

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Živočišné biotechnologie

Katedra: Katedra speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Detekce skrytých přenašečů dědičné katarakty u psů  
pomocí PCR**

Vedoucí diplomové práce: prof.      prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Konzultant diplomové práce:      Ing. Eva Jozová

Autor diplomové práce:              Bc. Barbora Farková

České Budějovice

2015

# PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové, a to v nezkrácené podobě v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích

duben 2015

.....

podpis

# PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D., za odborné vedení během vypracování mé diplomové práce.

Jedno z největších poděkování patří též konzultantce mé diplomové práce Ing. Evě Jozové za velkou pomoc v laboratoři a cenné rady.

Další poděkování patří chovatelům za poskytnutí svých psů k odběru DNA.

Poslední poděkování patří rodině a mým blízkým, kteří mě během celého studia podporovali.

## Abstrakt

Dědičná katarakta je jednou z nejrozšířenějších onemocnění očí u psů. U psů plemene Stafordšírský bullteriér došlo k tak masivnímu rozšíření této dědičné nemoci, že je v České republice zavedeno povinné testování alespoň jednoho jedince z chovného páru. Jedná se o degenerativní onemocnění čočky, kdy postižený jedinec do 3 let trvale oslepne. V České republice se již delší dobu nevyskytují jedinci postižení touto nemocí, ale stále se objevují skrytí přenašeči, které je třeba odhalit, aby nežádoucí alely mohly být vyloučeny z genofondu.

Cílem této práce bylo otestovat jednoduché metody odběrů biologického materiálu, vyzkoušet je v praxi a ověřit, zda jsou vhodné k izolaci DNA a dále otestovat alternativní metodu molekulární detekce tohoto onemocnění.

Celkem byly odebrány čtyři bukalní sliznice od 23 psů a fen plemene Stafordšírský bullteriér. Detekce skrytých přenašečů dědičné katarakty se prováděla pomocí PCR analýzy se specifickými primery. Získané amplikony byly detekovány pomocí gelové a čipové elektroforézy a pomocí fragmentační analýzy. Detekce přenašečů byla založena na přítomnosti 2 ampliconů (detekce heterozygotů).

V mé práci jsem došla k závěru, že pro detekci skrytých přenašečů je nutné používat fragmentační analýzu z důvodu rozdílu pouze jedné báze ve sledovaném úseku DNA. Gelová ani čipová elektroforéza neposkytuje tak vysoké rozlišení a není možné detekovat dva fragmenty lišící se pouze o jeden bp. Jako nejvhodnější metodu odběru DNA jsem zvolila čtyři bukalní sliznice cytologickým kartáčkem a izolaci DNA metodou chelex s následným přečištěním vzorku.

**Klíčová slova:** pes; izolace DNA; katarakta; molekulární markery; PCR

## Summary

The hereditary cataract is one of the most common eye disease in dogs. The expansion of this disease in the Staffordshire bullterrier breed has been so massive that in the Czech Republic was introduced the rule of mandatory testing of at least one of a breeding pair. This is a degenerative disease of the lens causing total blindness of the affected animal within three years. Since some time ago there are no more dogs affected by the disease in the Czech Republic, there are however still hidden carriers which need to be discovered to the complete extinction of the disease in the genome.

The goal of this study was to test simple ways of collecting biological samples, try them in practice and to verify whether they are suitable for the DNA isolation and also to test an alternative method of molecular detection of this disease.

In total there have been 23 buccal swabs collected from male and female Staffordshire Bullterrier examples. The detection of the hidden carriers of the hereditary cataract was carried out by PCR analysis with specific primers. The obtained amplicons were detected by both gel and chip electrophoresis and by using fragment analysis. This detection of the carriers was based on the presence of two amplicons (heterozygotes).

I came to conclusion that to detect hidden carriers it is necessary to use the fragment analysis because of the difference of only one base in the reference section of DNA. Neither gel nor chip electrophoresis does provide sufficiently high resolution and it is not possible to detect two fragments that differ only by one bp. As the most appropriate sampling method I have chosen the buccal smear by cytological brush followed by isolating the DNA by Chelex with purification of the sample subsequently.

**Keywords:** dog; DNA isolation; cataract; molecular markers; PCR

# OBSAH

1. ÚVOD .....	9
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE .....	11
2.1 STRUKTURA GENU A GENOMU .....	11
2.1.1 <i>Struktura savčího genomu</i> .....	11
2.1.2 <i>Struktura savčího genu</i> .....	11
2.1.3 <i>Struktura psího genomu</i> .....	11
2.2 METODY POUŽITÉ PŘI MAPOVÁNÍ PSÍHO GENOMU .....	12
2.2.1 <i>Vazbové mapování</i> .....	13
2.2.2 <i>Cytogenetické mapování</i> .....	13
2.3 METODY IZOLACE A ANALÝZY DNA .....	14
2.3.1 <i>Izolace DNA</i> .....	14
2.3.2 <i>Extrakce DNA</i> .....	16
2.3.3 <i>Analýzy DNA</i> .....	17
2.3.4 <i>Separace DNA</i> .....	19
2.4 NEJČASTĚJŠÍ GENETICKÉ TESTY U PSŮ .....	21
2.4.1 <i>Metoda kandidátních genů</i> .....	21
2.4.2 <i>Vazbová analýza</i> .....	21
2.4.3 <i>Analýza vazbové nerovnováhy</i> .....	21
2.4.4 <i>Genetické testy</i> .....	22
2.5 OVĚŘOVÁNÍ PARENTITY A PATERNITY .....	22
2.5.1 <i>Ověřování pomocí krevních skupin</i> .....	22
2.5.2 <i>Ověřování pomocí biochemických polymorfních znaků</i> .....	23
2.5.3 <i>Ověřování pomocí mikrosatelitů</i> .....	23
2.5.4 <i>Ověřování pomocí SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)</i> .....	23
2.6 NEJČASTĚJI ANALYZOVANÁ GENETICKÁ ONEMOCNĚNÍ .....	24
2.6.1 <i>Dědičná onemocnění oka</i> .....	24
3. CÍL PRÁCE .....	30
4. MATERIÁL A METODIKA .....	31
4.1. POUŽITÝ MATERIÁL .....	31
4.2. ODBĚR MATERIÁLU .....	32
4.2.1 <i>Stěr bukalní sliznice vatovou tyčinkou a cytologickým kartáčkem</i> .....	33
4.2.2 <i>Vytržení několika živých chlupů v ocasní partii psa i s cibulkami</i> .....	33
4.3. IZOLACE DNA .....	34
4.3.1 <i>Izolace DNA pomocí CTAB-PVP (polyvinylpyrrolidon)</i> .....	34
4.3.2 <i>Izolace DNA modifikovaná chloroformová</i> .....	36
4.3.3 <i>Izolace DNA chelexem</i> .....	37
4.3.4 <i>Izolace DNA modifikovanou SDS metodou</i> .....	38
4.4. MĚŘENÍ KONCENTRACE DNA .....	39
4.5. PŘEČIŠTĚNÍ DNA .....	40
4.6. PCR REAKCE .....	41
4.6.1 <i>Zkušební PCR reakce pro ověření použitelnosti vzorků z různých metod izolace, optimalizovaná</i> .....	44
4.6.2 <i>PCR reakce pro zjištění optimální teploty pro primery (HC Hereditary Cataract, gen HSF4)</i> .....	45
4.6.3 <i>PCR pro další analýzu a detekci carrier jedinců</i> .....	46
4.6.4 <i>PCR vzorků carrier jedince a zdravého s použitím různého množství DNA v reakci</i> .....	46

4.6.5. PCR vzorků s použitím prodlouženého a značeného primeru.....	47
4.6.6. PCR vzorků s použitím značeného primeru po optimalizaci ředění značeného primeru ...	47
4.7. PŘÍPRAVA AGAROSOVÉHO GELU A ELEKTROFORÉZA .....	48
4.8. ČIPOVÁ ELEKTROFORÉZA .....	50
4.9. FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA.....	51
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>53</b>
<b>6. DISKUSE.....</b>	<b>68</b>
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>70</b>
<b>8. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ.....</b>	<b>72</b>
<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>79</b>

# 1. ÚVOD

Chovem psů se člověk zabývá již od nepaměti. Psy začal šlechtit nejdříve pro účely lovu, ochrany obydlí a majetku. Později začal pes hrát nezastupitelnou roli i jako společník.

O původu a domestikaci psa se vedou dodnes diskuze, ochočování vlků jistě probíhalo paralelně v různých oblastech, ale zachovala se víceméně pouze jedna domestikovaná linie, tudíž mají současní psi společného předka. V současnosti Mezinárodní kynologická organizace FCI uznává kolem 350 plemen psů, mnoho dalších je FCI neuznaných. Z toho pramení vysoká morfologická rozmanitost navzdory úzké genetické základně. Přibližně 80 % současných plemen psů jsou tzv. moderní plemena, která se začala vyvíjet na přelomu 18. a 19. století, ale některá plemena mají velmi dlouhou historii, která sahá až tisíce let zpět.

