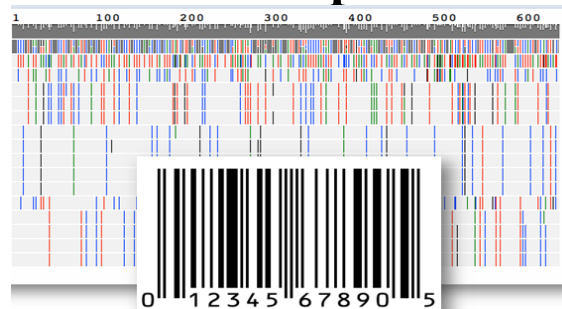
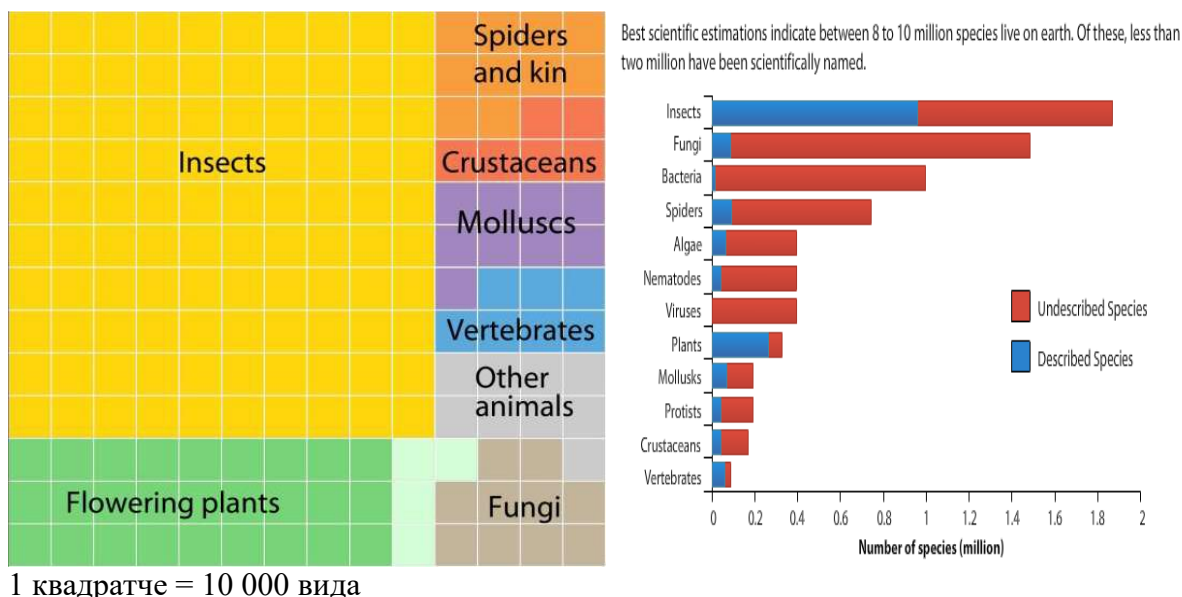


ДНК баркодинга като най- новият метод за таксономично определяне на компетентни вектори



Едно от забележителните постижения на съвременната биология и молекулярните методи за диагностика е разработването на точни и надеждни технологии за бърз скрининг на вариациите на ДНК последователността. Молекулярната идентификация и ДНК баркодирането е сравнително нов таксономичен метод, който може да се използва за идентифициране на даден вид, включително и неизвестен. Могат да бъдат диференцирани близкородствени видове или неизвестни такива. ДНК баркодирането е стандартизиран подход за идентифициране на растения и животни чрез минимални последователности на ДНК, наречени ДНК баркодове. Методите, основаващи се на ДНК идентификация на видовете, могат да се прилагат на всички етапи от живота, включително при стари или повредени проби, както и при обработени проби (Sperling et al., 1994; Wells and Stevens 2008). Има много опити да се използват молекулярни таксономични техники за идентификация на насекоми с добри резултати, публикувани от Xiang и Kochar, 1991; Kambhampati, 1995; Tang et al., 1996.

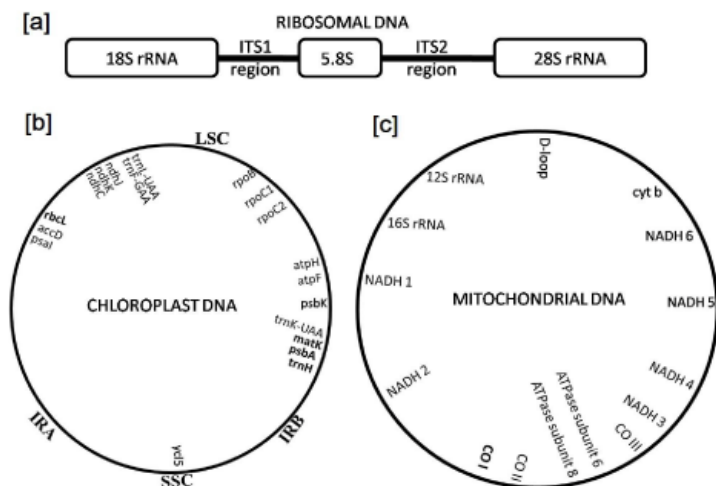
Секвенирането на ДНК е далеч по-информативна и полезна техника в сравнение с други молекулярни методи (за идентификация и за изучаване на междуспецифични и интраспецифични вариации). Този метод е много полезен при идентифициране и класифициране на най-голямата и недобре проучена група - насекомите. Това ново направление в молекулярната диагностика би могло да бъде внедрено в много направления – например при граничния контрол на храните, при инспекция качеството и състава на храните и идентифициране на търговски продукти (билкови добавки, дърво, кожи и хранителни продукти от животински или растителен вид). ДНК баркодинга може да бъде приложен за детекция на добавки и заместители в състава на храните и откриване на търговски и производствени измами. Друго приложение на ДНК баркодинга е например изследване на хранителните навици на даден вид животно въз основа на съдържанието на стомаха или изпражненията, или изследване на популациите от даден вид, гъстотата, сезонната динамика и териториалното им разпределение.



Фиг. 1: Голямото предизвикателство: около 10 млн вида съществуват, а едва 2 млн от тях са таксономично идентифицирани и описани

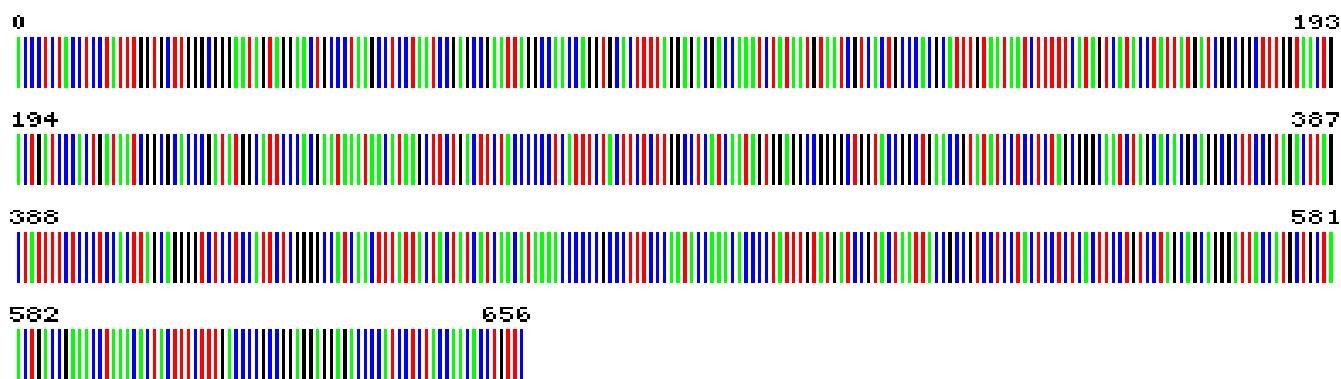
Създател на ДНК баркодинга е Paul D.N. Hebert и колектив от Университета в Гелф, Онтарио, Канада. Хеберт и неговите колеги демонстрират ползата от гена, кодиращ цитохром С оксидаза I (COI), използван за първи път от Folmer et al. през 1994 г. (в анализа са включени публикуваните от Хеберт ДНК праймери като инструмент за филогенетичен анализ на видово ниво).

Като цяло ДНК баркодът е кратка последователност от гени, които са част от митохондриалната ДНК, която се използва за идентифициране на видове. Тази стандартизирана къса последователност на ДНК е от порядъка на 400–800 bp, които трябва да бъдат лесно генерирани и така да бъдат характеризирани всички видове на планетата.



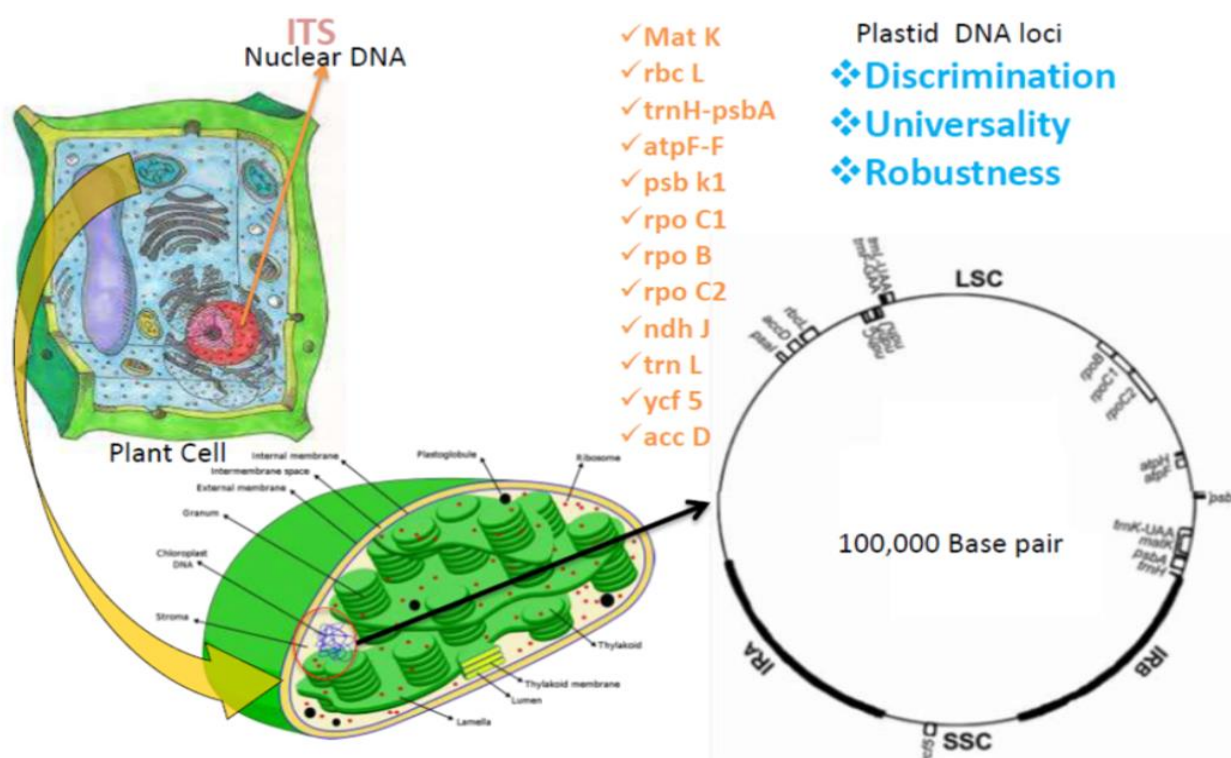
Фиг. 2: Специфични локуси от хлоропласт/ митохондриална ДНК, участващи в баркодинга

ДНК баркодът за животинските видове най-често включва локуси, намиращи се в mtДНК и в общият случай е фрагмент от 658 базови двойки от гена, кодиращ цитохромоксидаза I (COI или COX1).



