



**ČMSCH** a.s. | ČESKOMORAVSKÁ  
SPOLEČNOST  
CHOVATELŮ

# OPTIMALIZACE ODBĚRU ALTERNATIVNÍCH BIOLOGICKÝCH VZORKŮ PRO NÁVAZNOU KVALITNÍ IZOLACI GENOMICKÉ DNA

Daniela Schröffelová a kolektiv



**2018**

**CERTIFIKOVANÁ METODIKA**

**ISBN 978-80-87633-01-4**



**ČMSCH** | ČESKOMORAVSKÁ  
a.s. | SPOLEČNOST  
CHOVATELŮ

# CERTIFIKOVANÁ METODIKA

## OPTIMALIZACE ODBĚRU ALTERNATIVNÍCH BIOLOGICKÝCH VZORKŮ PRO NÁVAZNOU KVALITNÍ IZOLACI GENOMICKÉ DNA

Metodika byla vypracovaná v rámci výzkumného projektu

### **MZe NAZV QK1810253:**

*„Navýšení spolehlivosti celostátního genomického hodnocení  
dojeného skotu zařazením krav s domácí užitkovostí  
do genotypované referenční populace“*

#### **Autoři:**

Daniela Schröffelová  
Lucie Němcová  
Jarmila Hromádková  
Josef Kučera  
David Lipovský  
Vladimír Šteiger  
Michaela Přibáňová

#### **Oponenti:**

Zdenka Majzlíková  
Česká plemenářská inspekce, Praha  
Zdeněk Havlíček  
Mendelova univerzita v Brně

**2018**

Česká plemenářská inspekce  
Slezská 100/7, Praha 2, 120 00

v y d á v á

**OSVĚDČENÍ**

9872-ČPI/2018

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

**Název metodiky:** Optimalizace odběru alternativních biologických vzorků pro návaznou kvalitní izolaci genomické DNA. **QK1810253**

**Autoři:** D. Schröffelová, L. Němcová, J. Hromádková, J. Kučera, D. Lipovský, V. Šteiger, M. Přibáňová

**Názvy organizací:** Českomoravská společnost chovatelů, a.s. Hradištko pod Medníkem

**Místo vydání:** Praha

**Rok vydání:** 2018

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu/podpory na rozvoj výzkumné organizace č. **MZe NAZV QK1810253**

Využívá projekt „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví, rybolov“? ANO

V případě, že projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu“, je výsledek typu  $N_{met}$  zdarma k dispozici všem zájemcům na webové stránce:

[https://www.cmsch.cz/getattachment/Tiskopisy,-dokumenty/Laborator-imunogenetiky/Certifikovana-metodika-Optimalizace-odberu-alter/Metodika\\_NAZV\\_-2017-18.pdf.aspx?lang=cs-CZ](https://www.cmsch.cz/getattachment/Tiskopisy,-dokumenty/Laborator-imunogenetiky/Certifikovana-metodika-Optimalizace-odberu-alter/Metodika_NAZV_-2017-18.pdf.aspx?lang=cs-CZ)

Česká plemenářská inspekce  
Slezská 100/7  
120 00 Praha 2

V Praze dne 27. 9.2018 .....

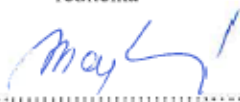
Razítko odborného orgánu státní správy

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Zdenka Majzliková

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

ředitelka

  
.....  
Podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitelky Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V Praze dne 31 -10- 2018

  
.....  
Ing. Pavlína Adam, Ph.D.

MINISTERSTVO  
ZEMĚDĚLSTVÍ  
125 00 Praha 1 - Nové Město  
110 00 Praha 1 - Nové Město

## Obsah:

<b>I. CÍL METODIKY</b> .....	1
<b>II. VLASTNÍ POPIS METODIKY</b> .....	1
<b>II. 1. Úvod</b> .....	1
<b>II. 2. Přehled možných zdrojů DNA</b> .....	2
<b>II. 3. Princip izolace a přehled aplikovatelných metod izolace DNA</b> .....	2
<b>II. 3. 1. Princip izolace</b> .....	2
<b>II. 3. 2. Přehled aplikovatelných metod izolace DNA</b> .....	2
<b>II. 4. Stanovení laboratorně–metodických kritérií výběru favorizovaných zdrojů DNA</b> .....	3
<b>II. 5. Stanovení praktických – „chovatelských“ – kritérií výběru vhodných zdrojů DNA</b> .....	4
<b>II. 6. Srovnání vhodnosti a zdůvodnění výběru favorizovaného a alternativního zdroje DNA podle stanovených kritérií</b> .....	6
<b>II. 6. 1. Srovnání metod izolace DNA, výběr favorizované a alternativní metody izolace DNA</b> .....	6
<b>II. 6. 2. Srovnání vhodnosti zdrojů DNA z praktických – chovatelských kritérií, výběr favorizovaného a alternativního zdroje DNA</b> .....	6
<b>II. 7. Výběr vhodné odběrové sady a zpracování postupu odběru pro favorizovaný a alternativní zdroj</b> .....	6
<b>II. 7. 1. Odběrová sada a postup odběru pro zdroj DNA chlupové cibulky</b> .....	6
<b>II. 7. 2. Odběrová sada a postup odběru pro zdroj DNA nasální stěr</b> .....	7
<b>II. 8. Vyhodnocení pilotní studie odběru favorizovaného a alternativního zdroje dna využitím odběrových setů pro odběr chlupových cibulek a nasálních stěrů</b> .....	7
<b>III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ</b> .....	8
<b>IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY</b> .....	9
<b>V. EKONOMICKÉ ASPEKTY</b> .....	9
<b>VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY</b> .....	10
<b>VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE</b> .....	12
<b>VIII. PŘÍLOHY</b> .....	13
Příloha 1A – Odběrový set pro odběr chlupových cibulek - část vzorkovnice .....	13
Příloha 1B – Odběrový set pro odběr chlupových cibulek - obálka.....	14
Příloha 2 – Odběrový set pro zdroj DNA – nasální stěr .....	15
Příloha 3A – 1 Kvalitně odebrané chlupové cibulky .....	17
Příloha 3A – 2 Nekvalitně odebrané chlupové cibulky .....	17
Příloha 3B – 1 Kvalitně odebraný nasální stěr .....	18
Příloha 3B – 2 Nekvalitně odebrané nasální stěry.....	18

## I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je:

- vtipovat, odzkoušet a doporučit pro chovatelskou praxi optimální a alternativní zdroje DNA vhodné pro plošný odběr biologických vzorků určených k izolaci genomické DNA skotu.
- Zdůvodnit výběr a doložit vhodnost favorizovaných zdrojů DNA z hlediska účelně stanovených kritérií.
- Při volbě kritérií zohlednit jak nároky a limity izolačních technik a metod praktikovaných v rutinní servisní laboratoři, tak možnosti komfortního provedení odběru zdroje v podmínkách chovatelské praxe.
- Kompromisní volbou optimálního zdroje DNA, která zohlední jak „laboratorní“ tak „chovatelské“ nároky na odběr vzorku, docílit vysokou míru jistoty, že z vybraných zdrojů bude možné úspěšně izolovat genomickou DNA a následně provést analýzu genomu pomocí SNP – Bovine Chip technologie.
- Popsat a chovatelské praxi nabídnout jednoduchý postup, podle kterého budou v chovech plošně odebírány standardizované biologické vzorky, vhodné pro izolaci DNA v kvalitě nárokované SNP – Bovine Chip technologií v industriálním laboratorním modelu s velkou průchodností vzorků rutinní laboratoří.
- Doporučit vhodnou odběrovou sadu/sady pro vtipovaný zdroj/zdroje DNA.
- Vyvinout a odzkoušet originální odběrovou sadu, nebude-li vhodná odběrová sada komerčně dostupná.
- Výběrem vhodných zdrojů DNA, vypracováním postupu odběru, doporučením a vývojem odběrové sady pro vybrané zdroje DNA komplexně optimalizovat proces odběru vzorků DNA a eliminovat riziko nutnosti opakování odběrů vzorků DNA, které v konečném důsledku vede ke zpomalení procesu genomických analýz a navýšení finančních nákladů na SNP genotypizaci.