Pravděpodobným předkem psa je starověký evropský vlk, domestikovaný evropskými lovci a sběrači před více než 18 000 lety a vlk je i geneticky nejbližším příbuzným psa. Za hlavní genetickou odlišnost mezi psy a vlky se kromě genů ovlivňujících psychiku pokládají geny pro enzymy amylázy, které umožňují trávit škrob.

Je známo několik set geneticky podmíněných nemocí, které se vyskytují současně u člověka i psa. K nejčastějším společným onemocněním patří rakovina, epilepsie, alergie, nemoci selhání imunitního systému, slepota, hluchota, srdeční onemocnění a i šedý zákal (katarakta). Rozšíření dědičných onemocnění přispěl jak pokles populace, který nastal několikrát v průběhu vývoje, tak regulace chovu (tzv. plemenné standardy). Příkladem může být požadavek čistoty plemene, který byl poprvé formulován v 19. století. Cena za množství moderních plemen, která vznikla selektivním chovem, je uchování určitých dědičných vloh, kterými byly dále předávány také negativní vlohy a mutace. Došlo ke „zpevnění“ genové struktury včetně dědičných nemocí.

Rozsáhlé šlechtění módních plemen (oblíbený sire efekt, liniová plemenitba), inbreeding a obtížná diagnostika přenašečů přispívají k mutacím zodpovědných za recesivní podmínky, které vedou ke vzniku vzácných recesivních onemocnění. Tyto



podmínky nastávají zejména u málopočetných plemen, ale vyskytují se i u plemen rozšířených, kde se praktikuje úzká příbuzenská plemenitba.

Účinnými prostředky na odstranění mutace u postižených plemen jsou především kontroly pomocí diagnostických testů DNA a praktikování vhodných šlechtitelských programů.

Tato práce je zaměřena na molekulární testování dědičného zákalu oka (katarakty) u plemene Staffordšírský bulteriér. Vystala otázka, zda je možné pro detekci této choroby použít i jiného postupu, než-li je běžně používaná metoda molekulární detekce choroby a zda je možné alternativně odebrat a izolovat DNA psů. To by zjednodušilo práci jak samotným chovatelům, tak laboratořím, které by se chtěly zabývat výzkumem této nemoci vyskytující se v populaci psů s teoretickou návazností na výzkum této choroby u člověka.

## **2. LITERÁRNÍ REŠERŠE**

### **2.1 Struktura genu a genomu**

#### **2.1.1 Struktura savčího genomu**

Genom je soubor genetického materiálu nejen buňky, ale i jedince a druhu a je složen z kódujících a nekódujících částí DNA sekvencí. Hlavní genetický materiál se nachází v jádru buňky. Převážná část genomu je tvořena v různém rozsahu nekódujícími sekvencemi DNA (95 %). Zbylých 5 % nese genetickou informaci v podobě genů, které řídí polypeptidové řetězce a jsou označovány jako strukturální geny (savci jich mají okolo 100 000) (Hruban a Majzlík, 2005).

#### **2.1.2 Struktura savčího genu**

Gen je základní funkční jednotka dědičnosti, nesoucí genetickou informaci pro jeden polypeptidový řetězec. Gen je možné chápat z různých hledisek a dříve uvedená charakteristika odpovídá pohledu molekulární genetiky. Další hlediska např. klasická mendelistická genetika chápe gen jako jednotku genetické analýzy, která je používána u dědičných znaků, u nichž je známá jejich přibližná lokalizace na chromosomu, ale není znám jejich polypeptidový produkt. Novější definice udává, že strukturální gen je sekvence nukleotidů nesoucí genetickou informaci, která po transkripci a translaci řídí jeden polypeptidový řetězec (Snustad and Simmons, 2011). Tyto strukturální geny jsou různých velikostí a dají se rozdělit do několika skupin. Malé geny, které jsou velké přibližně okolo 500 párů bází, střední geny a velké geny, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 1 200 až 20 000 párů bází a poslední skupinu tvoří geny obří, jejichž velikost dosahuje až 2 milióny párů bází (Hruban a Majzlík, 2005).

#### **2.1.3 Struktura psího genomu**

Uvádí se, že pes má 20 439 genů, což je mnohem méně než u člověka (Dostál, 2007). Velikost genomu psa je 2,4 Gbp (Kirkness et al., 2003), toto je srovnatelné s velikostí genomu myši 2,5 Gbp (Waterston et al., 2002) nikoli však s velikostí lidského genomu, který činí 3 100 000 000 bp (3,1 Gbp) (Peter, 2005). Podíl repetitivních sekvencí ve struktuře genomu je zhruba 31%, což je opět méně

než u lidského genomu (46%) a myšního genomu (38%) (Kirkness et al., 2003). Nejběžněji vyskytujícím se mikrosatelitním motivem genomu psa je (CA)<sub>n</sub>(GT)<sub>n</sub>. Z pohledu mapování jsou významné zejména tetranukleotidové repetice (GAAA)<sub>n</sub>, vyskytující se v celém genomu psa a vykazující vysokou úroveň polymorfismu (Francisco et al., 1996). Délka mitochondriálního genomu je zhruba 16,7 kb a zahrnuje regulační oblasti 13 ORFs, 22 genů pro tRNA a 2 dva geny pro rRNA (Kim et al., 1998).

## 2.2 Metody použité při mapování psiho genomu

Mapování psiho genomu znázorňuje stanovení pořadí genů, jejich umístění na chromosomech, seskupení, posloupnost v rámci vazebných skupin a následné určení sekvence DNA. Metody, používající se k mapování, se mohou a dají kombinovat. Výsledkem jsou pak různé typy genetických map, jako jsou např. vazbové, chromosomové, fyzické, komparativní nebo kombinované. V roce 1992 byly položeny základy mezinárodní spolupráce při mapování psiho genomu. Do projektu DogMap bylo postupně zapojeno 42 laboratoří z 20 evropských zemí, Velké Británie, Austrálie a Severní Ameriky. Cílem bylo sestavení detailní vazbové mapy se vzdáleností markerů 20 cM a cytogenetickou lokalizací vazbových skupin na chromosomy pomocí FISH. Pro tento účel byly sestaveny rodiny založené z jedinců plemene beagle a německý ovčák (Dolf et al., 1999).

Součástí této mezinárodní spolupráce byl ustanoven THE NHGRI Dog Genome Project jehož cílem byla identifikace genetických markerů dědičných onemocnění (THE NHGRI Dog Genome Project, 2005).

V současné době jsou uveřejněny v databázi EMBL/GenBank výsledky ze dvou projektů zabývajících se sekvenací genomu psa. První výsledky uvedl tým složený z The Institute for Genomic Research a The Center for Advancement of Genomics. Genomové sekvence byly získány od plemene pudl (Kirkness et al., 2003) a výsledky z druhého výzkumu uskutečněného na Broad Institute MIT/Harvard, Cambridge, USA, byly sekvence genomu plemene boxer (Lindblad, 2004).

### **2.2.1 Vazbové mapování**

Vazbové mapování je založeno na sledování segregace alel polymorfních markerů ve vícegeneračních referenčních rodinách. Čím jsou tyto markery na chromosomu blíže k sobě, tím větší je pravděpodobnost, že rodičovské alely nebudou crossing-overem vzájemně separovány a budou se u potomstva vyskytovat společně (Ostrander et al., 2001).

Prvních 16 vazbových skupin genomu psa zahrnujících 43 markerů bylo popsáno ve studii projektu DogMap. Celkem bylo využito 129 psů (německý ovčák a beagl) (Lingaas et al., 1997). Průběžně byl počet markerů navýšen na 187 s průměrnou vzdáleností 8,9 cM tvořících celkem 39 vazbových skupin (Lingaas et al., 2001).

Ze 17 třígeneračních rodin tvořených 212 jedinci plemene trpasličí pudl, toy pudl, norský elkhound, irský setr, beagle a doberman bylo určeno 30 vazbových skupin (velikost cca 2,3 – 106,1 cM s průměrnou vzdáleností 14,03 cM) byla sestavena vazbová mapa. Celková délka této mapy činila zhruba 2073 cM (Mellersh et al., 1997).

### **2.2.2 Cytogenetické mapování**

Mellersh et al. (2000) spojením vazbové a cytogenetické mapy psího genomu lokalizoval 217 markerů pomocí vazbového i radiačního hybridního mapování, což vyústilo v identifikaci 44 syntenních skupin. Současné metody cytogenetického mapování jsou především založeny na fluorescenční in situ hybridizaci (FISH), somatických hybridních panelech a radiačních hybridních panelech (RH-panely).

