



*Z supermarketu do odnalezienia
nowego gatunku.*

*Barkoding DNA jako narzędzie
do opisu bioróżnorodności.*

24.10.2024 r.

Organizator



Województwo
Śląskie



Muzeum
Górnośląskie
w Bytomiu

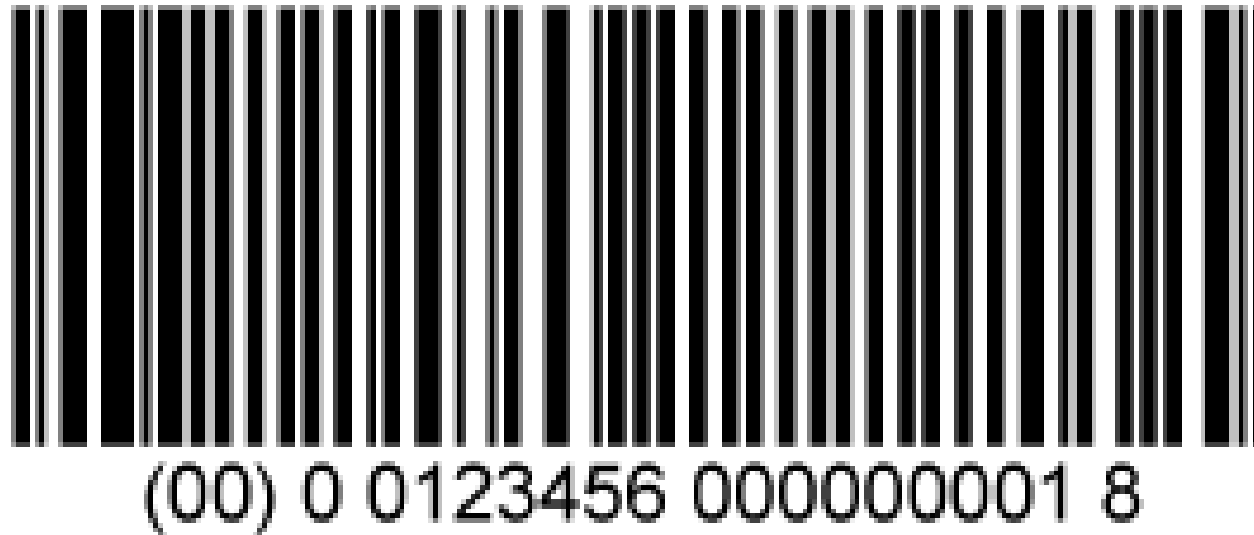
Muzeum Górnośląskie w Bytomiu jest instytucją kultury
Samorządu Województwa Śląskiego.



Pawel Domagala

Uniwersytet Opolski, Instytut Biologii, ul. Oleska 22, 45-052 Opole

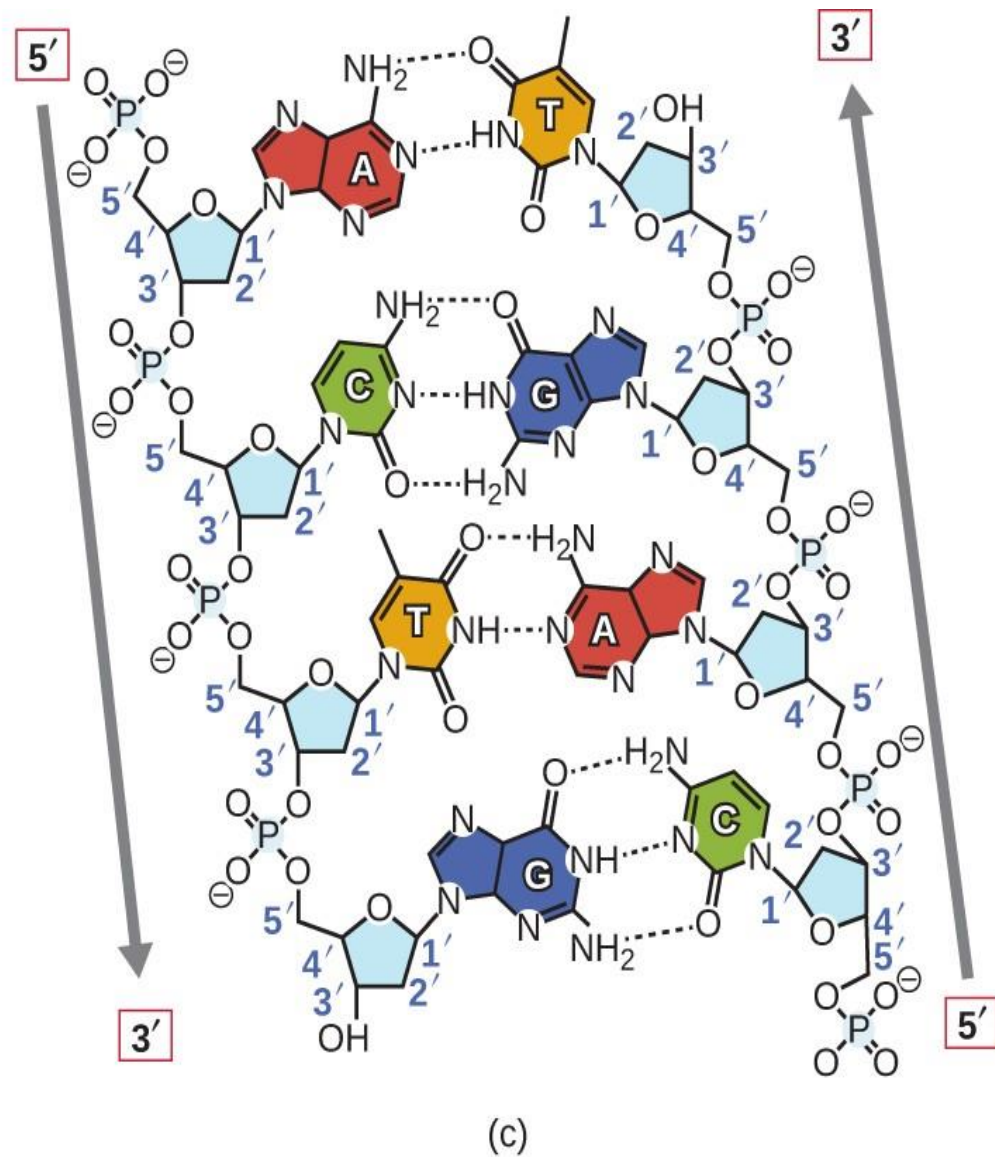
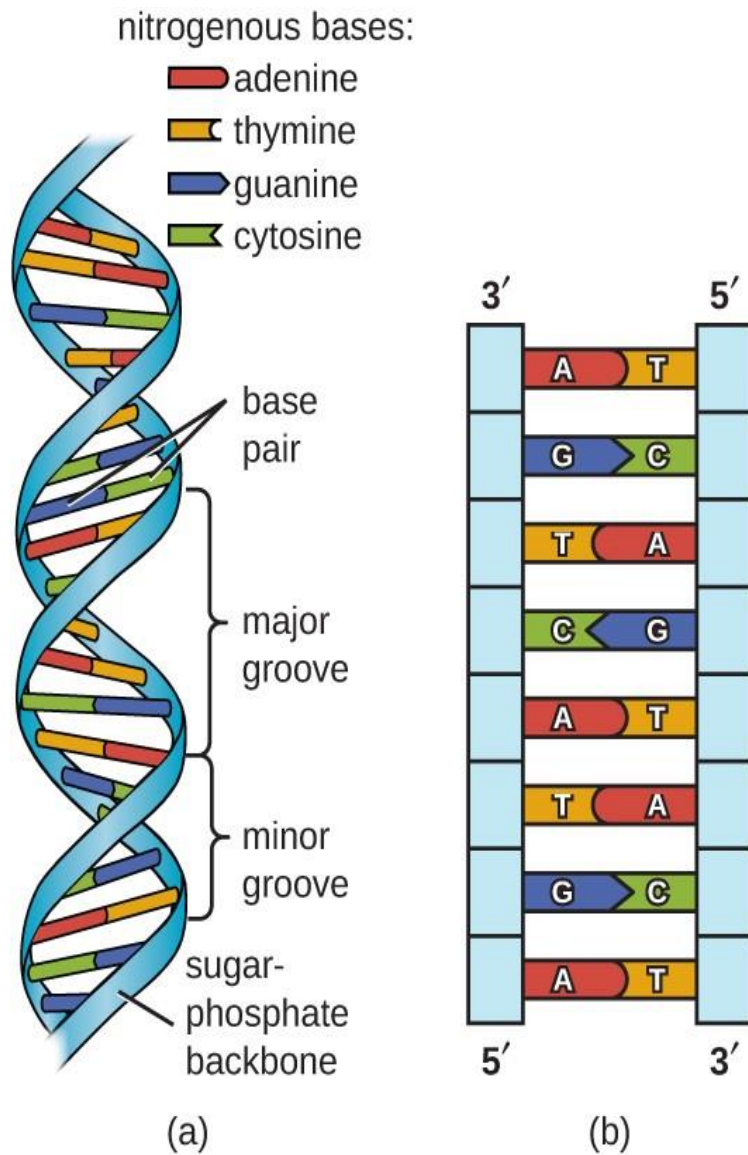
Barkoding DNA – ogólne założenia