## II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

### II. 1. Úvod

Molekulárně biologické analýzy DNA patří již přes dvacet let k laboratorním metodám, které slouží jako metodický nástroj k ověřování rodičovství (polymorfismus STR – mikrosatelity) a ke screeningu statusu genu s vlivem na zdraví a užitkovost přímým testem bodových mutací (PCR-RFLP, alelově specifická PCR apod.).

V posledních letech se nejrozšířenější molekulárně biologickou analýzou v oblasti agrigenomiky stala SNP technologie, zejména pak analýza SNP polymorfismu na microarrays (DNA čipech – Bovine Chips). Metoda prioritně poskytuje analytická data potřebná k výpočtu genomických plemenných hodnot (GPH) a souběžně nabízí možnost interpretace statusu genů s vlivem na zdraví a užitkovost metodou haplotypování, jako alternativu k přímým testům bodových mutací.

Výpovědní hodnota jakéhokoliv výsledku DNA analýzy je do značné míry závislá na typu použitého biologického zdroje, který striktně podmiňuje a limituje výtěžnost a kvalitu extraktu DNA.

Kvalitně izolovaná DNA je nutnou podmínkou úspěšné analýzy v navazující SNP technologii a limituje míru úspěšnosti genotypizace na microarrays (Bovine Chips) vyjádřenou tzv. call rate.

Absence analytických dat (nebo jejich části) – nízký call rate – je limitujícím faktorem možnosti zařazení výsledku analýzy SNP jedince, ze kterého byl vzorek pro izolaci DNA odebrán, do výpočtu GPH.

Vzhledem k finanční náročnosti SNP technologie je proto nutné zařazovat do procesu genotypizace na microarrays pouze kvalitní vzorky DNA, kterou je možné izolovat pouze ze standardně odebraných zdrojů.

Spolehlivost výpočtů GPH se zvyšuje a zpřesňuje navýšením počtu genotypizovaných jedinců v referenční populaci, z čehož logicky vyplývá nutnost zavedení plošného odběru vzorků v početných stádech za současného zachování standardu kvality odběru.

Optimalizace odběrů kvalitního zdroje DNA se tedy stává zcela zásadní podmínkou úspěšnosti a efektivity projektu genomického hodnocení dojeného skotu v ČR.

## II. 2. Přehled možných zdrojů DNA

DNA lze teoreticky izolovat z jakéhokoliv vzorku odebraného z těla hospodářského zvířete, který obsahuje plnohodnotné buňky s buněčným jádrem v limitní kvantitě a zachované kvalitě (Sebastianelli *et al.*, 2008).

K „tradičním“ biologickým materiálům pro izolaci DNA hospodářských zvířat patří vzorky nesrážlivé žilní krve ve standardních odběrových zkumavkách.

K molekulárně biologické analýze lze rutinními postupy získat DNA i z jiných, „alternativních“, biologických zdrojů: chlupové cibulky, vzorky z biopsií tkání (např. **TSU** - Tissue Sample Unit), stěry sliznic, sperma, popřípadě i některé biologicky nedegradované části kadáverů (Giella and Rigg, 2017).

Diskutabilní je možnost izolace DNA z reziduálních, degradovaných a jinak nestandardních zdrojů (použité pejetý po inseminaci, biopsie embryí apod.). I z takto nestandardních zdrojů je možné vhodně zvolenou a individuálně praktikovanou metodou izolovat genomickou DNA a následným nabohacením výtěžku *in vitro* docílit možnosti aplikovat takto upravenou DNA na microarray. Tento složitý, časově náročný a finančně nákladný postup však nelze aplikovat při plošné genotypizaci velkého počtu vzorků (Beránek *et al.*, 2012).

## II. 3. Princip izolace a přehled aplikovatelných metod izolace DNA

### II. 3. 1. Princip izolace

Izolace genomické DNA ze živočišných buněk v principu probíhá ve dvou, případně ve třech, na sebe navazujících krocích:

- **První fáze** tzv. **Lýze buněk** – narušení integrity buněčné stěny a uvolnění DNA do roztoku. Používá se kombinace fyzikálních a chemických postupů. Důležitou roli hraje využití detergentů a proteolytických enzymů (nejčastěji Proteináza K). Přítomné detergenty rozrušují fosfolipidové membrány a proteinázy zas degradují veškeré proteiny, čímž je docíleno uvolnění DNA z buňky. V případě buněk s pevnými buněčnými stěnami musí enzymatickému štěpení předcházet mechanické rozrušení membrán. Výsledkem je buněčný lyzát obsahující DNA ve směsi s proteiny, solemi, nečistotami, zbytky lyzačních činidel, detergentů apod. (Šteiger, 2018).
- **Druhá fáze: vlastní extrakce DNA z buněčného lyzátu** tj. oddělení DNA od ostatních složek lyzátu.
- **Třetí fáze (purifikační fáze)** zahrnuje postupy zaměřené na přečištění uvolněné DNA, především je zaměřena na odstranění takových složek ze vzorku, které by mohly inhibovat následné analytické metody. Nejčastěji je využíváno „dočištění“ extraktu ethanolem. V některých případech lze od posledního kroku „dočištění“ v rutinních protokolech upustit (Miller *et al.*, 1999; Vondrejs and Storchová, 1997).

Vhodnou metodu izolace DNA volíme na základě několika různých faktorů, ke kterým patří vlastnosti výchozího biologického vzorku-zdroje DNA, předpokládaný výtěžek a kvalita DNA nárokováná následnou analytickou metodou, robustnost a opakovatelnost metody izolace a v neposlední řadě i časová a finanční náročnost metody izolace (Raška, 2006, Beránek *et al.*, 2006).

### II. 3. 2. Přehled aplikovatelných metod izolace DNA

SNP microarrays – Bovine Chips Illumina technologie nárokuje v rutinním protokolu DNA s vysokou čistotou a koncentrací. Doporučené hodnoty: měřeno spektrofotometricky – NanoDrop: R 260/280 a 260/230 = 1,8 – 2,1 + limitní koncentrací 50ng/μl (*Infinium® HTS Assay Protocol Rev. A October 2013*).

Výše specifikovaný nárok na kvalitu a kvantitu výtěžku DNA v kombinaci s podmínkou zabezpečení vysoké průchodnosti vzorků rutinní laboratoří v praktikovaném industry modelu provozu, do jisté míry zužuje široké spektrum popsanych metod izolace DNA, které lze účelně a efektivně aplikovat (Neary *et al.*, 2014).

Způsob provedení prvního metodického kroku izolace DNA – lýze buněk – vychází z vlastností výchozího zdroje DNA.

Z pohledu zabezpečení vysoké průchodnosti vzorků laboratoří je žádoucí minimalizovat počet alternativních výchozích zdrojů DNA a do nejvyšší možné míry unifikovat proces prvního kroku – lýze buněk – pro všechny alternativní zpracovávané zdroje.