#### **Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)**

Rozvoj FISH ve spojení s konstrukcí bakteriálních knihoven psího genomu významně rozšířila paletu metod použitelných k lokalizaci markerů na psí chromosomy (Li et al., 1999; Schelling et al., 2002; Schelling et al., 2004).

K označení DNA-sond pro FISH lze využít dvou metod. K přímému označení je využíváno nukleotidů konjugovaných s fluorochromem (FITC-dUTP, Cy3-dUTP), kdy je po hybridizaci viditelný signál vytvářený konjugátem. Nepřímé označení vyžaduje vizualizaci sond označených hapteny (např. biotin-16-dUTP) (Breen et al., 2000). Metodu FISH lze rovněž použít k mapování markerů typu I i II (Stabej et al., 2004; Klukowska-Rotzler et al., 2005).

## **Somatické hybridní panely**

Somatické hybridní panely jsou tvořeny kolekcí mezidruhových hybridních linií buněk. Každý hybrid obsahuje kromě chromosomů prvotního akceptorového organismu také mikrobuněčné či celobuněčné hybridní panely chromosomů donorového organismu, jež je předmětem studia. Poloha genetických markerů se určuje na základě jejich segregace mezi jednotlivými hybridy (Naylor, 1997).

## **Radiační hybridní panely**

Během mapování pomocí radiačních hybridních panelů jsou chromosomy donorového organismu vystaveny radiaci. Následně dojde k fragmentaci chromosomů a poté je provedena fúze získaných fragmentů s neošetřenými buňkami akceptora, během níž dochází k vytvoření hybridních linií buněk akceptorového organismu obsahujících přesně definovanou část chromosomů donora. Výhodou tohoto mapování je možnost lokalizace i nepolymorfních markerů (Ostrander et al., 2001).

První celogenomový radiační hybridní panel u psů nesl označení RHDF5000 (Vignaux et al., 1999a; Vignaux et al., 1999b) k jehož sestavení bylo použito fúze psích fibroblastů a akceptorových buněk křečka. Výsledkem pak bylo 126 linií buněk s průměrnou retenční frekvencí 21% a rozlišovací schopností 600 kb. Uvedený panel byl použit k sestavení první RH-mapy psího genomu zahrnující 218 genů a 182 mikrosatelitů (Priat et al., 1998).

## **2.3 Metody izolace a analýzy DNA**

### **2.3.1 Izolace DNA**

Během izolace DNA se musí brát v úvahu podobnost s ostatními biopolymery, a proto jsou vybírány metody s vysokou selektivitou, časově nenáročné a z ekonomického hlediska výhodné. Pro vzorky obsahující malé množství DNA, jsou sestaveny velmi citlivé metody. Je rovněž potřeba počítat s nestabilitou DNA a zachovat takové podmínky, aby co nejvíce odpovídaly fyziologickým hodnotám a nedocházelo k degradaci molekul (především pH a teploty) (Anzenbacher a Kovář 1986).

## **Izolace CTAB (cetyltrimetylamoniombromid)**

Izolace CTAB slouží k extrakci většího množství DNA pro účely standardizace metod a pro účely AFLP analýzy. Tato metoda je založena na schopnosti CTAB vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který se při vysoké koncentraci solí rozpouští (0,7 M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45 M NaCl) vytváří sraženiny. CTAB současně působí jako detergentní činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Další modifikací této izolace je přidání CTAB-PVP. Přidání PVP odstraňuje kontaminanty a umožňuje tak získání čisté a kvalitnější DNA (Williams et al., 1992; Borges, 2009; Murray and Thompson, 1980).

## **SDS - PAGE**

Tato metoda probíhá za přítomnosti dodecyl sulfátu sodného na polyakrylamidovém gelu. Jde o velice dobře reprodukovatelnou a vhodnou metodu pro tvorbu proteinových profilů. Metoda pracuje na principu oddělování proteinů na jejich odlišné relativní molekulové hmotnosti, která je zjišťována z mobility bílkovin na polyakrylamidovém gelu.

SDS-PAGE se dříve vyznačovala dvěma podstatnými charakteristickými rysy:

- 1) Velikost póru v gelu bylo možno upravovat tak, jak bylo potřeba, tedy jak velké ionty bylo nutné izolovat.
- 2) Analyzované ionty byly před začátkem oddělení soustředěné do úzké startovací zóny. (Ornstein, 1964)

Metoda byla následně vylepšena a začala se používat pro frakcionaci bílkovin a dále bylo zavedeno použití Tris - glycinových pufrů (Laemmli, 1970). Metodu dále vylepšili Schäfer a von Jagow (1987).

Dodecyl sulfát sodný působí jako denaturační činidlo a rozděluje naprostou většinu nekovalentních vazeb v proteinech. Aniont SDS je vázán na základní řetězec polypeptidu (jedna molekula SDS na dvě aminokyseliny). Komplex denaturovaného proteinu s SDS získá záporný náboj a na gelu migruje k anodě (Gorg et al., 2004).

## **2.3.2 Extrakce DNA**

### **Fenol-chloroformová extrakce**

Při fenol-chloroformové extrakci dochází k denaturaci proteinů a ty je možné oddělit od DNA rozpuštěné ve vodném prostředí. V extrakčním pufru je přítomna proteináza K a SDS (dodecyl sulfát sodný), aby došlo k rozrušení buněčné stěny a proteinů chránících nukleotidová vlákna v chromozomech. Extrakce zahrnuje přidání směsi fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu. Chloroform se nemísí s vodným roztokem, jež obsahuje DNA, ale při protřepání sráží proteiny, které jsou přítomny ve vodné složce. Po centrifugaci se na rozhraní těchto dvou částí objeví bílý prstenec sražených proteinů. Horní vrstva s obsahem DNA je opatrně přenesena do nové zkumavky k další analýze. Tento typ metody je také z časového hlediska náročnější (Köchler et al. 2005).

### **Extrakce chelexem**

Chelex je speciální chelatující činidlo, vázající ionty hořčíku a může být přidána přímo do zkumavky se vzorkem DNA. Tím, že dojde k navázání hořčíku, inaktivuje Chelex různé nukleázy, které mohou poškodit DNA. Většinou je přidávána 5% suspenze Chelexu a DNA je po několik minut denaturována. Po centrifugaci je odebrán supernatant s DNA, zatímco Chelex spolu s nečistotami a denaturované proteiny zůstávají při dně. Výhodou je, že po izolaci se může rovnou postoupit k PCR (Walsh et al. 1991).

### **Adsorbce na silikát**

V dnešní době je zejména používaná metoda extrakce DNA pomocí silikátu. Nejčastěji jsou používány např. QIAamp DNA Mini Kit. Metoda je založena na tom, že v prostředí chaotropních solí se DNA adsorbuje na silikátové částice. Nečistoty a případné inhibitory, které zůstanou v roztoku lze pak jednoduše odstranit. Částice s adsorbovanou DNA se nechají usadit (lze urychlit centrifugací) a pak se supernatant obsahující nežádoucí látky odsaje a promyjeme novou dávkou pufru s chaotropními solemi. Po opětovném odstředění a odsátí zůstává na částicích čistá DNA. Tu lze snadno uvolnit přidáním vody nebo vhodného pufru, který neobsahuje chaotropní soli. Po odstředění zůstanou na dně jen samotné částice, nad nimi je čistý roztok DNA (Greenspoon et al. 1998).

## Vsolování a vysolování

Metoda vsolování a vysolování je založena na změně rozpustnosti molekul DNA v závislosti na změně koncentrace iontů v roztoku. S rostoucí koncentrací iontů rozpustnost zpočátku roste (DNA se do roztoku vsoluje) a po dosažení maxima rozpustnost molekuly klesá (DNA z roztoku vysoluje) (Anzenbacher a Kovář 1986).

### 2.3.3 Analýzy DNA

#### PCR (polymerase chain reaction - polymerázová řetězová reakce)

PCR byla objevena v roce 1986 Karlem Mullisem. Jde o enzymatický proces, během kterého dochází k replikaci určité části sekvence DNA a neustále se amplifikuje (Mullis et al. 1986). Tento proces vyžaduje okolo 30 cyklů, kde dochází k zahřívání a ochlazování vzorků. Během tohoto procesu se střídají tři různé teploty 25 – 35 krát. Nejdůležitější součástí jsou polymeráza (Taq polymeráza pocházející z bakterie *Thermus aquaticus*) a templát. Dále chlorid hořečnatý, KCl, pufr, deoxynukleotid trifosfát (dNTPs), sérový albumin a voda. PCR je složeno z několika kroků:

1. **Denaturace** (DNA je zahřívána na teplotu 94–98 °C, dochází k rozvolnění dvoušroubovice a vzniká tak jednovláknová DNA, na kterou poté nasedají primery).
2. **Nasednutí primerů** (při teplotě 50 – 65 °C nasedají primery na specifická místa DNA).
3. **Prodlužování primerů** (při teplotě 72 °C (pro Taq polymerázu) dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru od 5' konce k 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA (Kumar and Gurusubramanian, 2011, Mullis et al. 1986).

#### RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

RAPD je metoda založená na metodě PCR, při které se používají velmi krátké náhodné primery a nízké teploty nasedání. Do směsi pro PCR se přidává jen jeden primer, který má díky své malé délce řadu komplementárních míst na různých místech genomu. S velkou pravděpodobností se pak stane, že dva primery nasednou na komplementární vlákna DNA poměrně blízko sebe a takto označený fragment se namnoží při PCR. Obvykle se při jedné PCR takových dvojic najde více a vzniká



směs fragmentů o různé délce, které lze elektroforeticky analyzovat (běžně se používají horizontální agarózové gely).

Bohužel, RAPD metoda má některé problematické vlastnosti. Má nízkou opakovatelnost, je velmi citlivá i na sebemenší změny i na nepatrné kontaminace. Dalším problémem je taktéž dominance fragmentů, které neumožňují rozlišení heterozygotů od dominantních homozygotů. I přes tyto nevýhody je metoda úspěšně používána nejen při druhových identifikacích, ale i při populačních studiích nebo analýze paternity. Značnou výhodou je její univerzální využití, nízká cena a poměrně jednoduché technické vybavení (Kumar and Gurusubramanian, 2011).

### **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) je označení pro jev, při němž se po rozštěpení několika vzorků DNA od různých jedinců pomocí zvláštních enzymů (restrikčních endonukleáz) projeví rozdíly v délce takto vzniklých DNA restrikčních fragmentů. Tyto rozdíly jsou způsobeny odchylkami sekvencí DNA, které obsahují rozpoznávací řetězec nukleotidů pro restrikční endonukleázy a může tak dojít ke štěpení DNA, anebo restrikční místo neobsahují a ke štěpení nedojde.

RFLP má praktické využití v postupech zjišťujících genetické rozdíly mezi jedinci jednoho druhu. Konkrétně je využíváno k prenatálním testům na srpkovitou anémii (Rasmussen, 2012).

### **AFLP (amplified fragment length polymorphisms)**

AFLP je metoda využívající kombinace restrikčního štěpení a PCR. Výhodou je, že rychle vygeneruje velké množství polymorfních markerů bez nutnosti znalosti genomu studovaného organismu. Na rozdíl od RAPD vyniká vysokou mírou opakovatelnosti a nevýhodou oproti RAPD je vyšší cena a technická náročnost (Vos and Kuiper, 1997)

### **Sekvenční analýza**

Sekvenční analýza stanovuje primární strukturu DNA, tj. přesné pořadí jednotlivých nukleotidů (Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin) (Klug et al., 2006). Znalost přesného pořadí jednotlivých nukleotidů se využívá v mnoha oborech, jako jsou medicínská diagnostika některých chorob nebo vrozených vad, forenzní biologie

(forenzní antropologie, odontologie...) a v neposlední řadě biologická klasifikace a biotechnologie. Sekvenační analýza mitochondriální DNA (mtDNA) je důležitým nástrojem forenzních genetiků vhodným pro identifikaci lidských pozůstatků např. při hromadných neštěstích, při nálezů masových hrobů nebo v případech degradované DNA (Butler, 2005).

### **2.3.4 Separace DNA**

#### **Kapilární elektroforéza**

Elektroforéza je rozdíl pohybu nabitých částic (iontů) v elektrickém poli. Umístěním směsi proteinů do zkumavky se základním elektrolytem (background electrolyte, BGE) a použitím elektrického pole bylo zjištěno, že jednotlivé komponenty vzorku migrují určitou rychlostí. Tato rychlost je dána jejich nábojem a mobilitou. Účinnost separace ve vodném roztoku je redukována tepelnou difuzí a konvekcí (šířením tepla), proto byla klasická elektroforéza převedena na nekonvekční média, jako jsou např. polyakrylamidový gel (PAGE) nebo agarozový gel. Gely na desce nebo v podobě trubic jsou používány zejména pro separaci biologických makromolekul (nukleové kyseliny a proteiny). Nevýhodami jsou např. příliš dlouhá separace, nízká účinnost nebo obtížnost detekce. Jinou variantou je separace v úzkých otevřených trubicích nebo kapilárách. Tyto kapiláry mají nízkou vodivost a produkují jen malé množství tepla. Elektroforéza v otevřených trubicích byla poprvé popsána roku 1967 Hjerténem. Tehdy byly k dispozici pouze milimetrové kapiláry, proto je Hjertén začal otáčet podélně kolem jejich osy, aby minimalizoval účinky konvekce. V poslední době se kapilární elektroforéza vyvinula natolik, že má zastoupení nejen v laboratořích, ale i při mnoha dalších praktických aplikacích v různých oblastech (ve farmaceutických, forenzních, klinických, potravinářských, chemických a biochemických analýzách) (Lauer, 2010).

#### **Čipová elektroforéza**

Roku 1992 byla kolektivem Harrisona poprvé představena kapilární elektroforéza v mikrofluidním formátu na čipu (micro-chip based capillary electrophoresis, MCE) (mikrofluidním formátem je označena manipulace s tekutinami v mikrokanálech o rozměru 10 – 100  $\mu\text{m}$ ). Odvod tepla v rámci čipu je mnohem výhodnější než v rámci kapiláry, avšak stále se jedná o ten samý materiál. Kanálek, v němž probíhá separace je kratší a může být upotřebena vyšší intenzita

elektrického pole, a tím se celá separace urychlí. Další výhodou je nízká spotřeba vzorku a dalších potřebných chemikálií. Elektroforéza je tak stále nejvýznamnějším zdrojem separace na mikrofluidních čipech. Za prvé, podstatnou částí elektroforézy je elektrické pole aplikované prostřednictvím kontaktu elektrod s elektrolytem bez použití vysokého tlaku jako je třeba v případě chromatografie. Za druhé, v některých modifikacích elektroforézy (CZE, MEKC, IEF), je separační účinnost dána velikostí napětí. Při elektroforéze na čipu je možno dosáhnout vysoké účinnosti při aplikaci vysokého napětí, i přestože je separační kanál krátký. Obecně tedy platí, že toto vše vede ke zjednodušení obsluhy mikrofluidní čipové elektroforézy, snížení ceny čipu a k jeho miniaturizaci a zvýšení mobility (Wu et al., 2008).

Většina mikročipů byla vyrobena ze skla nebo křemene pomocí fotolitografie, mokrým leptáním nebo tepelným lepením. Přesto je jejich využití omezeno z důvodu vysokých nákladů, škodlivých a komplikovaných postupů výroby a geometrických modifikací kanálů na čipu. Proto se polymery stávají nejslibnějšími materiály pro výrobu čipů. Polydimethylsiloxan (PDMS) a polymethylmethakrylát (PMMA) se staly nejvíce využívanými polymery pro výrobu čipů. Jsou levné, lehce se vyrábí a mají vynikající optickou transparentnost (Chen et al., 2006).

Čipová elektroforéza získala mnoho výhod v odvětví, jako je monitorování životního prostředí, biomedicínské a farmaceutické analýzy, klinická diagnostika a forenzní vyšetřování (Chen et al., 2006). Existuje mnoho modifikací elektroforézy např. kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), izoelektrická fokusace (IEF) a kapilární gelová elektroforéza (CGE). Toto jsou metody, které jsou nejčastěji využívané módy kapilární elektroforézy a byly převedeny do mikrofluidního čipového formátu (Feng et al., 2009).

### **Fragmentační analýza**

Zabývá se fragmenty DNA k následnému využití identifikace jedince, zjištění příbuzenských vztahů a k určení paternity. DNA fragmenty jsou fluorescenčně označeny během PCR pomocí specifických primerů a fluorescenčních barev. Délka těchto fragmentů je porovnávána s vnitřním standardem (Internal Size Standard), což je soubor fragmentů o známé délce značený odlišnou fluorescenční barvou, který se

analyzuje společně se vzorkem testované DNA. Intenzita signálu (fluorescence) je znázorněna výškou píků (Butler, 2005).

## **2.4 Nejčastější genetické testy u psů**

### **2.4.1 Metoda kandidátních genů**

Metoda kandidátních genů je využívána tehdy, nejsou-li vhodné rodiny zvířat nebo jsou neúplné. Výhodou je možnost provádění na několika postižených a zdravých jedincích (Lin et al., 2002). Kandidátní geny jsou vybírány s ohledem na známé asociace orthologních genů s obdobnými dědičnými onemocněními u ostatních organismů, na základě fyziologické funkce jejich exprimovaných produktů či jako poziční kandidátní geny z chromosomových oblastí identifikovaných vazbovou analýzou nebo analýzou vazbové nerovnováhy (Greer et al., 2003; Goddard, 2003).