Kod kreskowy, kod paskowy (ang. barcode) umożliwia graficzne kodowanie informacji w celu jej późniejszego, szybkiego i bezbłędnego odczytu.

Kod kreskowy składa się z kresek jasnych i ciemnych, które są graficznym odzwierciedleniem wydrukowanych pod nimi numeru identyfikującego oraz jasnego marginesu otaczającego symbol kodu o ściśle określonej szerokości.

Barkoding DNA – ogólne założenia



Źródło: <https://www.khanacademy.org/science/biology/dna-as-the-genetic-material/dna-discovery-and-structure/a/discovery-of-the-structure-of-dna>

Barkoding DNA – ogólne założenia

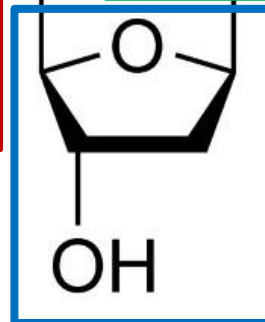
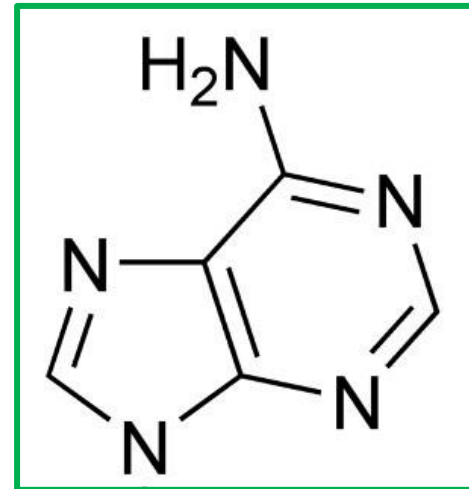
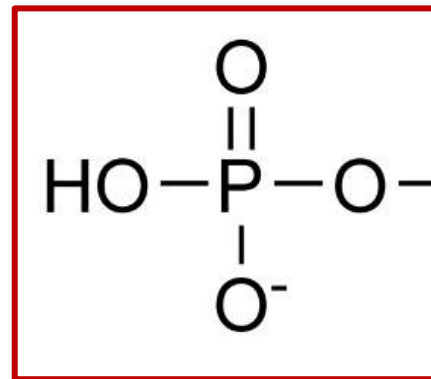
DNA – **d**eoxyribonucleic **a**cid Kwas deoksyrybonukleinowy

Podstawową jednostką (monomerem) budulcową DNA i RNA jest **nukleotyd**.

Zasada azotowa

Nukleotyd

Grupa fosforanowa



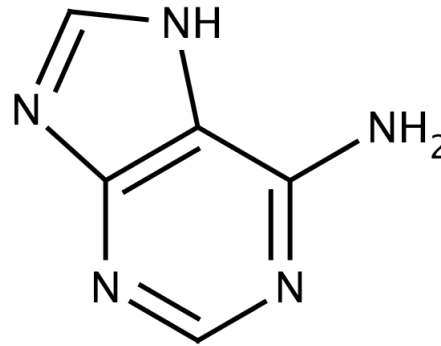
Cukier pentoza - deoksyryboza

Nukleozyd

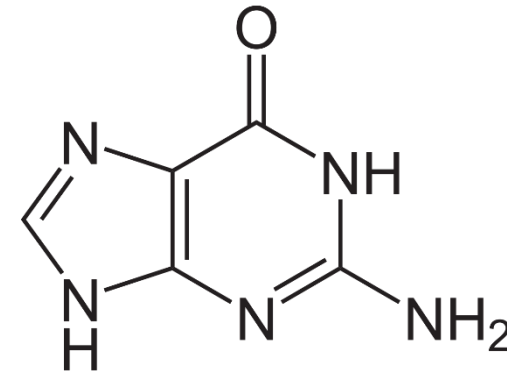
Barkoding DNA – ogólne założenia

Zasady azotowe w DNA:

Puryny:

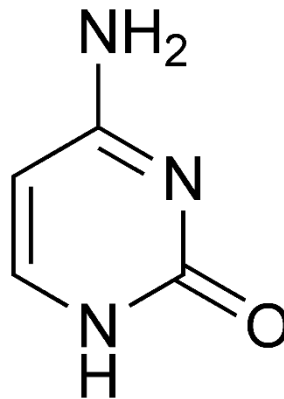


Adenina

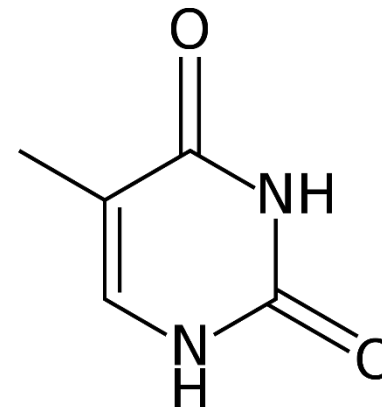


Guanina

Pirymidyny:



