



ČMSCH | ČESKOMORAVSKÁ
a.s. | SPOLEČNOST
CHOVATELŮ

SYSTÉM ODBĚRU VZORKŮ DNA

Daniela Schröffelová a kolektiv



2019

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

ISBN 978-80-87633-03-8

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

SYSTÉM ODBĚRU VZORKŮ DNA

Metodika byla vypracovaná v rámci výzkumného projektu

MZe NAZV QK1910217

„Vytvoření referenční populace a vývoj postupů pro odhad genomických plemenných hodnot znaků prasat zařazených do Českého národního šlechtitelského programu.“

Autoři:

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

Oponenti:

Zdenka Majzlíková
Česká plemenářská inspekce, Praha
Gustav Chládek
Mendelova univerzita v Brně

2019

Obsah:

I. CÍL METODIKY	1
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	2
II. 1. Úvod	2
II. 2. Výběr vhodných zdrojů DNA	2
II. 2. 1. Obecný přehled možných zdrojů DNA	2
II. 2. 2. Stanovení kritérií výběru vhodných zdrojů DNA z pohledu chovatelské praxe	3
II. 3. Volba vhodných metod izolace DNA v závislosti na zdroji	4
II. 3. 1. Princip izolace genomické DNA	4
II. 3. 2. Přehled aplikovatelných metod izolace DNA	5
II. 3. 3. Výběr metod izolace genomické DNA z vybraných zdrojů	6
II. 4. Vývoj vhodné odběrové sady a zpracování postupu odběru pro favorizovaný zdroj – štětinové cibulky a alternativní zdroj – nasální stěr	8
II. 4. 1. Odběrová sada a postup odběru pro zdroj DNA štětinové cibulky	8
II. 4. 2. Odběrová sada a postup odběru pro zdroj DNA nasální stěr	9
II. 5. Vyhodnocení pilotní studie odběrů vybraných zdrojů DNA do odběrových setů pro odběr štětinových cibulek a nasálních stěrů	9
II. 6. Možnosti využití jiných biologických vzorků k získání genomické DNA u prasat	10
II. 6. 1. Metodické možnosti získání genomické DNA z kančího spermatu	11
II. 6. 2. Metodické možnosti získání genomické DNA z archivních zdrojů	12
II. 7. Metodický postup pro primární kontrolu kvality izolované DNA	13
III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	15
IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	15
V. EKONOMICKÉ ASPEKTY	16
VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	17
VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	21
VIII. PŘÍLOHY	22
Příloha 1A – Odběrový set pro odběr štětinových cibulek - vzorkovnice.....	22
Příloha 1B – Odběrový set pro odběr štětinových cibulek - obálka	23
Příloha 2A – Odběrový set pro zdroj DNA – nasální stěr – před odběrem.....	24
Příloha 2B – Odběrový set pro zdroj DNA – nasální stěr – po odběru	24
Příloha 3A – Kvalitně odebrané štětinové cibulky	25
Příloha 3B – Nekvalitně odebrané štětinové cibulky.....	25

I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je:

- V návaznosti na aktuální vývoj metod molekulárně genetických analýz genomu prasat definovat kritéria volby biologického vzorku určeného k izolaci genomické DNA vhodné pro aplikaci v SNP technologiích, zejména pak k analýzám na microarray's – PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina.
- Tradiční biologické zdroje – obvykle odběr nesrážlivé krve – nahradit neinvazivním odběrem inovativních zdrojů DNA, umožňujícím zachování welfare zvířat, souběžně s eliminací dodatečných nákladů na odběr, uchovávání a transport odebraných vzorků.
- Zdůvodnit výběr inovativního biologického zdroje (zdrojů) DNA a doložit důvody jeho primární volby z hlediska účelně stanovených kritérií.
- Při specifikaci kritérií volby zdroje DNA vycházet z potřeby nekonfliktního a komfortního provedení odběru zdroje DNA v podmínkách chovatelské praxe a souběžně zohlednit nároky na zpracování zdrojů DNA v rutinní servisní laboratoři, s možností uplatnit tzv. industry model průchodnosti vzorků laboratoří, potřebu automatizace metod izolace DNA a využití robotických zařízení.
- Vyvinout a odzkoušet odběrovou sadu/sady pro vytipovaný zdroj/zdroje DNA, nebude-li vhodná odběrová sada komerčně dostupná.
- Nabídnout chovatelům prasat a zainteresovaným organizacím jednoduchý postup, podle kterého budou v chovech prasat plošně odebírány standardizované biologické vzorky do optimalizovaných odběrových sad.
- Pro potřeby tvorby referenční populace rozpracovat metody izolace genomické DNA z nestandardních biologických zdrojů – reziduální a archivní zdroje, pro případy, kdy není k dispozici zdroj standardní.
- Výběrem vhodných zdrojů DNA, vypracováním postupu odběru, vývojem odběrové sady pro vybraný zdroj(e) DNA komplexně optimalizovat proces odběru a snížit riziko nutnosti opakování odběrů zdrojů DNA.
- Definovat postup pro primární kontrolu kvality izolované DNA s ohledem na potřebu vyřazení nekvalitních extraktů DNA z analytických procesů ještě před aplikací na microarray's tak, aby se minimalizovaly neúčelně vynaložené náklady.
- Sofistikovaným odběrem biologického vzorku a primární kontrolou kvality izolované DNA před zařazením do genomických SNP analýz eliminovat předvídatelné příčiny absence výsledků SNP genotypizace, která vede k předražení SNP microarray's analýz, ke zpomalení plošné SNP genotypizace prasat a v konečném důsledku limituje využití potenciálů genomických analýz v procesu šlechtění prasat.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

II. 1. Úvod

Praktické využití molekulárně genetické analýzy DNA u prasat se v posledních třech desetiletích tradičně soustředilo zejména na ověřování rodičovství – polymorfismus mikrosatelitů – STR (Kandalcová, 2008), detekci genů velkého účinku, které řídí kvantitativní znaky – QTL (Miller *et al.*, 2000), případně na screening statusu genu s vlivem na zdraví a užitkovost – PCR/RFLP, alelově specifická PCR (Dvořáková, 2011).

Plné využití potenciálů SNP technologií a následných genomických analýz ve šlechtění prasat je limitováno aplikací „tradičních“ – méně výkonných analytických metod, které poskytují (zejména pokud jde o kvantitu) pouze omezené informace o genomu prasat. Tento limit by mohl být odstraněn aplikací technologie microarray's – „DNA čipy“, která umožňuje detekovat desetitisíce SNP variant v rámci jedné analýzy (Ramos *et al.*, 2009).

Princip microarray's spočívá v cílené hybridizaci genomické DNA a sekvenčně specifických DNA sond, které jsou vázány na povrchu čipu. Na čipu může být imobilizováno až několik stovek tisíc sond specifických pro různé úseky DNA, což umožňuje analyzovat široké spektrum SNP mutací (Gojová a Kozák, 2006).

Genomická selekce, která je založena na predikci plemenné hodnoty (genomické plemenné hodnoty GPH nebo GEBV) u zvířat na základě SNP genotypů získaných microarray's analýzou, mění v posledních desetiletích chovatelské strategie a přístupy ke šlechtění zejména u skotu. Výchozím bodem pro aplikaci genomické selekce u prasat byl vývoj komerčního čipu pro vysoce výkonnou genotypizaci, sekvenování genomu prasat a aplikace statistických a bioinformatických přístupů, které byly nejprve vyvinuty u skotu a poté adaptovány na zvláštnosti odvětví chovu prasat (Samorè a Fontanesi, 2016)

Kvalitně izolovaná DNA je nutnou podmínkou korektního výsledku všech DNA analýz, což dvojnásob platí pro vysoce výkonné SNP technologie. Kvalita DNA extraktu určuje míru úspěšnosti SNP genotypizace na microarray's vyjádřenou tzv. call rate. /Call rate se rovná počtu SNP, u kterých byl při gonotypizaci na čipu stanovený SNP genotyp, děleno celkovým počtem SNP na čipu (Huentelman *et al.*, 2005)/.

Absence analytických dat (nebo jejich části) – nízký call rate – snižuje relevanci informace o statusu SNP genotypu jedince, ze kterého byl biologický vzorek pro izolaci DNA odebrán.

Nevhodně zvolený a/nebo nekvalitně odebraný zdroj DNA je nejčastější příčinou nízkých call rate a vyřazování neúplných datových souborů získaných SNP analýzou z následného bioinformatického zpracování.

Vzhledem k finanční náročnosti SNP technologie je proto nutné zařazovat do procesu SNP genotypizace na microarray's pouze kvalitní vzorky DNA, kterou je možné izolovat pouze z vhodně zvolených a standardně odebraných zdrojů.

