovní pomůcky a bezpečnost

Pro zajištění bezpečnosti laboratorního personálu a zachování integrity vzorků je při všech krocích molekulární identifikace povinné používat odpovídající osobní ochranné pracovní prostředky:

- Při zpracování jakýchkoli biologických vzorků je nutné nosit **laboratorní plášť**. Pro činnosti zahrnující manipulaci s PCR produkty musí být vyhrazeny samostatné pláště, aby se předešlo křížové kontaminaci.
- **Rukavice** je nutné používat neustále při manipulaci se vzorky nebo činidly a je třeba je ihned vyměnit, pokud dojde ke kontaminaci, poškození nebo po dokončení pracovního činnosti. Použité rukavice je nutné vyhodit do vyhrazených odpadních nádob.
- Při práci s nebezpečnými chemickými látkami nebo biologickým materiálem s potenciálním infekčním rizikem je třeba použít dodatečné ochranné pomůcky, jako jsou **ochranné brýle** a **teplu odolné rukavice** (např. při práci s rozehrátým agarózovým gelem).

1.2 Specifická rizika a bezpečnostní opatření

Biologický materiál může obsahovat infekční agens; je proto nezbytné dodržovat přísná bezpečnostní opatření:

- Při manipulaci se vzorky vždy používejte rukavice a ochrannou roušku (respirátor).
- Nedotýkejte se obličeje ani sliznic, abyste minimalizovali riziko expozice.
- Po použití rukavic je ihned vložte do určené odpadní nádoby a důkladně si umyjte ruce vodou a mýdlem.
- Při práci se zdroji ultrafialového (UV) záření používejte ochranné brýle s UV filtrem.

1.3 Rozdělení pracovních prostor v laboratoři a kontrola kontaminace

Aby se zabránilo kontaminaci neamplifikovaných vzorků DNA produkty z PCR (tzv. carry-over kontaminace), je nezbytné fyzicky oddělit jednotlivé pracovní prostory. Extrakce DNA a příprava PCR probíhají v jiných místnostech než samotná PCR a následná manipulace s PCR produkty. Veškeré aktivity související s amplifikovanou DNA se provádějí výhradně ve vyhrazené post-PCR místnosti s omezeným přístupem.

Vyhrazené laboratorní prostory zahrnují:

- **Prostor pro kontrolu důkazního materiálu:** určený k počáteční prohlídce odebraných vzorků, odebrání dílčích vzorků a dočasnému uložení důkazního materiálu a referenčních vzorků.
- **Prostor pro zpracování důkazního materiálu:** pro přípravu vzorků, jako je vrtání nebo rozmělnění při extrémně nízkých teplotách.
- **Prostor pro extrakci DNA:** místo, kde probíhá izolace DNA včetně enzymatického štěpení a purifikace.
- **Prostor pro přípravu PCR:** vyhrazený k přípravě extrahované DNA pro kvantifikaci a amplifikaci.
- **Post-PCR místnost:** určená výhradně k manipulaci s PCR produkty, včetně samotné amplifikace DNA, elektroforézy, likvidace odpadů a uchovávání PCR produktů. Tato místnost je fyzicky oddělena od ostatních prostor za účelem minimalizace rizika kontaminace.
- **Sekce pro Sangerovo sekvenování:** obsahuje přístroje pro sekvenaci DNA pomocí Sangerovy metody.

Zdroje kontaminace

Kontaminace může vznikat z různých zdrojů:

- environmentální DNA zavlečená během odběru nebo manipulace se vzorkem,
- exogenní DNA z laboratorních povrchů, nástrojů nebo vzduchu,
- křížová kontaminace mezi vzorky během přípravy nebo extrakce,
- přenos amplifikovaných PCR produktů do neamplifikovaných reakcí (carry-over),
- kontaminovaná nebo degradovaná činidla.

Prevence kontaminace

Vzhledem k vysoké citlivosti metod založených na PCR – schopných amplifikovat i jedinou molekulu DNA – je nezbytné přísně kontrolovat možné zdroje kontaminace. DNA laboratoře musí dodržovat důsledné uspořádání pracovních prostor, pracovní postupy a pravidelnou dekontaminaci, aby byla zajištěna spolehlivost výsledků. Všechny podezřelé nebo potvrzené události spojené s kontaminací musí být zaznamenány v **Protokolu o kontaminaci sekce genetiky**.

A. Kontrola environmentální kontaminace DNA

- Příprava PCR musí probíhat v laminárním boxu sterilizovaném pomocí UV záření.
 - Po každé pracovní relaci je třeba pracovní plochu boxu vyčistit činnidly degradujícími DNA.
 - Po skončení práce zapněte UV záření na dobu minimálně 20 minut k degradaci zbytkových nukleových kyselin.
- Při práci v prostoru pro přípravu PCR nebo v laminárním boxu je nutné vždy používat rukavice.
- Zkumavky se vzorky musí být uzavřeny, pokud se z nich právě neodebírá pipetou, aby se minimalizovalo riziko expozice vzdušným částicím.
- Při pipetování je třeba postupovat opatrně, aby nedocházelo k tvorbě aerosolu; vždy používejte špičky s filtrem.
- Pro přípravu PCR musí být vyhrazena samostatná sada pipet; tyto pipety nesmí být vynášeny z boxu.
- V boxu lze uchovávat pouze sterilní spotřební materiál určený výhradně pro PCR (např. špičky s filtrem, sterilní vodu, PCR zkumavky). Tento materiál nesmí být používán v jiných částech laboratoře.

B. Prevence křížové kontaminace mezi vzorky

- Do reakčních zkumavek je nutné nejprve přidat všechna PCR činidla. DNA se přidává jako poslední, následovaná uzavřením zkumavky, jemným promícháním a krátkým odstředěním.
- Při manipulaci s cílovou DNA je nutné používat špičky s filtrem a vyhrazené pipety. Je třeba zabránit kontaminaci pipet, rozstřikováním či tvorbě aerosolu.
- Zkumavky musí být vždy uzavřeny, pokud nejsou používány.
- Před otevřením jakékoli zkumavky se vzorkem nebo reakčním činidlem je třeba provést krátkou mikrocentrifugaci, aby se snížilo riziko kontaminace.
- Extrakce DNA nebo příprava PCR z důkazních vzorků se musí provádět odděleně od referenčních vzorků, a to buď v odlišný čas, nebo na jiném místě.
- Ze zásobního činidla by měly být připraveny malé dávky, které se použijí přímo do reakcí, čímž se minimalizuje opakovaná manipulace a riziko kontaminace.
- Veškeré pomůcky uložené v PCR boxu (pipety, centrifuga, PCR zkumavky, psací potřeby) musí v boxu zůstat a být používány výhradně pro přípravu PCR reakcí.

C. Prevence kontaminace činidly

- Pro zpracování DNA z důkazních materiálů lze používat pouze validovaná nebo ověřená klíčová činidla.
- Činidla by měla být připravována z čerstvě otevřených spotřebních materiálů, které nebyly dříve vystaveny kontaktu s DNA.
- Každý pracovník musí používat vlastní dělené množství činidel, aby se zabránilo kontaminaci mezi jednotlivými uživateli.
- Před otevřením zkumavek s činidly je doporučeno je krátce odstředit, aby se kondenzát shromáždil na dně, čímž se sníží riziko kontaminace rukavic a pipet při otevírání.

Údržba laboratoře a dekontaminace

Udržování čisté laboratoře bez kontaminace je zásadní pro zachování integrity DNA vzorků. Pravidelné čistící protokoly chrání vzorky před degradací, kontaminací a kompromitací během analýzy. Tato kapitola uvádí standardy čištění laboratoře, vybavení a nakládání s odpady v laboratoři molekulární genetiky.