Pro extrakci DNA z buněčného lyzátu a případné pročištění DNA (druhý a třetí krok) lze praktikovat několik základních metodických postupů:

- **Postupy založené na oddělení polárních a nepolárních látek – „metoda precipitační“**

Podstatou je přidání směsi nasyceného roztoku NaCl a 24:1 (v/v) chloroform-isoamyl alkoholu k buněčnému lyzátu. Po protřepání a samovolném oddělení zůstává ve vodné fázi rozpuštěná DNA, zatímco do organické fáze se rozpustí nepolární látky, např. lipidy. Bílkoviny, které mají polární i nepolární části, zůstanou na rozhraní obou fází. Po manuální separaci horní fáze (pipetováním) se DNA z vodní fáze precipituje isopropanolem. Následně se pročistí ethanolem (Miller *et al.*, 1988).

- **Postupy založené na inaktivaci enzymatických kofaktorů – „metoda CHELEX“**

Podstatou je separace buněčného lyzátu pomocí centrifugace, po které následuje přidání tzv. chelatačních činidel – látek, které jsou na sebe schopny vyvazovat některé typy iontů. V praxi je nejčastěji používán Chelex–100, iontoměničová pryskyřice, která vyvazuje dvojmocné ionty kovů. Přidáním Chelexu–100 k lyzátu dojde k vyvázání hořčnatých iontů z roztoku, které pak nemohou plnit funkci kofaktorů, a tudíž endonukleázy nemohou enzymaticky štěpit DNA; tím je izolát stabilizován.

DNA nebývá z roztoku precipitována ani dále pročišťována (Walsch *et al.*, 1991).

- **Postupy založené na vazbě DNA na pevnou fázi**

Využívají efektu, že DNA je molekula s parciálním (tj. částečným) záporným nábojem. Jako zmíněná pevná fáze je zpravidla užívána silika (polymerní oxid křemičitý), která je na povrchu rovněž záporně nabitá. V čisté vodě se tak DNA a silika navzájem odpuzují. Pokud však do roztoku přidáme tzv. chaotropní soli, zafungují jako zprostředkovatel vazby mezi DNA a silikou. Touto vazbou je pak DNA pevně vázána k silice a může být spolu s ní transportována. Po změně složení roztoku (snížení koncentrace solí, změně pH z kyselého na zásadité) dojde ke zrušení vazby DNA na silikát a k jejímu uvolnění do roztoku (Šimková, 2012).

V praxi jsou užívána dvě základní uspořádání tohoto izolačního postupu:

- tzv. silikátové kolonky, kde je DNA zachycena na kolonce během centrifugace lyzátu, poté je přečištěna a následně uvolněna do čistého elučního roztoku – „**metoda KOLONKY**“

Podmínkám provozu rutinní laboratoře nejlépe vyhovuje komerčně dostupný, vysoce sofistikovaný izolační kit: *QIAamp DNA Mini Kit 250* (Neary *et al.*, 2014).

- magnetosilikové partikule, kde se DNA naváže na tyto paramagnetické kuličky, které mohou být manipulovány pomocí magnetu – např. vyjmuty z roztoku, přeneseny do přečišťovacích roztoků a z nich nakonec do elučního roztoku, kde je DNA uvolněna – „**metoda MAGNETICKÉ KULIČKY**“

Podmínkám provozu rutinní laboratoře nejlépe vyhovuje komerčně dostupný, sofistikovaný izolační kit: *OMEGA Mag-Bind Blood&Tissue DNA HDQ Kit 96* (Keijzer *et al.*, 2010; Sebastianelli *et al.*, 2008).

## **II. 4. Stanovení laboratorně–metodických kritérií výběru favorizovaných zdrojů DNA**

Výše popsané metody, které má rutinní laboratoř aktuálně k dispozici, byly zhodnoceny a srovnány z hlediska následujících kritérií:

- nároky na pracovní sílu – **pracnost**
- trvání procesu izolace – **časová náročnost**
- nákupní cena chemikálie, komerčních izolačních kitů, spotřebního plastu apod. – **finanční náklady**
- **kvalita extraktu** – hodnocena z hlediska koncentrace, čistoty a absolutního výtěžku extraktu
- **možnost robotizace** – možnost modifikovat manuální protokoly pro TECAN EVO Freedom



	METODA PRECIPITAČNÍ	METODA CHELEX	METODA KOLONKY	METODA MAGNETICKÉ KULIČKY
PRACNOST	vysoká	nízká	střední	střední
ČASOVÁ NÁROČNOST	vysoká	nízká	střední	střední
FINANČNÍ NÁKLADY	nízké	střední	vysoké	střední
KVALITA EXTRAKTU	vysoká	střední	vysoká	vysoká
MOŽNOST ROBOTIZACE	NE	NE	NE	ANO

hodnoceno vzájemným srovnáním metodik, 3 relativní stupně: vysoký – střední – nízký; nebo ANO – NE

Dále byla posouzena **vhodnost** dispozičních **metod** pro izolaci DNA z jednotlivých zvažovaných zdrojů

	METODA PRECIPITAČNÍ	METODA CHELEX	METODA KOLONKY	METODA MAGNETICKÉ KULIČKY
NESRÁŽLIVÁ KREV	ANO	+/-	ANO	ANO
CHLUPOVÉ CIBULKY	NE	NE	ANO	ANO
NASÁLNÍ STĚRY	NE	ANO	+/-	+/-
TKÁŇ UCHA (TSU)	+/-	NE	+/-	ANO
SPERMA	ANO	+/-	ANO	ANO

Způsob hodnocení: ANO – vhodná, NE – nevhodná, +/- parciálně použitelná

## II. 5. Stanovení praktických – „chovatelských“ – kritérií výběru vhodných zdrojů DNA

Hodnoceny byly následující aspekty:

**INVAZIVITA ODBĚRU** – úkon odběru zdroje byl posouzen s ohledem na welfare zvířete během odběru a nutnost asistence veterinárního lékaře při odběru – Vyhláška 19/2018 Sb.

**NÁROKY NA SPECIÁLNÍ ODBĚROVÉ POMŮCKY** – posouzena nutnost používání (tím i předchozí distribuce) speciálních odběrových pomůcek: aplikačních kleště, injekční stříkačky apod.

**POŘIZOVACÍ NÁKLADY NA ODBĚROVOU SADU**

**SLOŽITOST PROVEDENÍ ODBĚRU** – nutnost proškolení osob k provedení odběru, potřeba fixace zvířete, případně nutnost asistence dalších osob u odběru, časová náročnost apod.

**NÁROKY NA UCHOVÁVÁNÍ ODBĚROVÉ SADY** – posouzena možnost dlouhodobého uchovávání odběrových sad při pokojové teplotě před odběrem a po něm.

**RIZIKO ZNEHODNOCENÍ VZORKU BĚHEM TRANSPORTU DO LABORATOŘE** – posouzena odolnost odebraného vzorku vůči vysoké a nízké teplotě a vůči mechanickému poškození během transportu poštou.

### CHIMERISMUS

Zvláštní pozornost je při hodnocení vhodnosti zvažovaných zdrojů DNA potřeba věnovat biologickému jevu – **Chimerismus**. Tento jev byl popsán v souvislosti s vícečetnou graviditou u skotu v souvislosti s ověřováním původu (Owen, 1945; Verdonck *et al.*, 1996; Ron *et al.*, 1995).