Cytozyna



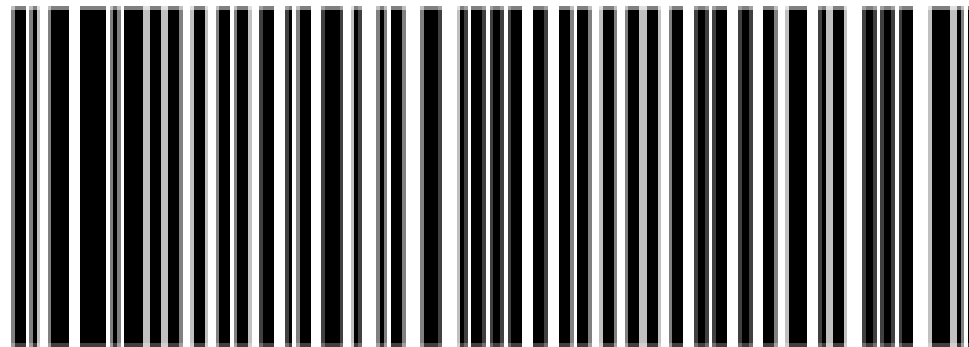
Tymina



Barkoding DNA – ogólne założenia

```
AACCCAACACCTCACAGCAGGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTGTATATAGACCCCAAACGGGGAATAATTATCTCTAACTAT
AACCCAACACCTCACAGCAGGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTGTATATAGACCCCAAACGGGGAATAATTATCTCTAACTAT
AACCCAACACCTCACAGCAGGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTGTATATAGACCCCAAACGGGGAATAATTATCTCTAACTAT
AACCCAACACCTCACAGCAGGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTGTATATAGGCCCCCAAACGGGGAATAATTATCTCTAACTAT
AACCCAACACCTCACAGCAGGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTGTATATAGACCCCAAACGGGGAATAATTATCTCTAACTAT
AACCCAACACCTCACAGCAGGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTGTATATAGACCCCAAACGGGGAATAATTATCTCTAACTAT
AACCCAACACCTCACAGCAGGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTGTATATAGACCCCAAACGGGGAATAATTATCTCTAACTAT
AACCCAACACCTCACAGCAGGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTGTATATAGGCCCCCAAACGGGGAATAATTATCTCTAACTAT
AACCCAACACCTCACGGCAGGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTGTATACAGACCCCAAACGGGGAATAAGTTATCTCTAACTAT
AACCCAACACCTCACAGCAGGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTGTATACAGACCCCAAACGGGGAATAAGTTATCTCTAACTAC
AACCCAACACCTCACAGCAGGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTGTATACAGACCCCAAACGGGGAATAAGTTATCTCTAACTAC
AACCCAACACCTCACAGCAGGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTGTATACAGACCCCAAACGGGGAATAAGTTATCTCTAACTAT
```

Czy DNA może być porównany do kodu kreskowego ?



(00) 0 0123456 000000001 8

Barkoding DNA – ogólne założenia



W roku 2003 **Paul Hebert** z Uniwersytetu w Guelph (Kanada) zaproponował nową metodę identyfikacji gatunków nazwaną **”DNA barcoding”**.



Received 29 July 2002
Accepted 30 September 2002
Published online 8 January 2003

Biological identifications through DNA barcodes

Paul D. N. Hebert*, Alina Cywinska, Shelley L. Ball
and Jeremy R. deWaard

Department of Zoology, University of Guelph, Guelph, Ontario N1G 2W1, Canada

Although much biological research depends upon species diagnoses, taxonomic expertise is collapsing. We are convinced that the sole prospect for a sustainable identification capability lies in the construction of systems that employ DNA sequences as taxon ‘barcodes’. We establish that the mitochondrial gene cytochrome *c* oxidase I (COI) can serve as the core of a global bioidentification system for animals. First, we demonstrate that COI profiles, derived from the low-density sampling of higher taxonomic categories, ordinarily assign newly analysed taxa to the appropriate phylum or order. Second, we demonstrate that species-level assignments can be obtained by creating comprehensive COI profiles. A model COI profile, based upon the analysis of a single individual from each of 200 closely allied species of lepidopterans, was 100% successful in correctly identifying subsequent specimens. When fully developed, a COI identification system will provide a reliable, cost-effective and accessible solution to the current problem of species identification. Its assembly will also generate important new insights into the diversification of life and the rules of molecular evolution.

Keywords: molecular taxonomy; mitochondrial DNA; animals; insects; sequence diversity; evolution

1. INTRODUCTION

The diversity of life underpins all biological studies, but it is also a harsh burden. Whereas physicists deal with a cosmos assembled from 12 fundamental particles, biologists confront a planet populated by millions of species. Their discrimination is no easy task. In fact, since few taxonomists can critically identify more than 0.01% of the

Allander *et al.* 2001; Hamels *et al.* 2001). However, the problems inherent in morphological taxonomy are general enough to merit the extension of this approach to all life. In fact, there are a growing number of cases in which DNA-based identification systems have been applied to higher organisms (Brown *et al.* 1999; Bucklin *et al.* 1999; Trewick 2000; Vincent *et al.* 2000).

Genomic approaches to taxon diagnosis exploit diversity

Barkoding DNA – ogólne założenia

BARCODING

Metoda taksonomiczna wykorzystująca marker genetyczny (**sekwencje mitochondrialnego lub jądrowego DNA**) organizmu w celu jego identyfikacji i określenia przynależności do określonego gatunku.



Barkoding DNA – ogólne założenia

Cechy COI, które umożliwiają zastosowanie tej sekwencji w barkodingu:

sekwencje COI charakteryzują się **małą zmiennością wewnątrzgatunkową** (mała zmienność nukleotydowa pomiędzy osobnikami);

zmienności sekwencji DNA pomiędzy osobnikami tego samego gatunku, np. u motyli na poziomie **0,1-0,3%**;

sekwencje COI charakteryzują się **dużą zmiennością międzygatunkową** (dużą zmiennością nukleotydową pomiędzy dwoma gatunkami w obrębie tego samego rodzaju);

1,1-4,3% różnic nukleotydowych (czasami więcej) pomiędzy dwoma gatunkami należącymi do tego samego rodzaju u motyli.

Barkoding DNA – ogólne założenia

Co umożliwia barkoding DNA ?

- identyfikację gatunku wyłącznie na podstawie fragmentów tkanek, krwi, kości i wszelkich innych fragmentów okazów (piór, pyłków, nasion itp.);
- identyfikację gatunku jedynie na podstawie stadiów rozwojowych, larw, jaj itp.;
- odkrycie nowych gatunków dla nauki;
- identyfikację gatunku przez osoby nie będące specjalistami.

Barkoding DNA – ogólne założenia

Barkoding DNA różni się od tzw. **filogenezy molekularnej**, której celem jest identyfikacja wzorców pokrewieństwa między gatunkami w oparciu o sekwencje DNA (lub sekwencje RNA lub sekwencje aminokwasów).

Barkodingu DNA nie należy mylić z "kodem kreskowym DNA" stosowanym w optycznym mapowaniu DNA (chromosomów) ani z "kodem kreskowym" przeciwnie stosowanym w identyfikacji białek.

Barkoding DNA – ogólne założenia



Region barkodowy u zwierząt:

- DNA mitochondrialny: Pierwsza podjednostka oksydazy cytochromowej (**COI**, **COX1**)



Grzyby:

- DNA mitochondrialny: Pierwsza podjednostka oksydazy cytochromowej (**COI**, **COX1**)
- DNA jądrowy: (**ITS** – internal transcribed spacer).



Rośliny:

- DNA chloroplastowy: **rbcLa**, **matK**, **trnH-psbA**
- DNA jądrowy: (**ITS** – internal transcribed spacer).



Barkoding DNA – mini-barkoding

DNA mini-barkoding:

- podobny do klasycznego barkodingu DNA;
- do identyfikacji gatunków wykorzystuje się małe fragmenty genu COI (około 100 bp);
- stosuje się w przypadku próbek mających zdegradowane DNA i niepełną izolację/amplifikację fragmentów genów COI.

Molecular Ecology Notes (2006) 6, 959–964

doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01470.x

BARCODING

A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded

MEHRDAD HAJIBABAEI,* M. ALEX SMITH,* DANIEL H. JANZEN,+ JOSEPHINE J. RODRIGUEZ,‡
JAMES B. WHITFIELD‡ and PAUL D. N. HEBERT*

*Biodiversity Institute of Ontario, Department of Integrative Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, N1G 2W1,

†Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA, ‡Department of Entomology,

University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61801, USA

Barkoding DNA – metabarkoding

METABARCODING to barcoding umożliwiającą jednoczesną identyfikację wielu taksonów w tej samej próbce.