A. Údržba laboratorních prostor

- **Rozvrh čištění:** Podlahy laboratoře by měly být čištěny pravidelně. Místnosti post-PCR je nutné čistit v jiný čas a jiným úklidovým náčiním než ostatní laboratoře. Pokud se čistí ve stejný den, čistí se post-PCR prostor až nakonec, aby se zabránilo křížové kontaminaci.
- **Pracovní plochy:** Pracovní desky a plochy laminárních boxů je třeba utírat laboratorně schválenými čistícími prostředky (např. etanol nebo chlorové bělidlo). Na pracovní plochy používejte jednorázové podložky nebo savý papír, aby se omezila kontaminace během procedur.
- **Biosafety kabinety a PCR laminární box:** Po každém použití očistěte kabinety dezinfekčním prostředkem a následně aktivujte UV záření alespoň na 20 minut k degradaci zbytkové DNA.
- **Nakládání s odpady:** Odpad z post-PCR zón laboratoře odstraňujte až po vyprázdnění běžného laboratorního odpadu. Odpad z post-PCR odstraňujte samostatnou cestou, aby nebyl přenášen přes oblast přípravy PCR.

B. Osobní ochranné pracovní prostředky

- **Rukavice:**
Rukavice měňte často, zejména mezi jednotlivými kroky manipulace se vzorky, aby nedošlo k přenosu DNA.

- **Laboratorní pláště:**

- Bílé pláště používejte pro pre-PCR práci (extrakce, příprava PCR).
- Modré nebo jednorázové pláště jsou vyhrazeny pouze pro post-PCR oblasti.
- Pláště perte nebo vyměňujte, pokud jsou viditelně znečištěné nebo po manipulaci s rizikovými materiály.

C. Čištění vybavení

- **Skleněné nádobí:** Mytí ručně laboratorním detergentem nebo v myčce (nastavení pro laboratoř). Důkladně opláchnout vodou z vodovodu a následně deionizovanou vodou. Nechat volně uschnout.
- **Termocyklery, centrifugy a pipety:** Čistit pravidelně 70% etanolem nebo zředěným Savem. Zajistit, aby vnější povrchy byly beze zbytků, zejména po častém používání.
- **Malé nástroje (např. pinzety, nůžky):** Dekontaminovat mezi vzorky Savem nebo etanolem. Používat jednorázové nástroje, pokud je to možné. Nástroje pravidelně autoklávovat.
- **Pipetovací špičky a mikrozkuřavky:** Pro práci s DNA používejte vždy špičky s filtrem. Špičky měňte mezi jednotlivými vzorky. Pro PCR a kroky citlivé vůči DNA používejte pouze sterilní, beznukleázové mikrozkuřavky.

D. Autoklávování

- **Pokyny pro sterilizaci:** Autoklávujte pouze materiály, které jsou kompatibilní s vysokou teplotou. Neautoklávujte roztoky obsahujících SDS, DTT nebo jiné teplotně citlivé chemikálie.
- **Příprava:** Všechny předměty musí být před autoklávováním očištěny. Uzávěry povolte nebo ponechte nezašroubované. Použijte autoklávovou pásku k indikaci úspěšné sterilizace. Malé předměty zabalte do hliníkové fólie nebo autoklávovatelných sáčků.

E. Nakládání s nebezpečným odpadem

- **Biologický odpad:** Po naplnění uzavřete nádoby s bioodpadem a transportujte je přímo na místo likvidace. Případně odstraňte pytel odpadu samostatně a vnější nádoby opakovaně použijte.
- **Chemický odpad:** Nebezpečné chemikálie, jako jsou fenol, chloroform, soli guanidinia a formamid, likvidujte ve správně označených nádobách podle interních předpisů pro chemickou hygienu. Likvidace musí probíhat pravidelně v plánovaných intervalech.

- **Postup při rozlití:** V případě rozlití DNA (např. extrahovaného nebo amplifikovaného produktu) okamžitě očistěte absorpčním materiálem a vhodným dekontaminačním prostředkem (např. 10% Savo nebo DNA odstraňující činidla). Oblast důkladně dezinfikujte, aby se zabránilo zbytkové kontaminaci.

F. Dekontaminace a příprava pracovního místa

- Veškerý použitý spotřební materiál by měl být certifikovaný jako DNase-, RNase- a DNA-free.
- Pracujte ve vyhrazené pre-PCR oblasti s UV sterilizací.
- Nástroje dekontaminujte 10% Savem (1 min), opláchněte 70% etanolem a beznukleázovou vodou.
- Mezi vzorky měňte rukavice.

2. Kategorizace a úvodní zpracování vzorků

Kategorizace a počáteční manipulace se vzorky jsou zásadní pro zajištění správné následné molekulární analýzy. Pro přehled postupů u různých typů vzorků a doporučené podmínky odběru a uchovávání živých zvířat a živočišných produktů viz Černá Bolfíková et al. (2024): *Metodologie pro odběry, biologickou bezpečnost a archivaci biologického materiálu ze zvířat zadrženého v rámci ilegálního obchodu pro účely forenzních analýz*.

Doporučené zacházení / úvodní zpracování vzorků

Typ vzorku	Pokyny pro zacházení / úvodní zpracování
Měkké tkáně	Uchovávat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Minimalizovat cykly zmrazování a rozmrazování. Používat sterilní nástroje pro odebrání menších částí měkkých tkání.
Tělní tekutiny	Skladovat v lednici při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ s vhodným činidlem, které zabrání srážení krve. U stěrů ze sliznic je potřeba předcházet mikrobiálnímu osídlení vzorků, je potřeba vzorek co nejrychleji zpracovat, případně jej fixovat ve stabilizačním roztoku (např. etanol).
Mineralizované tkáně (kosti, zuby, parohy, slonovina)	Povrch očistit 10% Savem následovaným sterilní vodou k odstranění nečistot a exogenní DNA, nechat uschnout na vzduchu. Použít vrták s dentální frézou (nízké otáčky pro snížení působícího tepla) nebo pulverizovat kryogenním mlýnem (např. značka Freezer/Mill). Nasbírat prášek/fragmenty do zkumavky. Vzorek demineralizovat, pokud je potřeba. Extrahovat z dřene nebo dřevové tkáně, pokud je přítomna měkká tkáň. U slonoviny odebrat $50\text{ mg}-1\text{ g}$ prášku a vyextrahovat do $20-25\text{ }\mu\text{l}$ roztoku.
Keratinové tkáně (chlupy, nehty, rohy, šupiny)	U chlupů odstříhnout $0,5-1\text{ cm}$ od kořínku; použít kořínky a přilehlou část stvolu pro mitochondriální DNA (mtDNA). Nehty/šupiny očistit a nakrájet na malé kousky. Rohy pulverizovat nebo vrtat při nízkých otáčkách; sbírat spirální jádro nebo prášek. Použít kryogenní mlýn, pokud je k dispozici.

Typ vzorku	Pokyny pro zacházení / úvodní zpracování
Zpracované tkáně / kůže	Použít vnitřní části vzorku. Vyhnout se vnějším povrchům, které byly chemicky ošetřeny. Vzorek nakrájet nebo pulverizovat (>1 cm ² u kůže), umýt a změkčit přes noc v 1M PBS / 1M GTE (viz Dodatky pro složení roztoku) v termotřepačce při 56 °C; opakovat praní až 3 dny podle potřeby s postupným snížením teploty a otáček k ochraně DNA.
Skvrny na látce nebo tvrdých površích	Seškrábnout nebo setřít stěrkou. Odstříhnout skvrny z textilu a extrahovat je přímo, nebo oddělit filtrát skvrny pomocí sterilního síťového filtru do vzorkových zkumavek. Vložit stěr či seškrabaný materiál nebo tampony se vzorkem do zkumavek. Zdokumentovat a vyfotografovat místo odběru.
Chlupy s tekutinami	Zkontrolovat přítomnost tekutin u chlupu. Použít sterilní navlhčený tampón (očištěná voda, PBS, TE nebo lyzační pufr) nebo umýt chlupy v 1M PBS / 1M GTE pufrch. Extrahovat chlupy a přítomnou tekutinu odděleně.
Peří	Odebrat tkáň připojenou k osnému stvolu nebo krev u báze (z místa výtoku krve). Otevřít stvol a odebrat paprsky, vyhnout se nadměrnému odběru. U zpracovaných výrobků, u kterých chybí brk, použijte paprsky.
Kaviár (vajíčka)	Použít 2 vajíčka, pokud je obsah homogenní; alespoň 5 vajec, pokud je heterogenní. Pokud je to možné, odebrat vzorek z neotevřeného balení. Použít analýzu mtDNA.
Žlučníky	Vyhnout se kontaminaci žlučí. Odebrat tkáň blízko trávicího traktu. Pokud se odebírá žluč, použít odpovídající extrakční protokol (např. Qiagen Stool Kit).
Řemeslné výrobky	Opatrně extrahovat materiál (např. slonovina, roh, peří), zajistit odběr biologických zbytků (krev, membrána), vyhnout se anorganickým příměsím a příměsím, jako je lepidlo nebo dřevo.