I když je skot zvíře převážně uniparní, jisté procento telat pochází z vícečetných gravidit a porodů dvojčat (4 – 10 % podle plemene). U skotu se jedná především o dvouvaječná (dizygotická-fraternální) dvojčata. Využívají se ze dvou oplodněných vajíček. Z genetického hlediska jsou to dva sourozenci, kteří se narodili současně a překonali intrauterinní vývin ve shodném prostředí a identickém čase.

Během raného intrauterinního vývoje dochází u plodů vícečetných gravidit k anastomickému spojení mezi oběma plody. Tato spojení vedou k výměně buněk mezi plody, kdy je jedno dvojče donorem, druhé recipientem buněk sourozence. Tento jev je časově omezen stádiem vývoje a výměna buněk se týká pouze orgánů a orgánových soustav, které se vytváří ze zárodečných listů entoderm a mezoderm.

Popsaný jev je komplikovaný skutečností, že výměna částí buněk mezi dvojčaty zůstává prezentována celoživotně a perzistuje dokonce i v případě odúmrti jednoho z plodů před ukončením gravidity a porodem pouze jednoho telete (Anderson, 1982; López-Gatius *et al.*, 2017).

Zvláště markantní je chimerismus u buněk krvetvorných orgánů, objevuje se však i u buněk dýchacího systému. Je tudíž prezentován zvláště ve vzorcích plné krve a nasálních stěrech. U dvojčat je proto odběr těchto DNA zdrojů spojen s vysokým rizikem (cca 90 %), že odebraný vzorek bude obsahovat směsnou populaci buněk obou jedinců.

Chimerismus je nejčastější příčinou nízkých call rate při genotypizaci skotu SNP Bovine Chip technologií.

Je indikací nutnosti provedení nového odběru alternativního zdroje, ve kterém tento jev nebude limitovat SNP analýzu.

**Shrnutí hodnocení vhodnosti zdrojů z pohledu praktických – „chovatelských“ kritérií:**

	NESRÁŽLIVÁ KREV	CHLUPOVÉ CIBULKY	NASÁLNÍ STĚRY	TKÁŇ UCHA (TSU)
INVAZIVITA ODBĚRU	ANO	NE	NE	NE
SPECIÁLNÍ ODBĚROVÉ POMŮCKY	ANO	NE	NE	ANO
NÁKLADY NA ODBĚROVOU SADU	STŘEDNÍ	NÍZKÉ	VYSOKÉ	VYSOKÉ
SLOŽITOST PROVEDENÍ ODBĚRU	VYSOKÁ	NÍZKÁ	NÍZKÁ	STŘEDNÍ
NÁROKY NA UCHOVÁVÁNÍ ODBĚROVÉ SADY	VYSOKÉ	NÍZKÉ	NÍZKÉ	NÍZKÉ
RIZIKO ZNEHODNOCENÍ VZORKU BĚHEM TRANSPORTU	VYSOKÉ	NÍZKÉ	NÍZKÉ	NÍZKÉ
VÝSKYT CHIMERISMU	ANO	NE	ANO	+/-

hodnoceno vzájemným srovnáním metodik, 3 relativní stupně: vysoký – střední – nízký; nebo ANO – NE

## II. 6. Srovnání vhodnosti a zdůvodnění výběru favorizovaného a alternativního zdroje DNA podle stanovených kritérií

### II. 6. 1. Srovnání metod izolace DNA, výběr favorizované a alternativní metody izolace DNA

Z hlediska zhodnocení posuzovaných laboratorně-metodických kritérií, vyhovuje industriálnímu modelu provozu rutinní laboratoře – s ohledem na zabezpečení nárokové vysoké průchodnosti vzorků laboratoří, hospodaření s nákladovými položkami a pracovní silou, které se v konečném důsledku promítají do ceny za SNP genotypizaci – nejlépe metoda izolace na magnetosilikových partikulích pracovně nazvaná „**metoda MAGNETICKÉ KULIČKY**“, s využitím komerčního kitu *OMEGA Mag-Bind Blood&Tissue DNA HDQ Kit 96* s využitím robotizace některých částí procesu izolace DNA.

Jako alternativní metoda druhé volby, pro podmínky rutinní laboratoře, byla vyhodnocena jako dobře aplikovatelná „**metoda CHELEX**“.

„Precipitační metoda“ je pro rutinní laboratoř s velkou průchodností vzorků nevhodná zejména z hlediska vysoké pracnosti, časové náročnosti a nevhodnosti k robotizaci.

„Metoda KOLONKY“ představuje při plošném využití zejména velkou finanční zátěž.

Obě zmíněné metody budou v laboratoři k dispozici pro využití v individuálních případech, kdy nebude možné aplikovat žádnou z favorizovaných metod.

### II. 6. 2. Srovnání vhodnosti zdrojů DNA z praktických – chovatelských kritérií, výběr favorizovaného a alternativního zdroje DNA

Z hlediska všech hodnocených kritérií, s ohledem na preferovanou metodu izolace, byl jako favorizovaný zdroj doporučen **odběr chlupových cibulek**. Závěr koresponduje s publikovanými daty (Neary *et al.* 2014).

Vzhledem k jednoduchosti odběru, možnosti dlouhodobého uchování odběrové sady před a po odběru vzorků DNA a ve snaze nabídnout chovatelské praxi alternativu, byl jako možnost druhé volby vybrán **odběr nasálních stěrů**. Možnost této volby je spojena s výše objasněnými negativy (chimerismus, dražší odběrová sada), které jsou do značné míry kompenzovány komfortem při odběru.

Odběr nesrážlivé krve se jeví nevýhodný zejména z hlediska invazivity odběru, nároků na zabezpečení podmínek při transportu do laboratoře (riziko degradace krevních vzorků teplem v letních měsících, poškození zkumavek při manipulaci s poštovními zásilkami apod.).

Odběr tkáně z ucha (TSU - Tissue Sample Unit), plošně praktikovaný v některých evropských zemích (během aplikace ušních známek, nebo samostatně), předpokládá vynaložení vysokých vstupních nákladů na odběrové sady a nárokuje předchozí distribuci odběrových kleští, bez kterých není možné odběr provést.

DNA z obou zmíněných zdrojů (krev, tkáň ucha) stejně jako ze spermatických dávek, bude v důvodných případech DNA dále izolována, mimo rutinní režim za individuálně stanovených podmínek.

## II. 7. Výběr vhodné odběrové sady a zpracování postupu odběru pro favorizovaný a alternativní zdroj

### II. 7. 1. Odběrová sada a postup odběru pro zdroj DNA chlupové cibulky

Pro vybraný favorizovaný zdroj DNA chlupové cibulky není na trhu k dispozici vhodná, komerčně dostupná odběrová sada.

Z hlediska zabezpečení vysoké míry uniformity zdroje, který vstupuje do procesu izolace DNA, je nutné provádět odběr pomocí jednotné odběrové sady, kterou se unifikuje kvantita i kvalita vzorků během procesu vzorkování.

Navržený odběrový set musí zamezit možnosti vzájemné kontaminace vzorků během odběru, transportu do laboratoře, prvotní evidence a zadávání zakázky do laboratorního systému, a též během prvního kroku

laboratorního zpracování, kterým je odebrání aliquoty chlupových cibulek na začátku izolačního procesu. Chlupové cibulky se od chlupů oddělují manuálně – ustřížením.

Dále je nutné, aby navržený odběrový set umožnil archivaci zbytku nepoužitého zdroje DNA pro možnost opakování izolace DNA.

S ohledem na všechny výše zmíněné nároky byl navržen, odzkoušen a do praxe uveden odběrový set pro odběr chlupových cibulek (viz Přílohu 1A a 1B).