Фиг. 3: схематично представен баркод от 656 bp на гена, кодиращ цитохромоксидаза 1

При растенията локусите, които най-често биват използвани при баркодиране са: MAT K, rbc L, trnH-psbA, ATP F-F, psb k1, rpo C1, rpo B, rpo C2, ndh j, trn L, jcf 5, acc D.



Фиг. 4: Схематично представени локуси при растенията, които участват в баркодинга

Не е съвпадение, че ДНК кодирането е разработено съвместно с изследванията, основани на геномиката. ДНК баркодирането и геномиката споделят една крайна цел, а именно мащабното събиране на генетични данни, което предлага нови отговори на въпроси, които досега са извън обхвата на традиционните дисциплини. Огромна онлайн база данни на баркодовете служи като стандарт, към който може да бъде причислена последователността на ДНК баркода на неидентифицирана проба. Подобно на геномиката, ДНК баркодирането ще позволи да се категоризират познатите видове и да се определя таксономичната принадлежност на видове, които все още предстои да бъдат открити в природата. Една от целите на ДНК баркодирането е да се използва информацията на един или няколко генни региона за таксономично определяне на компетентни вектори, преносители на различни заболявания при животни и хора.

„Глобалната система за биоидентифициране“, наречена така от Hebert et al., се управлява чрез базата данни Barcode of Life Data Systems (BOLD), която по данни от месец юни 2017 г. съдържа почти 5 500 000 генерирани баркодове на над 265 000 вида животни, растения и гъби. Системата BOLD е уеб базирана работна среда и база данни, обхващаща генерирането, съхранението, анализа и публикуването на ДНК баркодове и може да служи като референтна библиотека за ДНК баркодове. BOLD е най-видимо използваният софтуер за баркодирание и е свободно достъпен за всеки изследовател с интереси в тази област.



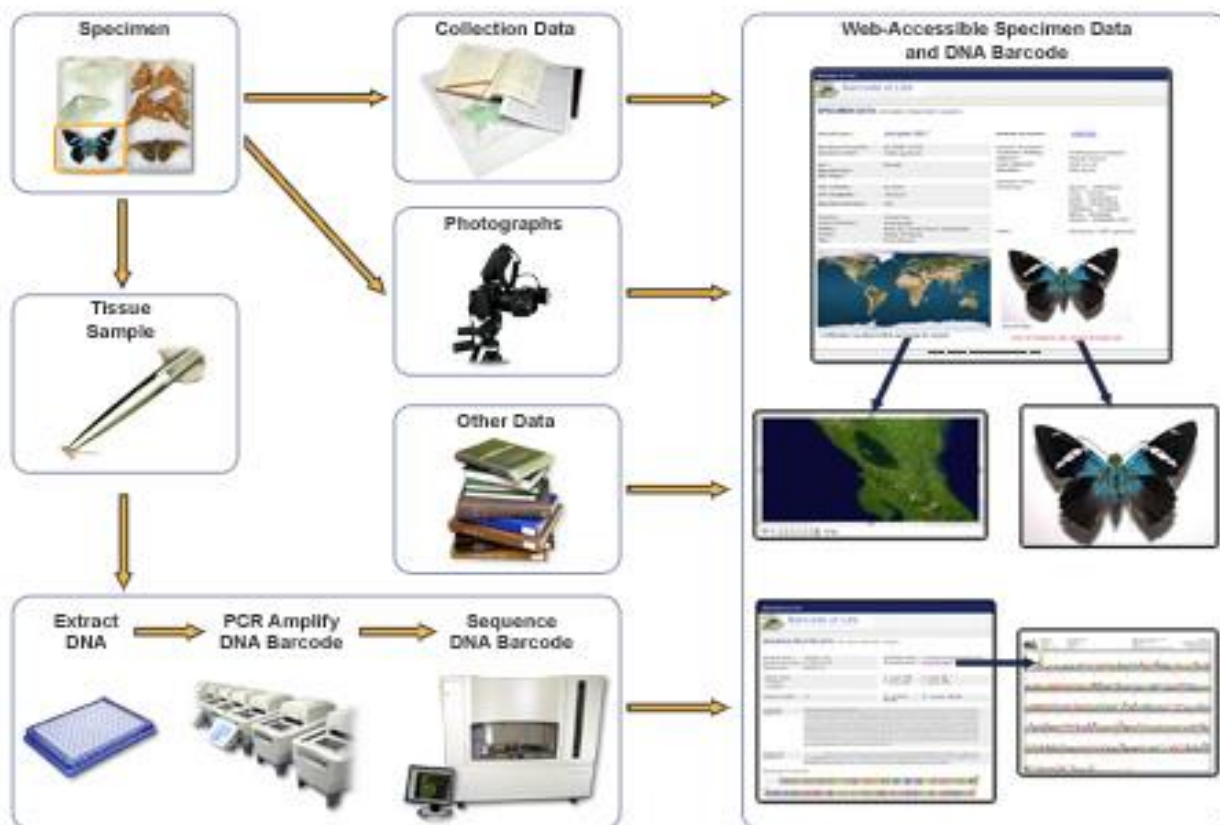
Фиг. 5: Последни данни от системата за броя генерирани баркодове към 01.2019г.

Консорциумът, който отговаря за платформата BOLD (CBOL) стартира през май 2004 г. и сега включва повече от 120 организации от 45 държави. CBOL насърчава развитието на международните изследователски съюзи, натоварени с нелеката задача да изградят през следващите 20 години онлайн баркод библиотека за всички еукариоти. Баркод библиотеката на животинското царство ще бъде много по-голяма, около 100 милиона записи - почти два пъти повече от сегашния размер на GenBank (52 милиона записани последователности към 7 март 2006 г.). Платформата BOLD - www.barcodinglife.org - поддържа всички фази на аналитичния път от събирането на пробите до строго валидирана библиотека с генерирани баркодове.

BOLD платформата е написана на Java, C ++ и PHP. Тя работи в Linux среда с всички данни, които се намират в релационна база данни PostgreSQL (www.postgresql.org). BOLD платформата е на разположение на адрес: www.barcodinglife.org.

Процесът на ДНК баркодинг включва два основни етапа:

1. Събиране на база данни от баркодове на таксономично познати видове, които да служат като референтни.
2. Съпоставяне на референтните ДНК баркодове на видовете от базата данни с такива, които са неидентифицирани или са непознати видове животни, растения и други организми.

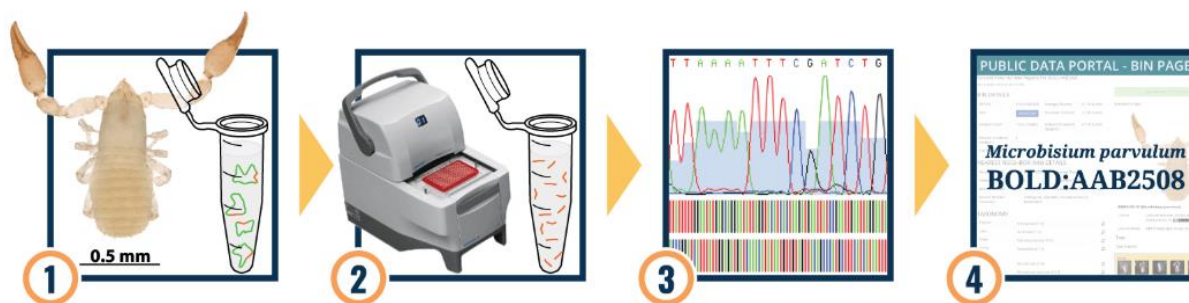


Фиг. 6: Схематично представен процес по генериране на баркод

Първият етап включва таксономична експертиза при избора на няколко индивида от вид, служещи като еталонни проби в базата данни с ДНК баркодове. Тези проби могат да бъдат взети както от хербарии и музейни експонати, така и от живи животни и растения на терен. След като референтната библиотека за ДНК баркодове е подготвена за изследваните организми, независимо дали е включена информация за географския регион, от който са събрани, таксономична група или целева група (например, лечебни растения, дървесни видове и т.н.), тогава ДНК баркодовете, генерирани за неидентифицираните изследвани проби се сравняват с референтните баркодове, като се използва алгоритъм на съвпадение. Повечето алгоритми включват сравняване на две ДНК последователности с цел измерване на разстоянието между секвенциите. В ДНК баркодирането, обикновено се използва алгоритъм за намиране на най-близката до неизвестната последователност в базата данни. BLAST (Basic local alignment search tool) е инструмент за търсене на съвпадение на нуклеотидни или пептидни последователности, който се предоставя от GenBank базата данни за търсене на съответствие между две секвенции, в случая два ДНК баркода. Два други често

използвани алгоритми са Kimura-2-Parameter Distance и Smith–Waterman Algorithm, подобни на BLAST.

Стандартната оперативна процедура по генерирането на баркод включва няколко основни етапа:



1. Събиране на проби;
2. Подготвителен етап на пробата и процес на лизиране на пробата;
3. ДНК екстракция;
4. Мерене на количество екстрахирана ДНК посредством Nanodrop и разделяне на фрагментите посредством електрофореза;
5. Полимеразно верижна реакция – амплификация на таргетния участък, кодиращ цитохромоксидаза I (COI или COX1);
6. PCR за пречистване на продуктите;
7. Секвентен анализ;
8. Пречистване на продукта след секвентния анализ;
9. Анализ на резултатите от секвенирането;
10. Подравняване и сравняване на секвенциите посредством програми като BioEdit и BLAST в бази данни като BOLD;

Относно събирането на пробите, то те могат да бъдат, цели организми, части от организми, тъкани, кръв, сперма, фекалии и др. Пробите могат да бъдат замразени (-20°C/-80°C), поставени в сух лед или в течен азот, съхранявани в спирт или формалин, с цел да бъдат транспортирани до лаборатория или да бъдат съхранени за определен период от време.

Екстракция на ДНК

Извличането на ДНК може да се извърши по много и различни протоколи за екстракция и посредством различни търговски китове. Методите на екстракция могат да бъдат, както мануални, така и автоматизирани чрез роботи за екстракция. За екстракция на ДНК, методите на базата на мембрана от силикагел са доказали, че дават добър добив ДНК с високо качество. В сравнение с други технологии за екстракция, тези методи са лесни за работа, сравнително евтини и позволяват висока производителност (96-ямков формат).

Въпреки че за ДНК баркодинга стъпката по екстракция на ДНК е стандартизирана и се прилага за широк кръг таксонови, все пак при някои таксономични групи има нужда от предварителна обработка на пробите. Пробите за ДНК баркодирането могат да бъдат от всякакъв биологичен материал - тъканни проби от различни видове животни, цели инсекти, кръвни проби, фекални проби и други. Особено проблематична е екстракцията на ДНК при проби, съдържащи големи количества полизахариди, мукополизахариди, полифеноли, смоли и други метаболити.

Например при идентифициране на видовете птици при мониторинг на заболяването инфлуенца А се използват фекални проби, клоакални тампон проби или проби от пера като неинвазивен метод за получаване на генетичен материал, но изискват предварителна обработка преди пристъпване към екстракция.

При растителните проби предексрационната подготовка включва замразяване с течен азот и нарязване на растителните части.