Typ vzorku	Pokyny pro zacházení / úvodní zpracování
Olej / tuk	Uchovávat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Minimalizovat cykly zmrazování a rozmrazování. Použít $>0,5\text{--}1\text{ ml}$ a ihned pokračovat do lyzačního kroku (u tohoto typu je nízká úspěšnost extrakce).
Jiné / neuvedené vzorky	Zpracovat dle uvážení analytika. Podrobně zaznamenat a vyfotografovat vzorek.

3. Extrakce DNA

3.1 Vysoké množství DNA: pokyny pro manipulaci a extrakci

- Veškeré postupy související s extrakcí, purifikací, ředěním a přípravou na kvantifikaci DNA se musí provádět ve vyhrazené laboratoři pro extrakci DNA.
- Při manipulaci s jakýmkoli materiálem obsahujícím DNA je nutné vždy používat rukavice, aby se minimalizovalo riziko kontaminace.
- Pracovní plochy se musí před i po zpracování vzorků očistit a dezinfikovat čerstvě připraveným 10% roztokem Sava.
- Vzorky určené k extrakci a čerstvě extrahovaná DNA by měly být uchovávány při teplotě 4 °C nebo –20 °C pro krátkodobé uskladnění. Pro dlouhodobé uchování se doporučuje mrazicí box na –20 °C nebo –80 °C.
- Každý extrakt DNA – ať už uchovávaný ve zkumavkách nebo v destičkách – musí být opatřen jasně čitelným a jednoznačným identifikačním štítkem.

3.2 Nízké množství DNA: zvláštní opatření při manipulaci

- Vzorky, u nichž lze očekávat velmi nízké množství DNA, je třeba zpracovávat odděleně od vzorků s vyšší koncentrací DNA. Ideální je začít s izolací vzorků s nízkým očekávaným obsahem DNA.
- Při práci s těmito vzorky se musí vždy používat čistý laboratorní plášť a rukavice, aby se zabránilo i stopové kontaminaci.
- Všechny pracovní plochy se musí před i po zpracování dezinfikovat 10% roztokem Sava.
- Pokud se používá laminární box, je nutné povrch po očištění 10% roztokem Sava vystavit UV záření po dobu nejméně 20 minut.
- Po odběru vzorků s nízkou koncentrací DNA lze pokračovat standardními extrakčními postupy.

3.3 Doporučené extrakční kity a alternativy

Typ vzorku	Doporučená souprava	Alternativy
Bukální stěr	Presto™ Buccal Swab gDNA Extraction Kit	Zymo Quick-DNA™ Buccal Swab Kit
Měkké tkáně	Qiagen DNeasy® Blood & Tissue	Macherey-Nagel NucleoSpin® Tissue
Keratinové tkáně	Qiagen DNeasy® Blood & Tissue + DTT	Promega Wizard® SV / QIAamp DNA Investigator Kit
Kost/zub	Qiagen DNeasy® Blood & Tissue + dekalifikace pomocí EDTA	PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit / QIAamp DNA Investigator Kit
Tepelně opracované tkáně	Qiagen DNeasy® Blood & Tissue + DTT	Macherey-Nagel NucleoSpin® Tissue / QIAamp DNA Investigator Kit
Tuk/olej	Qiagen DNeasy® Blood & Tissue	Macherey-Nagel NucleoSpin® Tissue / QIAamp DNA Investigator Kit

3.4 Přehled protokolu

- Odstraňte promývací pufr centrifugací při vysokých otáčkách ($>10\,000 \times g$) po dobu 3–5 minut před zahájením štěpení.
- Vzorky podrobte přes noc enzymatickému štěpení při 56 °C v ATL pufru s proteinázou K (20 µl; 20 mg/ml). [Podrobnosti o úpravách podle typu vzorku viz tabulka níže.]
- Dekalcifikace (kost/zuby): Dekalcifikace je přípravný krok pro izolaci DNA z tvrdých tkání (kostních a zubních vzorků), protože odstraňuje minerální složku, především vápník, z tkáňové matrice. Tento proces změkčuje jinak rigidní strukturu a usnadňuje tak pronikání lyzačních pufrů a enzymatických činidel. Lepší prostupnost zvyšuje jak výtěžnost, tak i čistotu izolované DNA. Dekalcifikace navíc omezuje současnou izolaci inhibičních látek, které mohou negativně ovlivnit následné analýzy, a výsledkem je díky tomu DNA vyšší kvality vhodná pro další zpracování. Dekalcifikace na bázi EDTA je obecně upřednostňována před jinými postupy, protože účinně zachovává integritu DNA a minimalizuje její degradaci ve srovnání se silnými kyselinami (viz Dodatky pro přípravu EDTA a různé protokoly dekalifikace).

- DTT (chlupy, peří, nehty): Keratinové a chitinem obohacené materiály, jako jsou chlupy, peří, nehty, některé typy kostí a tvrdá kůže/kožené tkáně, vyžadují ošetření dithiothreitem (DTT) jako přípravný krok izolace DNA. DTT je redukční činidlo, které rozbíjí disulfidické vazby v keratinu, a tím zvyšuje účinnost lyzačních pufrů a enzymů. Tímto způsobem se zlepšuje výtěžnost DNA, která je jinak v těchto typech materiálu nízká (viz Dodatky pro přípravu DTT).

Upravené protokoly štěpení podle typu vzorku

Typ vzorku	Doporučený protokol štěpení	Poznámky a reference
Syrová/vařená/sušená tkáň/tuk	56 °C v lyzačním pufru s proteinázou K (20 µl; 20 mg/ml), nechat působit 2–24 hodin.	Qiagen DNeasy® Blood & Tissue kit protokol
Keratinové tkáně	56 °C v ATL pufru s proteinázou K (40 µl; 20 mg/ml) + 20 µl 1M DTT, 24 h v termotřepačce (po 24 h zvýšit koncentraci DTT a proteinázy K).	(Campos & Gilbert 2011) – upraveno
Kost/zub	0,5–5 g kostního prášku (dle stáří a stavu), 56 °C, dekalcifikovat a lyzovat s 0,5 M EDTA pH 8,0, 0,5% dodecylsírany sodný a 100 µg/ml proteinázy K; inkubace v termotřepačce přes noc při 55 °C a následně 24 h při 37 °C.	(Yang et al. 1998) – upraveno Viz Dodatky pro alternativní protokoly
Kůže	56 °C s 360 µl ATL + 40 µl proteinázy K + 40 µl 1M DTT, 24–48 hodin v termotřepačce (po 24 h zvýšit koncentraci DTT a proteinázy K).	(Hebenstreitová et al. 2024) – upraveno

- Po ukončení štěpení se směs odstředí při vysokých otáčkách ($>10\,000 \times g$) po dobu 3–5 minut, aby se zbývající pevné částice usadily na dně. Čirý supernatant se opatrně přenesl do nové zkumavky, přičemž se dbá na to, aby se nepřenese žádné pevné částice, které by mohly ucpat kolonu.
- Do supernatantu se přidá 200 µl pufru AL a 200 µl etanolu a směs se dobře promíchá.

- Vzorek se následně přenese na kolonu DNeasy[®] a promyje se pomocí pufrů AW1 a AW2.
- DNA se uvolní v 50–100 µl pufru AE nebo beznukleázové vody; pro vyšší výtěžnost je možné eluci zopakovat.