Optimalizaci odběrů kvalitního zdroje DNA je tedy nutné chápat jako první a významný krok k zavedení a následné plošné aplikaci SNP technologie – microarray's v procesu šlechtění prasat.

II. 2. Výběr vhodných zdrojů DNA

II. 2. 1. Obecný přehled možných zdrojů DNA

DNA lze teoreticky získat z jakékoliv tělní tkáně, která obsahuje plnohodnotné buňky s buněčným jádrem v limitní kvantitě a zachované kvalitě (Sebastianelli *et al.*, 2008), přičemž platí, že informační hodnota DNA získaná z různých tkání stejného jedince je identická (Veselá 2009).

Výjimkou je DNA získaná z některých tkání fraternalních dvojčat u vybraných druhů zvířat, především u skotu, u kterých byl zaznamenán výskyt tzv. Chimerismu. 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). S ohledem na typ placenty prasnice, nebyl tento jev u druhu *Sus scrofa* ani *Sus scrofa f. domestica* pozorován, proto nemusí být při výběru vhodného zdroje DNA u prasat zohledněn.

„Tradičním“ biologickým zdrojem pro izolaci DNA u prasat v minulosti byly především vzorky nesrážlivé žilní krve ve standardních odběrových zkumavkách a obvyklých antikoagulačních roztocích – citrát sodný (Trisodium citrate), K3EDTA, K2EDTA, Na2EDTA apod.

Odběr nesrážlivé krve poskytuje dostatečné množství kvalitního zdroje DNA, umožňujícího získat uspokojivý výtěžek izolované DNA v nárokové koncentraci a čistotě, s možností aplikace řady alternativních izolačních metod v manuálních i robotických protokolech.

Odběr nesrážlivé krve lze na druhou stranu bohužel hodnotit jako nekomfortní, s řadou nevýhod: invazivita odběru, potřeba předchozího proškolení a předpokládanou zkušenost osob odebírajících vzorek, nutnost fixace zvířat při odběru, narušení welfare zvířat. Rovněž jsou kladeny nároky na zabezpečení podmínek při transportu krevních vzorků do laboratoře (riziko degradace krevních vzorků teplem v letních měsících, poškození zkumavek při manipulaci s poštovními zásilkami apod.), proto se od nesrážlivé krve jako biologického zdroje první volby pro získání genomické DNA v současnosti ustupuje.

K molekulárně biologické analýze lze rutinními postupy získat genomickou DNA i z jiných, „alternativních“, biologických zdrojů. Jsou to zejména chlupové – štětinové cibulky, vzorky z biopsií tkání (např. **TSU** – **Tissue Sample Unit** – odběr tkáně ucha), stěry sliznic (nasální, bukální), sperma (čerstvé, mražené) popřípadě i některé biologicky nedegradované části jatečných těl či kadáverů (Gielda and Rigg, 2017).

DNA lze získat také z reziduálních, částečně biologicky degradovaných a jinak nestandardních zdrojů – tuby po inseminaci, dlouhodobě zmražené (archivní) krevní vzorky apod. Z 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), nicméně je žádoucí tyto techniky metodicky rozpracovat pro případy, kdy bude nutné získat pro referenční skupinu genotypy cenných již nežijících jedinců, ze kterých nebude k dispozici standardní zdroj DNA v potřebné kvalitě a/nebo kvantitě.

II. 2. 2. Stanovení kritérií výběru vhodných zdrojů DNA z pohledu chovatelské praxe

Vhodnost odběru biologického materiálu za účelem izolace genomické DNA prasat byla posouzena u těchto standardních biologických zdrojů:

NESRÁŽLIVÁ KREV, TKÁŇ UCHA, ŠTĚTINOVÉ CIBULKY A STĚR Z NOZDER RYPÁKU

Hodnoceny byly relevantní praktické aspekty, rozhodující pro komfort provedení odběru v prostředí velkochovu. Na kritéria výběru favorizovaného zdroje bylo nahlíženo s ohledem na možnost plošného provádění odběrů většího počtu vzorků v intenzivních chovech najednou tak, aby bylo možné využít potenciál genomických analýz, za současné minimalizace nákladů na jednotlivou analýzu.

Definována byla tato kritéria výběru zdroje:

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: aplikační 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 vzorku vůči extrémním teplotám a vůči mechanickému poškození vzorkovnice během transportu.

PROSTOROVÉ NÁROKY NA ARCHIVACI BIOLOGICKÝCH ZDROJŮ PO PROVEDENÍ IZOLACE GENOMICKÉ DNA – tato skutečnost je dána potřebou uchovávat původní zdroje DNA pro případnou nutnost revize

provedených zkoušek, nebo jejich rozšíření o nové metodické postupy v návaznosti na expanzi využívání SNP technologií jako nástroje pro šlechtění prasat v ČR v budoucnu.

Hodnocení bylo provedeno vzájemným srovnáním kritérií pro jednotlivé zvažované biologické zdroje.

škála: 3 relativní stupně: vysoký – střední – nízký; nebo ANO – NE

Tabulka 1: Hodnocení kritérií vhodnosti zdrojů DNA z pohledu chovatelské praxe:

	NESRÁŽLIVÁ KREV	ŠTĚTINOVÉ 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
PROSTOROVÉ NÁROKY NA ARCHIVACI	VYSOKÉ	NÍZKÉ	VYSOKÉ	STŘEDNÍ

Zjištění:

Z hlediska všech hodnocených kritérií se jako biologický zdroj první volby jeví **odběr štětinových cibulek**. Závěr koresponduje s publikovanými údaji (Neary *et al.* 2014).

Jako alternativa bude v praxi odzkoušena metoda **odběru nasálních stěrů**.

U odběru nesrážlivé krve zjevně převažují negativa nad pozitivy, tento zdroj nebude doporučen pro plošný odběr velkého počtů vzorků.

Odběr tkáně z ucha (TSU – Tissue Sample Unit), plošně praktikovaný v některých evropských zemích u skotu (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 dále izolována mimo rutinní režim za individuálně stanovených podmínek.

II. 3. Volba vhodných metod izolace DNA v závislosti na zdroji

II. 3. 1. Princip izolace genomické DNA

Nehledě na široké spektrum izolačních metod, jejíž volba je přímo závislá na charakteru biologického zdroje, lze proces izolace genomické DNA ze savčích buněk v principu rozdělit na dva, případně tři, na sebe navazující kroky:

- **První krok: 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

degradují veškeré proteiny, čímž je docíleno uvolnění DNA z buňky. První fáze se může výrazně lišit v závislosti na zdroji a je nejvíce závislá na specifických vlastnostech daného biologického materiálu. V případě buněk s pevnými buněčnými stěnami musí enzymatickému štěpení předcházet mechanické rozrušení membrán.

Výsledkem této fáze izolace je buněčný lyzát obsahující DNA ve směsi s proteiny, solemi, nečistotami, zbytky lyzačních činidel, detergentů apod. (Šteiger, 2018).

- **Druhý krok: vlastní extrakce DNA z buněčného lyzátu** tj. oddělení DNA od ostatních složek lyzátu. Druhý krok extrakce již lze pro různé biologické zdroje unifikovat, případně souběžně zpracovávat lyzáty získané různými metodami. Zjednodušeně lze konstatovat, že druhá fáze izolace není relevantně závislá na charakteru biologického zdroje. Extrakci DNA z kvalitních buněčných lyzátů lze bez větších problémů úspěšně robotizovat.
- **Třetí krok: 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 etanolem. V některých případech lze od posledního kroku „dočištění“ v rutinních protokolech upustit (Miller *et al.*, 1999; Vondrejs a Storchová, 1997).

Vhodnou metodu izolace DNA volíme na základě souběžného posouzení několika různých kritérií, 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

Systém odběru vzorků určených k izolaci genomické DNA a její následné aplikaci na microarray's – PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina primárně vychází z nároků na kvalitu izolované DNA, která do analytického procesu vstupuje, přesně definovaného v rutinním protokolu Infinium HD technologie (*Infinium® HD Assay Protocol Part # 11328087, Rev. B November 2009*).

Doporučené hodnoty čistoty a koncentrace DNA uvádí dodavatel PorcineSNP60 v2 BeadChips technologie, firma Illumina, Inc., v instrukčním manuálu: měřeno spektrofotometricky – NanoDrop2000.