Nie koncentruje się na jednym konkretnym organizmie, lecz ma na celu określenie składu gatunkowego w całej badanej próbce.

Journal of
**Cell Science &
Molecular Biology**



Volume 2, Issue 1 - 2015
© Pavan-Kumar A 2015
www.opensciencepublications.com

DNA Metabarcoding: A New Approach for Rapid Biodiversity Assessment

Review Article

Pavan-Kumar A*, Gireesh-Babu P and Lakra WS

Division of Fish Genetics and Biotechnology, ICAR-Central Institute of Fisheries Education, Versova, Mumbai-61

***Corresponding author:** Dr. Annam Pavan Kumar, Scientist, Division of Fish Genetics and Biotechnology, ICAR-Central Institute of Fisheries Education, Versova, Mumbai-61, India, E-mail: pavanannam@gmail.com

Article Information: Submission: 29/11/2014; Accepted: 25/02/2015; Published: 06/03/2015

Abstract

Biodiversity characterization is important to understand the ecological processes on earth. The recent advancements in molecular techniques have enabled us to identify the species composition more efficiently than the traditional methods. In DNA metabarcoding, the pooled genomic DNA extracted from environmental samples is used to amplify evolutionarily conserved genes by universal primers and sequenced using next generation sequencing technologies. In this brief review, the concept of DNA metabarcoding and its applications, limitations and challenges have been discussed.

Keywords: Biodiversity; DNA metabarcoding; Next Generation Sequencing; Environmental DNA

Procedury laboratoryjne w barkodingu DNA

Etapy uzyskiwania sekwencji DNA:

Metoda „klasyczna”:

- pobranie materiału,
- izolacja DNA,
- PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy),
- sekwencjonowanie,
- analiza sekwencji.

Metoda NGS:

- pobranie materiału,
- stworzenie biblioteki NGS,
- sekwencjonowanie,
- analiza sekwencji.



Procedury laboratoryjne w barkodingu DNA

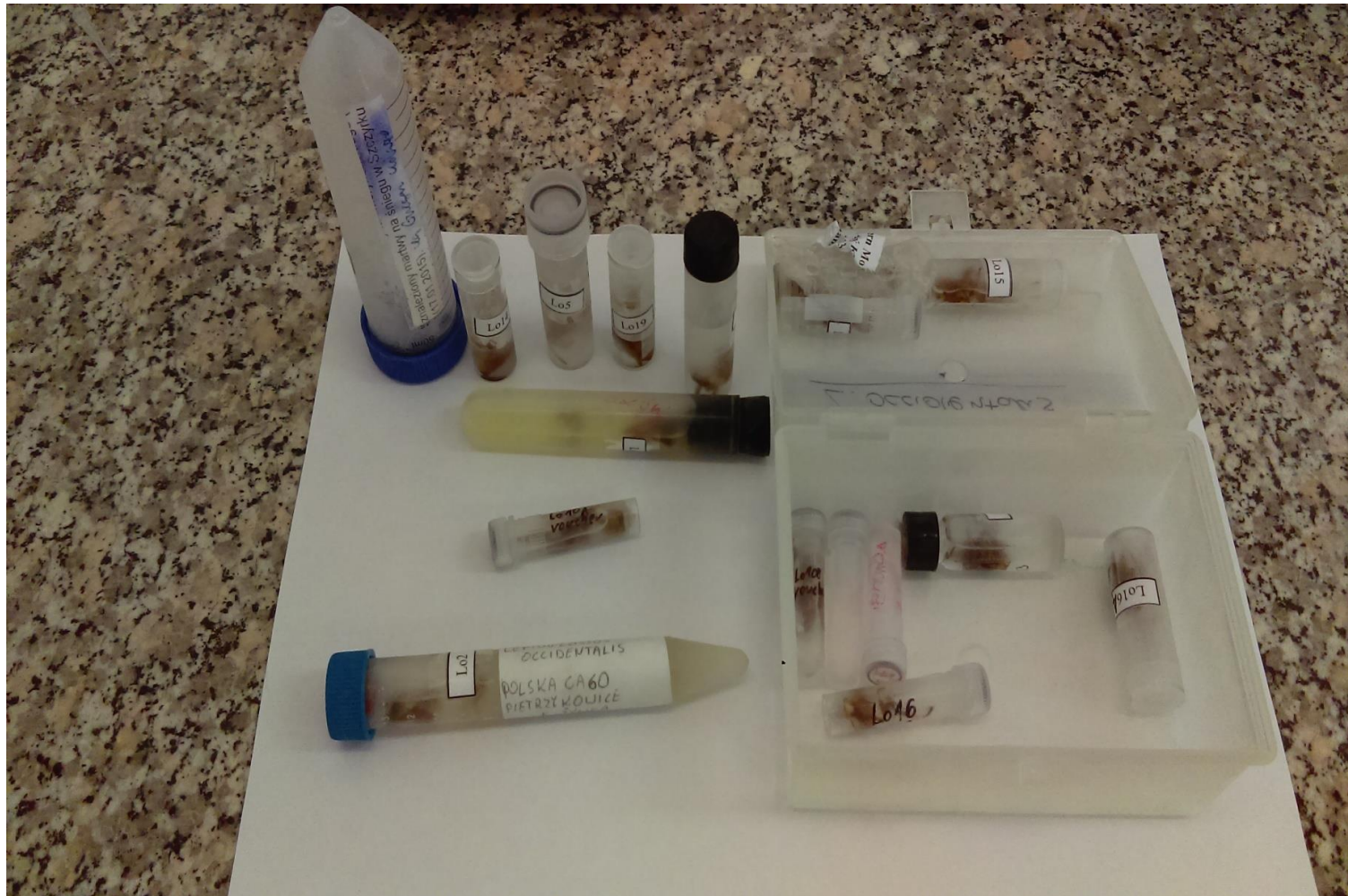
Etapy uzyskiwania sekwencji DNA (metoda klasyczna):

1. Pobranie materiału.
2. Izolacja materiału genetycznego.
3. Namnożenie interesującego nas fragmentu DNA (reakcja PCR).
4. Sekwencjonowanie.
5. Analiza bioinformatyczna uzyskanych sekwencji.