4. Kvantifikace DNA

Metoda	Popis	Poznámky
NanoDrop	UV-spektrofotometrie (poměr 260/280, 260/230)	Nadhodnocuje koncentraci DNA v přítomnosti nečistot a vysokého množství RNA, vhodný především pro stanovení čistoty extrahované DNA
Qubit	Fluorometrická metoda využívající barviva specifická pro dvouvláknovou DNA (dsDNA)	Přesná při nízkých koncentracích DNA
Gelová elektroforéza	Vizuální ověření délky a degradace fragmentů	Použijte 1,5% agarózový gel, molekulární žebřík pro určení délky

Očekávané hodnoty:

Čistá DNA: poměr 260/280 = **1,8–2,0**; poměr 260/230 >**1,5**

Qubit: >**1 ng/μl** pro spolehlivou PCR

Problém	Možná příčina	Doporučené řešení
Nízký výtěžek DNA	Nedostatečná lyzace tkáně	Prodloužit dobu enzymatického štěpení (přes noc či déle)
		Zvýšit koncentraci proteinázy K a/nebo DTT
	Nízké množství vstupního vzorku nebo degradovaný vzorek	Použít předeřhřátý eluční pufr nebo beznukleázovou vodu
		Koncentrovat vzorek vakuovým koncentrátorem (např. SpeedVac) nebo etanolovou precipitací

Problém	Možná příčina	Doporučené řešení
Nízký výtěžek DNA	Ulpívání DNA na filtrační membráně nebo stěně zkumavky	Předem zvlhčit kolony elučním pufrém
		Před použitím ohřát eluční pufr na 60 °C
	Neefektivní eluce	Provést druhou eluci
		Zvýšit objem elučního pufru nebo prodloužit dobu inkubace na koloně
		Použít předeřhřátý eluční pufr nebo beznukleázovou vodu (vede ke snížení koncentrace získané DNA)
Přítomnost inhibitorů	Zpracované/tukové/olejovité vzorky	Provést další čištění pomocí chloroformu:isoamylu nebo na silikové membráně
		Po extrakci zařadit krok dodatečné purifikace (např. Zymo OneStep, AMPure beads)
	Kontaminace detergenty nebo činidly	Používat čerstvě připravené pufrý
		Omezit použití SDS nebo jiných detergentů během štěpení
Nízký poměr 260/280 (<1,6)	Kontaminace proteiny	Opakovat etanolová promytí

Problém	Možná příčina	Doporučené řešení
Nízký poměr 260/230 (<1,8)	Reziduální soli nebo organická rozpouštědla (např. etanol, EDTA)	Zajistit úplné vysušení kolon před elucí
		Přidat navíc krok centrifugace pro kompletní vysušení membrány
Degradovaná DNA (rozmazání)	Nadměrná expozice teplotě, UV nebo enzymatickému štěpení	Vyhnout se opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorku
		Používat čerstvé dávky pufrů
Degradovaná DNA (rozmazání)	Nedostatečná konzervace vzorku nebo degradace stářím	Upravit podmínky štěpení DNA (inkubace při nižším počtu otáček – 500 rpm, snížit teplotu na při prodloužené době štěpení, snížit množství DTT)
Ucpání kolony / žádný průtok	Přenos nestrávených pevných částic	Zajistit správnou centrifugaci po enzymatickém štěpení (>10 000 × g po dobu 3–5 min)
		Použít pipetovací špičky se širokým hrdlem, aby nedošlo k narušení usazeniny
	Nadměrné množství vzorku nebo vysoký obsah lipidů	Snížit množství vstupního materiálu
Inhibice PCR nebo její selhání	Společná extrakce inhibitorů (např. hem, melanin, tuky)	Zvážit předběžné kroky, jako je centrifugace a odstranění tuků
		Provést čištění DNA (např. Zymo PCR Inhibitor Removal Kit, siliková membrána nebo etanolová precipitace)
Inhibice PCR nebo její selhání	Společná extrakce inhibitorů (např. hem, melanin, tuky)	Přidat do reakce BSA nebo PCR enhancery

5. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

5.1 Činidla

- **PPP Master Mix (Top-Bio):** 2× mix obsahující Taq DNA polymerázu, optimalizovaný pufr a nukleotidy (dNTPs). (Lze použít i jiné komerčně dostupné mastermixy nebo jednotlivé PCR složky.)
- **Primery:** Používejte ověřené primery pro DNA barcoding (např. mitochondriální 16S rRNA, cytochrom b nebo COI) s M13¹ příponou nebo bez ní podle potřeby.
- **BSA (hovězí sérový albumin):** Konečná koncentrace 0,1 µg/µl může být přidána u vzorků obsahujících PCR inhibitory (např. kost, kůže, zpracované vzorky).
- **High-fidelity polymeráza:** Pro vzorky s nízkým počtem kopií DNA (např. Q5[®] Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, NEW ENGLAND Biolabs).

5.2 Výběr primerů

Vyhodnocení vzorku a kontextu

- **Kvalita DNA:** degradovaná / zpracovaná / nízký počet kopií vs. střední či vysoká kvalita
- **Předpokládaný taxon (pokud je znám):** savci / ptáci / plazi / obojživelníci / ryby / jeleni / medvědovití / hadi apod.

1. Univerzální screening pomocí 16S (krátký fragment)

- Použit **16S rRNA** (≈200–250 bp; **16SARF / 16SARR**) → nejvhodnější pro degradované či zpracované vzorky nebo vzorky s nízkým obsahem DNA.
- Pokud je shoda jednoznačná → pokračovat k analýze dat (viz kapitola 8).
- Pokud je shoda nejednoznačná nebo má nízké rozlišení → použít univerzální nebo taxon-specifické primery uvedené níže.

¹ Sekvence M13 slouží jako univerzální nasedací místa při sekvenaci Sangerovo metodou. Během počátečních PCR cyklů se na cílovou DNA váže pouze barcodingová část primeru, zatímco M13 se postupně začlení do vznikajícího amplikonu. V následujících cyklech oblast M13 poskytuje jednotné nasedací místo pro sekvenování pomocí univerzálních primerů M13F nebo M13R, což zlepšuje kvalitu čtení a umožňuje jednotné sekvenování napříč různými cílovými oblastmi. Tento přístup je vhodný při amplifikaci více oblastí nebo druhů, s využitím jediného sekvenačního primeru.

2) Univerzální (CytB, COI) a taxon-specifické primery

CytB

- Nejprve univerzální sada **CytB (L14724 / H15149)**; ~500–550 bp).
- Pokud výsledek nemá dostatečné rozlišení, použít taxon-specifické sady CytB podle potřeby:
 - Jelenovití: **Cytb483-F / Cytb3** nebo **Cytb_Cerv / CytoB-B2**
 - Medvědovití / jeseteři: **H15125 / L14851**
 - Ryby: **H15149 + LA5**

COI

- Univerzální **COI (HCO2198 / LCO1490-F)**, ~710 bp) → pro obratlovce.
- Pokud výsledek nemá dostatečné rozlišení, použít taxon-specifické sady COI podle potřeby:
 - Hadi: **COIdeg1 / COIbdeg**
 - Želvy a někteří šupinatí: **R-CO1a / F-CO1f**