### **2.4.2 Vazbová analýza**

Pro určitá onemocnění s obtížnou etiologií je vhodné využít vazbové analýzy. Výhodou metody je minimální heterogenita genetických příčin onemocnění u psů, která jsou způsobena nízkou genetickou variabilitou uvnitř plemen (Greer et al., 2003). Principem je nalezení vztahu mezi alelami markeru a alelami neznámého příčinného genu v určité rodině (Goddard, 2003), jenž vychází z páření dvou heterozygotních jedinců (přenašečů) nebo heterozygotního a postiženého jedince (Hyun et al., 2003).

### **2.4.3. Analýza vazbové nerovnováhy**

Cílem analýzy vazbové nerovnováhy je určit vazbu mezi alelami markeru a příčinného genu. Děje se tak na základě detekované společné segregace příslušných alel markeru a genu, jenž se vyskytuje častěji, než by se dalo předpokládat při platnosti pravidla volné kombinovatelnosti. Tento stav je označován jako vazebná nerovnováha, kterou lze očekávat v populacích založených na společném předkovi (Greer et al., 2003; Goddard, 2003). Metoda je použitelná i v případě, kdy není k dispozici rodina odvozená od heterozygotního zakladatele (Hyun et al., 2003).

#### **2.4.4. Genetické testy**

Hlavním cílem výzkumu dědičných chorob psů je odhalení mutací, která jsou původcem onemocnění a vyvinout takovou metodu, pomocí které by bylo možno provádět rutinní testování. V podstatě jsou rozlišovány dva druhy DNA genetických testů: vazbové a mutační (Patterson, 2000).

##### **Vazbové genetické testy**

Vazbové genetické testy jsou využívány tehdy, kdy nebyla kausální mutace dosud identifikována. K odhadu genotypu neznámého genu, jenž je příčinou je využíváno markerů, které jsou s ním v genetické vazbě. Nezbytnou podmínkou je, aby vazbové markery vykazovaly v populaci či sledované rodině dostatečnou míru polymorfismu a bylo možno vysledovat mutantní alely mezi generacemi. Nevýhodou je časová a finanční nákladnost a naopak výhodou je použitelnost u více plemen (Patterson, 2000).

##### **Mutační genetické testy**

Mutační genetické testy přímo detekují mutaci v sekvenci DNA, o které je známo, že podmiňuje vznik konkrétního onemocnění. Výhodou je přesnost a nevýhodou je, že v případě onemocnění postihujících více plemen, není test univerzálně použitelný, protože molekulárně-genetický základ onemocnění je u jednotlivých plemen odlišný (Patterson, 2000). Mutačními genetickými testy lze určit např. predispozici k retinální dystrofii u plemene briard, která je způsobena delecí 4 bp v genu RPE65 (Veske et al., 1999).

### **2.5 Ověřování parentity a paternity**

#### **2.5.1 Ověřování pomocí krevních skupin**

Krevní skupiny se k ověřování začaly používat v 60. letech 20. století. Nevýhodou krevních skupin u psů pro ověření původu je náročné testování a příprava specifických reagentů. Mimo to systémy krevních skupin psů nejsou uzavřené, to znamená, že fenotypické vyjádření např. homozygota  $D^aD^a$  je stejné jako vyjádření heterozygota  $D^aD^r$ . Tato skutečnost dovoluje jen velmi omezené využití krevních skupin u psů pro ověřování původu (Dostál, 1995).

### **2.5.2 Ověřování pomocí biochemických polymorfních znaků**

K praktickému využití pro ověřování parentity a paternity jsou vhodné jen ty polymorfní znaky, u nichž jsou alely v kodominantním genetickém vztahu, jejich fenotyp se nemění během života jedince a dají se snadno testovat bez ohrožení životních funkcí jedince. Pro ověřování se tedy nehodí genetické znaky testované ve tkáních vnitřních orgánů těla psa a nevhodné jsou také genetické znaky mléka, semenné plazmy, případně dalších tekutin, které jsou produktem pouze jednoho pohlaví. Pro ověřování se nevyužívá hemoglobin. Mohou být ale snadno využity následující systémy polymorfních znaků: albumin, kyselá fosfatáza, leucinaminopeptidáza, tetrazolium oxidáza, transferin. Jejich vhodnost se však poněkud mění podle plemene a podle individuálních podmínek každého případu. Proto nelze při ověřování parentity žádný z uvedených znaků vynechat. Z dalších známých polymorfních systémů mohou být perspektivně využity ještě peptidáza D (Pep D) a glukózofosfátizomeráza (GPI) (Dostál, 1995).

### **2.5.3 Ověřování pomocí mikrosatelitů**

Vyšetření založené na mikrosatelitech je relativně jednoduché a levné, široce se využívá ve vazebných, asociačních a populačních studiích, pro DNA diagnostiku i pro forenzní účely. Polymorfismus mikrosatelitů může být rychle a spolehlivě testován pomocí nejrůznějších metod založených na analýze DNA. Ke genetické identifikaci a následnému ověřování rodičovství se vybírají mikrosatelity s délkou 70–360 bp. Dva nepříbuzní jedinci mohou mít v genetické výbavě úseky o stejné délce. Proto je nutné k ověření rodičovství prověřit několik mikrosatelitních oblastí (obvykle 10–12), aby se zvýšila pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče. Frekvence výskytu mikrosatelitů o stejné délce je samozřejmě vyšší v rámci plemene a velice vysoká při úzké příbuzenské plemenitbě (Schröffelová, 2001).

### **2.5.4 Ověřování pomocí SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)**

Základem je změna v DNA, která vzniká delecí (ztrátou), substitucí (záměnou) nebo inzercí (vložením) nukleotidu. Přesněji, SNP se objevuje, je-li jeden nukleotid např. adenin (A) nahrazen jiným např. thyminem (T), cytosinem (C) nebo guaninem (G). Důležité je, že jeden nukleotid znamená ve

skutečnosti 1 pár bází v DNA, tudíž jeli A nahrazeno C, musí být v komplementárním řetězci T nahrazen G. Tyto záměny se vyskytují v kódujících i nekódujících oblastech savčího genomu s četností přibližně 1 SNP na 50 – 500bp. SNPs u psů je v současnosti pouze ve fázi výzkumu. U některých zvířat (myši, masný a mléčný skot) byly sestaveny jednotlivé panely SNPs. Např. panel pro masný skot je sestaven z 32 lokusů. Při pokusech bylo zjištěno, že pravděpodobnost vyloučení náhodně vybraného kandidátního otce je 99,4 % pro čistokrevnou populaci plemene Aberdeen Angus a 99,9 % pro populaci z více plemen (Heaton et al., 2002).

## **2.6 Nejčastěji analyzovaná genetická onemocnění**

Cílem chovů čistokrevných plemen je dosáhnout co nejlepšího standardu a dokonalého exteriéru, jež je posuzován na výstavách a eliminovat dědičná onemocnění, která zasahují především oči a pohybový aparát, ale i další znaky. Dále dochází také k eliminaci a výběru zbarvení srsti. Aktuální přehled dědičných chorob psů lze získat na webových stránkách *Inherited Diseases in Dogs* (<http://www.vet.cam.ac.uk/idid/>). Dalšími zdroji, kde lze najít informace o dědičných onemocnění jsou *OMIA Database - Online Mendelian Inheritance in Animals* (<http://omia.angis.org.au/home/>) a *CIDD - Canine Inherited Disorders Database* (<http://ic.upei.ca/cidd/>).

Na stránkách <http://www.genomia.cz/cz/veterinari/psi/> lze najít seznam nemocí psů, jež jsou testovány.

### **2.6.1 Dědičná onemocnění oka**

#### **Progresivní retinální atrofie (PRA)**

PRA představuje skupinu dědičných onemocnění sítnice psů postihující fotoreceptory a retinální epiteliální pigment popř. obojí. PRA je možno rozdělit do dvou kategorií:

1. **Centrální progresivní retinální atrofie (CPRA)** (postihuje především retinální epiteliální pigment, nemusí vést k oslepnutí). V současnosti je označení CPRA nahrazováno označením dystrofie retinálního epiteliálního pigmentu (RPED).

2. **Generalizované progresivní retinální atrofie (gPRA)** (zasahuje především fotoreceptory, v konečném stádiu způsobuje oslepnutí). (Narfström et Ekesten, 1999).

**gPRA** lze dále rozdělit na:

- a) **časné formy** (např. degenerace tyčinek a čípků typu 1 a 2 (rcd-1, rcd-2), dysplasie tyčinek, časná degenerace sítnice (ERD))
- b) **střední formy** (pohlavně vázaná gPRA (XLPRa) u sibiřských husky, PRA u tibetských terierů a dlouhosrstých trpasličích jezevčků)
- c) **pozdní formy** (progresivní degenerace tyčinek a čípků (PRCD) (Petersen – Jones, 1998))

Hlavním příznakem většiny PRA je nyktalopie (zhoršené vidění za šera a v noci), která je postupně doprovázena hemeralopií (snížené vidění za denního světla) až do úplného oslepnutí zvířete. Při oftalmoskopickém vyšetření je možno pozorovat zeslabení neuroretiny, degeneraci axonů gangliových buněk, zeslabení povrchových cév sítnice spojené s omezením krevního zásobení a depigmentaci netapetální části fundu. Častým jevem je také atrofie těla optického nervu a zpomalení pupilárního reflexu. Před nástupem vlastních oftalmologických změn je možno některé typy gPRA diagnostikovat na základě změny elektroretinogramu (ERG) při světelné stimulaci sítnice (Petersen – Jones, 1998).