Set má dvě nedílné části: vzorkovnici určenou k fixaci odebraných chlupů. Ta je opatřena čárovým kódem a místem pro jednoznačnou identifikaci zvířete (ušní číslo), od kterého byl vzorek odebrán.

Druhou částí setu je obálka, do které se vzorkovnice vkládá, aby byl vzorek chráněn před znehodnocením a možnostmi kontaminace. Přímo na obálce je natištěn jednoduchý návod k odběru vzorku.

#### **Postup odběru – skot:**

- Vytrhněte chlupy z konce ocasu
- Je nutno vytrhnout 30 – 40 chlupů
- Zkontrolujte, zda chlupy mají cibulky
- Z chlupů vytvořte svazeček
- Z odběrového kitu odlepte samolepku
- Do lepicí části vložte svazek chlupů tak, aby cibulky zasahovaly do pole pro chlupové cibulky



- Přelepte konce chlupů samolepkou
- Očistěte si ruce před dalším odběrem
- Vyplňte elektronickou žádanku na [igenetika.cz](http://igenetika.cz)

Podrobný návod s názornou videoukázkou odběru chlupových cibulek do odběrového setu k dispozici na:

[https://www.cmsch.cz/laboratore/laborator-imunogenetiky-\(li\)/odberove-sety-cibulky/](https://www.cmsch.cz/laboratore/laborator-imunogenetiky-(li)/odberove-sety-cibulky/)

### **II. 7. 2. Odběrová sada a postup odběru pro zdroj DNA nasální stěr**

Pro odběr nasálních stěrů byla vybrána komerční odběrová sada PG-100 Performagene firmy DNAgenotek Inc., Ottawa, Canada (Foley et al., 2011; Maclean *et al.*, 2013).

Tento odběrový set je celosvětově používaný k odběru nasálních a bukálních stěrů u skotu, koní, malých přežvýkavců a psů.

Návod na odběr byl přehledně zpracován a poskytnut chovatelům v českém jazyce (viz Přílohu 2) a rovněž je v dispozici na: <https://www.cmsch.cz/getattachment/09b8ed21-3825-4f3e-a76d-862650143a99/Zpusob-odberu-biologickeho-vzorku-pro-genomickou-analyzu.pdf.aspx?lang=cs-CZ>, včetně instruktážního videa.

### **II. 8. Vyhodnocení pilotní studie odběru favorizovaného a alternativního zdroje dna využitím odběrových setů pro odběr chlupových cibulek a nasálních stěrů**

Favorizovaný a alternativní zdroje DNA byly, po předchozí dohodě a jednoduché edukaci k odběru, odebírané v chovech holštýnského skot: Zemědělská společnost Ostřetín, a.s.; Zemědělská akciová společnost Nivnice a VFU Brno ŠZP Nový Jičín.

Po vizuální kontrole kvality odběru byly z dalšího procesu zpracování vyloučeny vzorky DNA, které neodpovídaly požadovanému standardu – označeno: nekvalitně odebraný vzorek (viz Přílohy 3A a 3B).

DNA byla izolována vybranými metodami: „metoda Magnetické kuličky – robotický protokol“ pro izolaci z chlupových cibulek a „metoda CHELEX – manuální protokol“ pro izolaci z nasálních stěrovek.

Po zhodnocení kvality DNA izolátu (měření koncentrace a čistoty a u koncentrací nižších 50 ng/μl následná kontrolní PCR\_STR reakce) byly DNA izoláty aplikovány na Bovine Chip v protokolu Illumina HTS infinium technologie.

U všech vzorků, které byly zařazeny do SNP analýz, proběhla analýza s call rate vyšší 0,95, což odpovídá nárokům na zařazení do výpočtu GPH.

U 18 vzorků byl zjištěn nízký call rate 0,82 – 0,87 z důvodu chimerismu (prověřeno PCR\_STR)

**Výsledky jsou uvedeny v tabulce:**

	<b>CHLUPOVÉ CIBULKY</b>	<b>NASÁLNÍ STĚRY</b>
<b>POČET ODEBRANÝCH VZORKŮ</b>	1413	514
<b>POČET OPAKOVANÝCH ODBĚRŮ (špatně odebraný vzorek)</b>	6	13
<b>% ÚSPĚŠNOSTI ODBĚRU</b>	99,5 %	97,4 %
<b>ROZMEZÍ KONCENTRACE IZOLOVANÉ DNA ng/μl</b>	542,7 – 5,2	754,7 – 25,3
<b>PRŮMĚRNÁ KONCENTRACE ng/μl</b>	202,5	247,1
<b>PRŮMĚRNÁ ČISTOTA IZOLOVANÉ DNA R260/280 (NanoDrop)</b>	1,91	1,53
<b>POČET IDENTIFIKOVANÝCH CHIMÉR – %</b>	0	18 – 3,5 %

Výsledky dokládají:

- vysokou míru úspěšnosti volby favorizovaného zdroje a alternativního zdroje DNA
- vhodnost volby následných metod izolace DNA, s benefitem široké možnosti uplatnění robotizace procesu, která garantuje velkou průchodnost vzorků laboratoří a tím možnost plošného genotypování SNP technologií
- univerzální upotřebitelnost a uživatelský komfort při využívání originální, v rámci projektu vyvinuté a odzkoušené, sady pro odběr chlupových cibulek
- velmi dobrou a flexibilní upotřebitelnost komerční odběrové sady – nasální stěrovka.

### **III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ**

V současné době není pro oblast agrigenomiky, především pak pro chovatelskou praxi v ČR, k dispozici dostupná metodika zabývající se problematikou odběru zdrojů DNA vhodných pro industriální model provozu rutinní, servisní molekulárně-genetické laboratoře s velkou průchodností vzorků. Využití potenciálu SNP Bovine Chips technologie nárokuje tento model laboratorního zpracování vzorků a odběr zdrojů DNA musí být tomuto modelu přizpůsoben.

Dosud dostupné informace o nárocích na metodiku odběru zdrojů, která kvalitu odebraných vzorků DNA podmiňuje, jsou jen dílčí. Dosud byly předávány formou prezentací a interních sdělení v rámci setkání a odborných seminářů pro subjekty využívající služby rutinní laboratoře iGenetiky ČMSCH a.s., případně zveřejňované na [www.cmsch.cz](http://www.cmsch.cz).

Předkládaná metodika dokládá důležitost získání kvalitního zdroje DNA jako limitujícího faktoru úspěšnosti procesu genotypizace skotu SNP Bovine Chips technologií, jenž předchází výpočtu GPH. Sumarizuje a koreluje laboratorně-metodické a praktické požadavky na odběr vzorků DNA.

Součástí metodiky je i vyhodnocení vhodnosti jednotlivých zdrojů DNA, navazujících metod odběru vzorku a metod izolace DNA z odebraných vzorků, dále také zdůvodnění volby favorizovaného a alternativního zdroje DNA. Pilotní studie prověřuje a dokládá správnost výběrů zdrojů.

Novost metodiky spočívá v integraci procesu vzorkování zdrojů DNA do procesu SNP genotypizace, doložení jeho důležitosti pro úspěšnost celého procesu genotypizace. Vysvětlení provázanosti a podmíněnosti kvality odběru zdroje DNA s finální možností laboratorní analýzy DNA izolované z kvalitně odebraného zdroje.

#### **IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY**

„Metodika optimalizace odběru alternativních biologických vzorků pro návaznou kvalitní izolaci genomické DNA“ v první části zahrnuje teoretický úvod do problematiky. V praktické části jsou pak uvedeny postupy potřebné pro správný odběr vzorků s cílenou vazbou na následnou volbu metody izolace genomické DNA v kvalitě a kvantitě nárokové SNP Bovine Chip – microarray technologií.