Pokud je podezření na plazy/obojživelníky → 16S

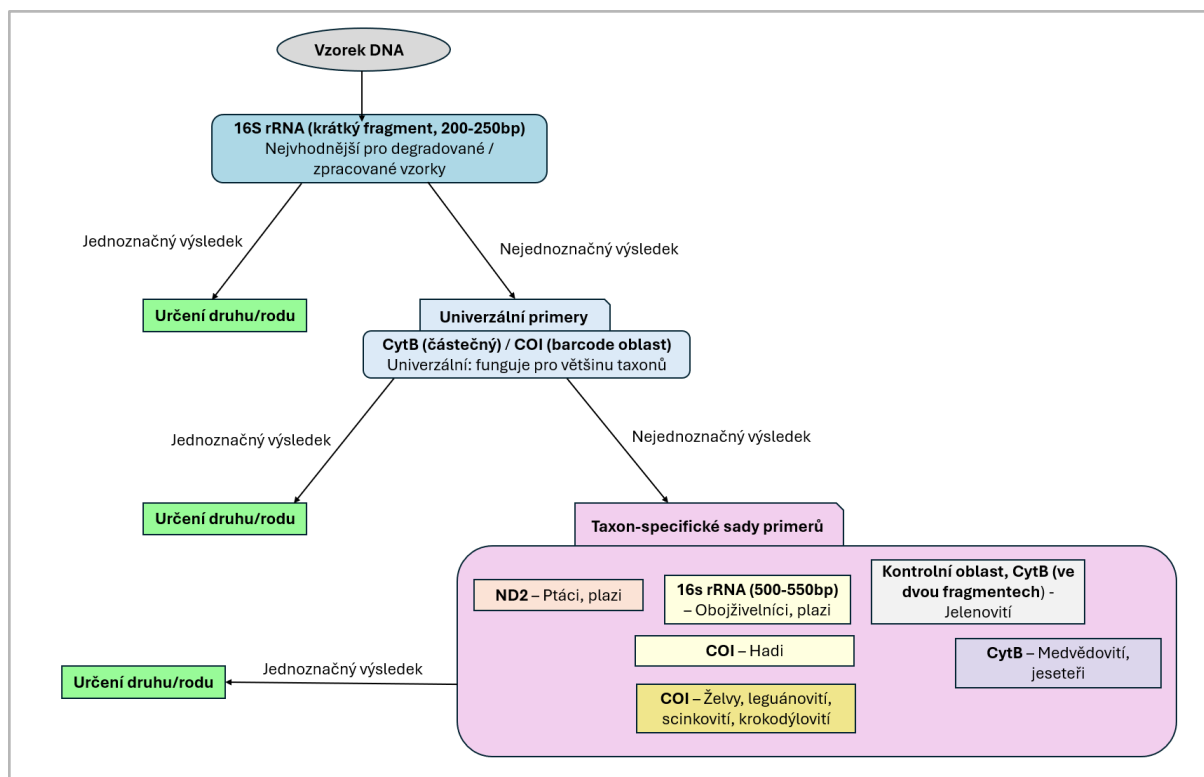
- **16S rRNA** dlouhý fragment (~500–550 bp; 16SrA-L / 16SrB-H) → specifický pouze pro plazy a obojživelníky.

Alternativní lokusy pro vybrané taxony

- **ND2 (L5216 / H5766)**: zejména ptáci a plazi.
- **Kontrolní oblast (D-loop)**: pro rozlišení blízce příbuzných druhů (např. jelenovití).

3) Kontrola kvality a ověřování v každém kroku

- Ověřit procentuální shodu, pokrytí a kvalitu podpůrných metadat (viz 8.5/8.6).
- Pokud skutečný druh není v databázích zastoupen nebo jsou referenční sekvence vzácné či nekonzistentní, uvádět výsledek pouze na nejnižší spolehlivé taxonomické úrovni (často rod) s poznámkou o chybějících datech.



Seznam primerů

Gen	Identifikátor primeru	Sekvence (5'–3')	Velikost amplikonu (bp)	Teplota navázání primeru	Poznámky	Reference
16S rRNA	16SARF	AYA AGA CGA GAA GAC CC	222–252 bp	57 °C	Univerzální; vhodné pro zpracovaný/degradovaný materiál nebo nízký počet kopií DNA	Sarri et al. 2014
	16SARR	GAT TGC GCT GTT ATT CC				
16S rRNA	16SrA-L	CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT	500–550 bp	55 °C	Plazi, obojživelníci a další obratlovci	Vences et al. 2012a
	16SrB-H	CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T				
ND2	L5216	GGC CCA TAC CCC GRA AAT G	500–550 bp	55 °C	Ptáci, plazi	Johnson & Sorenson 1998; Sorenson et al. 1999
	H5766	RGA KGA GAA RGC YAG GAT YTT KCG				
COI	HCO2198	GGT CAA CAA ATC ATA ATA AAG ATA TTG G	710 bp	40 °C	Univerzální; některé taxony plazů	Vences et al. 2012
	LCO1490-F	GGT CAA CAA ATC ATA ATA AAG ATA TTG G				

Gen	Identifikátor primeru	Sekvence (5'–3')	Velikost ampliconu (bp)	Teplota navázání primeru	Poznámky	Reference
COI	COIdeg1	AGC TTC TGA CTN CTA CCA CCN GC	~580bp	56,5–65 °C	Hadi	Vences et al. 2012
	COIbdeg	ATT ATT GTT GCY GCT GTR AAR TAG GCT CG				
COI	R-COIa	AGT ATA AGC GTC TGG GTA GTC	~640bp	45–58 °C	Želvy, leguáni, krokodýli	Vences et al. 2012
	F-COI f	CCT GCA GGA GGA GGA GAY CC				
CytB	H15149	CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A	500–550 bp	50–55 °C	Univerzální (L14724 + H15149)	Kocher et al. 1989; Irwin et al. 1991
	L14724	TgA TAT gAA AAA CCA TCg TTg T				
	LA5	GAC CAA CAT CCG AAA AAC AC		55 °C	Ryby (H15149 + LA5)	

Gen	Identifikátor primeru	Sekvence (5'–3')	Velikost ampliconu (bp)	Teplota navázání primeru	Poznámky	Reference
CytB	H15125	AGT ACA TAT CCT AGC AAG GC	300–350 bp	55 °C	Medvědovití, jeseteři	Brown et al. 1989
	L14851	GTG TGA TGA AAT TTT GGC TC				
Kontrolní úsek (D-loop)	H-Phe	GGG AGA CTC ATC TAG GCA TTT TCA GTG	~500bp	60 °C	Jelenovití	Lorenzini & Garofalo 2015
	CST2	TAA TAT ACT GGT CTT GTA AAC C				
CytB	Cytb483-F	GAC TAA TGA TAT GAA AAA CCA TCG TTG	~450bp	55 °C	Jelenovití	
	Cytb3	GGG TGT TCD ACT GGY TGB CCY CC				
CytB	Cytb_Cerv	CTT TCC ACT TTA TTC TCC CAT TTA TC		55 °C	Jelenovití	
	CytoB-B2	GGA GGT TGG TAG CTC TCC TTT T				

Gen	Identifikátor primeru	Sekvence (5'–3')	Velikost ampliconu (bp)	Teplota navázání primeru	Poznámky	Reference
M13	M13F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT			Sekvenovací oblast	Messing 1983
	M13R	CAG GAA ACA GCT ATG ACC				

5.3 Příprava PCR (celkový objem 25 µl)

Složka	Objem (µl)	Konečná koncentrace
PPP Master Mix (2×)	12,5	1× PPP Master Mix (75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,01 % Tween 20, 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP, 2,5 U Taq Purple DNA polymerázy, stabilizátory a aditiva)
Forward primer (10 µM)	1,0	0,1–1 µM (~20 nukleotidů)
Reverse primer (10 µM)	1,0	0,1–1 µM (~20 nukleotidů)
BSA (10 mg/ml) [volitelně]	0,4	0,1 µg/µl
DNA templát	1,0–2,0	1–10 ng/µl (genomová DNA)
Beznukleázová voda	do celkového množství 25 µl	—

Poznámka: Jemně promíchejte a krátce odstředte před vložením do termocykleru.

5.4 Nastavení termocykleru (obecné parametry)

Krok	Teplota	Doba	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94 °C	1 min	1
Denaturace	94 °C	15 s	25–35
Navázání primeru	50–58 °C	15 s (upravit podle typu primerů)	
Extenze	72 °C	1 min/kb	
Konečná extenze	72 °C	7 min	1
Ukončení reakce	4 °C	∞	—

5.5 Kontroly

- **Reagent Blank (RB):** Sleduje kontaminaci činidel pro extrakci.
- **Negativní kontrola:** PCR bez přidané DNA, používaná pro kontrolu kontaminace v PCR činidlech.
- **Pozitivní kontrola:** přidána DNA již analyzovaného druhu, potvrzuje funkčnost činidel a podmínky amplifikace.