Procedury laboratoryjne w barkodingu DNA

1. Pobranie materiału.



Procedury laboratoryjne w barkodingu DNA

2. Izolacja materiału genetycznego.



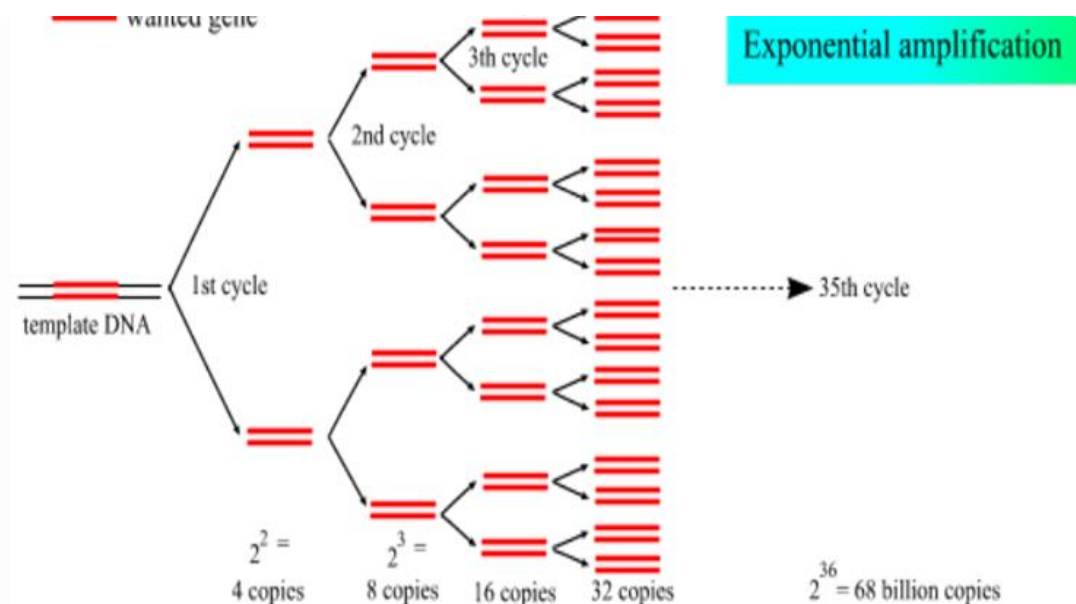
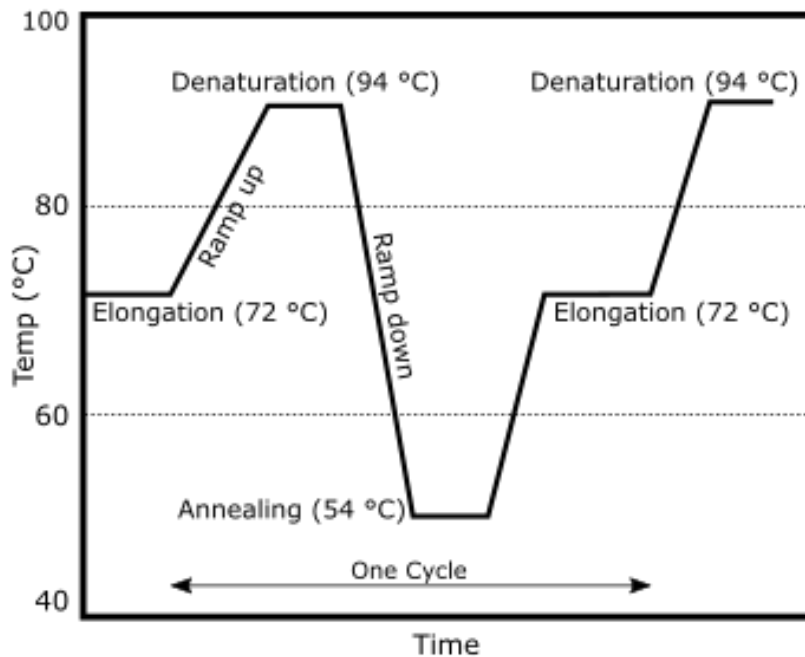
Procedury laboratoryjne w barkodingu DNA

3. Namnożenie interesującego nas fragmentu DNA (reakcja PCR).

Polymerase Chain Reaction (PCR) – Reakcja łańcuchowa polimerazy

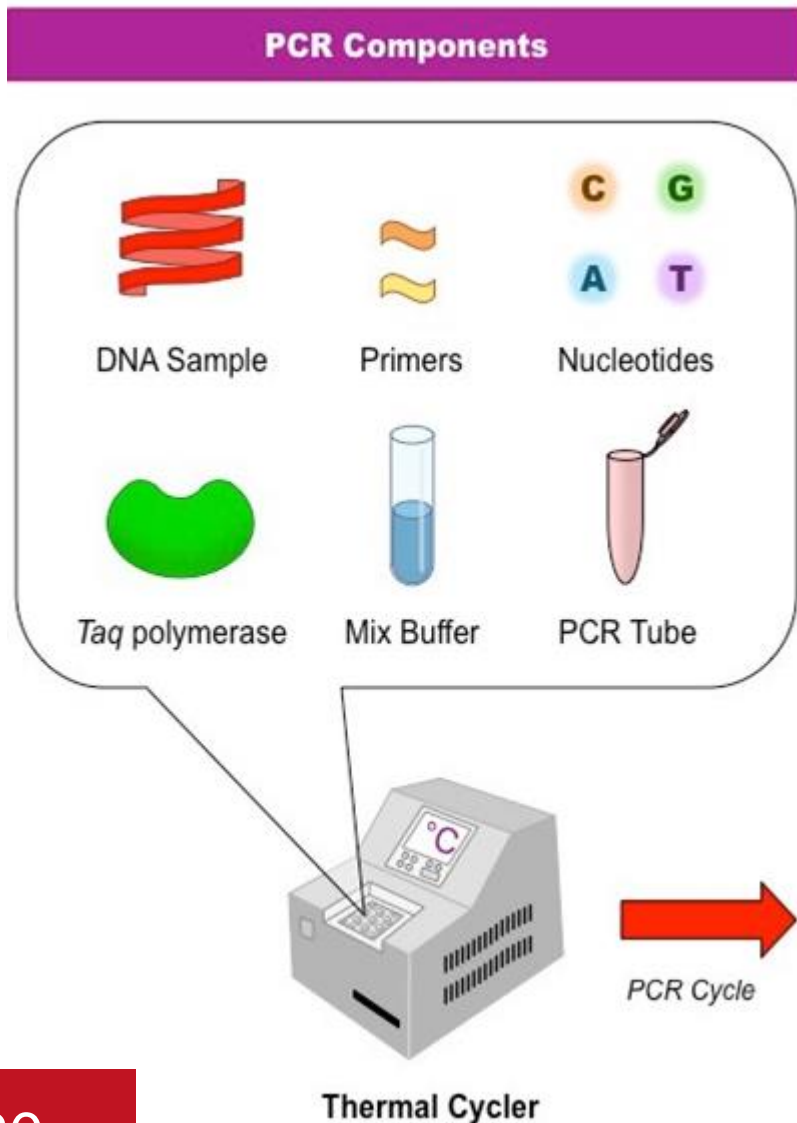
Naśladuje naturalny proces replikacji.

Metoda, która pozwala powielić dany fragment DNA do liczby wielu milionów kopii.



Reakcja PCR

Składniki



- Matrycowy DNA – fragment DNA, który chcemy powielić, wcześniej pobrany, wyizolowany i oczyszczony.
- Polimeraza Taq (Termostabilna Polimeraza DNA)
- Para zazwyczaj krótkich, jednoniciowych starterów oligonukleotydowych
- Bufor – taki, który będzie zapewniał odpowiednie pH
- **Jony magnezowe – kofaktory polimerazy**
- Duży nadmiar nukleotydów
- substraty do budowy nowych nici DNA

Reakcja PCR



Skład mieszaniny PCR (objętość 50 μ l):

- PCR Mix Plus 25 μ l
 - Taq DNA polimeraza 0,1 U/ μ l
 - MgCl₂ 4 mM
 - dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 0,5 mM
 - stabilizatory
 - czerwony barwnik
 - bufor obciążający
- Starter F 2 μ l
- Starter R 2 μ l
- DNA matrycowe 5 μ l
- Woda jałowa 16 μ l