При мониторинг на векторно предаваните заболявания таргетната цел при пробовземането е събиране на самите вектори, преносители на заболяването, а именно – комари, мухи, пясъчни мухи, табаниди и кърлежи. При този вид проби първоначалната обработка преди екстракцията на ДНК е много важна – необходимо е разделяне на насекомите в отделни епруветки и замразяване с течен азот и лизиране на хитиновата обвивка на насекомите. При инсектите качеството и количеството на екстрахираната ДНК е от съществено значение за последващите стъпки по генериране на баркод. Установено е, че инкубация на насекомите в 95% етанол или замразяването им в течен азот спомага по-бързото лизиране на клетките.

Процесът по екстрахиране на ДНК най-общо включва няколко подетапа: лизиране на клетките/тъканите, пречистване на екстрахирания продукт и елуиране на ДНК. Готови китове като prepGEM® Insect на фирма ZyGEM или ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit на фирма Thermo Fisher SCIENTIFIC, DNeasy Blood and Tissue Kit на фирма Qiagen са най- често препоръчвани в научните среди за процеса на изолиране на ДНК от инсекти.

При спин колонковият метод на екстракция, предложен от Qiagen, екстракцията на ДНК отнема около 45 мин и включва следните стъпки:

Предварително хомогенизирана 50 мг тъкан се прехвърля в 1,5 мл микроцентрифужна епруветка и към нея се добавя 180 µl буфер ATL. След това се добавят 20 µl протеиназа К и се вортексират, след което се инкубират при 56°C, с цел лизис на хомогената от насекомите, което изисква 1–3 ч. Времето на инкубацията варира според вида и състоянието на пробите от насекоми. След инкубацията към лизата се добавя буферен разтвор (200 µl буфер AL + 200 µl 96% - 100% етанол). След това всяка проба се прехвърля в DNeasy Mini spin колонка, която се поставя в 2 мл събирателна епруветка и пробите се центрофугират в продължение на 1 минута при скорост 8000 об/мин. След тази стъпка се изхвърля събирателната епруветка и спин колонката се прехвърля в нова събирателна епруветка и се добавят 500 µl миеш буфер AW1 и етапът на центрофугиране се повтаря. Следва второ „миене“ с 500 µl миеш буфер AW2 и центрофугиране със скорост от 14,000 об./ мин, за да се изсуши мембраната с ДНК на спин колонката. Спин колонката с ДНК се премества в нова епандорфка от 1,5 мл добавят се 200 µl буфер АЕ (елуиращ буфер) и пробите се центрофугират на 8000 об./мин, за да се елуира ДНК.

Лабораторията „Animal Production and Health“ към IAEA в Зайбърсдорф, Виена има разработен и верифициран свой протокол за екстракция на ДНК от инсекти. Предложеният от IAEA протокол включва предварителна подготовка на няколко разтвора:

- Екстракционен буфер: 0.1 M NaCl
6.8% захароза
0.1 M Tris-Cl pH 9.1
0.05 M EDTA pH 8.0

0.5 % SDS

- 6М КАС рН 6.5 (8 М) буфер
- Наситен разтвор фенол/ хлороформ (1:1)
- Хлороформ/изоамилов алкохол (24:1)
- 70% етанол

За по-лесно хомогенизиране на инсектите се препоръчва предварителна подготовка на пробите: замразяване на инсектите в течен азот или поставянето им в 96% етанол. Екстракционният буфер се загрява при 68°C. Епендорфките с инсектите се изваждат от течния азот и към тях се добавя половината от количеството екстракционен буфер. Следва стъпка на хомогенизиране на пробите. След това се добавя останалото количество буфер и пробите се инкубират при 68°C на водна баня за минимум час до максимум 24 часа (ON) с цел разграждане на хитиновата обвивка на насекомите и пълно лизиране на клетките. Добавя се разтвора на 6М КАС към лизираните проби, след което епендорфките с пробите се разклащат внимателно и се поставят върху лед за най-малко 1 час до максимум 24 часа (ON). Следваща стъпка от екстракцията е центрофугиране за 10 мин при максимална скорост 15 000 об./мин. Супернатантата се прехвърля в чиста епендорфка. Незадължителна последваща стъпка е: Добавяне на наситен разтвор 1:1 фенол/хлороформ към супернатантата и центрофугиране, с цел разделяне на фазите. Това е етапа на пречистване на ДНК. Извършва се второ пречистване с хлороформ/изоамилов алкохол и супернатантата се прехвърля след последващо центрофугиране в нова стерилна епендорфка. Добавя се равен обем изопропанол или 2.5 обемни единици етанол. ДНК пробите се оставят за около 15 минути (най-малко) при стайна температура да се изкубират и след това се центрофугират при 15,000 об./мин в продължение на 15 - 20 минути. Следва промиване на пелетата със 70% етанол и центрофугиране на максимална скорост. Предпоследна стъпка е отстраняване на етанола и сушене на пробите. Последната стъпка в този протокол на екстракция е добавяне на елуиращия буфер ТЕ 50 µl.

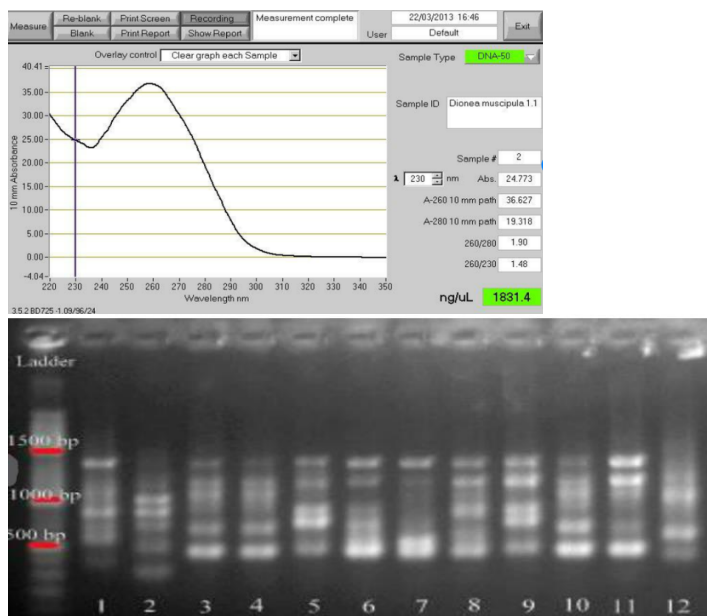
Принципът на екстракция на ДНК при други таксономични групи животни е подобен на този при инсектите.

Мерене на количество екстрахирана ДНК:

След екстракцията се пристъпва към мерене на добив ДНК посредством **спектрофотометър** - най-често се използва NanoDrop, или посредством електрофореза за разделяне на фрагментите, които дават количествена оценка на добитата нуклеинова киселина. Бисбензимидазоловите багрила като PicoGreen® и QuantiFluor™ dsDNA се използват при меренето на концентрация ДНК и се свързват селективно с двойноверижната ДНК. Концентрацията на ДНК от неизвестни проби се изчислява на базата на сравняване със стандартна крива, получена от проби с известна ДНК концентрация или буфер. Факторът на разреждане трябва да се вземе предвид при изчисляване на концентрацията на ДНК. Материалите, необходими за флуоресцентните методи са: флуоресцентно ДНК свързващо багрило, флуорометър и подходящи стандарти за ДНК.

Агарозната гел електрофореза е друг метод за оценка на ДНК концентрацията. За да се използва този метод, са необходими хоризонтална вана за гел електрофореза, агароза, 1X TAE буфер, молекулен маркер и багрило (етидиев бромид или SYBR® Green). По-

малките ДНК фрагменти мигрират по-бързо и така изолираната ДНК се разделя по размер. Фрагментите могат да се заснемат чрез фотодокументираща система.

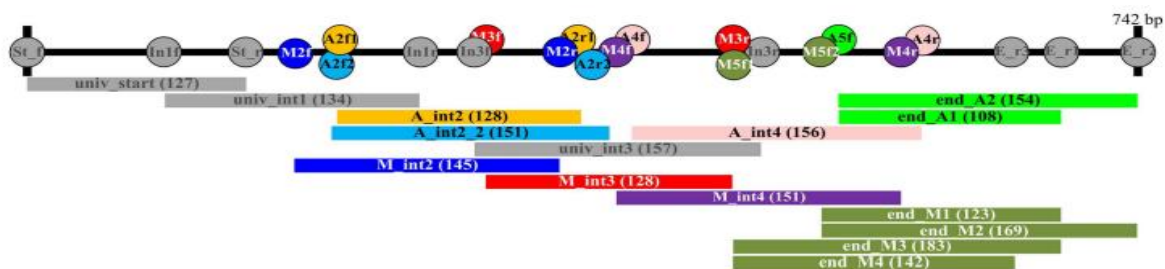


Фиг. 7: Мерене на количество добив ДНК посредством NanoDrop и разделяне на фрагментите посредством електрофореза

Полимеразно верижна реакция (PCR):

Полимеразно верижната реакция (PCR) на локусите, кодиращи митохондриалната цитохром С оксидаза I (COI) за повечето групи животни е много сходна. Основната разлика е изборът на специфични праймери за отделните таксони. Затова преди намножаване на целевите фрагменти от ДНК е необходим предварителен дизайн на праймери, които да амплифицират точните фрагменти от генома, кодиращи митохондриалния цитохром С оксидаза I (COI) баркодиращ регион. При дизайна на праймерите трябва да се съблюдават няколко условия:

1. Праймерите трябва да са с дължина между 20 и 30 bp.
2. Съдържанието на G/C трябва да бъде приблизително 50%.
3. Трябва да бъде избягвано повторение на моно- или динуклеотиди в праймерите.
4. Праймерът трябва да завършва на G или C.
5. Температурата на топене на двойките праймери трябва да бъде съобразена с цел избягване на неспецифично свързване.
6. С цел най-прецизен дизайн на праймери за COI гена за определена таксономична група е необходимо да се сравнят колкото се може повече последователности от близки видове, като за целта би могло да се направи проучване в GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
7. Праймерите е хубаво да бъдат маркирани с опашки M13.



Name	Sequence	Use with	Direction
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	HCO2198	F
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	LCO1490	R
LepF1	ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG	LepR1	F
LepR1	TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA	LepF1	R
MLepF1	GCTTTCACGAATAAATAATA	LepR1	F
MLepR1	CCTGTTCCAGCTCCATTTC	LepF1	R
M13F (-21)	TGTA AACGACGGCCAGT		F
M13R (-27)	CAGGAAACAGCTATGAC		R