Ratio of the absorbance: A260/280 a A260/230 = 1,8 – 2,1 a limitní koncentrace: 50 ng/μL

Nárokováné hodnoty na čistotu a koncentraci vstupní DNA, vlastnosti biologického vzorku, který bude do procesu izolace DNA vstupovat, a potřeba zabezpečit vysokou průchodnost vzorků rutinní laboratoří v praktikovaném industry modelu provozu, do jisté míry zužuje široké spektrum popsaných metod izolace DNA, které lze účelně a efektivně aplikovat (Neary *et al.*, 2014).

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

Pro zabezpečení efektivní průchodnosti vzorků laboratoří a možnosti využití automatizace je žádoucí minimalizovat počet alternativních výchozích zdrojů DNA a unifikovat proces prvního kroku – lýze buněk – pro všechny alternativní zpracovávané zdroje.

Výjimkou je zpracování nestandardních zdrojů, které je nutno z rutiny vyčlenit a zpracovávat je s ohledem na jejich specifitu. Zpracování těchto zdrojů je věnována samostatná kapitola II.6.

Pro extrakci DNA z buněčného lyzátu námi vybraných biologických zdrojů (viz. II.2.2.) a případné pročištění DNA (druhý a třetí krok) lze praktikovat několik základních metodických postupů:

- **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 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 postupu založeného na vazbě DNA na pevnou fázi:

- 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).

Pro reziduální a archivní zdroje byl odzkoušen *GeneAll Exgene DNA micro (118-050)* izolační kit firmy GeneAll GENERALL BIOLECHNOLOGY CO., LTD

- **magnetosilikové partikule**, kde se DNA naváže na 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. 3. 3. Výběr metod izolace genomické DNA z vybraných zdrojů

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 chemikálií, 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

Tabulka 2: Hodnocení kritérií vhodnosti metod izolace DNA v provozu rutinní laboratoře

	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

Zjištění:

Z prvotního hodnocení vhodnosti izolačních metod k využití v rutinní laboratoři se jako nejvhodnější jeví metoda purifikace buněčných lyzátů na magnetických kuličkách, která je rozumným kompromisem vynaložených nákladů a spolehlivého potenciálu metody produkovat DNA extrakty v požadované kvalitě a výtěžnosti. Jako výrazné pozitivum lze hodnotit možnost robotizace zmíněné izolační metody.

Ve většině hodnocených kritérií nevyhověla metoda precipitační.

Metody izolace na kolonkách a tzv. Chelex nelze primárně ani vyloučit ani doporučit. Možnost jejich využití při izolaci genomické DNA prasat bude nutné pečlivě posoudit v kontextu jejich kompatibility s navrhovanými biologickými zdroji.

Návazně na výběr použitelných metod izolace DNA byla posouzena **vhodnost vybraných izolačních metod** pro laboratorní zpracování jednotlivých vytipovaných biologických zdrojů DNA prasat.

Tabulka 3: Zhodnocení vhodnosti metod izolace DNA ve vztahu k jednotlivým zdrojům

	METODA PRECIPITAČNÍ	METODA CHELEX	METODA KOLONKY	METODA MAGNETICKÉ KULIČKY
ŠTĚTINOVÉ CIBULKY	NE	NE	ANO	ANO
NASÁLNÍ STĚRY	NE	ANO	+/-	ANO
NESRÁŽLIVÁ KREV	ANO	+/-	ANO	ANO
TKÁŇ UCHA (TSU)	+/-	NE	+/-	ANO
SPERMA	ANO	+/-	ANO	ANO
REZIDUÁLNÍ, ARCHIVNÍ, NESTANDARDNÍ ZDROJE	NE	NE	ANO	+/-

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

Zjištění:

Z komplexního hodnocení vhodnosti zvažovaných biologických zdrojů vhodných k odběru za účelem izolace genomické DNA u prasat a jejich kompatibility s možnými izolačními metodami (s ohledem na provozní a ekonomická hlediska) se jako nevhodnější biologický zdroj jeví **štětinové cibulky**.

Jako možná alternativa bude – s ohledem na jednoduchost odběru a následnou nízkonákladovou izolační metodu – odzkoušen **odběr nasálních stěrů**.

Ostatní zdroje (viz. Tabulka 3) budou v případě, že nebude možnost odebrat standardní zdroj DNA, vyčleněny z rutinní průchodnosti vzorků laboratoří a budou zpracovány individuálně některou z vhodně zvolených metod izolace, které má laboratoř k dispozici.

II. 4. Vývoj vhodné odběrové sady a zpracování postupu odběru pro favorizovaný zdroj – štětinové cibulky a alternativní zdroj – nasální stěr

II. 4. 1. Odběrová sada a postup odběru pro zdroj DNA štětinové cibulky

V režimu velké průchodnosti vzorků laboratoří, je nutné provádět odběr štětín pomocí jednotné odběrové sady. Sofistikovaná odběrová sada unifikuje kvantitu i kvalitu biologického vzorku během procesu vzorkování a umožňuje bezkonfliktní vstup vzorku do procesu laboratorní analýzy.

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

Při návrhu a optimalizaci odběrového setu pro prasata byly využity zkušenosti s obdobným odběrovým setem používaným ke vzorkování chlupů skotu (Schröffelová *et al.*, 2018).

Navržený odběrový set eliminuje možnosti vzájemné kontaminace vzorků během odběru, transportu do laboratoře, prvotní evidence a zadávání zakázky do laboratorního systému.

Umožňuje komfortní, jednoduché a časově nenáročné provedení prvního kroku laboratorního zpracování, kterým je odebrání aliquotu štětinových cibulek: manuálně – ustřížením.

Navržený odběrový set zároveň umožňuje 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 štětinových cibulek (viz Příloha 1A a 1B).

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

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

Postup odběru – prasata:

- Vytrhněte štětiny ze hřbetu zvířete
- Je nutno vytrhnout 30 – 40 štětín
- Zkontrolujte, zda štětiny mají cibulky
- Ze štětín vytvořte svazeček
- Z odběrového kitu odlepte samolepku – „Odlep zde“
- Do lepicí části vložte svazek štětín tak, aby cibulky zasahovaly do pole pro štětinové cibulky



- Přelepte konce štětín samolepkou
- Očistěte si ruce před dalším odběrem

Podrobný návod odběru do odběrového setu k dispozici na:
<https://www.cmsch.cz/navod/postup-odberu-prasata/>

II. 4. 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) – foto viz Přílohy 2A a 2B.

Tento odběrový set je jak v ČR, tak celosvětově používán k odběru nasálních (případně bukálních) stěrů u skotu, malých přežvýkavců a psů.

Pro prasata nebyl tento způsob neinvazivního odběru nasálního stěru dosud odzkoušen. V rámci projektu proběhla pilotní zkouška odběrové sady u pokusné skupiny 33 zvířat.

Odběr v rámci pilotní studie byl prováděn podle instruktážního videa a návodu výrobce odběrové sady, k dispozici na: <https://www.youtube.com/watch?v=Cfva6llzN2E>

II. 5. Vyhodnocení pilotní studie odběrů vybraných zdrojů DNA do odběrových setů pro odběr štětinových cibulek a nasálních stěrů

Štětinové cibulky byly pro potřeby pilotní studie odebírány do navrženého odběrového setu, po předchozí jednoduché edukaci k odběru podle návodu uvedeného v kapitole II.4.1. Vzorky zařazené do pilotní studie byly náhodně vybrány ze čtyř různých odběrů, které byly podle zadání Svazu chovatelů prasat, z.s. v rámci řešení projektu provedeny ve třech šlechtitelských chovech prasat.

Nasální stěry byly odebrány na Testační stanici Ploskov, Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, ČZU Praha.

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“ pro izolaci ze štětinových cibulek a „metoda CHELEX – manuální protokol“ pro izolaci z nasálních stěrů.

Po zhodnocení kvality DNA izolátu (standardní měření koncentrace a čistoty, případně další kontrolní kroky, viz. Kapitola II.7.) byly vybrané DNA izoláty aplikovány na PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina v protokolu Illumina HD Infinium technologie. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4: Sumární výsledky pilotní studie odběru vybraných biologických zdrojů DNA u prasat

	ŠTĚTINOVÉ CIBULKY	NASÁLNÍ STĚRY
POČET ODEBRANÝCH VZORKŮ	115	33
POČET NESTANDARDNÍCH ODBĚRŮ VYLOUČENÝCH Z DALŠÍ ANALÝZY PO PRVOTNÍ VIZUÁLNÍ KONTROLE	6	8
% ÚSPĚŠNOSTI ODBĚRU	94,7 %	75,8 %
ROZMEZÍ KONCENTRACE IZOLOVANÉ DNA ng/μL	338,4 – 13,6	154,7 – 64,5
PRŮMĚRNÁ KONCENTRACE ng/μL	102,5	247,1
PRŮMĚRNÁ ČISTOTA IZOLOVANÉ DNA A260/280 (NanoDrop)	2,01	1,09
ROZMEZÍ DOSAŽENÝCH „call rate“ PO APLIKACI REPREZENTATIVNÍCH VZORKŮ DNA NA PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina	0.997 – 0,992	0.977 – 0,637
PRŮMĚRNÁ HODNOTA „call rate“	0.994	0.807

Zjištění z pilotní studie:

V rámci pilotní studie bylo prokázáno, že:

1) Štětinové cibulky jsou optimálním biologickým zdrojem genomické DNA u prasat.