Metodika představuje soubor optimalizovaných návodů, na jejichž základě lze provádět rutinní odběry standardizovaných zdrojů DNA přímo v chovech skotu. Finálním výsledkem uplatnění metodiky je pak úspěšná SNP analýza izolované DNA, která poskytuje data potřebná k výpočtu GPH a dalším bioinformatickým analýzám s praktickými výstupy, např. ověřování původu, interpretace statusů genů s vlivem na zdraví a užitkovost.

Uživatelé metodiky mohou být Oprávněné organizace, Svazy chovatelů skotu, Česká plemenářská inspekce a široká chovatelská veřejnost. Metodika bude uváděná do praxe prostřednictvím ČMSCH a.s., VÚŽV, v.v.i. a dalších spolupracujících subjektů s oblasti chovu skotu.

#### **V. EKONOMICKÉ ASPEKTY**

Podle zákona č. 110/1997 Sb. O potravinách a zákona č. 154/2000 Sb. O šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat ve znění pozdějších předpisů je ČMSCH, a.s. právnická osoba pověřená Ministerstvem zemědělství ČR k výkonu činností podle jednotlivých bodů, je povinna poskytovat spolu s plemennou knihou chovatelům a oprávněným osobám údaje, zpracovávat, zveřejňovat a evidovat výsledky, což se týká všech chovatelsky důležitých vlastností.

V souladu s doporučením Rady vlády pro výzkum uvádíme, že ČMSCH, a.s. a jednotlivé plemenné knihy nevytváří těmito činnostmi zisk, ale poskytují široké chovatelské veřejnosti co nejobektivnější údaje a vyhodnocením celostátních databází vytváří podklady pro prokázání kvality plemenářské práce chovatelů.

Získané plemenné hodnoty jsou předány jednotlivým plemenným knihám, které je využívají dle schváleného řádu plemenných knih při zařazování jedinců do plemenitby a při tvorbě přípařovacích plánů, jako služba pro chovatelskou veřejnost.

Předpokládané ekonomické přínosy metodiky jsou kalkulovány až do výše 1.040,- Kč za jeden vzorek dodaný do laboratoře ve standardizovaném formátu. Empirickým odhadem se předpokládá, že metodicky správným odběrem biologického materiálu lze eliminovat z procesu laboratorního zpracování 3 – 6 % vzorků, jejichž laboratorní výsledek by bylo nutno opakovat. Jako přínos je nutno hodnotit i snížení administrativní zátěže personálu laboratoře při vyřizování žádostí o dodání nového vzorku biologického materiálu. Dalšími přínosy předkládané metodiky je rozšíření spektra technik a metodických postupů používaných v laboratoři iGenetiky, jejichž standardizace vytváří předpoklad pro robotizaci částí izolačních procesů. Robotizací mechanicky se opakujících, odborně nenáročných procesů, se částečně řeší současný nedostatek kvalifikovaného personálu. Zavádění automatizovaných výrobních linek nezbytné, jak z důvodu nedostatku pracovních sil, tak i z pohledu produktivity a kvality zpracování vzorků v industriálním modelu laboratoře.

Přínosem pro chovatele je poskytnutí step by step postupu při odběru biologického vzorku. Metodika se tak stává součástí komplexu informací, díky kterým chovatelé začlení genomickou selekci plemenných zvířat do rutinního managementu svých stád. Získávají tak inovativní nástroj pro ověřování původu a zároveň i selekční nástroj, díky kterému se výrazným způsobem zpřesňuje výběr nejcennějších jedinců pro rozšíření žádoucích produkčních i mimoprodukčních vlastností v populaci jednotlivých druhů hospodářských zvířat.

## VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- 1 Anderson, G.B., BonDurant, R.H., Cupps, P.T. (1982):**  
Induction of twins in different breeds of cattle.  
*J Anim Sci.*, 54(3), s. 485–90.
- 2 Beránek M., Hegerová J., Drastíková M. (2012):**  
„Alternativní“ biologický materiál pro rutinní analýzu nukleových kyselin – validace preanalytické fáze vyšetření DNA.  
*Klin. Biochem. Metab.*, 20 (41)No. 1, s. 31–37.
- 3 Beránek, M., Vlčková, J., Hypiusová, V., Živný, P., Palička, V. (2006):**  
Comparison of various methods used for extraction of genomic DNA from human plasma.  
*Klin. Biochem. Metab.*, 14, s. 21–24.
- 4 Foley, C., O’Farrelly, C., Meade, K.G. (2011):**  
Technical note: Comparative analyses of the quality and yield of genomic DNA from invasive and noninvasive, automated and manual extraction methods.  
*J. Dairy Sci.*, 94, s. 3159–3165.
- 5 Gielda, L. and Rigg, S. (2017):**  
Extraction of amplifiable DNA from embalmed human cadaver tissue.  
*BMC Res Notes*, 10:737, s. 1– 5.
- 6 Keijzer, H., Endenburg, S. C., Smits, M. G., Koopmann M. (2010):**  
Automated genomic DNA extraction from saliva using the QIAextractor.  
*Clin. Chem. Lab. Med.*, 48, 641–643.
- 7 López – Gatiús, F., Andreu – Vázquez, C., Mur – Novales, R., Cabrera, V.E., Hunter, R.H.F. (2017):**  
The dilemma of twin pregnancies in dairy cattle. A review of practical prospects.  
*Livestock Science*, 197, s. 12–16.
- 8 Maclean, E.J., Niles, J.O., James, C.M., Iwasiow, R.M. (2013)**  
Microsatellite and SNP analysis for parentage verification using bovine nasal samples with Performagene™.  
*DNA Genotek Inc., Ottawa, Canada Patent (www.dnagenotek.com/legalnotices) MK–00195 Issue 1/2013–05.*
- 9 Miller, S. A., Dykes, D. D., Polesky, H. F.(1988):**  
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.  
*Nucleic Acids Res.*, (3)16, s. 1215.
- 10 Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L. and Ghiorse, W. C. (1999):**  
Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples.  
*Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), S. 4715–4724.
- 11 Neary, M. T., Neary, J. M., Lund, G. K., Garry, F. B., Holt, T. N., Mohun, T. J. and Breckenridge, R. A. (2014):**  
Technical note: A comparison of DNA collection methods in cattle and yaks.  
*J. Anim. Sci.*, 92, s. 3811–3815.
- 12 Owen, R.D. (1945):**  
Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins.  
*Science*, 102 (2651), s. 400–401.