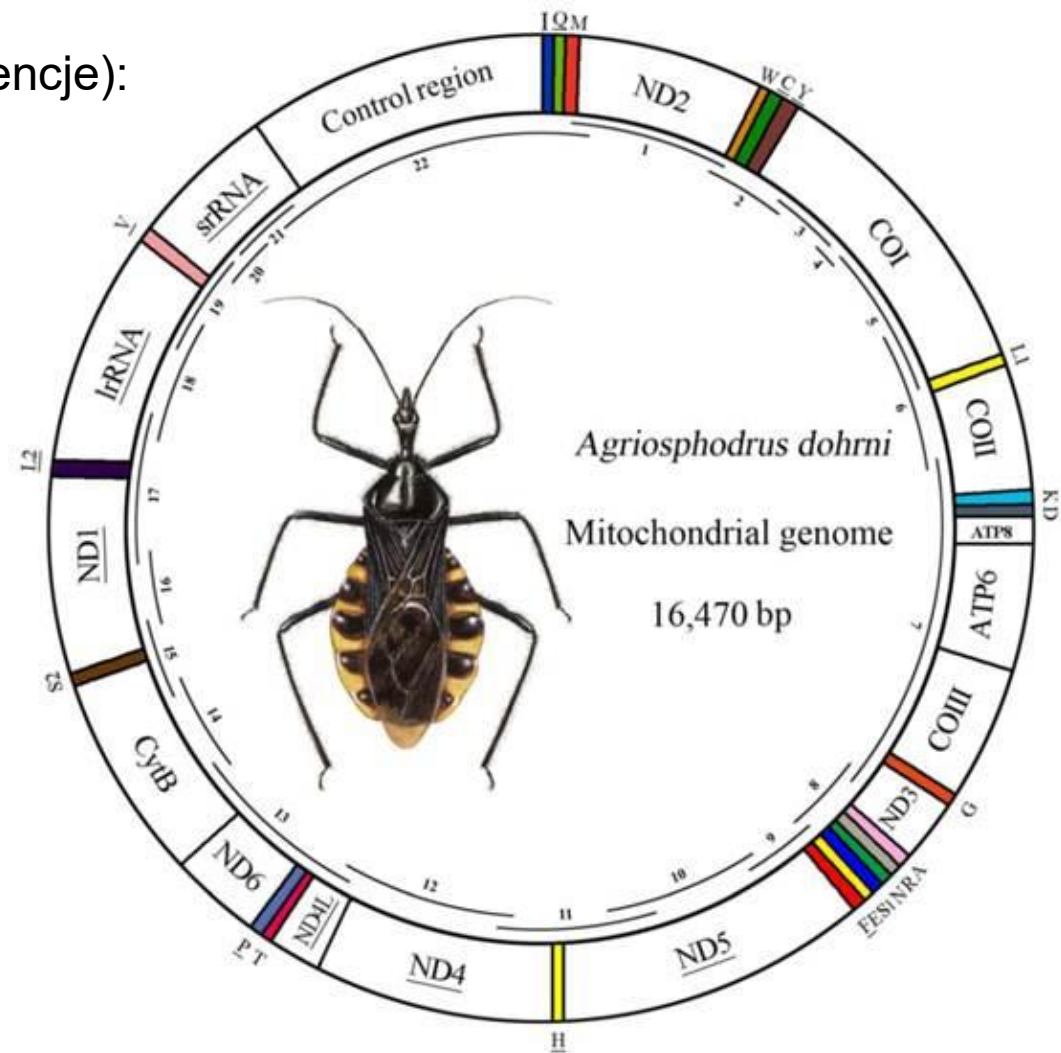
Najczęściej badane markery (sekwencje):

DNA mitochondrialne:

- COI
- cytochrom b
- 16S rDNA
- 12S rDNA

DNA jądrowe:

- EF-1 α
- EF-2 α
- 28S rDNA





Reakcja PCR

Przykład wykorzystywanych starterów dla różnych genów:

16S:

LR-J-12887 (5'-CCGGTTTGAGCTCAGATC-3') (forward)

LR-N-13398 (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') (reverse)

(Simon et al. 1994)

COI:

Jerry (5' -CAA CAT TTA TTT TGA TTT TTT GG – 3') (forward)

Pat (5' - TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A- 3') (reverse)

(Dupuis & Sperling 2015)

CytB:

REVCB2H (5'-TGAGGACAAATATCATTTTTGAGGW-3' (forward)

REVCBJ (5'-ACTGGTCGAGCTCCAATTCATGT-3' (reverse)

(Muraji et al. 2001)

28S:

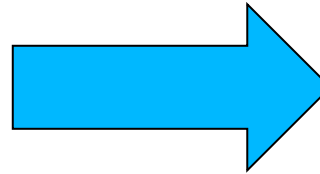
28SD2-F (5'-AGAGAGAGTTCAAGAGTACGTG-3') (forward)

28SD2-R (5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG-3')(reverse)

(Belshaw & Quicke 1996)

Etapy reakcji PCR

1. Inicjacja
2. Denaturacja
3. Hybrydyzacja (przyłączenie starterów)
4. Elongacja
5. Elongacja końcowa
6. Zakończenie



1. Denaturacja
2. Hybrydyzacja
3. Elongacja

Termocykler – urządzenie laboratoryjne do prowadzenia łańcuchowej reakcji polimerazy.

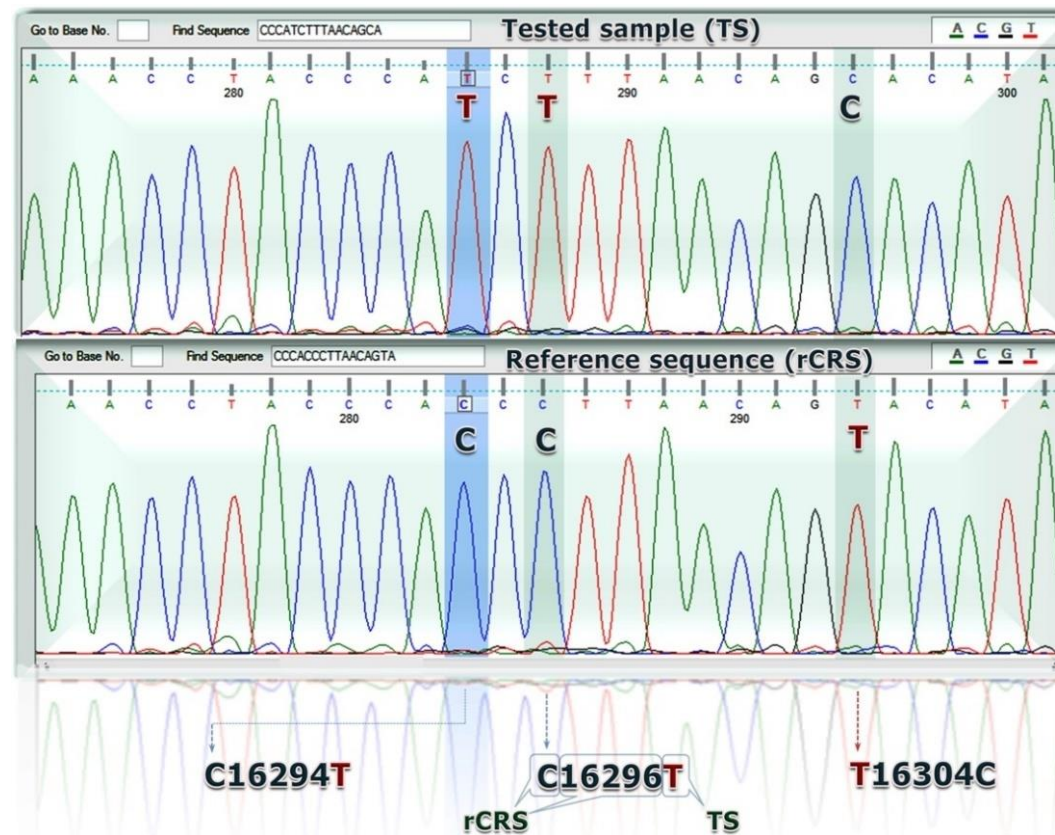




Procedury laboratoryjne w barkodingu DNA

4. Sekwencjonowanie.

Odczytywanie kolejności (sekwencji) nukleotydów w pewnym odcinku DNA.