Фиг. 8: Често използвани праймери за инсекти

Primer name— forward/reverse	5–3' Forward primer sequence	5–3' Reverse primer sequence	T_m	Taxon utility	Amplicon size
<i>CO1 (3' "Trimer" region)</i>					
LCO1490/ HCO2198	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	40–55°C	Universal Metazoa	650 bps
dgLCO/dgHCO	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	40–44°C	Degenerate Universal Metazoa	650 bps
CycF/CycR	CGRATGGARCTTCTCATCC	TAAAAATACGRTCTGTAAAAA	45°C	Cyclophora	487 bp
Cohen-Fwd/ Cohen-Rev	ATTTTBCCNGGRTTTGG	TACCTCGNCAAAAAAC	NA	Brachiopoda	663 bp
Tun_fwd/Tun_rev2	TCGACTAATCATAAAGATATTAG	AACTTGATTTAAATTAAGATC	58°C	Unicostata	586 bp
AmphL109/ AmphH135	ATTGCGNGGAAATNTYCNAGCC	TCNGAATAYCGNGGWGGTATNCC	45–60°C	Cephalochordata	1 kb
COIcd/COIcdR	ACTGCCCAAGCCCTAGTATGATATT TTTTATGGTNTATGCC	TGGTGTGTCTACGTCCATTCCTACTG TTRACATCTG	51°C	Echino-dermata	655 bp
COI7/COI-D	ACNAATAARCAYGAYKTYGGNAC	TCTGGGTCTCRAARAAYCARAA	40°C	Gnathostomulida, Annelida	657 bp
LCO1490/ HCOoutout	See above	GTAAATATATGRTTGDGCTC	42 and 50°C	Tardigrada, Chelicerata, Myriapoda	742 bp
Chelicerate-F1/ Chelicerate-R1	TACTCTACTAATCATAAAGACATTGG	CCCTCTCTCTGAAAGGGTCAAAAAATGA	45 and 50°C	Arachnida	660 bp
Chelicerate-F1/ Chelicerate-R2	See above	GGATGGCCAAAAATCAAAATTAATG	45 and 50°C	Arachnida	660 bp
CrustF1/ CrustDR1	GGTCTWCAAAATCATAAAGAYATTGG	TAAACTTCAGGRTGACCAARAAYCA	45 and 51°C	Crustacea	650 bp
CrustF1/HCO2198	TTTTCTACAATTCATAAAGACATTGG	See above	45 and 51°C	Crustacea	650 bp
CrustF2/HCO2198	GGTCTCTCTCCACCAACC ACAARGAYATHGG	See above	42°C	Crustacea	650 bp
MCOIF/MCOIR	TCTACAATCATAAAGACATAGG	GAGAAATATACCAAAAACGAGG	55°C	Scleractinia	650 bp
LCOF/HCO2198	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAAC	See above	45–51°C	Medusozoa	650 bp
<i>16 S rDNA (mitochondrial LSU)</i>					
16sar-L/16sbr-H	CGCCTGTTTATCAAAAAAT	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	45–55°C	Universal Metazoa	500 bp
<i>18 S rDNA (nuclear SSU)</i>					
18 S-A/18 S-B	AACCTGGTTGATCCTGCAAGT	TGATCCTTCGGCAGGTTACCTT	47°C	Universal Metazoa	1.8 kb
<i>28S rDNA (nuclear LSU) D1-D2 region</i>					
LSU D1D2 fw1/ LSU D1D2 rev1	AGCGGAGGAAAAGAACTA	TACTAGAAGGTTCCGATTAGTC	52.5°C	Universal Metazoa	0.8–1.3 kb
LSU D1D2 fw1/ LSU D1D2 rev2	See above	ACGATCCGATTGACAGTCCAG	52.5°C	Universal Metazoa	0.8–1.3 kb
<i>ITS1, 5.8S, ITS2</i>					
ITS5/ITS4	GGAAGTAAAGTGGTAACAAGG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	NA	Universal	>600 bps

Фиг. 9: Често използвани праймери при безгръбначни

Barcode primer name	Barcode primer sequence 5' → 3'
FISHCO1LBC	TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC
FISHCO1HBC	ACTTCYGGGTGRCCRAARAATCA
FISHCO1LBCm13F	CACGACGTTGTA AACGACTCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC
FISHCO1HBCm13R	GGATAACAATTTACACAGGACTTCYGGGTGRCCRAARAATCA
16SAR	CGCCTGTTTATCAAAAACAT
16SBR	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT
m13F	CACGACGTTGTA AACGAC
m13R	GGATAACAATTTACACAGG

Фиг. 10: Често използвани праймери при риби

Name	Orientation	Sequence (5'-3')	Length	Location
Bird F1	F	TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC	26	51
Bird R1	R	ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTG	25	747
Bird R2	R	ACTACATGTGAGATGATTCOGAATCCAG	28	747
Bird R3	R	AGGAGTTTGCTAGTACGATGCC	22	1,064
FalcoFA	F	TCAACAAACCACAAAGACATCGGCAC	27	51
Vertebrate R1	R	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	26	707
COIbirdR2	R	ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTGG	26	746
COI-EstF	F	ACGCTTTAACACTCAGCCATCTTACC	26	-2
COI-EstR	R	AACCAGCATATGAGGGTTGATTCCT	26	1,551
PasserF1	F	CCAACCACAAAGACATCGGAAC	24	52
PasserR1	R	GTAACCTTCGTGGTGACCAAAGAATC	26	708
AWCF1	F	CGYIWAACAYTCYGCCATCTTACC	25	-2
AWCR6	R	ATTCTATGTAGCCGAATGGTCTTT	26	794
LTyr	F	TGTAAAAGGWCTACAGCCTAACGC	25	-24
COIaRt	F	AACAAACCACAAAGATATCGC	21	49
COI748Ht	R	TGGGARATAATTCRAAGCCTGG	23	746
COI745h2	R	ACTGNGAGATRAATTCRAANCCNG	25	747
COI907aH2	R	GTRGCNGATGTRARTATGCTCG	23	905
COIF	F	TTCTCGAACCAGAAAGACATTGGCAC	26	51
COIR	R	ACTCTGGGTGGCCAAAGAATCAGAA	26	704
L6615	F	CCYCTGTAAAAGGWCTACAGCC	23	-30
H10884	R	GGRTCRAANCCRCAYTCRTANGG	23	4,260
H8121	R	GGGCAGCCRTGRATTCAYTC	20	1,478

Фиг. 11: Най-често използвани праймери при птици

Primer name	Primer sequence	M13 seq primer	Ratio in cocktail	Application	Thermocycler program	Product length (bp)
LcpF1_r1	Mammal Cocktail [C_VF1LF1 + C_VR1LR1] TGTA AACGACGGCCAGTATTCAAC CAATCATAAAGATAATTGG	M13F	1	RB, EB	MammCOI	658
VF1_r1	TGTA AACGACGGCCAGTATTCAAC CAACCACAAAGACATTGG	M13F	1	RB, EB		
VF1d_r1	TGTA AACGACGGCCAGTATTCAAC CAACCACAARGAYATYGG	M13F	1	RB, EB		
VF1i_r1	TGTA AACGACGGCCAGTATTCAAC CAACCALAAIGAIATIGG	M13F	3	RB, EB		
LcpR1_r1	CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTC TGGATGTCCAAAAATCA	M13R	1	RB, EB		
VR1d_r1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTC TGGGTGGCCRAARAAYCA	M13R	1	RB, EB		
VR1_r1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTC TGGGTGGCCAAAGAATCA	M13R	1	RB, EB		
VR1i_r1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTC TGGGTGICCLAAIAICA	M13R	3	RB, EB		
FishF2_r1	Fish Cocktail [C_FishF1r1 + C_FishR1r1] TGTA AACGACGGCCAGTCGACTAA TCATAAAGATATCGGCAC	M13F	1	RB, EB	Fish52	652
VF2_r1	TGTA AACGACGGCCAGTCACCAA CCACAAAGACATTGGCAC	M13F	1	RB, EB		
FishR2_r1	CAGGAAACAGCTATGACTACTTCAGG GTGACCGAAGAATCAGAA	M13R	1	RB, EB		
FR1d_r1	CAGGAAACAGCTATGACTACTTCAGG GTGTCGAAARAAYCARAA	M13R	1	RB, EB		
dgLCO-1490 dgHCO-2198	Folmer degenerate [dgLCO-1490+dgHCO-2198] GGTCAACAAATCATAAAGAYATYGG TAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA		N/A N/A	RB, EB RB, EB	COIfast	668
RonM_r1	Forward primers for express and forensic barcoding TGTA AACGACGGCCAGTGGMGC CMGATATRGCAATTC	M13F	N/A	FB, EB	MammCOI54	421
AquaF2	ATCACRACCATCATYAAATRAARCC		N/A	FB, EB	ExpressCOI	187
BarL5310 R6036R	Rat primers [BarL5310+R6036R] CCTACTCRGCCATTTTACCTATG ACTTCTGGGTGTCCAAAGAATCA	N/A N/A	N/A N/A	RB, EB RB, EB	RatCOI	702
VF1 ^b BC1R BC2F BC2R BC3F BC3R BC4F BC4R BC5F BC5R BC6F VR1 ^b	Primers for forensic and express barcoding of bats TTCTCAACCAACCACAAAGACATTGG GCATGAGCTGTTACGATTACG CTGGGGCCCTATTAGGTGAT TATATCGGGTGCGCCAATTA GGGGGATTGGTAATTGATT GGCTAGTGGTGGGTATACGG TACAGTTGAAGCTGGCGTTG AGCTCCAAGGATTGACGAAA TCTCTCTTCACTAGCCGGA GGCAGTGTATTAACCGGATCA GCCCTCTCTCAATATCAAACAC TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	N/A N/A N/A N/A N/A N/A N/A N/A N/A N/A N/A N/A	N/A N/A N/A N/A N/A N/A N/A N/A N/A N/A N/A	RB, EB, FB FB, EB FB, EB FB, EB FB, EB FB, EB FB, EB FB, EB FB, EB FB, EB RB, EB, FB	ExpressCOI	117 106 134 96 93 161
M13F (-21) ^a M13R (-27) ^a	Sequencing primers TGTA AACGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGAC	N/A N/A			Seq3.1	

Фиг. 12: Често използвани праймери при бозайници

По данни от научна литература са проектирани нови праймери за амплификация на митохондриалния цитохром С оксидаза I (COI) ген за птици и бозайници в шест припокриващи се фрагмента на базата на сравняване на пълни ДНК баркодове на всички видове птици и бозайници, изтеглени от BOLD (www.boldsystems.org).

Fragment	fwd	Sequence 5' to 3' (base pair positions within the 742 bp COI fragment)	rev	Sequence 5' to 3' (base pair positions within the 742 bp COI fragment)	Reference	Ta
univ_start	St_f	CYNCWAMCCACAARGAYATNGGNAC (-24-0)	St_r	GAARATYATNAYGAANGCRTGNCG (128–151)	Meusnier et al. 2008*	48°C/ 50°C
univ_int1	In1f	GGNGAYGAYCARATNTACAATGT (95–117)	In1r	GGNGGNAGNAGTCARAARC (252–270)	this study	48°C/ 50°C
A_int2	A2f1	CCNGACATRGCNTTCCCNCNG (218–237)	A2r1	GCNARGTCNACNGANGCNCNCNG (366–387)	Patel et al. 2010*	46°C/ 48°C
A_int2_2	A2f2	GNGCNCNGAYATRGCNTTYCC (213–234)	A2r2	CNGCNAGRTGNAGNGARAARATNGC (386–410)	this study	46°C/ 48°C
M_int2	M2f	GGNAAATGACTNGTNCNCCT (185–204)	M2r	CNGCRTGNGCNAGRITTTCC (350–368)	this study	46°C/ 48°C
univ_int3	In3f	GGNGTNGGNACNGGNTGAAC (311–330)	In3r	GATCANACGAANAGNGGNGTYTG (488–510)	Patel et al. 2010*	46°C/ 48°C
M_int3	M3f	GGNACNGGNTGAACNGTNTACC (317–338)	M3r	GRTATTGNGANATNGCNGGNGG (467–488)	this study	46°C/ 48°C
A_int4	A4f	CNTCNATCCTNGGNGCAATYAAC (417–439)	A4r	GCNNGGTCRAAGAANGTNGTGTT (596–618)	Patel et al. 2010*	48°C/ 50°C
M_int4	M4f	GCNNGGNTNTCNTNATTYTAGG (407–429)	M4r	ARGTTGTRTTYARGTTNCGGTCYGT (581–605)	this study	48°C/ 50°C
end_A1	A5f	GGNATCACNATRCTNCTNACNGACCG (563–588)	E_r1	GTRKGAGATRATTCCGAAKCC (697–716)	this study	46°C/ 48°C
end_A2	A5f		E_r2	ATNCSTATGTANCCGAATGGRTCTTT (743–769)	Patel et al. 2010*	46°C/ 48°C
end_M1	M5f2	CNGTNTAGCNGCYGGNATYACNAT (549–573)	E_r1		this study	46°C/ 48°C
end_M2	M5f2		E_r2			46°C/ 48°C
end_M3	M5f1	CNCARTAYCAAACNCCNCTNTTYGT (488–513)	E_r1		this study	46°C/ 48°C
end_M4	M5f1		E_r3	TANACNTCNGGNTGNCCNAANAATCA (656–681)	this study	46°C/ 48°C

fwd, forward primer; rev, reverse primer; primer positions (bp) indicate the position within the COI fragment amplified by primers St_f and E_r2 (total length of this fragment, 742 bp); Ta, annealing temperature

*, new primer is a modified version of a previously published primer.