- 13 Raška, M. (2006):**  
Základní postupy práce s nukleovými kyselinami  
[http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/II.workshop/II.%20workshop\\_Milan%20Raska.doc](http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/II.workshop/II.%20workshop_Milan%20Raska.doc)
- 14 Ron, M., Blank, Y., & Band, M. (1995):**  
Determination of the optimal tissue source and number of microsatellites for detection of zygotic origin of cattle twins.  
*Animal Biotechnology*, 6(1), s. 27–39.
- 15 Sebastianelli, A., Sen, T., Bruce, I. J. (2008):**  
Extraction of DNA from soil using nanoparticles by magnetic bioseparation.  
*Letters in Applied Mikrobiologie, Apr*, s. 488–491.
- 16 Šimková, H., (2012):**  
Breviář forenzní genetiky,  
*Tribun EU, Brno*, 212 s.
- 17 Šteiger, V. (2018):**  
Molekulární diagnostika ptačích schistosom při nákaze přirozených i náhodných hostitelů,  
*Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta*, s. 33
- 18 Vondrejs, V. a Storchová, Z. (1997):**  
Genové inženýrství I.,  
*Praha: Karolinum*
- 19 Verdonck, L. F., van Blokland, W. T. M., BosboomKalsbeek, E. K., van Heugten, H. G., Tilanus, M. G. J., de Weger, R. A. (1996):**  
Complete donor T cell chimerism is accomplished in patients transplanted with bone marrow grafts containing a fixed low number of T cells.  
*Bone Marrow Transplant.*, 18, s. 389–395.
- 20 Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R (1991):**  
Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material.  
*BioTechniques*, 10, s. 506–513.
- 21 Infinium® HTS Assay Protocol Guide ,**  
ILLUMINA PROPRIETARY Part # 15045738, Rev. A October 2013
- 22 19/2018 Sb., Vyhláška**, kterou se mění vyhláška č. 342/2012 Sb., o zdraví zvířat a jeho ochraně, o přemísťování a přepravě zvířat a o oprávnění a odborné způsobilosti k výkonu některých odborných veterinárních činností, ve znění pozdějších předpisů



## VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- 1 Schröffelová D., Příbáňová M., Kučera J., Němcová L., Lipovský D. (2018):**  
Identification of Beta-Casein Alleles and Genotypes Using PCR and RFLP Methods and Illumina iScan Microarray Technologies in Holstein Cattle  
Mezinárodní konference XXVIIIth Genetic Days 2018, České Budějovice, Book of abstracts, p. 17
- 2 Příbyl J., Bauer J., Motyčka J., Příbylová J., Šplíchal J., Vostrá-Vydrová H., Vostrý L. (2018):**  
Step of Agreement of Pedigree and Genomic Relationship in Genomic Evaluation of Dairy Cattle  
Mezinárodní konference XXVIIIth Genetic Days 2018, České Budějovice, Book of abstracts, p. 25
- 3 Schröffelová D. a Lipovský D. (2018):**  
Informace o genotypování v ČMSCH, internetová aplikace evidence genotypování  
Odborný seminář pro chovatelskou veřejnost Nové poznatky ve šlechtění dojného skotu, Hradištko, Sborník referátů, p. 31-33
- 4 Příbyl J. a Zavadilová L.:**  
Genomický odhad plemenných hodnot  
Odborný seminář pro chovatelskou veřejnost Nové poznatky ve šlechtění dojného skotu, Hradištko, Sborník referátů, p. 26-27

## VIII. PŘÍLOHY

### Příloha 1A – Odběrový set pro odběr chlupových cibulek - část vzorkovnice




**www.igenetika.cz**  
Vytvořte elektronickou objednávku na



**Kit pro odběr chlupových cibulek pro izolaci DNA**

**Odběrový kit vložte do obálky až po vytvoření objednávky na [igenetika.cz](http://igenetika.cz) kde je třeba zadat číselný kód odběrové sady!**



**ČMSCH** a.s. | ČESKOMORAVSKÁ SPOLEČNOST CHOVATELŮ



Informace a návod na odběr na: [igenetika.cz](http://igenetika.cz)

Českomoravská společnost chovatelů, a.s.  
Laboratoř imunogenetiky  
Benešovská 123, 252 09 Hradištko  
Tel: 257 896 329  
[imunogenetika@cmsch.cz](mailto:imunogenetika@cmsch.cz)  
[igenetika.cz](http://igenetika.cz)

**CHLUPOVÉ CIBULKY**


Číslo: 

C	Z	0	0	0															
---	---	---	---	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Formát čísla! 


C	Z	0	0	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Kód pro elektronickou objednávku:




123456

## Příloha 1B – Odběrový set pro odběr chlupových cibulek - obálka




**Postup odběru:**

- Vytrhněte chlupy z konce ocasu
- Je nutno vytrhnout 30 - 40 chlupů
- Zkontrolujte, zda chlupy mají cibulky
- Z chlupů vytvořte svazeček
- Z odběrového kitu odlepte samolepku
- Do lepící části vložte svazek chlupů tak, aby cibulky zasahovaly do pole pro chlupové cibulky



- Přelepte konce chlupů samolepkou
- Očistěte si ruce a kleště před dalším odběrem
- Vyplňte elektronickou žádanku na [igenetika.cz](http://igenetika.cz)



Tel: 257 896 329  
imunogenetika@cmsch.cz  
igenetika.cz

Českomoravská společnost chovatelů, a.s.  
Laborator imunogenetiky  
Benešovská 123, 252 09 Hradištko

## Příloha 2 – Odběrový set pro zdroj DNA – nasální stěr

### Výhody odběrového setu pro nasální stěr

#### Systém "vše v jednom" - odběr, stabilizace, přeprava a uchování vzorku:

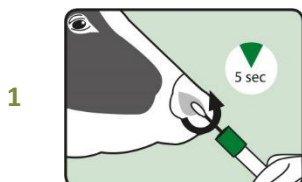
- Bezbolestný neinvazivní způsob odběru biologického vzorku zajišťující optimální welfare zvířat.
- Spolehlivost odběru v různých podmínkách prostředí - lze použít ve stáji i na pastvině
- Eliminace možnosti bakteriální kontaminace vede k menšímu počtu neúspěšně izolovaných vzorků.
- Možnost přepravy odebraných vzorků bez nutnosti kontroly teplotního režimu standardními způsoby včetně poštovního systému
- Stabilita odebraného vzorku při pokojové teplotě po odběru po dobu minimálně 1 měsíce, laboratorně zpracovatelný až 1 rok za vhodných podmínek skladování.
- Čistá a kvalitní extrahovaná DNA, která umožňuje několik testů z jediného vzorku (STR mikrosatelity, SNP- genomika, testy genů pro užitkovost a zdraví (MSTN, Buldok-Dwarf...))
- Ověřený způsob odběru od hospodářských zvířat a domácích mazlíčků pro ověřování paternity, zjišťování genetických vad, genotypování a sekvenování.
- Identifikace čárovým kódem umožňuje sledování vzorku v průběhu celého pracovního postupu od příjmu laboratoří po výpočet genomických plemenných hodnot.

#### Popis způsobu odběru s nasální stěrovkou:

Čistá nosní dírka poskytuje nejlepší vzorek DNA. Nicméně jsou přijatelné stopy nečistot nebo krmiva v nosních dírkách, kterému se u skotu v podstatě nelze vyhnout. Pokud je to možné, vyvarujte se odběru vzorků ihned po nakrmení. Během odběru zajistěte, aby se molitanová houbička nedotkla jiného zvířete, čímž předejdete kontaminaci vzorku.

**Pozor: odběrová ampule obsahuje konzervační roztok, který se nesmí vylít.** Tento roztok konzervuje DNA a v laboratoři je součástí izolačního procesu.

#### Upozornění: Před odebráním vzorku neodstraňujte víčko.



Držte vzorkovnici pevně v prstech a stírejte sliznici nosní dírky zvířete odběrovým tampónkem po dobu 5 sekund. Ujistěte se, že houbička vypadá mokrá a je pokrytá hlenem z nosní dírky.

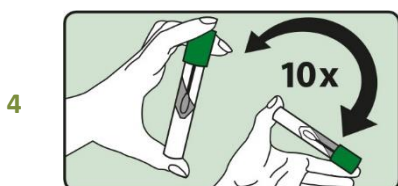
U zvířat starších 6 měsíců může být vyžadováno mírné fixace.



Držte vzorkovnici ve vzpřímené poloze a odšroubujte uzávěr z tuby.