Tento fakt je doložen:

- nízkým počtem opakování odběru štětinových cibulek
- vysokou úspěšností izolací, poskytujících kvalitní izolát DNA jak z pohledu koncentrace, tak čistoty výsledné DNA. Výsledky korespondují s publikovanými údaji (Sironen *et al.*, 2011).
- vysokou úspěšností analýzy DNA extraktů na PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina, vyjádřenou „call rate“.

Dosažené „call rate“ umožňují zařazení všech SNP genotypů stanovených v rámci pilotní studie do dalšího bioinformatického zpracování pro vytvoření referenční populace a vývoj postupů pro odhad genomických plemenných hodnot znaků prasat zařazených do Českého národního šlechtitelského programu

2) Metoda izolace DNA ze štětinových cibulek (izolace na magnetických kuličkách) byla vhodně zvolena.

Volba izolační metody přináší benefit široké možnosti uplatnění automatizace a robotizace izolačního procesu, co následně umožňuje velkou průchodnost vzorků laboratoří a vytváří výhodné ekonomické podmínky pro plošné SNP genotypování u prasat.

3) Odběrová sada pro štětinové cibulky vyvinutá a odzkoušená v rámci studie je vhodně zvolena, má universální upotřebitelnost, poskytuje uživatelský komfort při odběru biologického vzorku v chovu i při zpracování odebraných vzorků v laboratorních procesech a jejich archivaci.

4) Nasální stěry nejsou vhodným biologickým zdrojem genomické DNA u prasat.

Tento fakt je doložen:

- vysokým počtem opakování odběru nasálních stěrů
- nízkou úspěšností izolací, zejména pak z hlediska čistoty výsledné DNA
- nízkou úspěšností analýzy izolované DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina, vyjádřenou nízkým „call rate“.

Pouze u 4 analyzovaných vzorků bylo dosažené „call rate“ umožňující zařazení výsledných SNP genotypů do dalšího bioinformatického zpracování. Obvykle uváděná hraniční hodnota pro zařazení SNP analýzy do výpočtu GPH u prasat je >0,90, lépe >0,95 (Uimari *et al.*, 2011, Bovo *et al.*, 2019).

Odběrem nasálních stěrů nelze u prasat jednoduše získat použitelný zdroj k izolaci genomické DNA.

Pravděpodobnou příčinou bude charakter utváření nozder u prasat. Z hlediska funkčně-anatomického utváření jsou nozdry prasat ve srovnání s jinými živočišnými druhy (kůň, skot, malý přežvýkavci) charakterizovány jako nejméně poddajné a ze srovnávaných druhů „nejtvrďší“ (Reece, 2009), proto z nich pravděpodobně nelze získat dostatečné množství biologického materiálu pouhým setřením nasální stěrovkou. Tento odběr biologického vzorku pro izolaci genomické DNA u prasat nelze pro praxi doporučit.

II. 6. Možnosti využití jiných biologických vzorků k získání genomické DNA u prasat

Součástí studie zaměřené na rozpracování systému odběrů biologických vzorků určených k izolaci genomické DNA prasat po SNP technologii byl rovněž – vedle vytipování ideálního biologického zdroje vhodného k plošnému odběru zdrojů DNA od početných skupin zvířat, metodicky rozpracován rovněž – způsob získávání DNA z nestandardních, reziduálních a archivních zdrojů. Metody izolace DNA z těchto zdrojů je nutné mít k dispozici pro případy, kdy bude žádoucí získat pro referenční skupinu genotypy cenných již nežijících jedinců, ze kterých nebude k dispozici standardní zdroj DNA v potřebné kvalitě a/nebo kvantitě.

Posouzeny budou metodické možnosti získat genomickou DNA v potřebné kvalitě a výtěžku z:

- kančího spermatu – nativní, zmrazené, reziduální (použitá tuba po inseminaci)
- dlouhodobě archivované nesrážlivé krve – uchované v mrazicím box při teplotě -20°C déle než 1 rok

II. 6. 1. Metodické možnosti získání genomické DNA z kančího spermatu

Normální savčí sperma je směsí spermatozoí suspendovaných v sekretech z varlat a nadvarlat, které jsou smíchány se sekretem z prostaty, semenných váčků a bulbouretrálních žláz. Konečným výsledkem je viskózní tekutina nazývaná ejakulát, semeno, sperma (Kubíček, 2010).

DNA ve spermatu je v buněčných strukturách chráněna buněčnými membránami spermatozoí, což ji činí odolnou vůči technikám izolace DNA používaných pro somatické buňky a vyžaduje alternativní metody izolace a purifikace genomické DNA (Wu *et al.*, 2015).

Běžně využívané metody izolace genomické DNA ze spermatu býků nelze bez modifikace aplikovat k izolaci DNA z kančího spermatu, protože vlastnosti spermatu obou druhů se výrazně liší.

Kančí sperma se liší od spermatu ostatních druhů domácích zvířat zejména velkým objemem a extrémní citlivostí spermií na prudké ochlazení bezprostředně po odběru (Kamanová, 2016).

Inseminace prasnic je většinou zajišťována formou dodávky čerstvého (zchlazeného ve speciálním režimu) spermatu v plastových flakonech (plastový obal – tuba).

Z hlediska izolace DNA není potřebné uchovat v biologickém zdroji (ejakulátu) potenciální předpoklady fertility spermií, pouze je nutné zabránit biologické degradaci spermatu před provedením izolace DNA. Proto lze inseminační dávky během přepravy do laboratoře bez problémů uchovávat při pokojové teplotě, a před a po analýze v mrazicím boxu při teplotě -20°C.

Pro izolaci DNA ze spermatu byla zvolena metoda tzv. **silikátové kolony**, kde je DNA zachycena na kolonce během centrifugace lyzátu, poté je fixovaná DNA přečištěna a následně uvolněna do čistého elučního roztoku.

Odzkoušeny byly komerčně dodávané izolační kity: *QIAamp DNA Mini Kit 250* firmy QIAGEN Group, Inc. a *GeneAll Exgene DNA micro izolační kit* firmy GeneAll GENERAL BIOLECHNOLOGY CO., LTD. Kvalita a výtěžek DNA z obou izolačních kitů byly srovnatelné. Pro použití v rutinním provozu budou plošně využívány izolační kolony GeneAll, které jsou z hlediska materiálových nákladů na jednotlivou izolaci finančně výhodnější.

Jako nejzávažnější problém izolace DNA se ukázala nutnost eliminace bílkovinné frakce – sekretu přídatných pohlavních žláz – ze spermatu. Neschůdnější možnou cestou řešení problému je zmenšit podíl bílkovinné frakce minimalizací výchozího objemu biologického vzorku na začátku procesu izolace DNA.

Tato zkušenost vedla k pokusu odzkoušet jako možný zdroj DNA reziduum spermatu v použité tubě po inseminaci. Výsledky studie shrnuje Tabulka 5.