### **Progresivní degenerace tyčinek a čípků (PRCD)**

PRCD je autosomálně recesivní onemocnění sítnice, jenž je řazeno mezi generalizované progresivní retinální atrofie s pozdním nástupem (Petersen – Jones, 1998). Postupný rozvoj onemocnění vede ke ztenčení sítnice, zeslabení cév a atrofii optického nervu. Typickým klinickým příznakem pokročilého onemocnění je nyktalopie, která se u postižených jedinců objevuje ve věku 3-5 let (Aguirre et Acland, 1988).

### **Anomálie oka kolií (CEA - Collie Eye Anomaly)**

CEA vyvolává defekt zadní stěny oční koule. Příznaky se mohou značně lišit jak v rámci plemene, tak mezi rodiči, potomkem a sourozenci ve vrhu (Dostál et al., 2010). U CEA dochází k abnormálnímu vývoji cévnatky v sítnici oka (Yakely et al.,



1968). Onemocnění se projevuje už v raném věku a je nevyléčitelné (Chmelíková et al., 2006).

Střední forma CEA je patrná už ve věku 5 – 8 týdnů, kdy dochází k poškození cévnatky. Krevní kapiláry v cévnatce jsou špatně vyvinuté a může dojít k úbytku pigmentu a následně ke vzniku tzv. hypoplazie cévnatky (bledá a ztenčená). Ve 3 měsících dochází k jevu „go normal“, kdy dochází k zabarvení sítnice a pigment občas změny na cévnatce ukryje. Psi postižení střední formou CEA běžně neoslepou, ale jejich potomci mohou zdědit těžkou formu CEA (Chmelíková et al., 2006).

Těžká forma postihuje asi 25 % psů. Poškození oka je na první pohled vážné. Cévy v cévnatce jsou zkroucené a samotná cévnatka je zprohýbaná. Je zde nárůst abnormálních cév, které praskají a způsobují tak krvácení do oka. Kolobomy a zkroucení cév se s věkem sice nemění, ale krvácení do oka a odchlípení sítnice se více zhoršují (Chmelíková et al., 2006).

### **Primární luxace čočky (PLL – primary lens luxation)**

Čočka v oku je fixována závěsným aparátem. Při jeho poškození dochází k dislokaci čočky z fossa hyaloidea do přední nebo zadní oční komory popř. sklivce. Dislokace čočky může nastat i následkem úrazu. Dědičná forma je způsobena defektní fixací vláken čočky - uvolnění vláken způsobí posunutí čočky a výsledkem je zelený zákal a slepota. Primární luxace čočky postihuje mnoho ras psů, obzvláště teriéry, pudly a knírače (<http://www.genomia.cz/cz/test/pll/>, 2015).

### **Katarakta (šedý zákal)**

Katarakta je porucha průhlednosti čočky. Jedná se častou dědičnou chorobou, vyskytující se u více než 70 plemen psů. V souvislosti s dědičnými formami katarakty je popisováno více způsobů dědičnosti. Většina je zděděna autozomálně recesivně, ale existují i formy s autozomálně dominantní dědičností popř. polygenní dědičností. Hereditární katarakty jsou taktéž označovány jako primární katarakty. Jako sekundární jsou označovány formy šedého zákalu doprovázené např. progresivní retinální atrofií, glaukomem, retinální dysplasií, metabolickými chorobami aj. Katarakty mohou vzniknout i v důsledku poranění oka (traumatická katarakta), popř. v důsledku stáří tzv. senilní katarakta. Katarakty jsou u jednotlivých plemen značně specifické s ohledem na část postižené čočky, věku při začátku

choroby, rychlosti progresu, míry bilaterálního postižení (Mellersh et al. 2006, Mellersh et al. 2007).

### **Dědičná katarakta u stafordšírského bullteriéra (Hereditary Cataract – HC)**

Katarakta je považována za jedno z nejčastějších nitroočních onemocnění a za nejčastější příčinu slepoty psů (Davidson et Nelms, 1999; Helper, 1989; Rubin, 1989; Slatter, 2001). U stafordšírského bullteriéra existují různé druhy katarakty. Ta nejvíce známá se nazývá juvenilní dědičná katarakta (HC-HSF4).

Dědičná katarakta u tohoto plemene byla poprvé zaznamenána ve Velké Británii v roce 1976 (Barnett, 1976). Tato nemoc není vrozená, takže štěňata se rodí s normálníma očima a katarakta se začne objevovat ve stáří několika týdnů až měsíců. Ve věku 2 až 3 let přechází do úplného zákalu a slepoty. Tato katarakta je vždy bilaterální, v obou očích symetrická (Barnett, 1978).

Primární dědičná katarakta byla popsána u 97 různých plemen psů (Davidson et Nelms, 1999; Rubin, 1989).

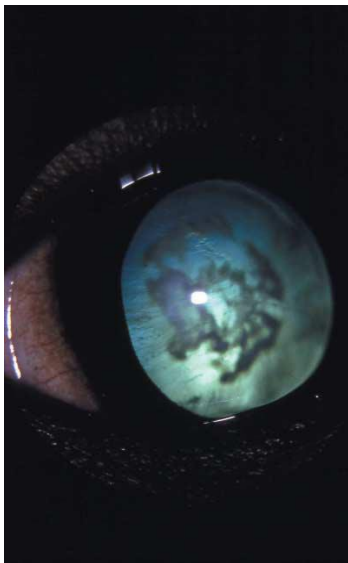
Studium rodokmenů a vyšetření úzce příbuzných jedinců, zejména rodičů a sourozenců, jasně ukazují na jednoduchý, autozomálně recesivní způsob dědičnosti (Barnett, 1978).

Recesivní onemocnění je v psí populaci obtížně sledovatelné, protože asymptomatictí přenašeči mohou být identifikováni až zpětně poté, co se reprodukovali a bylo diagnostikováno nemocí postižené potomstvo (Patterson, 2000).

Vzhledem k dostupnosti psí genomové sekvence od roku 2004 je dnes snadné porovnávat geny, které jsou pravděpodobně spojené s danou nemocí (Lindblad-Toh et al., 2005).

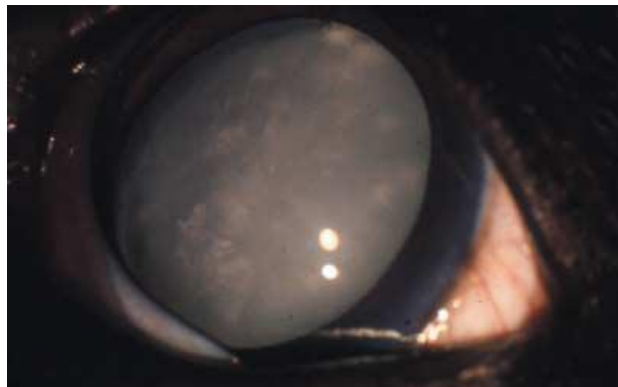
Dědičná katarakta je způsobena mutací v exonu 9 genu HSF4. Jedná se o inzerci jedné báze (Mellersh et al., 2006).

Obrázek 2: Rané stadium katarakty u ročního jedince



(Mellersh et al., 2006)

Obrázek 1: Pokročilá katarakta u tříletého jedince



(Mellersh et al., 2006)

### **Stafordšírský bullteriér**

Plemeno pochází z Anglie. Jako samostatné plemeno je Mezinárodní kynologickou organizací FCI uznán od roku 1935. V klasifikaci dle FCI patří do skupiny teriérů a sekce teriérů typu bull. U nás se chová zhruba od roku 1990. Je to pes střední velikosti s výškou okolo 40 centimetrů. Psi váží průměrně do 18 a feny do 15 kilogramů. Srst má krátkou a vyskytuje se v různých barvách od bílé po hnědou, červenou, zlatou a černou a v různých barevných kombinacích včetně žíhané. V posledních letech toto plemeno získává stále větší popularitu pro svou vyrovnanou povahu a lásku k dětem. Jako jediný pes má ohledně chování a povahy ve svém oficiálním standardu napsáno: „Statečný, nebojácný a naprosto spolehlivý pes“ (Spies, 2005).

Na obrázcích 3 a 4 jsou ilustrační fotografie feny a psa stafordšírského bullteriéra. DNA těchto jedinců bylo použito v mé práci.