5.6 Řešení problémů

Problém	Možná příčina	Doporučené řešení
Žádná amplifikace	Přítomnost inhibitorů v DNA	Přidat BSA, nebo DNA 1:10 zředit a opakovat, případně přechistit DNA
	Nízká koncentrace DNA	Zvýšit objem DNA (pokud je k dispozici)
		Použít nested PCR nebo zvýšit počet cyklů
	Nevhodná teplota navázání primeru	Upravit ± 2 °C podle typu primerů
Nespecifické fragmenty	Nízká specificita primerů / příliš nízká teplota navázání	Zvýšit teplotu navázání / použít gradient PCR pro zjištění optimální teploty navázání
		Optimalizovat koncentraci primerů nebo navrhnout nové primery
Rozmazání (smearing)	Nadbytek DNA / degradovaná DNA	Snížit množství DNA
		Zlepšit kvalitu DNA (např. silikové čištění)
		Použít High-fidelity polymerázy
Primer-dimery	Nadbytek primerů / nízká teplota navázání	Snížit koncentraci primerů
		Zvýšit teplotu navázání, případně navrhnout nové primery

Problém	Možná příčina	Doporučené řešení
Slabé nebo nevýrazné fragmenty	Nevhodné podmínky reakce / degradace činidel	Prodloužit dobu extenze
		Ověřit aktivitu enzymu a čerstvost pufru

6. Gelová elektroforéza a čištění PCR produktů

6.1 Příprava gelu a elektroforéza

- **Koncentrace agarózy:** Připravte 1,5% agarózový gel v 1× TAE nebo TBE pufru. Tato koncentrace je vhodná pro rozlišení DNA fragmentů o velikosti 200–1000 bp (běžně se vyskytující u PCR pro DNA barcoding).
- **Volba barviva do gelu pro vizualizaci DNA:** Zvolte jedno z následujících interkalačních barviv:
 - **Ethidium bromid (EtBr):** Přidat do neztuhlého gelu v koncentraci 0,5 µg/ml (zacházet opatrně, karcinogenní).
 - **SYBR Safe nebo GelRed:** Bezpečnější alternativy. Přidat přímo do gelu nebo použít pro barvení po elektroforéze dle návodu výrobce.
- **Barvivo pro PCR produkt (loading dye):** Smíchejte PCR produkt s 6× barvivem v poměru 5:1 před pipetováním do gelu. Pomáhá sledovat migraci DNA a správné ponoření vzorku.
- **Molekulární žebřík:** Použijte vhodný DNA žebřík k odhadu velikosti fragmentů. Ujistěte se, že očekávaná velikost amplikonu (např. ~250 bp pro 16S rRNA) je jasně rozlišitelná.
- **Podmínky elektroforézy:**
 - Proved'te při napětí 90–120 V po dobu cca 30–45 minut nebo dokud barvivo nedosáhne dvou třetin gelu.
 - Vizualizujte DNA pomocí UV nebo modrého světla podle použitého interkalačního barviva.
- **Kontrola fragmentů:** Ověřte, že amplifikovaný fragment odpovídá očekávané velikosti a je minimalizováno pozadí nebo rozmazání.

6.2 Čištění PCR produktů

A. Čištění PCR produktů bez gelu

- Použijte, pokud je amplifikace specifická a čistá (jediný fragment, žádné primer-dimery).
- **Doporučené sady:**
 - GeneAid GenepHlow™ PCR Cleanup Kit
 - Macherey-Nagel NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up
 - Qiagen QIAquick® PCR Purification Kit

- **Shrnutí postupu:**

- Přidejte vazebný pufr k PCR produktu dle instrukcí kitu (obvykle poměr 5:1).
- Navázanou DNA na silikagelovou kolonu omyjte etanolovým pufrem.
- Eluujte DNA v 30–50 µl beznukleázové vody nebo elučního pufru.

B. Extrakce z gelu (pokud jsou přítomny nespecifické produkty)

- Použijte, pokud se zobrazí více fragmentů nebo primer-dimery.
- **Postup:**
 - Vyřízněte požadovaný fragment čistým skalpelem nebo nožem pod UV/modrým světlem.
 - Vyhněte se vystavení dlouhému UV záření, aby nedošlo k poškození DNA.
 - Odvažte gelový kousek a pokračujte extrakcí z gelu se stejnými komerčními sadami (viz výše).
 - Eluujte do 30–40 µl elučního pufru nebo beznukleázové vody.

6.3 Poznámky a doporučené postupy

- Vždy používejte čisté špičky a rukavice, aby nedošlo ke kontaminaci.
- Uložte obrázky gelu pro každou PCR várku a označte jamky názvem vzorku pro budoucí porovnání.
- Pokud používáte SYBR Safe nebo GelRed, preferujte modré světlo, aby nedošlo k poškození DNA.
- Eluovanou DNA lze přímo použít pro Sangerovo sekvenování nebo opětovnou amplifikaci, pokud je to potřeba.

7. Sekvenace DNA a zpracování dat

7.1 Sekvenační reakce

Pro účely DNA barcodingu je doporučena Sangerova sekvenace (kapilární elektroforéza), a to kvůli své spolehlivosti a délce čtení (~600–900 bp).

Odeslání vzorků do sekvenační laboratoře:

- Odesílejte purifikované PCR produkty (ideálně 10–20 ng/μl) v beznukleázové vodě.
- Vzorky musí být jasně označeny a předány spolu se správným formulářem (pokud je vyžadován poskytovatelem služby).

Velikost amplikonu	Potřebné množství DNA pro Sangerovu reakci (na 1 reakci)
100–300 bp	5–10 ng
300–500 bp	10–20 ng
500–1000 bp	20–50 ng

Použití primerů:

- Pro první sekvenační běh použijte **forward primer**.
- Pokud je kvalita čtení nízká nebo jsou některé oblasti nejednoznačné, proveďte další sekvenaci s použitím **reverse primeru**.
- Pokud byly pro amplifikaci použity primery s M13 příponou, při sekvenaci použijte univerzální primery **M13F** a **M13R** místo genově specifických primerů.

Tip: Pro sekvenaci používejte pouze primery vysoké čistoty (HPLC nebo PAGE), abyste se vyhnuli smíšeným signálům.

Typ primeru	Potřebné množství pro Sangerovu reakci
Forward/Reverse	3,2–10 pmol (typicky 5 pmol)

7.2 Kontrola kvality sekvencí a zpracování

Prohlížení chromatogramů:

Pro vizualizaci a hodnocení chromatogramů (.ab1 soubory) lze použít:

- **Geneious Prime** (komerční, plně vybavený)
- **SnapGene Viewer** (zdarma, omezené funkce)
- **FinchTV** (zdarma, jednoduchý prohlížeč chromatogramů)

Ořezávání a sestavení konsenzu:

- Ořežte oblasti s nízkou kvalitou manuálně nebo podle nastavených prahů (např. Phred score <20).
- Zkontrolujte chromatogram na přítomnost dvojitých píků, artefaktů barviv či chybné přiřazení bází – případně je opravte ručně.
- Při použití obousměrného čtení:
 - Zarovnejte forward a reverse sekvence, opravte nesoulady a vytvořte konsenzuální sekvenci.
 - Pro ověření použijte zarovnávací nástroje (alignment) v Geneious nebo externí software (MEGA, AliView, BioEdit).

Export a správa souborů:

- Exportujte upravenou finální sekvenci do FASTA souboru (.fasta/.fa).
- Uchovejte surový chromatogram (.ab1), zarovnanou/upravenou sekvenci a případně souhrn kvality čtení (užitečné pro dohledatelnost).
- Používejte jasné názvy (např. *SampleID_COI_consensus.fasta*) pro usnadnění následné analýzy.

8. Analýza dat a taxonomická identifikace

8.1 Nástroje a zdroje

Pro taxonomické přiřazení DNA sekvencí využijte následující veřejné databáze:

- [NCBI BLASTn](#) Pro porovnání sekvencí s databází GenBank na základě podobnosti.
- [BOLD Identification Engine](#) Pro identifikaci založenou na DNA barcodingu při práci s COI a dalšími barcodingovými markery.

8.2 Kvalita sekvencí a příprava před BLASTováním

Před nahráním sekvencí k taxonomickému porovnání (BLAST):

- Odstraňte netemplátové ohraničující oblasti (např. primery, adaptéry).
- Ujistěte se, že sekvence neobsahuje nejednoznačné báze, pokud to není biologicky zdůvodněné (např. heteroplazmie).
- U kódujících genů proveďte translaci, abyste ověřili nepřítomnost předčasných stop kodonů.
- Používejte pouze sekvence, které splňují definovaná kritéria kvality (např. délka čtení, Phred score).