Degenerate bases are indicated by the appropriate International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) single-letter designation: R = A or G; Y = C or T; M = A or C; K = G or T; W = A or T; N = A, C, G, or T

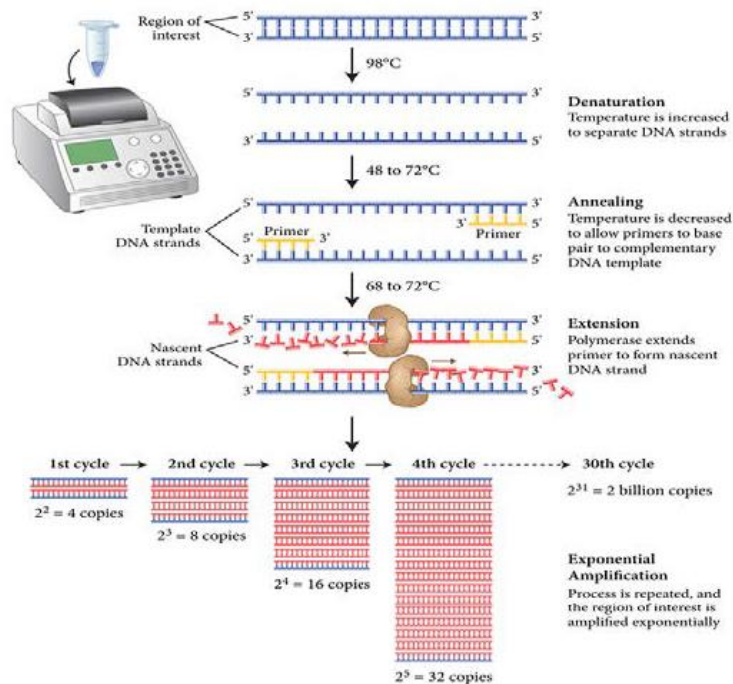
All primers were tagged with M13-tails (fwd, M13F: 5' -TGTAACGACGGCCAGT-3'; rev, M13R: 5' -CAGGAACAGCTATGAC-3'; Messing 1983)

Фиг. 13: Последователности от новосинтезирани праймери за ДНК баркодинг, разработени за повечето видове птици и бозайници

След като праймерите са синтезирани следва полимеразно верижна реакция с цел намножаване на таргетните локуси. Най-общо тази стъпка при всички организми е еднаква и се състои от подготовка на PCR мастер микс с подходящи праймери според целевите видове и настройване на температурен режим.

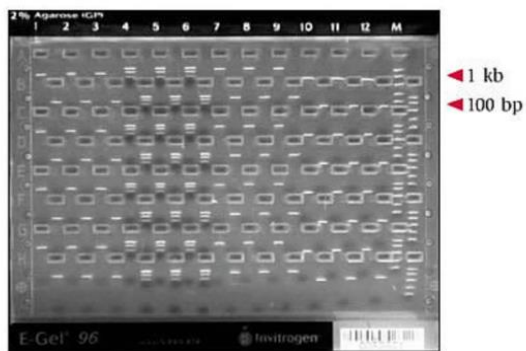
Ingredient	Amount of ingredient (μl)		Ingredient preparation
	Single tube	96-well microplate	
10% Trehalose	6.25	625	Dissolve 5 g D-(+)-trehalose dhydrate in 50 ml of total volume of molecular grade ddH ₂ O. Store at -20°C
ddH ₂ O	2	200	Store at 4°C
10× Buffer	1.25	125	10× PCR Buffer for Platinun Taq. Store at -20°C
50 mM MgCl ₂	0.625	62.5	50 mM MgCl ₂ . Store at -20°C
10 mM dNTPs	0.0625	6.25	10 mM dNTPs mix. Store at -20°C in 100 μl aliquots
10 μM F Primer working solution	0.125	12.5	Add 20 μl of 100 μM primer stock to 180 μl ultrapure ddH ₂ O. Store at -20°C
10 μM R Primer Working Solution	0.125	12.5	Add 20 μl of 100 μM primer stock to 180 μl ultrapure ddH ₂ O. Store at -20°C
Taq (5 U/μl)	0.06	6	Platinum Taq polymerase. Store at -20°C in 50 μl aliquots
Total	10.5	1,050	

Фиг. 14: Стандартен състав на мастер микс за PCR

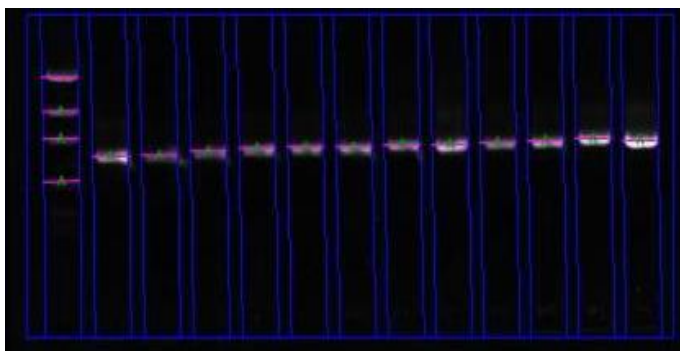


Фиг. 15: Схематично представяне на принципа на полимеразно верижната реакция и стъпките ѝ: денатурация, закачане на праймерите на специфичните разпознаваеми места и намножаване на копията от таргетния locus/фрагмент

След като е налице PCR продукт, следва той да бъде пречистен от остатъци от dNTPs, остатъци от праймери и буфери, и е желателно тази стъпка да не бъде пропускана с цел по-добри резултати при секвенирането на фрагментите. Успешното PCR амплифициране трябва да се потвърди чрез електрофореза на 2,5–5 µl от ампликона чрез 2% агар гел електрофореза с етидиев бромид и след това гела да се визуализира с фотодокументираща система. Успешно намножените ампликони ще изглеждат като единични ясно различими бандове. Слабо изразени бандове или смирове предполагат, че е необходима оптимизация на PCR процеса или праймерната концентрация. Има разработени готови китове за бърза електрофореза, като те могат да обезпечат обработването до около 20 000 проби на ден, тъй като гелът е излят в специални 96 ямкови готови плаки с по 8 маркера, такава система е например тази на Invitrogen E-gel 96.



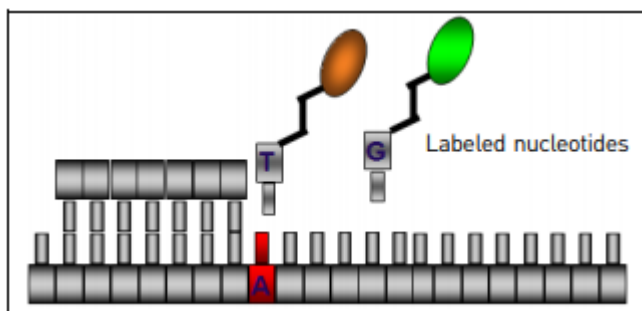
Lane	Sample
1, 2, 3	1 kb PCR product
4, 5, 6	pcDNA TM 3.1/ <i>Nco</i> I cut
7, 8, 9	2 kb PCR product
10, 11, 12	500 bp PCR product
M	E-Gel [®] Low Range Quantitative DNA Ladder



Фиг. 16: Схема на системата Invitrogen E-gel 96 и фотодокументиран резултат

Секвентен анализ:

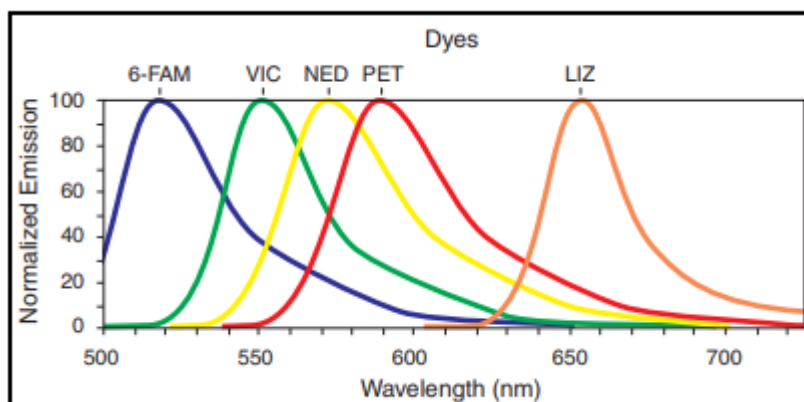
Класическият метод на Sanger или секвенирането изисква приготвяне на реакционен микс от PCR продукт, праймери, ДНК полимераза, радиоактивно или флуоресцентно белязани dNTP. Всеки от четирите dNTP е маркиран с различно флуоресцентно багрило, всяко флуоресциращо при различна дължина на вълната. Височината на пиковете съответства на увеличаването на броя на копираните фрагменти и увеличаването на силата на флуоресцентния сигнал.



Фиг. 17: Флуоресцентно белязани dNTP в 5'

края им

Най-често използваните багрила за белязване на dNTP са FAM, ROX, NED. Те имат различна флуоресценция. На **фиг. 18** е показана дължината на вълната, при която багрилата поглъщат.



Има готови китове за фрагментен анализ, които дават добри резултати и са сравнително лесни и бързи за употреба. Такъв пример е BigDye 1 Sequence Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Basic recipe for cycle sequencing

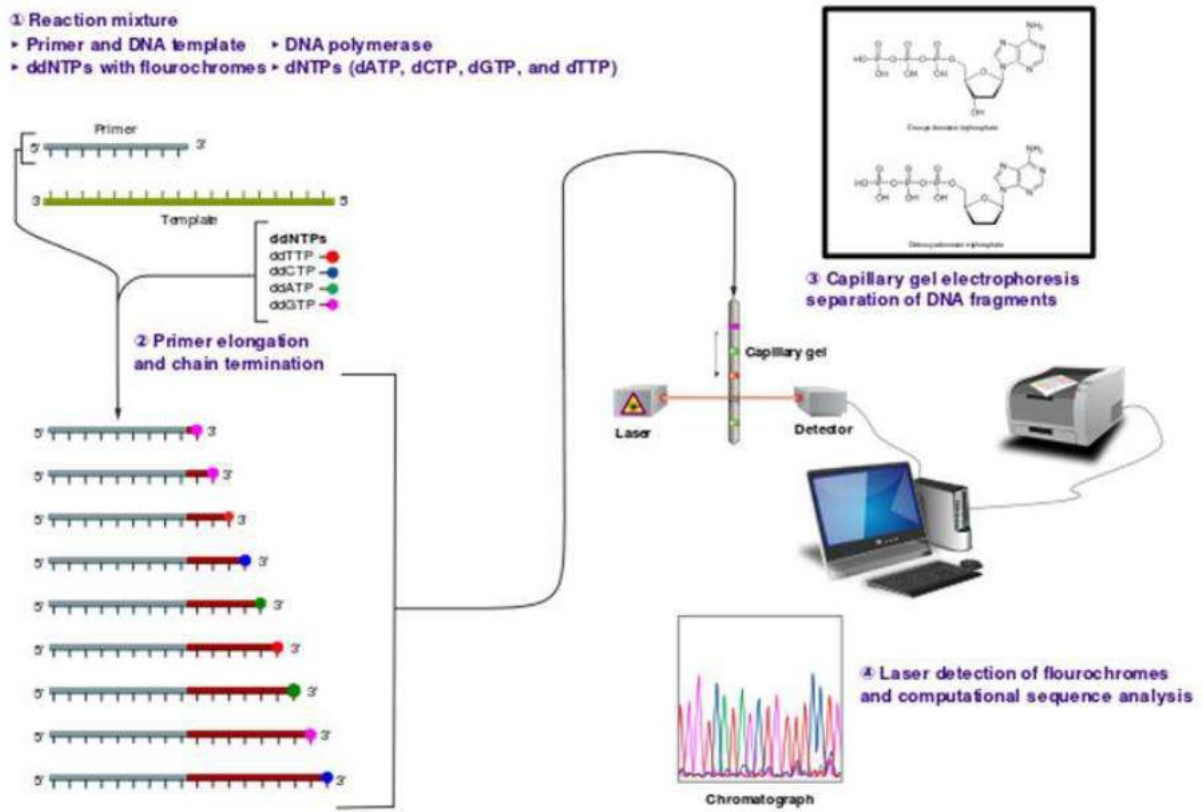
Ingredient	Amount of ingredient (µl)	
	Single tube	96-well microplate
Dye terminator mix v3.1	0.25	26
5× ABI sequencing buffer	1.875	195
10% Trehalose	5	520
10 µM Primer working solution	1	104
ddH ₂ O	0.875	91
Total	9	936