Obrázek 3: **Guisseppina Felicity Cheer**



Foto: Barbora Farková, 2014

Obrázek 4: **Dream of Hunter FB**



Foto: Rudolf Slaba, 2014

### 3. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo nalezení nejvhodnější metody odběru vzorku DNA a jednoduché a levné metody izolace DNA, které se běžně nevyužívají pro daný typ izolátů a zhodnocení jejich vhodnosti jako alternativy používání drahých komerčních izolačních kitů. Dalším cílem bylo ověření možnosti používání nově navržených metod odběru vzorku a izolace DNA jako rutinního postupu pro potřeby výzkumu.

Třetím cílem diplomové práce byla PCR analýza získaných vzorků a detekce případných skrytých přenašečů a ověření použitelnosti různých metod elektroforetické separace DNA fragmentů pro detekci hetorezygotů/přenašečů.

Hypotéza č. 1

Stěry bukální sliznice tlamy psa pomocí vatových tyčinek a cytologických kartáčků jsou vhodnou, jednoduchou a levnou metodou pro izolaci a analýzu DNA.

Hypotéza č. 2

Cytologické kartáčky jsou vhodnější pro stěry bukální sliznice.

Hypotéza č. 3

Je možné analyzovat vzorky staré více jak půl roku.

Hypotéza č. 4

DNA získanou stěry bukální sliznice lze izolovat i jinými metodami než dnes běžně využívanými komerčními izolačními kity.

Hypotéza č. 5

Skryté přenašeče lze detekovat gelovou elektroforézou bez nutnosti použití značeného primeru a fragmentační analýzy.

Hypotéza č. 6

Výsledky psů již dříve testovaných se nebudou lišit.

## 4. MATERIÁL A METODIKA

### 4.1. Použitý materiál

Byla použita DNA pouze čistokrevných psů plemene Stafordšírský bullterier.

Vzorky DNA pro analýzu jsem získala osobním odběrem za souhlasu majitele testovaného psa. Většina odběrů z důvodu vzdálenosti proběhla na území jižních Čech.

DNA byla uchovávána v ledničce v podobě bukálních stěrů na vatových tyčinkách, cytologických kartáčcích a v cibulkách čerstvě vytržených chlupů.

Byla použita DNA od 23 psů a fen plemene stafordšírský bullteriér. V případě nutnosti použití čerstvého materiálu se od feny Guiseppina Felicity Cheer odebíral vzorek DNA několikrát. Jednalo se o různé metody izolace DNA, kdy bylo potřeba odebrat chlup s čerstvou chlupovou cibulkou a bukální stěr vatovou tyčinkou.

Pro konečnou analýzu "carrier" jedinců (přenašečů) bylo DNA této feny použito pouze jednou.

Přesný popis a označení vzorků je uveden v následující tabulce (Tab. č. 1). Jelikož se vzorky využívaly v různých analýzách s různým číslováním, lze vzorky vždy přesně určit jen podle jména psa.

Tabulka 1: Seznam vzorků

Metoda odběru	Jméno psa	Odběr
cytobrush	Guiseppina Felicity Cheer	2014 - srpen
cytobrush	Elvis Dark Element	2014 - srpen
cytobrush	Cookki Queen Warriorbull	2014 - srpen
cytobrush	Atila Koubale	2014 - srpen
cytobrush	Mafia	2014 - srpen
cytobrush	Connie Girl Impossant Bohemia	2014 - srpen
cytobrush	Cloe z Hambalek Bušín	2014 - srpen
cytobrush	Shelby Angelo Custode	2014 - srpen

cytobrush	Dream of Hunter FB	2014 - srpen
cytobrush	Debbie ze Zalabské samoty	2014 - srpen
cytobrush	Lovable Babe of Eilatan	2014 - srpen
cytobrush	Zaby Red Warriorbull	2014 - srpen
cytobrush	Chilly Wind Fransimo Bohemia	2014 - srpen
cytobrush	Mascot Slade Czech	2014 - srpen
cytobrush	Amazing Ellisar Black Jewels Bull	2014 - srpen
cytobrush	Abbie Honey Heart	2014 - srpen
cytobrush	Dance Swan Warriorbull	2014 - srpen
cytobrush	Jolly Pastaff Legion	2014 - srpen
cytobrush	Bertone Blitz Volksbull	2014 - srpen
cytobrush	Artie Koubale	2014 - srpen
cytobrush	Glanc of Sama Slody CZ	2014 - srpen
cytobrush	Chilli Pepper Wizardbull	2014 - srpen
cytobrush	Heidy Olstaff	2014 - srpen
vatová tyčinka	Darcy ze Zalabské samoty	2013 - květen
vatová tyčinka	Churchill Walk Heart	2013 - duben
vatová tyčinka	Sára z Brixiho dvora	2013 - duben
vatová tyčinka	Abík Garlin	2013 - duben
vatová tyčinka	Guisseppina Felicity Cheer	2014 - listopad
vatová tyčinka	Guisseppina Felicity Cheer	2014 - listopad
vatová tyčinka	Guisseppina Felicity Cheer	2014 - listopad
vatová tyčinka	Guisseppina Felicity Cheer	2014 - listopad
chlup	Guisseppina Felicity Cheer	2014 - listopad
chlup	Guisseppina Felicity Cheer	2014 - listopad

## 4.2. Odběr materiálu

Pro odběr materiálu byly použity 3 metody:

- stěr bukální sliznice vatovou tyčinkou,
- stěr bukální sliznice cytologickým kartáčkem
- vytržení živého chlupu i s chlupovou cibulkou.

#### **4.2.1. Stěr bukální sliznice vatovou tyčinkou a cytologickým kartáčkem**

Cytologický štěteček/kartáček (tzv. cytobrush nebo gynobrush) se používá na cervikální stěry pro cytologickou analýzu (cervikální screening).

##### Postup odběru:

Odběrová sada obsahuje: cytologický kartáček (cytobrush) nebo vatovou tyčinku a obdélníkovou obálku na uložení kartáčku.

- odebírat min. 30 minut po posledním pití či potravě
- vyjmout opatrně sterilní kartáček (štetinky kartáčku nesmí přijít do kontaktu s jinou tkání než dutinou ústní odebíraného jedince) nebo vatovou tyčinku
- kartáčkem/tyčinkou důkladně stírat vnitřní stranu tváře zvířete po dobu 10 s, měnit směr pohybu stírání (dopředu, dozadu, nahoru dolů), otáčet kartáčkem kolem jeho osy (tyčinku vytřít oboustranně)
- po dokončení stěru - na kartáčku/tyčince zachyceno viditelné množství buněk bukální sliznice
- kartáček/tyčinku nechat několik sekund sterilně oschnout na vzduchu
- kartáček/tyčinku nijak nebalit, ale pouze vložit do přiložené obdélníkové obálky, obálku zalepit
- na obálku čitelně napsat identifikační údaje zvířete a kontakt na majitele
- kojená mláďata před stěrem min. 30 minut bez kontaktu s matkou a ostatními sourozenci z důvodů možné kontaminace cizí DNA

#### **4.2.2. Vytržení několika živých chlupů v ocasní partii psa i s cibulkami**

##### Postup odběru:

- chlupy vytrhávat vydezinfikovanou pinzetou (opálenou nebo otřenou lihem) ze špičky ocasu (tuto partii jsem zvolila z důvodu snadného přístupu a chlupy jsou zde dlouhé s velkými chlupovými cibulkami, což usnadní pozdější manipulaci a je zda dostatek materiálu pro izolaci DNA)
- chlupy vytrhávat po jednom
- zkontrolovat, zda je chlupová cibulka dobře znatelná



- vložit do předem popsané mikrocentrifugační zkumavky

### **4.3. Izolace DNA**

Izolace DNA byla provedena čtyřmi způsoby:

1. Izolace DNA pomocí CTAB-PVP (polyvinylpyrrolidon)
2. Izolace DNA ze stěru bukální sliznice – chloroformová
3. Izolace DNA chelexem
4. Izolace DNA modifikovanou SDS metodou

Tyto čtyři způsoby byly zvoleny z důvodu porovnání metod, z hlediska výtěžnosti DNA, časové náročnosti a nákladnosti izolace v přepočtu na jeden vzorek. Bylo třeba vyizolovat DNA v takovém množství a čistotě, aby šlo vzorky použít pro PCR reakci a elektroforézu.

Tyto způsoby izolace se většinou pro takový druh vzorků nepoužívají, proto byly zvoleny i pro zjištění, jaký typ izolace je pro vzorky DNA ze stěrů bukání sliznice nejvhodnější.

#### **4.3.1. Izolace DNA pomocí CTAB-PVP (polyvinylpyrrolidon), (Borges et al., 2009)**

Tato metoda se využívá zejména pro izolaci DNA z rostlinných pletiv. Slouží k extrakci většího množství poměrně čisté DNA pro účely standardizace metod. Přidání PVP (polyvinylpyrrolidon), odstraňuje kontaminanty a umožňuje získat čisté a kvalitnější DNA.