8.3 Interpretace výsledků BLASTu

% identity	Úroveň jistoty	Doporučené taxonomické rozlišení
≥99 %	Velmi vysoká	Identifikace na úroveň druhu (pokud jsou splněna i další kritéria)
98–98,9 %	Vysoká	Úroveň druhu, pokud je podpořena metadaty nebo fylogenezí
90,1–97,9 %	Střední	Úroveň rodu nebo blízkých druhů; zvážit použití dalších lokusů
<90 %	Nízká	Přiřadit pouze na úroveň čeledi nebo vyšší

Poznámka: Procentuální shoda a e-value musí být posuzovány spolu s rozsahem shody zadané sekvence, délkou zarovnání a kvalitou metadat.

8.4 Potvrzení a křížová kontrola

- Nespoléhejte pouze na první shodu v BLASTu. Posuďte konzistenci všech hlavních shod.
- Vylučte shody se záznamy označenými jako environmentální vzorky, sekvence nízké kvality (např. „WGS“, „NGS“, „library“) nebo s neočekávanou taxonomií.
- Zkontrolujte anomální odlehle hodnoty (např. jedna shoda s nesouvisejícím taxonem mezi jinak konzistentními výsledky).

8.5 Hodnocení kvality referenční sekvence (podle OSAC 2021-S-0006)

Sekvence může být považována za vysoce spolehlivou (zejména pro identifikaci na úroveň druhu), pokud splňuje alespoň jedno z následujících kritérií:

- Pochází z ověřeného exempláře s jedinečným identifikátorem.
- Je součástí recenzované studie s morfologickou identifikací potvrzenou odborníkem.
- Je zahrnuta v populační genetické nebo fylogenetické studii, která poskytuje kontext mezidruhové a vnitrodruhové variability.
- Vyazuje fylogenetickou shodu ve fylogenetických analýzách s očekávanou topologií.

Buďte obezřetní při práci se sekvencemi z databáze GenBank, které postrádají zdrojová metadata nebo pocházejí z nepublikovaných/neověřených studií.

8.6 Doporučení pro zveřejňování výsledků

Identifikace na úrovni druhu je vhodná, pokud:

- Sekvence vyazuje ≥ 99 % shody a ≥ 95 % pokrytí rozsahu shody.
- Referenční shody splňují alespoň dvě kritéria metadat (viz 8.5).
- Taxonomické přiřazení je v souladu se známým rozšířením druhu a fylogenetickými vztahy.

Identifikace na úrovni rodu nebo čeledi je doporučena, pokud:

- Nejlepší shody jsou konzistentní v rámci jednoho rodu, ale rozlišení na úroveň druhu je různé.
- Shoda je pod 99 % nebo referenční metadata nejsou úplná.

Chybějící data:

- Pokud skutečný druh není v databázi zastoupen, může nejlepší dostupná shoda nesprávně naznačovat jiný, avšak příbuzný druh. V takových případech je vhodné výsledky konzervativně uvést na úrovni rodu nebo vyšší taxonomické kategorie, s poznámkou, že daný druh může v aktuální databázi chybět.
- Je třeba počítat s možnými chybami nebo nesprávně určenými záznamy v databázích, zejména tehdy, když pro daný taxon existuje pouze omezené množství referenčního materiálu.
- Pokud jsou získány rozporné výsledky nebo výsledky s nízkou spolehlivostí, měla by být identifikace omezena na nejnižší spolehlivou taxonomickou úroveň, namísto rizika nesprávného určení druhu.

8.7 Další hlediska

- Ekologický a geografický kontext musí podporovat molekulární identifikaci (např. areál druhu se musí překrývat s původem zabaveného materiálu).
- Zvažte možnost smíšených DNA ve vzorcích s nízkou koncentrací nebo v degradovaných vzorcích.
- V případě komplexních nebo nejednoznačných výsledků zvažte sekvenaci dalšího lokusu nebo provedení fylogenetické analýzy.

9. Kontrola kvality a dokumentace

- Zaznamenávejte čísla šarží kitů, primerů a enzymů.
- Udržujte záznam o řetězci předávání vzorků (chain-of-custody log).
- Pro pre-PCR a post-PCR práci používejte oddělené prostory, abyste předešli kontaminaci.
- Dokumentujte nepovedené reakce a analýzy, opakované kroky a odchylky od standardních postupů.

Dodatky

Alternativní protokoly:

Dekalcifikace a štěpení kostních a zubních vzorků pro izolaci DNA:

Metoda 1 (Ewart et al. 2020)

Kostní/zubní prášek (~200 mg) se dekalcičuje pomocí 0,5 M EDTA (pH 8,0).

Rychlý protokol:

- Inkubace v termo-třepačce při 56 °C po dobu 1 h, následně při 37 °C po dobu 1 h, protřepávání na 550 rpm.
- EDTA se vyměňuje každou hodinu.
- Vzniklá usazenina se použije pro izolaci DNA.

Třídenní protokol:

- Inkubace při 4 °C po dobu 3 dnů, protřepávání na 400 rpm.
- EDTA se mění denně.

Metoda 2 (Hasan et al. 2014)

Příprava vzorku

- **Kost:** nakrájet na ~0,5 cm² velké kousky pomocí pitevní pily.
- **Zub:** ponechat celý (~2,0 g).
- Každý vzorek připravit zvlášť za použití sterilních jednorázových nástrojů v izolovaném prostoru.

Dekalcifikace

- Vložit 1–2 g kostních kousků nebo celý zub do 50ml Falcon zkumavky s 10 ml 0,5 M EDTA (pH 7,5).
- Inkubovat při pokojové teplotě v termo-třepačce.
- Roztok EDTA měnit každých 24 hodin.
- Pokračovat, dokud vzorek nezměkne a nestane se poddajným (obvykle 12–15 dnů v závislosti na obsahu minerálů).

Lýze

- Po úplné dekalifikaci inkubovat vzorek přes noc při 56 °C na termotřepačce v:

700 µl lyzačního pufru:

- 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 10 mM EDTA
- 10 mM NaCl
- 2% SDS
- Proteináza K (20 mg/ml)

Materiál pro izolaci DNA: Přenést 500 µl naštěpeného vzorku do 1,5ml mikrozkušavky pro následnou izolaci DNA.

Běžné laboratorní roztoky

1× TBE pufr (Tris–Borát–EDTA)

Konečné koncentrace (1× TBE):

- Tris base: 89 mM
- Kyselina boritá: 89 mM
- EDTA (disodná sůl): 2 mM
- pH: ~8,3 (úprava většinou není nutná)

Příprava 1 litru (1 L) 1× TBE: Ředí se z 10× zásobního roztoku (doporučený pro laboratorní použití).

10× TBE zásobní roztok (1 L):

- Tris base: 108 g
- Kyselina boritá: 55 g
- EDTA disodná sůl ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 7,44 g

Rozpusťte ve ~800 ml destilované vody, případně upravte pH na 8,3 a doplňte na 1 l. Dále zřed'te 100 ml 10× TBE 900 ml destilované vody pro výrobu 1 l 1× TBE.

0,5% SDS (dodecylsulfát sodný)

Roztok 0,5% SDS (w/v):

- 0,5 g SDS prášku
- Destilovaná voda do konečného objemu 100 ml

Postup:

1. Odvažte 0,5 g SDS prášku.
2. Přidejte do ~80 ml teplé destilované vody (40–50 °C usnadňuje rozpouštění).
3. Jemně míchejte, dokud se zcela nerozpustí (vyhněte se pění).
4. Doplňte do 100 ml destilovanou vodou.
5. Skladujte při pokojové teplotě nebo v chladu (4 °C). Pokud se vytvoří sraženina, roztok před použitím jemně zahřejte.