Фиг. 19: Основни компоненти на мастер микса за секвентен анализ

Препоръчително е реакциите за фрагментния анализ винаги да се извършват върху лед. Стандартните стъпки при приготвяне на пробите за фрагментен анализ са следните:

- Приготвя се мастер микс за капилярна електрофореза, като се смесват стандарт GeneScan™ 500 LIZ® (Applied Biosystems) и дейонизиран формамид (FA) в микроцентрифужна епруветка. Необходимото количество на реагентите се изчислява по следния начин:
 - Дейонизиран формамид (FA) = $N \times 10\mu\text{l}$, където N е броя на пробите
 - Стандарт GeneScan 500 LIZ = $N \times 10\mu\text{l}$, където N е броя на пробите
- Работният обем на мастер микса е $10\mu\text{l}$, като се използват специални плейтове за секвенатор.
- Добавя се PCR продукт във всяка ямка с реакционна смес (мастер микс), след което плейтът се покрива със стерилна септа и се центрофугира за кратко.
- Готовият плейт се поставя в PCR апарата и се стартира програмата за денатурация, при която плейтът се загрява на 95°C за 3 мин.

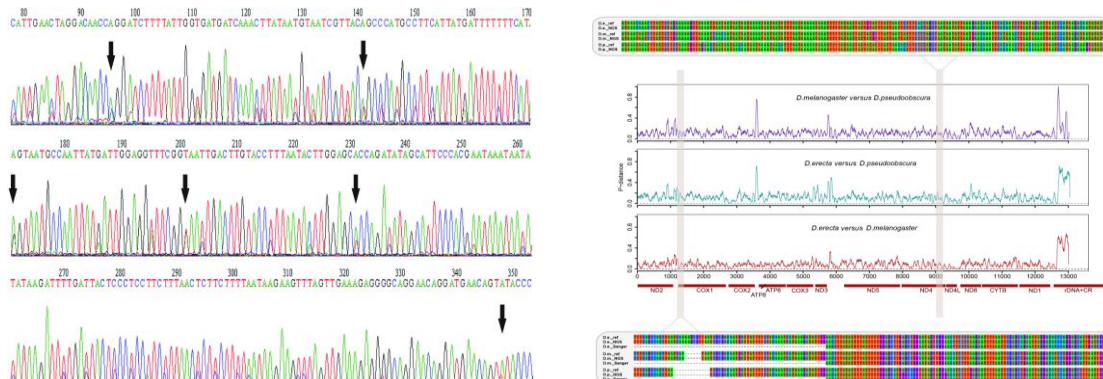
- След приключване на денатурацията плейтът с пробите се охлажда на 4°C и се поставя в секвенатора.



Фиг. 20: Принцип на капилярната електрофореза, част от секвенирането

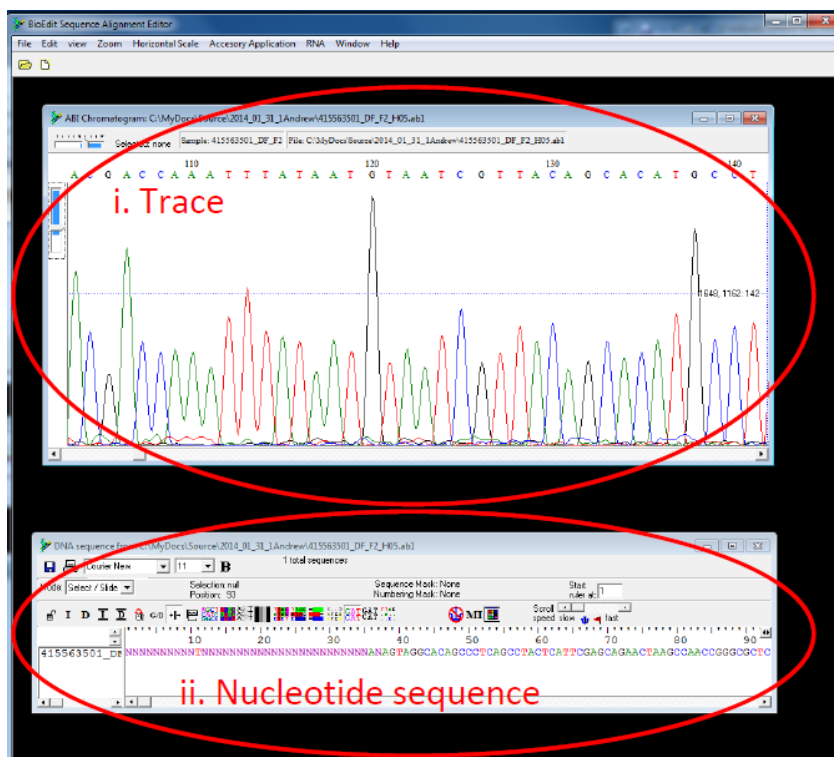
Повечето генетични лаборатории са установили стандартна практика да изпращат екстрахирана ДНК или PCR продукти за секвентен анализ на специализирани компании, извършващи тези услуги. Сред най-големите компании, които провеждат геномно секвениране са: Agencourt Bioscience, SeqWright и Lark Technologies.

Анализ на суровите данни от секвенирането:



Фиг. 21: Примери за сурови необработени данни от фрагментният анализ на CO 1 гена

След фрагментния анализ данните трябва да бъдат обработени посредством софтуер GeneMapper, който е лицензиран и е „в комплект“ със секвенатора на Applied Biosystems или директно в платформата BOLD. Секвенциите трябва да бъдат подравнени посредством програма ClustalW или BioEdit. Подравнените секвенции се сравняват в базата данни на BOLD или тази на NCBI (US National Library of Medicine National Institutes of Health).



Unaligned FASTA

```
LOP001-11  AACTTTATATTTTATTTTGGAAATTTGAGCAGGAATAGTAGGAACCTCTT
LOP002-11  ATATTTTATTTTGGAAATTTGAGCTGGATTAATTGGAACCTTCATT
LOP003-11  AACTCTATATTTTATTTTGGAAATTTGAGCAGGATTAAGTAGGAACCT
LOP004-11  TCTATATTTTATTTTGGAAATTTGAGCAGGTTTAGTTGGAACCTTCATT
LOP005-11_F AATGATGTTCCSTAACATACCTGCTCAAATACCAAAAATAAAAATATAAAGT
```

Aligned FASTA

```
LOP001-11  AACTTTATATTTTATTTTGGAAATTTGAGCAGGAATAGTAGGAACCTCTT
LOP002-11  NNNNNNATATTTTATTTTGGAAATTTGAGCTGGATTAATTGGAACCTTCAT
LOP003-11  AACTCTATATTTTATTTTGGAAATTTGAGCAGGATTAAGTAGGAACCTNNNN
LOP004-11  NNNNTCTATATTTTATTTTGGAAATTTGAGCAGGTTTAGTTGGAACCTTCAT
LOP005-11  AACTTTATATTTTATTTTGGTATTTGAGCAGGATAGTTAGGAACATCAT
МНАНС824-05 AACTTTATATTTTATTTTGGAAATTTGAGCAGGAATAGTAGGAACCTCTT
```

Фиг. 22: Обработка и подравняване на секвенции с BioEdit и експортиране на файловете във формат FASTA

Платформата BOLD, използвана за сравняване на барковете включва четири по-малки бази данни за идентифициране на последователности от COI:

1. **База данни с всички записи на баркодове** включва всеки записан в платформа BOLD баркод на COI с минимална дължина на последователността от 500bp (Предупреждение: Тази подбаза данни не включва записи за идентификация на видовете).
2. **База данни на ниво таксони** включва всеки баркод на COI с идентификация на видово ниво и минимална дължина на последователността от 500bp. Тази подбаза данни включва много видове, представени само от единични екземпляри, както и всички видове с временна таксономия.
3. **Публичната база данни за баркодове** включва всички публикувани COI записи от BOLD и GenBank с минимална дължина на последователността 500bp. Тази библиотека е сборна от записите на публикувани проекти в BOLD.
4. **Пълна ДНК баркод база данни** включва библиотеката на ниво таксони, като тук минималната дължина на последователността е 640bp и съдържа както публични, така и частни записи. Тази библиотека е предназначена за идентифициране на къси последователности, тъй като осигурява максимално припокриване с кратки участъци от региона на баркода.