Sekwencjonowanie metodą enzymatyczną (Metoda Sanger)

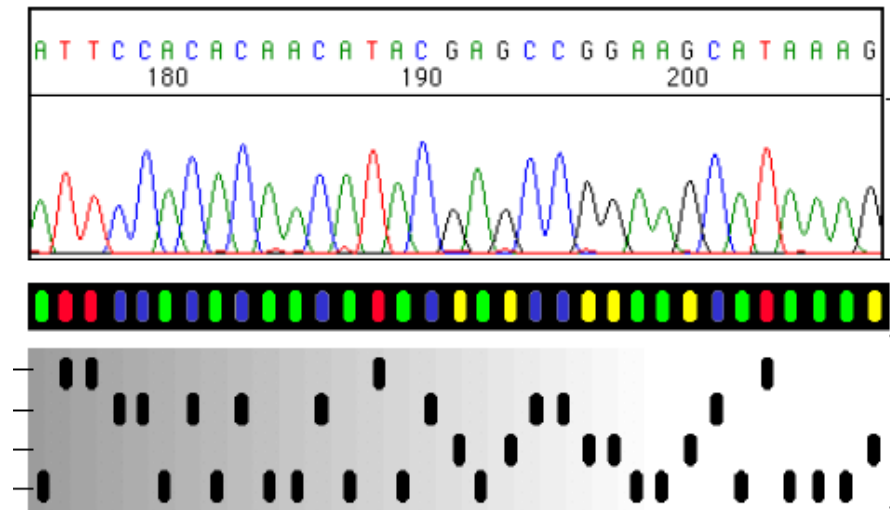
- Jeszcze najbardziej popularna technika,
- Wynalazł ją Fredrick Sanger w roku 1977,
- Przypomina reakcję PCR
- Opiera się na rozdzieleniu jednoniciowych DNA poprzez elektroforezę w żelu poliakryloamidowym.

Składniki reakcji:

- specyficzny produkt reakcji PCR (matryca DNA),
- polimeraza DNA,
- wolne nukleotydy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP),
- dideozynukleotydy (**ddATP**, **ddCTP**, **ddGTP**, **ddTTP**)

Dideozynukleotydy są odpowiednio wyznakowane fluorescencyjnie.

Sekwencjonowanie metodą enzymatyczną (Metoda Sanger)



Otrzymany wynik sekwencjonowania w formacie FASTA.

```
ACCGTGATTTCGACCTGATCATCCGCAGACTGAGACGCTGCACGGTCCGAGA  
CTGCACGGCGGCGACAACAGACGCGCCGCACCGATGTCCGCACAACGGCA  
GGACCTCGATAATACGACGTTATCTTGCGTCGGGCCGGACGCGCTTTTGT  
AAAATGCGCGTGCGCGATTTCGTGTCTTCTACCGTCCGACGGCCGGTCCG  
AAACCGTCACGGTCCAAACGCCTTACCCTTTGACAGGTAAAGACGATTGGG  
TCCCGAACGGCGCTTAGACCGACATCGAACGGGTCGCGATGCATTACTAAG  
GAGAAGTGCACGCCGTCCGCGAACGTCGACGCTGCCGGCCCGTGAAGCCC  
GCTATCCCCTTTGACAGGGACGGACGCCTCATCAGAGCGTGGCAGCGTACG  
CCGCGGATTGACGATGAATCTCTCCGTTTCGTTTCATTTCGAGTTTCGCAG  
GGTTTCCCCTGAACGGTTTCACGTACTCTTAAACTTCTCTCTAAAAAGGAG  
GGGGGGGGGGG  
GGAGGA
```

Procedury laboratoryjne w barkodingu DNA

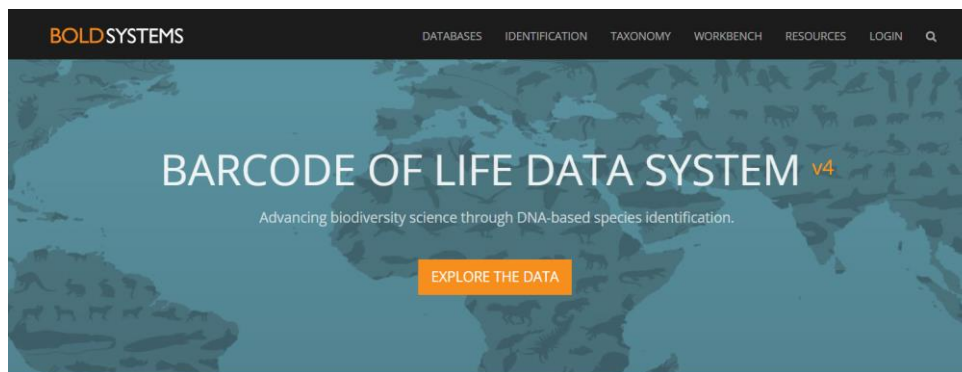
5. Analiza bioinformatyczna uzyskanych sekwencji.

Porównanie sekwencji z innymi sekwencjami w bazach danych.

Oznaczenie gatunku.

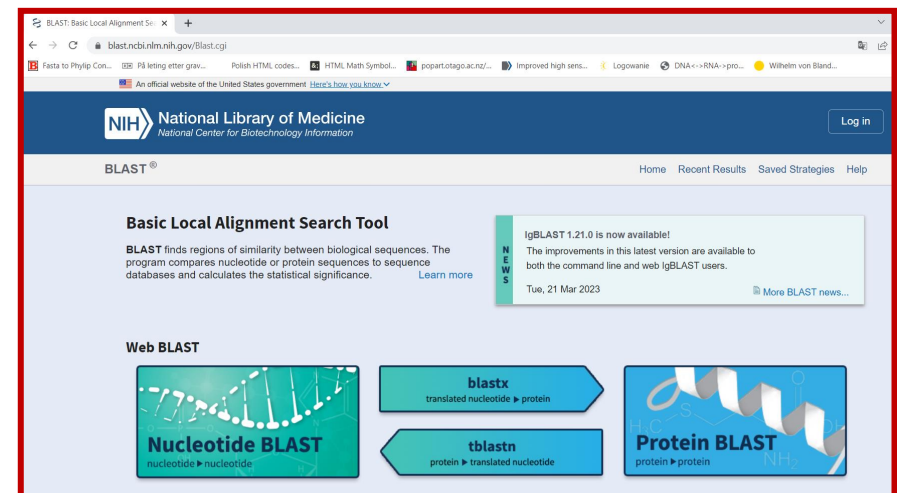
Najpopularniejsze bazy danych:

- **GenBank**
- **BOLDSYSTEMS**



DESIGNED TO SUPPORT THE GENERATION & APPLICATION OF DNA BARCODE DATA

BOLD is a cloud-based data storage and analysis platform developed at the Centre for Biodiversity Genomics in Canada. It consists of four main modules, a data portal, an educational portal, a registry of BINs (putative species), and a data collection and analysis workbench.



Analiza bioinformatyczna – detekcja gatunku

BOLDSYSTEMS

DATABASES

IDENTIFICATION

TAXONOMY

WORKBENCH

RESOURCES

LOGIN



The BOLD Identification System (IDS) for COI accepts sequences from the 5' region of the mitochondrial Cytochrome c oxidase subunit I gene and returns a species-level identification when one is possible. Further validation with independent genetic markers will be desirable in some forensic applications.

Historical Databases: **Current** Jul-2019 Jul-2018 Jul-2017 Jul-2016 Jul-2015 Jul-2014 Jul-2013 Jul-2012 Jul-2011 Jul-2010 Jul-2009

Search Databases:

All Barcode Records on BOLD (12,180,576 Sequences)

Every COI barcode record on BOLD with a minimum sequence length of 500bp. Records classified as Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, and Hymenoptera, without further taxonomic resolution, have been excluded to enhance the utility of the results. This search only returns a list of the nearest matches and does not provide a probability of placement to a taxon.