Tabulka 5: Výsledky optimalizace izolace DNA z kančího spermatu

	Průměrná KONCENTRACE DNA ng/μL	Průměrná ČISTOTA DNA A260/280	Počet izolovaných vzorků	Kontrola kvality DNA PCR_FA	call rate SNP BeadChip
Nativní sperma 500 μl	870.5	0.85	5	negativní	nebylo aplikováno na SNP BeadChip
Zmražené sperma 500 μl	521.4	1.02	4	negativní	nebylo aplikováno na SNP BeadChip
Nativní sperma 100 μl	37.4	1.65	5	pozitivní	0.87
Zmražené sperma 100 μL	32.1	1.74	4	pozitivní	0.94
Nativní sperma 25 μL	15.4	2.01	5	pozitivní	0.98
Zmražené sperma 25 μL	18.2	2.11	4	pozitivní	0.99
Vypláchnutá tuba po inseminaci	9.6	2.00	5	pozitivní	0.98

Zjištění:

Optimalizací metody izolace genomické DNA z kančího spermatu bylo zjištěno:

- a) vhodně zvolenou metodou izolace je metoda purifikace buněčných lyzátů na tzv. silikátových kolonkách, přičemž lze úspěšně využít méně nákladové kolonky *GeneAll Exgene DNA*
- b) nejzávažnější problém izolační metody – odstranění bílkovinných frakcí z ejakulátu – lze vyřešit minimalizací výchozího objemu biologického vzorku
- c) snížení výchozího objemu spermatu snižuje absolutní finální výtěžek, ale naopak výrazně zvyšuje čistotu extraktu, optimálním se jeví výchozí objem 25 μL spermatu
- d) mražení spermatu ovlivňuje výsledek izolace DNA spíše pozitivně (lze zdůvodnit fragilitou kančích spermatozoí a zlepšení přístupnosti DNA v buněčných strukturách spermatozoí v důsledku zmražení)
- e) rozhodující vliv na úspěšnost analýzy DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina (vyjádřeno call rate) má čistota extraktu DNA ze spermatu (vyjádřeno Ratio absorbance A260/280), nikoliv absolutní výtěžek izolace (vyjádřeno koncentrace $\text{ng}/\mu\text{L}$). Relativně nízká koncentrace izolované DNA za současného zachování vysoké čistoty nemá negativní vliv na výsledný call rate
- f) genomickou DNA lze úspěšně izolovat z reziduálního zůstatku spermatu v tubě po inseminaci
- g) kvalitu DNA extraktu a jeho použitelnost k analýze na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina lze s vysokou mírou spolehlivosti prověřit v méně finančně náročné STR_FA analýze (viz. Kapitola II.7)

Všechna zjištění je nutné v rámci projektu lépe prověřit na větší skupině vzorků spermatu, budou-li tyto v rámci projektu analyzovány.

II. 6. 2. Metodické možnosti získání genomické DNA z archivních zdrojů

Vytvoření referenční populace a vývoj postupů pro odhad genomických plemenných hodnot znaků prasat předpokládá, že do referenční skupiny bude žádoucí zařadit i SNP genotypy již nežijících plemenných zvířat, které byly předmětem molekulárně genetických testů za účelem ověření původu metodou STR genotypizace a/nebo MHS testu (polymorfismus genu pro vnímavost ke stresu *RYR1* – *ryanodinový receptor*) v předchozích letech. V některých případech jsou k dispozici archivní zdroje biologického materiálu, zejména zmražené nesrážlivé krve.

V rámci projektu byla prověřena možnost izolace DNA z těchto archivních zdrojů.

Jedná se o pilotní studii, do které byla zařazena malá skupina archivních vzorků, ve snaze ověřit možnost izolace genomické DNA z těchto biologických zdrojů a její následné použití k analýze SNP polymorfismu na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina.

Pro pilotní studii byly zvoleny vzorky nesrážlivé krve, které byly v laboratoři iGenetiky uchovány v mrazicím boxu při -20°C minimálně 1, nejdéle pak 3 roky.

Vzhledem k nákladovosti na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina technologie byla do pilotní studie zařazena pouze málo početná skupina archivních krevních vzorků, celkem 12 vzorků.

DNA z vybraných krevních vzorků byla izolována pomocí izolačního kitu *GeneAll Exgene DNA micro* firmy GeneAll GENERAL BIOLECHNOLOGY CO., LTD, který dle předchozích zkušeností nejlépe vyhovuje pro izolaci forenzních, archivních a částečně degradovaných krevních vzorků a umožňuje dosáhnout uspokojivé výtěžky (Jochová, 2019).

Pokusnou skupinu pro prověření možnosti izolovat genomickou DNA prasat ze zmražené, dlouhodobě uchovávané krve, tvořily náhodně vybrané vzorky, různé kvality – dle vizuální kontroly.

Z každé archivní skupiny – z let 2016, 2017 a 2018 byly vybrány 4 vzorky zmražené krve:

- 2 vzorky, které se dle vizuální kontroly jeví jako vysoce kvalitní před archivací
- 2 vzorky, u kterých byla na základě vizuální a senzorické kontroly předpokládána nižší kvalita před archivací

Výsledky shrnuje Tabulka 6.

Tabulka 6: Výsledky pilotní studie izolace DNA archivních zdrojů – zmražená nesrážlivá krev

	Průměrná KONCENTRACE DNA ng/μL	Průměrná ČISTOTA DNA A260/280	Počet izolovaných vzorků	Kontrola kvality DNA PCR_FA	call rate SNP BeadChip
Kvalitní krve 2018	57.5	1.85	2	pozitivní	0.98
Nekvalitní krve 2018	7.4	1.02	2	negativní	nebylo aplikováno na SNP BeadChip
Kvalitní krve 2017	49.4	1.90	2	pozitivní	0.97
Nekvalitní krve 2017	2.1	0.74	2	negativní	nebylo aplikováno na SNP BeadChip
Kvalitní krve 2016	29.9	2.01	2	pozitivní	0.99
Nekvalitní krve 2016	1.2	neměřitelný	2	negativní	nebylo aplikováno na SNP BeadChip

Zjištění:

Pilotní studie k možnosti izolace genomické DNA z dlouhodobě zmražených vzorků krve prasat přinesla následující výsledky:

- vhodně zvolenou metodou izolace *GeneAll Exgene DNA micro*, lze získat ze zmražených archivních vzorků nesrážlivé krve uspokojivý výtěžek genomické DNA v koncentraci a čistotě nárokané pro aplikaci na PorcineSNP60 v2 DNA BeadChips Illumina
- rozhodující vliv na úspěšnost izolace DNA má primární kvalita odebraného vzorku nesrážlivé krve, před archivací a zachování korektních podmínek archivace
- délka uchování vzorku při zachování podmínek -20°C nemá relevantní vliv na úspěšnost izolace, pouze pravděpodobně mírně klesá absolutní výtěžek (nutno dále prověřit)
- rozhodující vliv na úspěšnost analýzy DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina (vyjádřeno call rate) má čistota extraktu DNA (vyjádřeno Ratio absorbance A260/280), nikoliv absolutní výtěžek izolace (vyjádřeno koncentrace ng/μL). Důležitou roli hraje zachování přiměřené integrity DNA extraktu – kontrolováno ELFO v agarozovém gelu.
Relativně nízká koncentrace extraktu DNA za současného zachování vysoké čistoty a přiměřené integrity DNA izolátu nemá negativní vliv na výsledný call rate
- kvalitu DNA extraktu a jeho použitelnost k analýze na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina lze s vysokou mírou spolehlivosti prověřit méně finančně náročnými metodami: ELFO v agarozovém gelu a STR_FA analýzou (viz. Kapitola II.7).

Všechna zjištění z oblasti zpracování archivních zdrojů je nutné v rámci projektu lépe prověřit na větší skupině archivních vzorků, případně pokračovat ve zpracování archivních zdrojů starších 3 let, budou-li tyto k dispozici.

II. 7. Metodický postup pro primární kontrolu kvality izolované DNA

Genotypizace genomické DNA prasat na PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina je proces finančně nákladný a relativně časově náročný. Předpokládá proto důslednou eliminaci nekvalitních extraktů DNA z analytických procesů ještě před aplikací na microarray's tak, aby se minimalizovaly zbytečné finanční a časové ztráty.

V rámci projektu byl racionalizovaný systém kontroly DNA extraktů získaných z vybraných zdrojů cíleně volenými izolačními postupy.

Při posouzení kvality extraktu je nutné současně posoudit koncentraci, čistotu a případně i integritu DNA extraktu. Pokud bychom kterékoliv z jednotlivých kritérií favorizovali, nebo naň nahlíželi individuálně, vystavujeme se riziku chybného rozhodnutí:

- a) buď z procesu analýzy na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina zbytečně vyloučíme upotřebitelné zdroje a chovatele zbytečně vystavíme nutnosti opětovného odběru biologických vzorků DNA
- b) do další analýzy „uvolníme“ extrakty, které kvalitou neodpovídají nárokům procesů analýzy na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina, genotypizace neproběhne korektně a jejím výsledkem bude nízký call rate.

1) Základní stupeň kontroly kvality genomické DNA je spektrofotometrické měření DNA extraktu.

K vyhodnocení jsme použili spektrofotometr NanoDrop 2000 (ThermoScientific).

Roztok nukleových kyselin (NK) se spektrofotometricky vyhodnocuje při vlnové délce 260 nm a 280 nm.

NK absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti okolo 260 nm, zatímco proteiny mají maximum absorbance v oblasti okolo 280 nm.

Absorbance při 260 nm odráží „absolutní“ koncentraci nukleové kyseliny, absorbance při 280 nm odráží její čistotu, tj. míru přítomnosti proteinů.