Otočte uzávěr vzhůru nohama a umístěte nosní tampon do tuby. Pevně zajistěte víčko, aby nedošlo k úniku kapaliny během přepravy.



10x důkladně otočte a protřepejte, abyste důkladně promíchali vzorek s konzervačním roztokem.

5



Pomocí trvalého popisovače jasně napište identifikační číslo zvířete na bílý prostor, který je k dispozici na štítku vzorkovnice.

Celý proces manipulace a ukázka odběru je zachycena v instruktážním videu, které můžete shlédnout v internetovém prohlížeči zadáním zkrácené adresy: [bit.ly/2jho4Bp](https://bit.ly/2jho4Bp)

Limitujícím faktorem plošného zavádění analýzy SNP na čípech je hned na počátku procesu kvalita odběru biologického vzorku. Od zavedení metody odběru pomocí nasálního stěru si slibujeme hlavně kvalitativní posun v dodávaném zdroji DNA. Na trhu je více typů odběrových kitů. Musíme upozornit potenciální dodavatele, že izolační proces v laboratoři imunogenetiky ČMSCH, a.s. není kompatibilní se suchými nebo gelovými odběrovými sadami.

Jeden odběrový set stojí 70,- Kč (bez DPH). Jeho cena však bude následně odečtena z ceny izolace DNA provedené v laboratoři imunogenetiky ČMSCH, a.s

Pokud mají chovatelé o odběrové sety zájem, můžou si o ně požádat v laboratoři imunogenetiky ČMSCH, a.s. na e-mailové adrese: [imunogenetika@cmsch.cz](mailto:imunogenetika@cmsch.cz)



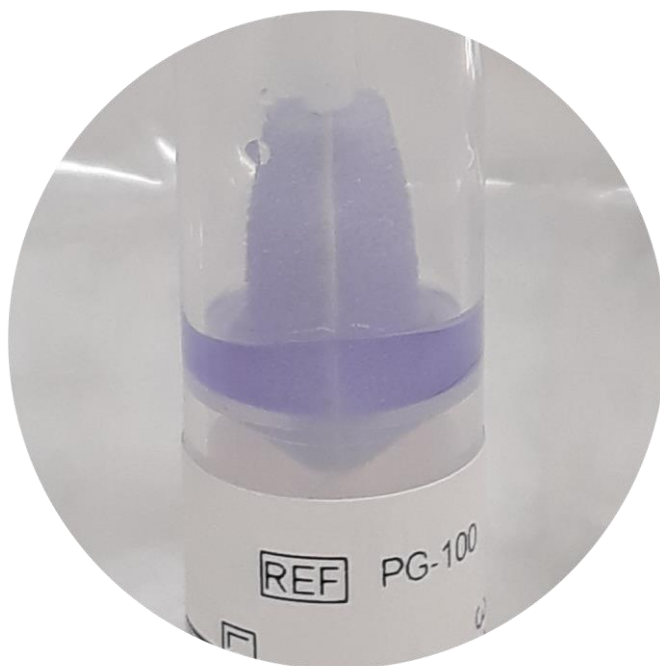
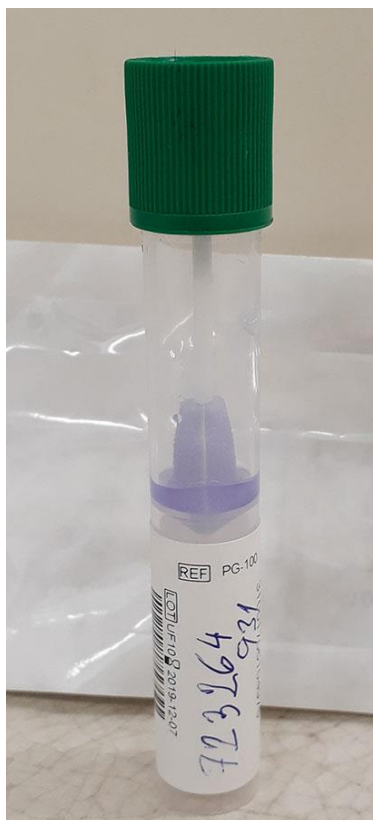
### Příloha 3A – 1 Kvalitně odebrané chlupové cibulky



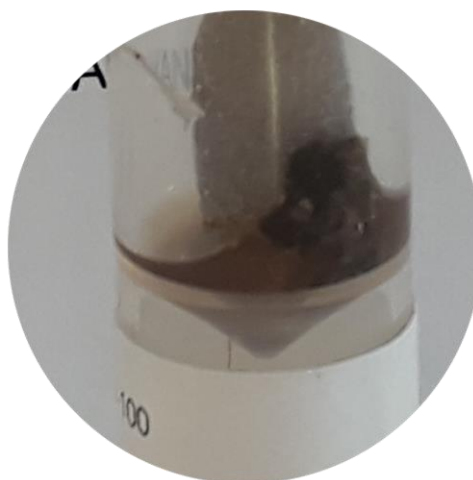
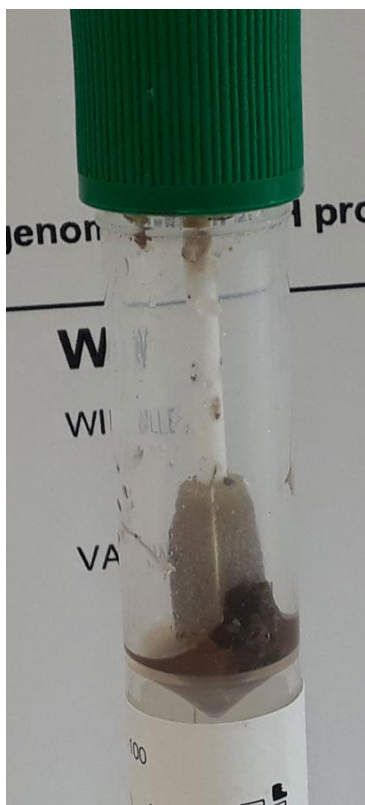
### Příloha 3A – 2 Nekvalitně odebrané chlupové cibulky



**Příloha 3B – 1 Kvalitně odebraný nasální stěr**



**Příloha 3B – 2 Nekvalitně odebrané nasální stěry**



**Název:**

Optimalizace odběru alternativních biologických vzorků pro návaznou kvalitní izolaci genomické DNA

**Autor:**

Ing. Daniela Schröffelová, CSc. (podíl na vzniku metodiky 45 %)

Bc. Lucie Němcová (podíl na vzniku metodiky 15 %)

Ing. Jarmila Hromádková (podíl na vzniku metodiky 15 %)

doc. Dr. Ing. Josef Kučera (podíl na vzniku metodiky 5 %)

Ing. David Lipovský (podíl na vzniku metodiky 10 %)

Ing. Vladimír Šteiger (podíl na vzniku metodiky 5 %)

Ing. Michaela Přibáňová, Ph.D. (podíl na vzniku metodiky 5 %)

**Oponenti:**

Ing. Zdenka Majzlíková, Česká plemenářská inspekce, Praha

doc. Dr. Ing. Zdeněk Havlíček, Mendlova univerzita v Brně

**ISBN 978-80-87633-01-4**

**Zpracováno za podpory MZe ČR, úkol MZe NAZV QK1810253:**

*„Navýšení spolehlivosti celostátního genomického hodnocení dojeného skotu zařazením krav s domácí užitkovostí do genotypované referenční populace“*

Českomoravská společnost chovatelů, a.s.

Benešovská 123

252 09 Hradištko

[www.cmsch.cz](http://www.cmsch.cz)

Copyright © 2018 ČMSCH, a.s.