Резултатите от проведения анализ и сравняване на секвенции в платформата BOLD изглежда по следният начин: **Фиг. 23 а) и б)**

BOLDSYSTEMS Databases | Taxonomy | Identification | Workbench | Resources Log In

Public Data Portal - Specimen Record

Public Data Search

XML TSV FASTA TRACE XML TSV Show Help
Specimen Data Sequences Combined

Record Details For MSAC189-09 Back to Search: Records

IDENTIFIERS:
 Sample ID: DAY129 Museum ID:
 Field ID: DAY129 Collection Code:
 Deposited In: Research Collection of Peter J. Lang

Add Tags & Comments Comments: 0 Associated Tags: No Tags

TAXONOMY:
 Phylum: Arthropoda Subfamily:
 Class: Insecta Genus:
 Order: Coleoptera Species:
 Family: BIN (Cluster ID): BOLD:AAE9724
 * Barcode Index Numbers(BIN): cluster barcode sequences to create OTUs that closely reflect species groupings

SPECIMEN DETAILS:
 Voucher Status: Reproduction:
 Tissue Descriptor: Sex:
 Brief Note: Life Stage: adult
 Detailed Notes:

COLLECTION DATA:
 Country: Australia Date Collected: 2007-11-27
 State/Province: South Australia Collectors: D.A.Young
 Region/Country: Kangaroo Island
 Sector: Flinders Chase National Park
 Exact Site: 1.4 km NNW Rocky River visitor centre
 Latitude: -35.939 Elevation:
 Longitude: 136.733 Elev. Accuracy:
 Coord. Source: Depth:
 Coord. Accuracy: Depth Accuracy:

SEQUENCE: COI-5P [Funding Source: IBOL:WG1.5]
 Sequence ID: MSAC189-09.COI-5P GenBank Accession: HQ575380
 Last Updated: 2012-06-11 Genome: Mitochondrial
 Locus: Cytochrome Oxidase Subunit 1 5' Region
 Nucleotides: 658 bp

AACAATATATTTTATTTTGGAGCTTGATCAGGAATAGTTGGAACCTGCCCTCAGTTTATTAATTCGAGCTGAACCT
 TGGTAAATCCAGGAACTTAAATGGAAACGATCAATTTATAAGTAATTGTCACCTGCTACGCCCTTATTTATAAT
 TTCTTTATAGTATACCTATATATAGCTGGATTTGGAACTGATTTAGTACCCCTAATTTAGGAGCCCGCGA
 TATAGCAATTCACGAAATAATAATATAAGATTTGATTACTCCCCCTCACTAATCTCTCTAATAAGAAAG
 AATNGTAGAAAGAGGCTCAGGAACCTGGATGAACAGTTTACCCCCCTTAGCAGCAATATTGCTCATAGAGGAGC
 ATCTGAGATTTAGCAATTTAGATCTCAATTTAGCCGAAATTCATATTTAGGGCAATTAACCTTTATAC
 TACAGTTTATATATACGATCAATAGGAATAACCTTTGATCGTATACCTTATTGATGATCAATCAATTAC
 AGCCCTACTACTTCCCTTCTTACCTGTTTAGCAGGCTATTAATCAATCTTTAAGCAGCCGAAATCTAAA
 TACATCCCTTTGATCCCTCAGGGGAGACCCATCCCTAATCAACTATTT


Amino Acids:
 TLYFIFGAMGQVGTALSLLRRELGNPGLIANDQIYNVIVTARAFIMIFFMVMPIHMGFGNMLVPLMLGAPD
 MAPFRMNNNSFWLLPPLSLTLLMSIVESGAGTGWTVYPLAANIARHGASVLDLAIPLSLHLAGISSILGAINFIT
 TVINRSMGNTFDRMPLFVWSISITALLLLSLPLAGAITMLLDRNLNTSFFDPAGGGDFILYQHLF

Illustrative Barcode:
 0 260
 269 537
 538 657


Add Tags & Comments Comments: 0 Associated Tags: No Tags

ELECTROPHEROGRAM TRACE FILES:

Length	Pcr Primers	Seq Primer	Read	Status	Run Date
654	LCO1490_t1 / HCO2198_t1	49	Forward	high qual	2009-09-26
656	LCO1490_t1 / HCO2198_t1	50	Reverse	high qual	2009-09-26

Specimen Images:

 License: Copyright (2009)
 License Holder: Peter J. Lang 2009, Unspecified

Add Tags & Comments Comments: 0 Associated Tags: No Tags

Collection Site:

 Attribution:
 Specimen Depository: Research Collection of Peter J. Lang
 Sequencing Center: Biodiversity Institute of Ontario
 Photography:
 Collectors: D.A.Young
 Specimen Identification: Peter J. Lang
 Project Manager: Renee Labbee
 Sequencing Support: International Barcode of Life (WG1.5)

Фиг. 23 а)

BOLD SYSTEMS
Specimen - *Phalonia manniana* paper [PHAMA]

IDENTIFIERS
Barcode ID: MM02738
Process ID: LEP277-10
Institution Short: University of Oulu
Museum ID: MM02738
Collection Code: ZMUJ0

TAXONOMY
Identification: *Cochylomyia alternans* (Stephens, 1864)
Rank: Species
Identifier: Marko Mutanen
Identifier Method: Photo
Identifier Institution: marko.mutanen@oulu.fi

SPECIMEN DETAILS
Voucher Status: AM002286
Sex: Male
Reproduction: Sexual
Life Stage: ADULT
Date Coll: 02 pupa 2006
Associated Taxa: *Cochylomyia alternans*

GEOGRAPHY
Country: Finland
Province/State: Region of Ostrobothnia
Region/County: Rengas
Sector: Västana
District: Västana
Locality: 60.311, 24.25

ANNOTATION
Add Tags & Comments | Comments: 0 | Associated Tags: No Tags

Specimen Data Page, with image pop-up illustrating a zoomed-in feature

Фиг. 23 б)

За изготвяне на филогенетични дървета могат да бъдат използвани програми като BioEdit, Staden, PHYLIP, PAUP и MEGA 7.0. При построяване на филогенетичните дървета може да бъде използван метода Neighbor-Joining, модел Maximum Composite Likelihood, а за потвърждаване на топографията на клоновете на филогенетичните дървета може да се приложи Bootstrap метода (вероятност на достоверност).

BOLD SYSTEMS
Sequence - *Phalonia manniana* paper [PHAMA]

IDENTIFIERS
Sample ID: MM02738
Process ID: LEP277-10
Barcode: *Cochylomyia alternans*

SEQUENCE DATA
GenBank Accession: HM872121
Translation Matrix: Invertebrate Mitochondrial
Last Updated: 2010-05-08
Clear Sequence | Edit Sequence

ILLUSTRATIVE BARCODE
658 bp

NUCLEOTIDE SEQUENCE
Sequence: TACTTTATATTTTATTTTGGAAATTTGACGAGGACGATGAGCTCTTGAAGTTATTTG
AATTTGTTGAGATTTGAAACCGGAGCTTTGATGAGGATGATGATTTGATGAC
TATCTTTGTCAGTGTGATTTATATATATTTTATTTGATGATGATTTATGATG
AGATTTGATGATTTATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATG
TATGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATG
ATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATG
TCTCTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATG
TTCTATTTGATGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATG
AGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATG
ATCTCTGATGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATG
TACATGATTTTGTGATGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTGATGATGATTTT

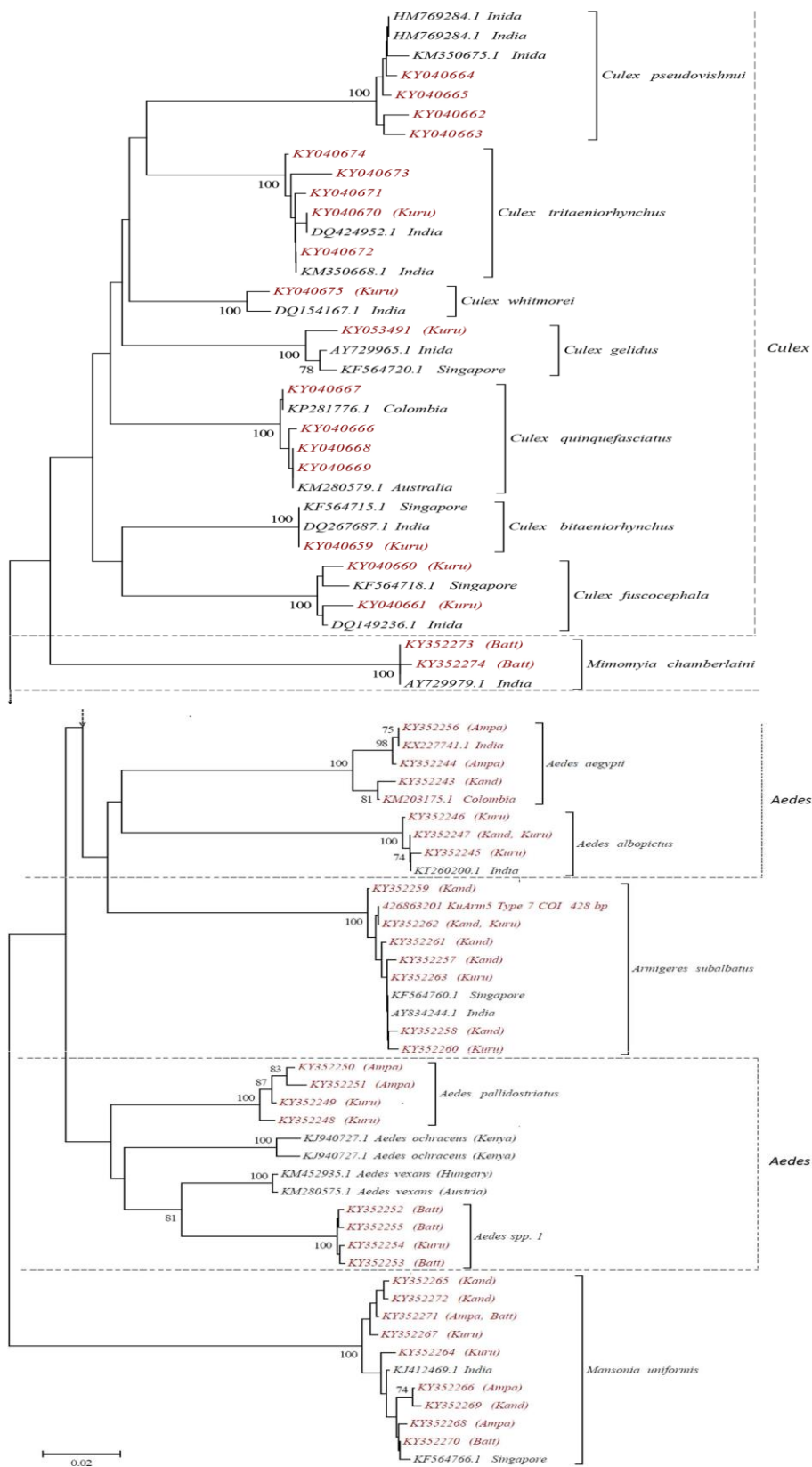
AMINO ACID SEQUENCE
Sequence: 233 residues
TS FT FGLWGHVPTGELLTNAELDFQSLGQQDTFTYVQKAPIMTFPPATYIIG
DFQKDTGVLGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
AGGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
LSLFLAAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG

PUBLICATION
Title: DNA barcodes reveal that the widespread European tortricid moth *Phalonia manniana* (Lepidoptera: Tortricidae) is a mixture of two species
Authors: MARKO MUTANEN, LEF AARVIK, PETER HLENER, LAURI KAILA, OLE KARSHOLT & KEVIN TUCK
Source: Zootaxa

TRACE VIEWER
View Sequences | View Barcode | View Quality Scores

Sequence Data Page

Trace Viewer



Фиг. 24: Пример за таксономична категоризация на база ДНК баркодинг на видове комари

ОБОЩЕНИЕ И ИЗВОДИ:

Баркодинга като иновативна технология може да бъде от огромна полза в много направления и при вземане на важни стратегически решения, и при изготвяне на мониторингови програми в областта на здравеопазването на животните, човека и растенията.