Poměr A260/A280 poskytuje informaci o čistotě extraktu.

Čistá DNA obvykle vykazuje hodnotu tohoto poměru okolo 1,8 - 2,0. Pokud hodnota poměru je výrazně nižší, je roztok kontaminován proteiny či rezidui extrakčních roztoků (Barbas *et al.*, 2007).

Do dalšího procesu analýzy byly bez další kontroly kvality uvolněny všechny DNA extrakty s koncentrací $\geq 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ a čistotou $A260/280 \geq 1.8$

2) U DNA extraktů s koncentrací $\leq 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ za současného zachování $A260/280 \geq 1.8$ byla provedena dodatečná kontrola kvality DNA využitím metody **multiplex PCR**. Tato metoda je primárně určená k STRs genotypizaci prasat za použití panelu Animaltype Pig PCR Amplification Kit (Robino *et al.*, 2007).

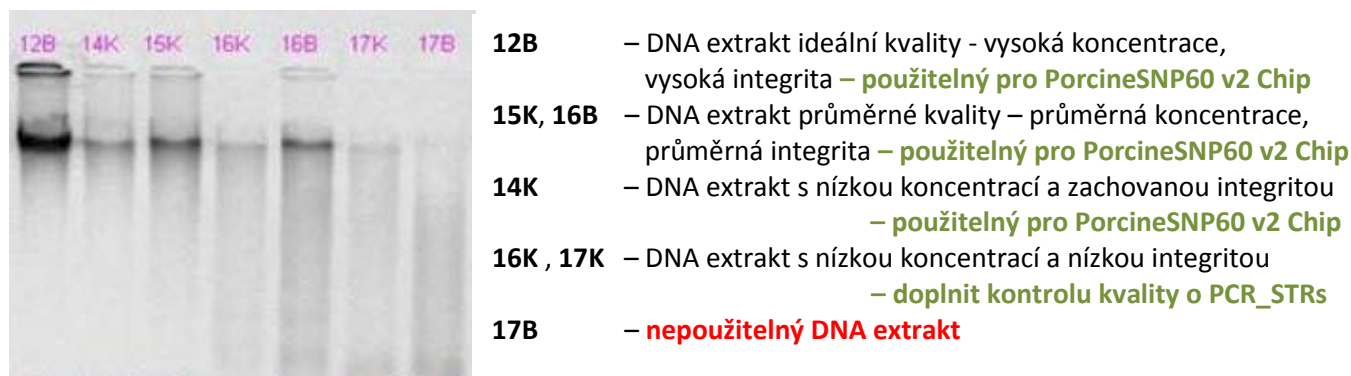
Bylo zjištěno, že plnohodnotná amplifikace všech 11 tetranukleotidových STRs zahrnutých v Animaltype Pig kitu je rovněž ukazatelem předpokládané úspěšnosti aplikace takto prověřeného DNA extraktu na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina s možností dosažení dostatečně vysokého call rate.

Jako limitní koncentrace pro aplikaci na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina byla stanoven hodnota **$\geq 9.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ a $A260/280 \geq 1.8$**

3) U DNA extraktů s koncentrací $\geq 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ a absorbance ratio $A260/280 \geq 1.2$ byla provedena kontrola integrity pomocí **elektroforézy v 1.5% agarozovém gelu**.

Hodnocení bylo provedeno vizuální kontrolou elektroforetogramu (viz. Obrázek 1).

Obrázek 1: kontrola kvality DNA extraktů elektroforeticky



III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

K izolaci genomické DNA u prasat byly dosud využívány tradiční biologické zdroje, zejména nesrážlivá krev, v menší míře pak sperma nebo cibulky ze štětin. Metody izolace DNA byly dosud voleny s ohledem na následné využívání DNA extraktů ke kvalitativním molekulárně-genetickým analýzám, zejména pro potřebu ověřování původu, k identifikaci QTL, nebo příčinných mutací genů s vlivem na zdraví a užitkovost.

Překotný rozvoj a expanze SNP technologií v agrigenomice nabízí SNP genotypizaci jako účinný nástroj pro šlechtění prasat, spolehlivě prověřený na modelu genomických analýz u skotu. Využití potenciálu SNP technologie v oblasti genomických analýz u prasat nárokuje rychlou a vysoce četnou průchodnost vzorků laboratoří v tzv. industry modelu. Tomuto modelu laboratorního zpracování vzorků musí být přizpůsoben již odběr zdrojů DNA v chovech, který je primární podmínkou úspěšného a efektivního provádění SNP analýz.

Aktuálně dostupné informace o nárocích na metodiku odběru biologických zdrojů DNA jsou pouze dílčí, získané zejména při odběrech biologických zdrojů u skotu. Takto nabyté zkušenosti jsou cenné, ale nemohou být bez modifikací aplikovány u prasat, zejména v důsledku výrazných biologických rozdílů obou živočišných druhů.

Předkládaná metodika dokládá důležitost získání kvalitního zdroje DNA jako limitujícího faktoru úspěšnosti procesu genotypizace prasat na PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina. Definuje požadavky na vlastnosti biologických vzorků odebíraných u prasat za účelem získání genomické DNA, s ohledem na morfologické a funkční druhové odlišnosti druhu. Sumarizuje a koreluje laboratorně-metodické a praktické-chovatelské požadavky na odběr vzorků DNA s cílem vyhovět jak chovatelským, tak laboratorním požadavkům na biologický zdroj a jeho odběr.

Novost metodiky spočívá v integraci procesu vzorkování zdrojů DNA do procesu SNP genotypizace, doložení jeho mimořádné důležitosti pro úspěšnost celého procesu genotypizace. Formuluje vysvětlení provázanosti a podmíněnosti kvality odběru zdroje DNA s finální možností laboratorní analýzy DNA izolované z kvalitně odebraného favorizovaného biologického zdroje – štětinových cibulek.

Nově je v metodice rozpracován postup práce s inovativními zdroji DNA, rovněž se zdroji reziduálními a archivními.

Popsán je rovněž postup důsledné kontroly DNA před jejím vstupem do analytického procesu genotypizace na PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina, který eliminuje nekvalitní extrakty (většinou pocházející z nekvalitních resp. špatně odebraných biologických zdrojů) již ve fázi, která umožní minimalizaci finančních ztrát.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

„Metodika SYSTÉM ODBĚRU VZORKŮ DNA“ je koncipovaná jako komplexní metodický přístup k volbě vhodného biologického zdroje DNA u prasat. Zahrnuje zdůvodnění volby z hlediska chovatelského – komfort při odběru a laboratorního – volba efektivních metod izolace genomické DNA.

Metodika představuje soubor optimalizovaných návodu, na jejichž základě lze provádět rutinní odběry standardizovaných zdrojů DNA přímo v chovech prasat a poté z nich v rutinní laboratoři v „industry“ modelu izolovat genomickou DNA v kvalitě nárokové SNP technologií.

Data získaná analýzou genomické DNA budou využita k vytvoření referenční populace a vývoji postupů pro odhad genomických plemenných hodnot znaků prasat zařazených do Českého národního šlechtitelského programu.

Metodika bude uplatněna společností CBS, a.s., ale i dalšími oprávněnými organizacemi, které jsou na základě rozhodnutí Ministerstva zemědělství oprávněny k výkonu šlechtění prasat.

Rovněž bude uváděná do praxe prostřednictvím ČMSCH, a.s., SCHP, z.s., VÚŽV, v.v.i. a dalších spolupracujících subjektů z oblasti chovu prasat.

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. jako osoba pověřená Ministerstvem zemědělství ČR k výkonu činností podle jednotlivých bodů, povinna poskytovat spolu s plemennou knihou chovatelům a oprávněným osobám údaje, zpracovávat, zveřejňovat a evidovat výsledky, což se týká všech chovatelsky důležitých vlastností.

Zatímco v minulosti byly aktivity společnosti primárně zaměřeny na problematiku plemenných hodnot dojených plemen skotu, jejich vývoj a rutinní aplikaci, bylo po dohodě se Svazem chovatelů prasat, z.s. přistoupeno také k aktualizaci postupů odhadu plemenných hodnot u prasat s cílem doplnit současné, konvenčně odhadované plemenné hodnoty prasat o informaci získanou genotypováním na PorcineSNP60 DNA Analysis Kit v2 s denzitou 64 000 SNP. Využitím zmíněného čipu je možné zajistit asociační studie celého genomu, stanovení genetické hodnoty, identifikaci lokusů kvantitativních znaků a výsledky využít pro srovnávací genetické studie. Zvolený chip je zároveň ekonomicky kompromisním řešením při garanci potřebného navýšení spolehlivosti plemenných hodnot, jak potvrzuje řada studií z posledního období (Wellmann *et al.* 2013, Stratz *et al.* 2014; Xiang *et al.* 2015).