Species Level Barcode Records (4,775,781 Sequences/241,239 Species/120,571 Interim Species)

Every COI barcode record with a species level identification and a minimum sequence length of 500bp. This includes many species represented by only one or two specimens as well as all species with interim taxonomy.

Public Record Barcode Database (2,362,953 Sequences/151,654 Species/62,699 Interim Species)

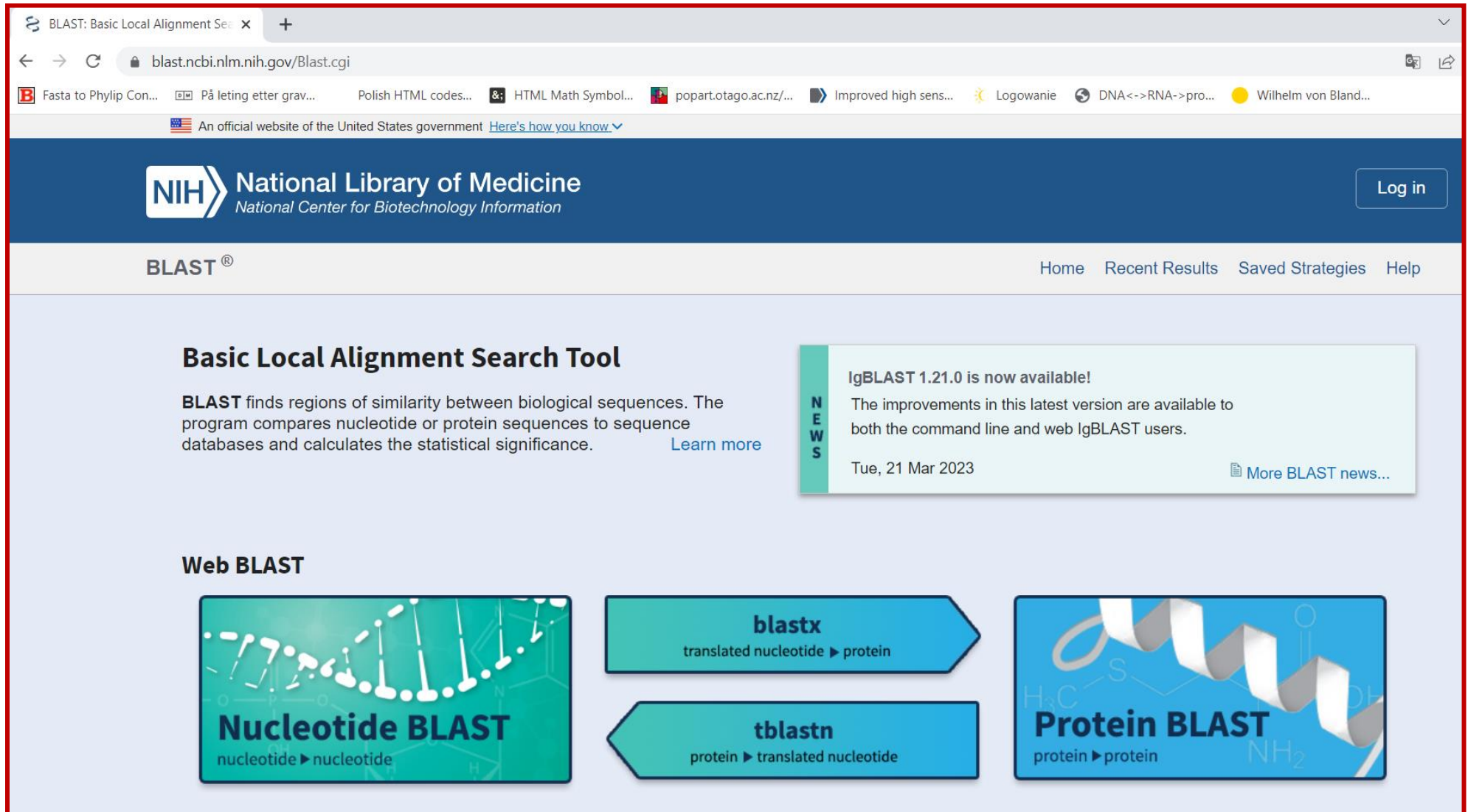
All published COI records from BOLD and GenBank with a minimum sequence length of 500bp. This library is a collection of records from the published projects section of BOLD.

Full Length Record Barcode Database (3,348,538 Sequences/217,298 Species/99,509 Interim Species)

Subset of the Species library with a minimum sequence length of 640bp and containing both public and private records. This library is intended for short sequence identification as it provides maximum overlap with short reads from the barcode region of COI.

Enter fasta formatted sequences in the forward orientation:

Analiza bioinformatyczna – detekcja gatunku



The screenshot shows the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) web interface. The browser address bar displays `blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi`. The page header includes the NIH logo and the text "National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information". A "Log in" button is visible in the top right corner. The main heading is "BLAST®" with navigation links for "Home", "Recent Results", "Saved Strategies", and "Help".

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. [Learn more](#)

Web BLAST

- Nucleotide BLAST**: nucleotide ► nucleotide
- blastx**: translated nucleotide ► protein
- tblastn**: protein ► translated nucleotide
- Protein BLAST**: protein ► protein

NEWS

IgBLAST 1.21.0 is now available!
The improvements in this latest version are available to both the command line and web IgBLAST users.
Tue, 21 Mar 2023 [More BLAST news...](#)

Analiza bioinformatyczna – detekcja gatunku

Database	nt See details ▾
Query ID	lcl Query_73193
Description	None
Molecule type	dna
Query Length	1009
Other reports	Distance tree of results MSA viewer ?

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

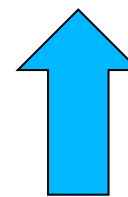
[Filter](#) [Reset](#)

- Descriptions**
- Graphic Summary
- Alignments
- Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▾ Select columns ▾ Show [?](#)

select all *100 sequences selected* [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Rebelia sp. BCREB063-09 voucher BC-EH-R63 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Rebelia sp. BCR...	785	785	60%	0.0	89.85%	658	HM407193.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lepidoptera sp. BOLD:AAL9916 voucher CLV5010 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitocho...	Stichobasis post...	776	776	60%	0.0	89.66%	658	HM902854.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rebelia herrichiella voucher BC ZSM Lep add 0140 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitocho...	Rebelia herrichiella	769	769	60%	0.0	89.36%	658	KX045628.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rebelia thomanni thomanni voucher BC-EH-R131 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitocho...	Rebelia thomanni...	769	769	60%	0.0	89.36%	658	HM407213.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rebelia herrichiella voucher BC ZSM Lep add 0135 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitocho...	Rebelia herrichiella	763	763	60%	0.0	89.20%	658	KX045811.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rebelia sapho voucher CLV3465 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Rebelia sapho	763	763	60%	0.0	89.20%	658	KX044475.1



Nazwa taksonu



Podobieństwo

Podsumowanie

Co ma wpływ na pozytywny wynik?

- wiek próbki,
- sposób przechowywania:
 - temperatura,
 - wilgotność,
 - uszkodzenia mechaniczne (szkodniki),
 - uszkodzenia „biologiczne” (pleśnie),
- niewłaściwie dobrane startery reakcji PCR,
- niewłaściwie dobrany profil temperaturowy reakcji PCR,
- niewłaściwa procedura podczas analizy sekwencji.

Dziękuję za uwagę !

Organizator



Województwo
Śląskie



Muzeum
Górnośląskie
w Bytomiu