- ДНК баркодирането подпомага контрола на селскостопанската продукция, категоризирането на вредителите по посевите, което само по себе си спестява милиарди долари в борбата с причинителите на заболявания по растенията, както и намалява поголовната употреба на инсектициди. Това от своя страна подкрепя световната инициатива за борба с глада и бедността.
- Много важно приложение на баркодинга е таксономичното определяне на компетентни вектори – комари, мухи, пясъчни мухи, табаниди и кърлежи - причинители на много заболявания при животните и хората. Примери за векторно предавани заболявания по животните със сериозно икономическо значение са: заболяването син език по преживните животни, предавано чрез кръвосмучещи насекоми от род *Culicoides*; треска от долината Рифт, предавана от комари от родовете *Culex* и *Aedes*, засягаща не само животни, а и хора; заразен нодуларен дерматит по говеда, пренасян от мухите *Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans*, *Tabanus spp.*, *Phlebotomus spp.* и комарите *Culex spp.*, *Anopheles spp.*, *Aedes spp.*; марсилска треска (Средиземноморска петниста треска), лаймска борелиоза (лаймска болест), Ку-треска, Кримска-Конго хеморагична треска (ККХТ), хеморагична треска с бъбречен синдром (ХТБС), кърлежов енцефалит, туларемия, Западно-Нилска треска, малария, висцерална лайшманиоза.
- ДНК баркодинга ще спомогне Глобалната инициатива за изграждане на референтна баркод база данни (BOLD), която може да помогне в направление здравеопазване на животните и човека и в контрола и превенцията на заболяванията, причинени от компетентните вектори. Баркодирането на причинителите на заболяванията, както и събирането на данни за тяхната популационна и сезонна динамика, териториалното разпространение, фенотипните им особености и тяхната гъстота в комбинация би спомогнало за вземане на важни стратегически решения в борбата със заболяванията по животни и хора, което от своя страна би довело до по-адекватни и своевременни мерки за намаляване на заболяемостта и редуциране употребата на продукти за растителна защита, ветеринарномедицински продукти и лекарства в хуманната медицина.
- Като цяло, баркодинга добавя основни познания към молекулярната еволюция на видовете растения и животни и може да бъде полезно за доусъвършенстване на молекулярните методи, използвани в програмите за контрол на популациите.
- Използвайки ДНК баркодинга би могла да бъде следена нелегалната търговия с ценни защитени дървесни или животински видове.

- Друго важно направление, в което би могло да се включи баркодирането е за подобряване качеството на питейна вода и да се създадат по-добри стратегии по мониторинг и класификация на организмите, обитаващи водоизточниците.
- ДНК кодирането се използва за създаване на база данни за лечебните видове растения, използвани в хуманната и ветеринарната медицина.
- Методът ДНК баркодинг е сравнително бърз, хуманен спрямо животните и ефективен и би следвало да бъде интегриран във всички направления за оценка и охарактеризиране на риска (за информация: по литературни данни лабораторният процес по генериране на баркод струва между 2 и 5 долара в най-добре оборудваните лаборатории и процесът отнема няколко часа, а може да се направи в някои лаборатории само за 90 минути. Разходите постоянно биват оптимизирани и намалени и процесът на баркодиране става все по-бърз).

Източници:

- Barcode Of Life Data Systems Handbook (www.boldsystems.org ,Version 3.6)
- DNA barcoding of morphologically characterized mosquitoes belonging to the subfamily Culicinae from Sri Lanka - Thilini Chaturika Weeraratne¹, Sinnathamby Noble Surendran and S. H. P. Parakrama Karunaratne
- BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org) - SUJEEVAN RATNASINGHAM and PAUL D. N. HEBERT, Canadian Centre for DNA Barcoding, Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Guelph, ON, Canada N1G 2W1
- STANDARD OPERATING PROCEDURE FOR THE GENETIC IDENTIFICATION OF FISH SPECIES USING DNA BARCODING (MITOCHONDRIAL CYTOCHROME-C-OXIDASE I SEQUENCING) - Prepared by the Labelfish Consortium
- An update on DNA barcoding of human pathogenic fungi - Meyer, W1, Serena, C1, Firacative, C1, Kröger, B1, Arabatzis, M2, Robert, V3, de Hoog, S3, Balajee, A4, Velegrak, A2
- DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates - O. Folmer, M. Black, W. Hoeh,* R. Lutz, and R. Vrijenhoek+, Center for Theoretical and Applied Genetics, and Institute of Marine and Coastal Science, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey 08903-231
- Development of Standard Operating Procedures for the Detection of Invasive Species of Emerging Concern Research and Development Office Science and Technology Program Final Report ST-2016-1248-1
- Functional genomics of the horn fly, *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) - Lorena Torres, Consuelo Almazán, Nieves Ayllón, Ruth C Galindo, Rodrigo Rosario-Cruz, Héctor Quiroz-Romero, José de la Fuente
- „Мистериозна болест "X" може да се превърне в следващата глобална и смъртоносна пандемия“- доц. д-р Янко Иванов
- „Общи съображения за превенция на някои важни векторно-трансмисивни вирусни заболявания при преживните животни в България“ – проф. д-р Георги Георгиев двмн, ЦОРХВ
- Проучвания върху вирусите на инфлуенца А по дивите птици в България – дисертационен труд - Георги Малинов Стоименов
- Barcoding blood meals: New vertebrate specific primer sets for assigning taxonomic identities to host DNA from mosquito blood meals - Lawrence E. Reeves¹, Jennifer L. Gillett-Kaufman, Akito Y. Kawahara, Phillip E. Kaufman¹, ¹ Entomology and Nematology Department, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, Florida, United States of America, ² McGuire Center for Lepidoptera and Biodiversity, Florida Museum of Natural History, University of Florida, Gainesville, Florida, United States of America
- Evolutionary and structural analysis of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene from *Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans* and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) mitochondrial DNA - MARCOS TU' LIO DE OLIVEIRA¹, ANA MARIA LIMA DE AZEREDO-ESPIN^{1,2}, & ANA CLAU' UDIA LESSINGER¹, ¹Laborato'rio de Gene'tica Animal, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Gene'tica (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Sa'õ Paulo, Brazil, and ²Departamento de Gene'tica e Evoluç,ãõ, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Sa'õ Paulo, Brazil
- DNA Extraction from Insects by Using Different Techniques: A Review Usman Asghar*, Muhammad Faheem Malik, Fakhra Anwar, Ayesha Javed, Ali Raza, Department of Zoology, University of Gujrat, Hafiz Hayat Campus, Gujrat, Pakistan

- Opening the treasure chest: A DNA-barcoding primer set for most higher taxa of Central European birds and mammals from museum collections - Sylvia Schaffer^{1*}, Frank E. Zachos², Stephan Koblmueller^{1*}, ¹ Institute of Zoology, University of Graz, UniversitaÈtsplatz 2, Graz, Austria, ² Natural History Museum, Vienna, Burggring 7, Vienna, Austria
- Book of DNA Barcodes: Methods and Protocols - W. John Kress, David L. Erickson
- DNA Barcoding: A New Tool for Identifying Biological Specimens and Managing Species Diversity, National Museum of Natural History Smithsonian Institution
- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- DNA Barcoding for the Identification and Authentication of Animal Species in Traditional Medicine, Fan Yang, Fei Ding, Hong Chen, Mingqi He, Shixin Zhu, Xin Ma, Li Jiang, Haifeng Li
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- DNA Barcoding, species delineation and taxonomy: a historical perspective, Nicolas Hubert, Robert Hanner
- DNA Barcoding and Its Applications - International Journal of Engineering Research and General Science Volume 3, Issue 2, Part 2, March-April, 2015, Sukhamrit Kaur
- Fast-track to Gene Annotation and Genome Analysis - DNA Subway
- DNA Barcoding - Kandhan. S, M. Tech (Biotechnology), PSG College of Technology
- DNA Barcoding of mosquitoes in India – Aladu Ramakrishnan Rajavel, N Pradeep Kumar - <https://www.researchgate.net/publication/272164880>
- DNA BARCODING – a promising venture of species identification
- DNA BARCODING- Dr. Nadeem Abass, Shakeela Mahwish Rana presentation
- DNA Barcode: species/variatal identification - www.tnagenomics.com
- DNA BARCODE- TOOL FOR FOOD TRACEABILITY
- Distributed Research with DNA Barcoding - Democratizing Species Identification - DNA Learning Center, Cold Spring Harbor Laboratory
- Single Laboratory Validated Method for DNA-Barcoding for the Species Identification of Fish- Sara M. Handy and Jonathan R. Deeds, U. S. Food and Drug Administration, Office of Regulatory Science, Center for Food Safety and Applied Nutrition, College Park, Maryland 20740, USA, at all
- DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis – Applied Biosystem user manual (DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis, Applied Biosystems Chemistry Guide, 3rd edition)
- Molecular studies on Indian Muscid flies (Diptera: Muscidae) - Devinder Singh, Ramandeep Achint, Punjabi University, Patiala, <https://www.researchgate.net/publication/321609455>
- DNA Barcode Mosquitoes from La Pintada Molecular Typing with COI - DNA Barcode of mosquitoes with medical importance from rural area of La Pintada, Antioquia, Colombia
- Richard Hoyos-López¹, ¹ Grupo de Medicina Molecular y Translación, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
- DNA Barcode Analysis of Mosquito Species from Pakistan - Muhammad Ashfaq, University of Guelph, Canada
- Barcoding blood meals: New vertebrate specific primer sets for assigning taxonomic identities to host DNA from mosquito blood meals Lawrence E. Reeves, Jennifer L. Gillett-Kaufman¹, Akito Y. Kawahara, Phillip E. Kaufman, Entomology and Nematology Department, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, Florida, United States of America, ² McGuire Center for Lepidoptera and Biodiversity, Florida, Museum of Natural History, University of Florida, Gainesville, Florida, United States of America
- An efficient method for purification of PCR products for sequencing - Hao Ma and Stephen DiFazio, Department of Biology, West Virginia University, Morgantown, WV, USA

- Disentangling Vector-Borne Transmission Networks: A Universal DNA Barcoding Method to Identify Vertebrate Hosts from Arthropod Bloodmeals - Miguel Alcaide, Ciro Rico1, Santiago Ruiz, Ramo' n Soriguer, Joaqui'n Mun~ oz, Jordi Figuerola
- ZyGEM Quick-Start Guide, DNA Extraction Using prepGEM® Insect user guide
- BIOINFORMATICS ANALYSIS OF NUCLEOTIDE SEQUENCES - Avellaneda Vergara, Adrian Gustavo, Yarasca Cerna, Withney Aracely, Zegarra Aguinaga, Janeth Alexandra, Farfan Hernandez, Kevin Jhonny, Graham Angeles, Laura Andrea
- DNA Barcoding - Johannes Bergsten, Swedish Museum of Natural History, Department of Entomology
- Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding - Ecaterina Edith Vamos , Vasco Elbrecht , Florian Leese, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany
- Use of DNA Barcoding in Insect Taxonomy - SHWETA PATEL, Id No.- 42537
- DNA BARCODING - VEENA P KUMAR, MSC, SCHOOL OF BIOSCIENCES, MGU
- DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics - W. John Kress* and David L. Erickson
- Department of Botany, MRC-166, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, P.O. Box 37012, Washington, DC 20013-7012
- An update on DNA barcoding of human pathogenic fungi - Meyer, W1, Serena, C1, Firacative, C1, Kröger, B1, Arabatzis, M2, Robert, V3, de Hoog, S3, Balajee, A4, Velegrak, A2, 1 Molecular Mycology Research Laboratory, Sydney Medical School – Westmead, University, of Sydney, Westmead Millennium Institute, Westmead Hospital, Westmead, NSW, Australia, 2 Medical School, University of Athens, Athens, Greece, 3 CBS-Fungal Biodiversity Center, 3508 AD Utrecht, The Netherlands, 4 Mycotic Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA
- Field Collecting for DNA Barcoding - Sarah Adamowicz & Alex Borisenko, Biodiversity Institute of Ontario & Dept. Integrative Biology, University of Guelph
- Nucleic Acid- Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers user manual
- GENETIC CHARACTERIZATION OF INDIGENIOUS LIVESTOCK BREEDS USING DNA MARKERS – Kathiravan Periasamy, Rudolf Pichler, Settypalli Kumar, Pamela Burger and Arjava Sharma – Animal production and health laboratory, Joint IAEA- FAO Laboratories, Seibersdorf, Austria
- DNA Barcoding as a Molecular Tool to Track Down Mislabeling and Food Piracy - Gianni Barcaccia, Margherita Lucchin and Martino Cassandro

Изготвил: Красимира Захариева, главен експерт в дирекция ОПХВ към ЦОПХВ, МЗХГ

София, 13.02.2019 г.