Předpokládané ekonomické přínosy metodiky jsou kalkulovány až do výše 980,- Kč za jeden vzorek dodaný do laboratoře ve standardizovaném formátu. Dle dosavadních zkušeností v oblasti genotypování dojených a masných plemen skotu lze předpokládat, že metodicky správným odběrem biologického materiálu lze eliminovat z procesu laboratorního zpracování 2 – 5 % 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. Standardizace vzorků a jejich kvalita při dodání do laboratoře je základním předpokladem pro zajištění následných kroků, které jsou dnes v laboratoři iGenetiky robotizovány a je proto nezbytné zajistit kontinuální kvalitu přijímaných vzorků. Veškeré odchylky od standardizovaného formátu dodaného vzorku mají za následek nutnost manuálního zpracování vzorku mimo robotický protokol, a tím přímý negativní dopad na ekonomickou stránku modelu genotypování u prasat.

Přínosem pro uživatele metodiky je zajištění uceleného návodu – standardního operačního postupu pro získání biologického vzorku potřebné kvality, jako základního předpokladu úspěšné analýzy. Pro chovatele prasat v ČR je implementovaná metoda genotypování zcela inovativní a proto je nezbytné zafixovat správné postupy již při jejím zavádění do širšího, rutinního provozu. Po vytvoření dostatečně robustní referenční populace zvířat bude kromě zvýšení spolehlivosti plemenných hodnot také možné se zaměřit na detekci některých chovatelsky a ekonomicky významných znaků s cílem zajistit výběr správných (nejcennějších) jedinců. V případě genotypování prasat, na rozdíl od stejných postupů u skotu, je třeba zohledňovat relativně vysoké náklady na genotypování, spojené s potřebou genotypování velkého množství kandidátních zvířat. Výběr správné strategie genotypování a definice skupin zvířat, která budou genotypována, musí být nedílnou součástí celého programu genotypování. Ekonomický přínos zvýšení spolehlivosti plemenných hodnot, zajištění přesnějšího výběru jedinců pro další reprodukci nebo eliminace jedinců nevhodných k využití v rámci šlechtitelských programů dále násobí zmíněné přímé úspory v procesu genotypování v závislosti na zvoleném scénáři genotypování.

VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- 1 Barbas III, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K., Silverman, G. J. (2007):**
Quantitation of DNA and RNA.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Appendix 3 Cold Spring Harbor, NY, USA, 2007.
- 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 Bovo, S., Mazzoni, G., Bertolini, F., Schiavo, G., Galimberti, G., Gallo, M., Dall’Olio, S., Fontanesi, L. (2019):**
Genome-wide association studies for 30 haematological and blood clinical-biochemical traits in Large White pigs reveal genomic regions affecting intermediate phenotypes.
Scientific RepoRts 9:7003 | <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43297-1>.
- 5 Dvořáková, V. (2011):**
Analýza růstu a jatečné hodnoty moderních genotypů prasat ve vztahu k vybraným kandidátním genům.
Dizertační práce, Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů.
- 6 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.
- 7 Gielda, L. and Rigg, S. (2017):**
Extraction of amplifiable DNA from embalmed human cadaver tissue.
BMC Res Notes, 10:737, s. 1–5.
- 8 Gojová L, Kozák L. (2006):**
Možnosti využití DNA čipů v molekulární diagnostice dědičných onemocnění.
Klin Biochem Metab 14, 89 – 95.
- 9 Huentelman, M. J., Craig, D. W., Shieh, A. D., Corneveaux, J. J., Hu-Lince, D., Pearson, J. V., Stephan, D. A., (2005):**
SNiPer: improved SNP genotype calling for Affymetrix 10K GeneChip microarray data.
BMC Genomics 6, 149.
- 10 Jochová, K. (2019):**
Vztah genů pro imunitní systém k funkčním vlastnostem (reprodukce a zdraví) u skotu.
Doktorská disertační práce, Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů.
- 11 Kamanová, V. (2016):**
Zhodnocení kanců působících na inseminační stanici.
Diplomová práce, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Agronomická fakulta.

- 12 Kandalcová, J. (2008):**
Analýza polymorfizmů DNA pomocí sady mikrosatelitů pro určování rodičovství u prasat.
Diplomová práce, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Agronomická fakulta.
- 13 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.
- 14 Kubíček, V. (2010):**
Spermatologické vyšetření.
Urologie pro praxi 2010; 11(4).
- 15 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.
- 16 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.
- 17 Miller, K. D., Ellis, M., McKeith, F. K., Bidner, B. S., Meisinger, D. J. (2000):** Frequency of the Rendement Napole RN- allele in a population of American Hampshire pigs.
Journal of Animal Sciences. 78. 1811-1815.
- 18 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.
- 19 Owen, R.D. (1945):**
Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins.
Science, 102 (2651), s. 400–401.
- 20 Ramos, A. M, Crooijmans, R. P., Affara, N. A., Amaral, A. J., Archibald, A. L., Beever, J. E., Bendixen, C., Churcher, C., Clark, R., Dehais, P., Hansen, M. S., Hedegaard, J., Hu, Z. L., Kerstens, H. H., Law, A. S., Megens, H.J., Milan, D., Nonneman, D. J., Rohrer, G. A., Rothschild, M. F., Smith, T. P., Schnabel, R. D., Van Tassell, C. P., Taylor, J. F., Wiedmann, R. T., Schook, L. B., Groenen, M. A. (2009):**
Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology.
PLoS One. 4, e 6524.
- 21 Raška, M. (2006):**
Základní postupy práce s nukleovými kyselinami.
http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/II.workshop/II.%20workshop_Milan%20Raska.doc
- 22 Reece, W. O. (2009):**
Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat – 2., rozšířené vydání.
Grada, 480 stran, ISBN: 978-80-247-3282-4.

- 23 Robino, C., Menegon, S., Caratti, S., Sona, B., Gino, S., & Torre, C. (2008):**
Forensic application of a multiplex PCR system for the typing of pig STRs.
Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 1(1), 614-615.
- 24 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.
- 25 Samorè, A. B., Fontanesi, L. (2016):**
Genomic selection in pigs: state of the art and perspectives.
Italian Journal of Science, vol. 15, no. 2, 211-232.
- 26 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.
- 27 Schröffelová, D., Němcová, L., Hromádková, J., Kučera, J., Lipovský, D., Šteiger, V., Přibáňová, M. (2018):**
Optimalizace odběru alternativních biologických vzorků pro návaznou kvalitní izolaci genomické DNA.
Certifikovaná metodika vypracovaná v rámci výzkumného projektu MZe NAZV QK1810253.
- 28 Sironen, A., Uimari, P., Vilkki J. (2011):**
Comparison of different DNA extraction methods from hair root follicles to genotype Finnish Landrace boars with the Illumina PorcineSNP60 BeadChip.
Agricultural and food Science, Vol. 20 (2011): 143–150.
- 29 Stratz, P., Wellmann, R., Bennewitz, J. (2014):**
Strategies to implement genomic selection in pig breeding using vary low marker density.
Manuscript n. 925. Proceedings of the 10th World Congress Genet Appl Livest Prod, August 2014, Vancouver BC, Canada.
- 30 Šimková, H., (2012):**
Breviář forenzní genetiky.
Tribun EU, Brno, 212 s.
- 31 Šteiger, V. (2018):**
Molekulární diagnostika ptačích schistosom při nákaze přirozených i náhodných hostitelů,
Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, s. 33.
- 32 Uimari, P., Sironen, A., Sevón-Aimonen, M. L. (2011):**
Whole-genome SNP association analysis of reproduction traits in the Finnish Landrace pig breed
Genetics Selection Evolution volume 43, Article number: 42.
- 33 Vondrejs, V., Storchová, Z. (1997):**
Genové inženýrství I.
Praha: Karolinum.
- 34 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.