0,5 M EDTA (pH 8,0)

Na 1 L roztoku:

- EDTA disodná sůl dihydrát ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 186,1 g
- Destilovaná voda: ~800 ml pro začátek
- NaOH pelety nebo 10N NaOH: k úpravě pH na 8,0
- Konečný objem: až 1 L destilované vody

Postup:

1. Odvažte 186,1 g EDTA.
2. Rozpusťte ve ~800 ml destilované vody.
3. EDTA se začne rozpouštět až po zvýšení pH na ~8,0.
4. Pomalu přidávejte pelety nebo roztok NaOH - po kapkách za míchání, dokud pH nedosáhne 8,0 (obvykle 20–25 ml 10N NaOH).
5. Po úplném rozpuštění doplňte na 1 l destilovanou vodou.
6. Sterilizujte autoklávem nebo sterilní filtrací.
7. Označte názvem a skladujte při pokojové teplotě.

1× GTE pufr

Konečné koncentrace:

- Glycin: 100 mM → 7,51 g
- Tris-HCl (pH 8,0): 10 mM → 1,21 g
- EDTA disodná sůl ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 1 mM → 0,372 g

Postup:

1. V ~800 ml destilované vody rozpust'ete: 7,51 g glycinu, 1,21 g Tris-HCl a 0,372 g EDTA.
2. Zkontrolujte a případně zvyšte pH (mělo by být blízko 8,0).
3. Dopln'ete na 1 l destilovanou vodou.
4. Podle potřeby sterilizujte (obvykle filtrací).

1 M DTT (dithiotreitol)

Na 10 ml roztoku:

- DTT prášek (MW = 154,25 g/mol): 1,54 g
- Destilovaná voda: do 10 ml

Postup:

1. Odvažte 1,54 g DTT.
2. Rozpus't'ete v ~8 ml studené destilované vody.
3. Dopln'ete na 10 ml.
4. Dávkujte do malých objemů (100–500 μl), abyste předešli opakovanému zmrazování a rozmrazování.
5. Uchovávejte při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, v dobře uzavřených zkumavkách (DTT je citlivé na světlo a vzduch).

Poznámky:

- DTT je nestabilní v roztoku, zejména při pokojové teplotě a na vzduchu.
- Vždy připravujte čerstvý roztok nebo použijte rozmraženou dávku, zbytek znovu nezmrazujte, ale bezpečně zlikvidujte.
- Používejte rukavice – DTT má výrazný sirný zápach a je dráždivý.

Reference

- Brown JR, Gilbert TL, Kowbel DJ, O'Hara PJ, Buroker NE, Beckenbach AT, Smith MJ. 1989. Nucleotide sequence of the apocytochrome B gene in white sturgeon mitochondrial DNA. *Nucleic acids research* 17:4389.
- Campos PF, Gilbert TMP. 2011. DNA extraction from keratin and chitin. Pages 43–49 *Ancient DNA: methods and protocols*.
- Černá Bolfíková B, Černý J, Matějů P, Bernáthová I, Shanthakrishnan D, Jankovská I, Sehnal R, Modrá T, Modrý D, Langrová I. 2024. Metodologie pro odběry, biologickou bezpečnost a archivaci biologického materiálu ze zvířat zadrženého v rámci ilegálního obchodu pro účely forenzních analýz. Česká zemědělská univerzita v Praze. Certifikovaná metodika, evid. č. GŘC 01/2024.
- Ewart KM, Lightson AL, Sitam FT, Rovie-Ryan JJ, Mather N, McEwing R. 2020. Expediting the sampling, decalcification, and forensic DNA analysis of large elephant ivory seizures to aid investigations and prosecutions. *Forensic Science International: Genetics* 44:102187.
- Hasan MM, Hossain T, Majumder AK, Momtaz P, Sharmin T, Sufian A, Akhteruzzaman S. 2014. An efficient DNA extraction method from bone and tooth samples by complete demineralization followed by the use of silica-based columns. *Dhaka University Journal of Biological Sciences* 23:101–107.
- Hebenstreitova K, Salaba O, Trubac J, Kufnerova J, Vanek D. 2024. The Influence of Tanning Chemical Agents on DNA Degradation: A Robust Procedure for the Analysis of Tanned Animal Hide—A Pilot Study. *Life* 14:147.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of molecular evolution* 32:128–144.
- Johnson KP, Sorenson MD. 1998. Comparing molecular evolution in two mitochondrial protein coding genes (cytochrome b and ND2) in the dabbling ducks (Tribe: Anatini). *Molecular phylogenetics and evolution* 10:82–94.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards S V, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:6196–6200.
- Lorenzini R, Garofalo L. 2015. Insights into the evolutionary history of *Cervus* (Cervidae, tribe Cervini) based on Bayesian analysis of mitochondrial marker sequences, with first indications for a new species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 53:340–349.
- Messing J 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology* 101:20–78.

- Sarri C, Stamatis C, Sarafidou T, Galara I, Godosopoulos V, Kolovos M, Liakou C, Tastsoglou S, Mamuris Z. 2014. A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. *Food Control* 43:35–41.
- Sorenson MD, Ast JC, Dimcheff DE, Yuri T, Mindell DP. 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular phylogenetics and evolution* 12:105–114.
- Vences M, Nagy ZT, Sonet G, Verheyen E. 2012a. DNA barcoding amphibians and reptiles. *DNA barcodes: methods and protocols*:79–107.
- Vences M, Nagy ZT, Sonet G, Verheyen E. 2012b. DNA barcoding amphibians and reptiles. *DNA barcodes: methods and protocols*:79–107.
- Yang DY, Eng B, Wayne JS, Dудар JC, Saunders SR. 1998. Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists* 105:539–543.



Pomáhat a chránit

POLICEJNÍ PREZIDIUM ČESKÉ REPUBLIKY

Osvědčení

o uznání certifikované metodiky

vydané v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací
a hodnocení programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací

Název metodiky:	Forenzně analytické metody pro účely určení živočišného druhu u biologického materiálu získaného ze zvířat (obratlovců) nebo jejich částí
Autor/autorský kolektiv:	Barbora Černá Bolfíková, Divyadharshini Shanthakrishnan, Petr Matějů, Juliana Walterová, Iva Bernáthová, Miroslav Mulko, Richard Sehnal, Jiří Černý
Žadatel (příjemce podpory):	Česká zemědělská univerzita v Praze
Projekt/program:	Metodologie identifikace a dalších forenzních analýz biologického materiálu a patogenů z volně žijících a exotických živočichů v rámci programu 1.VS OPSEC, bezpečnosti výzkum Ministerstva vnitra číslo VK01010103

Schváleno pod č. j.:
PPR-57757-4/ČJ-2025-990540

Evidenční číslo osvědčení: 20/2025

V Praze

genpor. Mgr. Martin VONDŘÁŠEK
policejní prezident



**Metodologie identifikace a dalších forenzních analýz
biologického materiálu a patogenů z volně žijících a
exotických živočichů.**

Poskytovatel podpory:	MINISTERSTVO VNITRA
Program:	VK – Otevřené výzvy v bezpečnostním výzkumu 2023-2029
Funding sub-programme identification:	Podprogram 1 - Rozvoj schopností vymáhání práva
Veřejná soutěž:	1. veřejná soutěž programu OPSEC
Doba řešení:	01/2023 – 12/2026
Stupeň důvěrnosti údajů:	S – Úplné a pravdivé údaje o projektu nepodléhající ochraně podle zvláštních právních předpisů.
Hlavní příjemce:	Česká zemědělská univerzita v Praze
Řešitel:	prof. Ing. Iva Langrová CSc.

Název: Forenzně analytické metody pro účely určení živočišného druhu u biologického materiálu získaného ze zvířat (obratlovců) nebo jejich částí

Certifikovaná metodika

Autor: Barbora Černá Bolfíková, Divyadharshini Shanthakrishnan, Petr Matějů, Juliana Walterová, Iva Bernáthová, Miroslav Mulko, Richard Sehnal, Jiří Černý

Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze

Adresa vydavatele: Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, Praha–Suchbát, 16500

Pořadí vydání: 1.

Rok vydání: 2025

ISBN 978-80-213-3523-3

Náklad: on line

Určeno: pro odbornou veřejnost

Povoleno: děkanátem FAPPZ ČZU v Praze

Počet stran: 41

Vydala Česká zemědělská univerzita ve svém nakladatelství