- 35 Veselá, H. (2009):**
Odebírání vzorků DNA, nakládání s nimi a následná identifikace osob.
Srovnávací studie č. 5.286, Parlament České republiky, Parlamentní institut.
- 36 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.
- 37 Wellmann, R., Preuß, S., Tholen E, Heinkel J, Wimmers K, Bennewitz J. (2013):**
Genomic selection using low density marker panels with application to a sire line in pigs.
Genet Sel Evol. 45:28.
- 38 Wu, H., de Gannes, M. K., Luchetti, G., Pilsner, J. R. (2015):**
Rapid method for the isolation of mammalian sperm DNA.
Biotechniques; 58(6): 293–300.
- 39 Xiang, T., Ma, P., Ostersen, T., Legarra, A., Christensen, O. F. (2015):**
Imputation of genotypes in Danish purebred and two-way crossbred pigs using low-density panels.
Genet Sel Evol. 47:54.
- 40 Infinium® HD Assay Protocol Guide,**
ILLUMINA PROPRIETARY Part # 11328087, Rev. B November 2009.
- 41 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. a kol. (2019):

Standardní operační postupy – SOP ZL1312 Laboratoře iGenetiky ČMSCH, a.s. (zkušební laboratoř 1312)

Zpracováno v rámci akreditace metody: Detekce SNP pomocí microarray's technologie na genotypovacích Infinium Bead Chips Illumina v celogenomové DNA teplokrevných zvířat – prase.

Viz. Osvědčení o akreditaci č.227/2019 podle ČSN EN ISO/IEC 17025:2018 a příloze k osvědčení

https://www.cai.cz/OA/pdf/P227_2019_CS.pdf

VIII. PŘÍLOHY

Příloha 1A – Odběrový set pro odběr štětinových cibulek – vzorkovnice



www.cmsch.cz



Kit pro odběr štětinových cibulek pro izolaci DNA

Odběrový kit vložte do obálky, zabráníte kontaminaci odebraného vzorku!



ČMSCH a.s. | ČESKOMORAVSKÁ SPOLEČNOST CHOVATELŮ



Návod na odběr a manipulaci s odběrovou sadou:

Českomoravská společnost chovatelů, a.s.
Laboratoř imunogenetiky
Benešovská 123, 252 09 Hradištko
Tel: 257 896 329
imunogenetika@cmsch.cz

ŠTĚTINOVÉ CIBULKY

AM číslo zvířete:

Kód pro elektronickou objednávku:

Příloha 1B – Odběrový set pro odběr štětinových cibulek – obálka



Postup odběru:

- Vytrhněte zvířeti štětiny
- Je nutno vytrhnout 30 - 40 štětín
- Zkontrolujte, zda štětiny mají cibulky
- Ze štětín vytvořte svazeček
- Z odběrového kitu odlepte samolepku
- Do lepicí části vložte svazek štětín tak, aby cibulky zasahovaly do pole pro štětinové cibulky

ŠTĚTINOVÉ
CIBULKY



- Přelepte konce štětín samolepkou
- Očistěte si ruce a kleště před dalším odběrem
- Vyplňte elektronickou žádanku na igenetika.cz



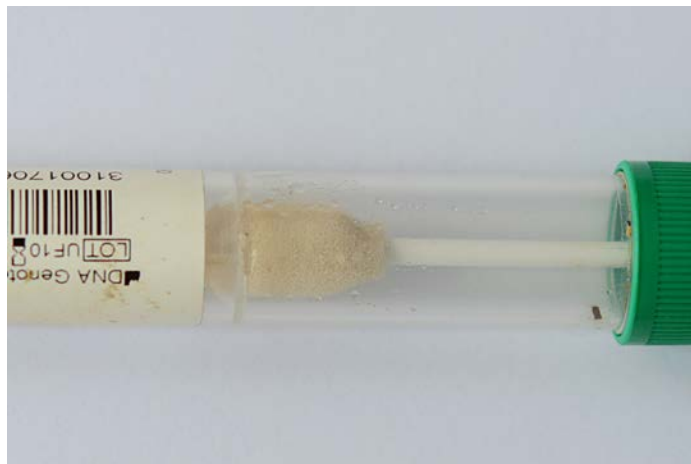
Tel: 257 896 329
imunogenetika@cmsch.cz
cmsch.cz

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

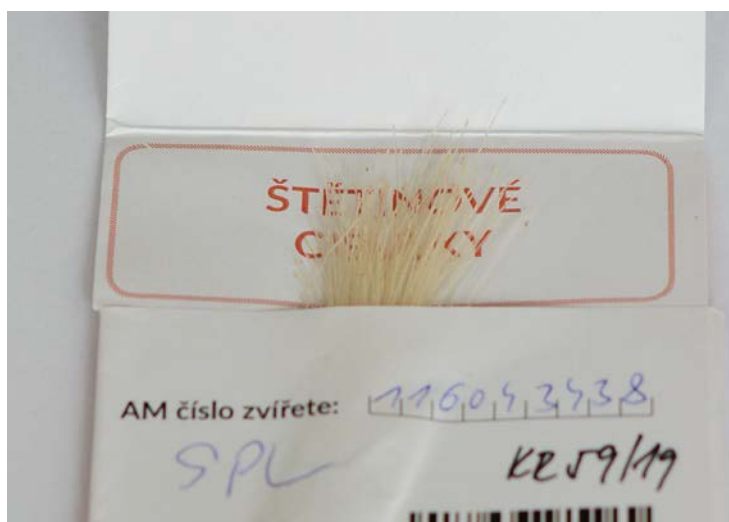
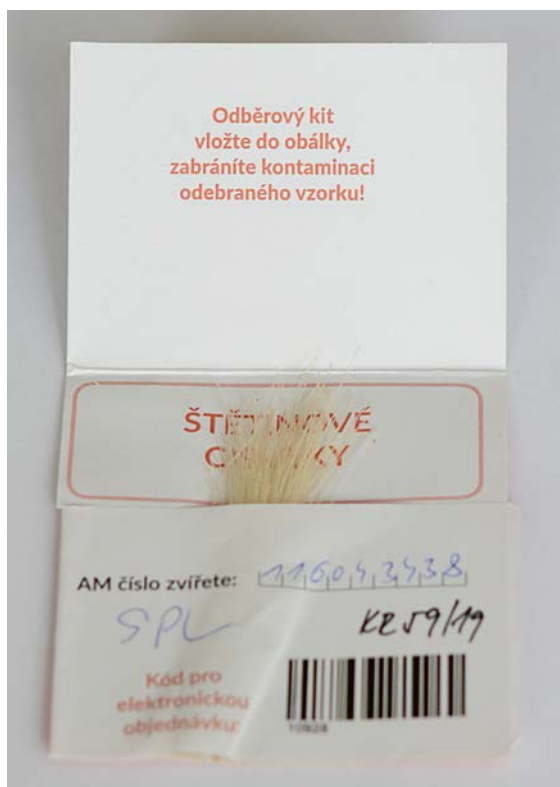
Příloha 2A – Odběrový set pro zdroj DNA – nasální stěr – před odběrem



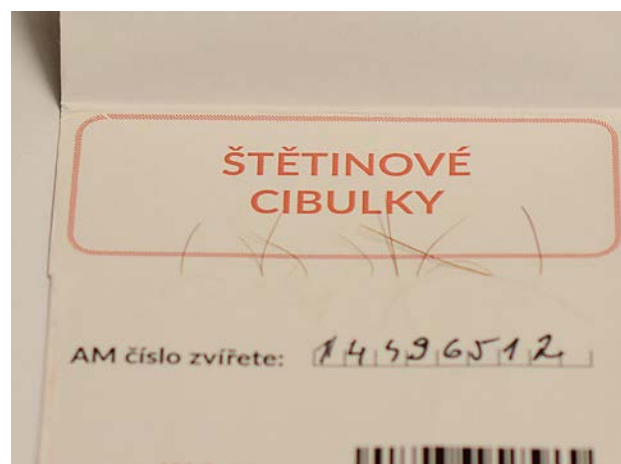
Příloha 2B – Odběrový set pro zdroj DNA – nasální stěr – po odběru



Příloha 3A – Kvalitně odebrané štětinové cibulky



Příloha 3B – Nekvalitně odebrané štětinové cibulky



Název:

System odběru vzorků DNA

Autor:

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

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

doc. Dr. Ing. Josef Kučera (podíl na vzniku metodiky 15 %)

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

Ing. Jarmila Hromádková (podíl na vzniku metodiky 5 %)

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

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

Oponenti:

Ing. Zdenka Majzlíková, Česká plemenářská inspekce, Praha

prof. Ing. Gustav Chládek, CSc. Mendelova univerzita v Brně

ISBN 978-80-87633-03-8

Zpracováno za podpory MZe ČR, úkol MZe NAZV QK1910217:

„Vytvoření referenční populace a vývoj postupů pro odhad genomických plemenných hodnot znaků prasat zařazených do Českého národního šlechtitelského programu.“

Českomoravská společnost chovatelů, a.s.

Benešovská 123

252 09 Hradištko

www.cmsch.cz

Copyright © 2019 ČMSCH, a.s.