Analýza je založena na schopnosti CTAB cetyltrimetylamoniombromid vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7 M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45 M NaCl ) vytváří sraženinu (Murray a Thompson, 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA je lze oddělit a získat dostatečně čistou DNA.

### Metodika:

- připravit roztok 2x PVP-CTAB a 1% merkaptoethanol, jeden vzorek 500 $\mu$ l (495 $\mu$ l 2x PVP-CTAB a 5 $\mu$ l 1% merkaptoethanolu ), předehřát na 65 °C
- cytologického kartáček nebo vatovou tyčinku vložit do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky
- ke každému vzorku přidat 500  $\mu$ l předehřátého pufru
- inkubace 45 min při 65 °C, každých cca 15 minut lehce promíchat
- centrifugace 10 min/12 000 rpm
- převést supernatant cca 500  $\mu$ l, do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek
- v digestoři přidat 500  $\mu$ l chloroformu s IAA 24:1, směs 10 min promíchávat, poté centrifugace 5 min/12 000 rpm
- prepipetovat vodnou fázi, přidat 1/5 objemu 5x CTAB, promíchat, opět přidat 500  $\mu$ l směsi chloroformu-IAA 24:1 a 10 min protřepat
- centrifugovat 5 min při maximální rychlosti (14 000 rpm) při laboratorní teplotě
- přepítovat vodnou fázi, přidat 2/3 objemu ledového isopropanolu (přibližně 250  $\mu$ l) a 2-3x lehce promíchat, uložit na 30 min do mrazáku (-20 °C)
- centrifugovat 5 min při 4 °C maximální rychlostí, DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky, odstranit supernatant
- přidat 300 $\mu$ l 1x TE a nechat 30-60 min inkubovat při 37 °C
- přidat 2 objemy (600 $\mu$ l) ledového (z mrazáku) 96% ethanolu, 2-3x lehce promíchat, vzorky uložit do mrazáku (-20 °C) na 2 hodiny
- 10 min centrifugovat/14 000 rpm při 4 °C, DNA by měla vytvořit viditelný pelet, odstranit supernatant
- přidat 1 ml ledového 70% ethanolu, 2-3x lehce promíchat

- centrifugovat 2 min/14 000 rpm při teplotě 4 °C, okamžitě odstranit všechnu supernatant, pro odstranění viditelných nečistot opakovat tento krok 2x
- vzorky nechat dobře vysušit
- podle množství peletu (DNA) přidat 20 µl 1x TE pufru, rozpustit 40 min/37 °C
- izoláty uchovávat v mrazáku

### 4.3.2. Izolace DNA modifikovaná chloroformová

Tato metoda se využívá pro izolaci DNA z masa.

#### Metodika:

#### 1. den

příprava DIGESTION PUFER:

100 mM NaCl

50 mM Tris-HCl

1% SDS

50 mM EDTA, pH = 8

- do mikrozkušavky přenést 1ml destilované vody, vložit cytologický kartáček nebo vatovou tyčinku a nechat 15 min stát, kartáček otřít o stěny mikrozkušavky tak, aby co nejvíce materiálu zůstalo v ní, poté odstranit
- centrifugovat 14 000 rpm/5 min, odstranit supernatant, na dně mikrozkušavky dobře viditelný pelet
- do každé mikrozkušavky (1,5 ml) odměřit 300 µl roztoku dig. pufru + 10 µl proteinázy K (c = 100 µg/ml)
- inkubace 2 hod při 50 °C, následuje inkubace při 37 °C přes noc

#### 2. den

- přidat 300 µl 5 M LiCl, důkladně vortexovat nejméně 1 min, pak přidat 600 µl chloroformu a převrácením promíchávat 30 min
- centrifugovat 15 min/14 000 rpm, popsat nové zkumavky

- viditelné 3 fáze: horní supernatant s DNA, prostřední, někdy méně viditelná, nejslabší s bílkovinami, apod. a nejspodnější vrstva s organickými rozpouštědly
- supernatant (horní vrstva) přendat do nové mikrozkušavky, nenasát kontaminant
- DNA se sráží isopropanolem nebo absolutním EtOH, zkumavku naplnit až pod okraj, ručně krátce protřepat či vertex, DNA se sráží ve formě vláček pozorovatelných pouhým okem – ne vždy jsou vidět
- centrifugovat 5 min/14 000 rpm, odstranit supernatant, ve zkumavce zůstane jen pelet (nemusí být nijak výrazný)
- pročištění – peletu převrstvit cca 200  $\mu$ l 70% etanolem, nenarušit pelet, nepromíchávat, poté opatrně odstranit
- peletu nechat 20 min vysychat
- peletu resuspendovat přes noc ve 100 – 200  $\mu$ l TE pufru v lednici (řídí se velikostí pelety, já dávala 20  $\mu$ l)

#### **4.3.3. Izolace DNA chelexem (Walsh et al., 1991)**

Jedná se o vlastní modifikaci izolace DNA z vlasů.

##### Metodika:

- nahřát termoblok na 56°C
- do mikrozkušavky (1,5 ml) vložit odštipnutý kus cytologického kartáčku se štětinkami, konec vatové tyčinky nebo celý chlup chlupovou cibulkou směrem dolů
- do zkumavky se vzorkem napipetovat 500  $\mu$ l 5 % roztoku chelexu a snažit se ze štětečku získat co nejvíce materiálu
- zvortexovat a stočit
- přidat 2  $\mu$ l Proteinasy K (koncentrace 20 mg/ml)
- zvortexovat
- inkubovat 15-45 min (30 min) při 56 °C

- mezitím nahřát vodní lázeň na 95-100 °C
- po inkubaci zvortexovat 10-15 s
- inkubovat (respektive povařit) 10 min při 95-100°C
- znovu zvortexovat 10-15 s
- vzorky centrifugovat 5 min při maximální rychlosti

#### **4.3.4. Izolace DNA modifikovanou SDS metodou, (Edwards et al., 1991)**

##### Metodika:

- odebraný biologický materiál (vatové tyčinky, cytologické kartáčky, chlupy) homogenizovat ve 100 µl extrakčního pufru v mikrocentrifugační zkumavce
- k homogenátu přidat 300 µl extrakčního pufru a 5 s vortexovat
- extrakt centrifugovat 1 min při 13 000 rpm a 300 µl supernatantu přenést do nové mikrocentrifugační zkumavky
- k supernatantu přidat 300 µl isopropanolu vychlazeného na -20°C a směs nechat 20 min srážet
- centrifugovat 5 min při 13000 rpm
- osušený pelet rozpustit ve 100 µl TE pufru, DNA lze uchovávat krátkodobě ve 4 °C, nebo po delší dobu v -20 °C

##### Složení extrakčního pufru:

- 200mM Tris-HCl (pH = 7,5)
- 250 mM NaCl
- 25 mM EDTA
- 5% SDS

##### TE pufr:

- 10 mM Tris-HCl (pH = 7,5)
- 0,1 mM EDTA

#### 4.4. Měření koncentrace DNA

U izolované DNA je potřeba změřit její koncentraci a čistotu. Bylo použito přístroje BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spektrofotometr od firmy SHIMADZU. Výhodou tohoto přístroje je rychlé, plně automatizované měření a snadné ovládání.

Přístroj měří koncentraci a čistotu DNA na základě detekce různé vlnové délky xenonové výbojky.

Na měření absorbance se dají využít jakékoliv molekuly absorbující světlo na specifické vlnové délce. Pro přesné výsledky je třeba použít co nejčistější vzorky nukleových kyselin.

Všechny nukleotidy, RNA, ssDNA a dsDNA absorbují při 260 nm.

2 hodnoty pro posouzení čistoty nukleové kyseliny:

- 260/280

Poměr absorbance při 260 nm a 280 nm se používá pro posouzení čistoty DNA a RNA. Poměr  $\sim 1,8$  je všeobecně přijímán jako „čistý“ pro DNA; poměr  $2,0 \sim$  je obecně přijímán jako "čistý" pro RNA.

Pokud je poměr znatelně nižší, může to znamenat přítomnost proteinu nebo jiné nečistoty, která silně absorbuje na nebo v blízkosti vlnové délky 280 nm.

- 260/230

Tento poměr se používá jako druhotné měření čistoty nukleové kyseliny. Poměr hodnoty 260/230 pro "čisté" nukleové kyseliny je často vyšší než příslušné hodnoty 260/280. Očekávané 260/230 hodnoty jsou obvykle v rozmezí 2,0 až 2,2. Je-li tento poměr výrazně nižší, může to znamenat přítomnost kontaminujících látek, které absorbují při vlnové délce 230 nm (například EDTA, sacharidy, fenoly, guanidine HCl), (NanoDropShimadzu, 2007).

##### Postup:

- napipetovat 2  $\mu$ l slepého vzorku, dle pufru, ve kterém je DNA resuspendována (1x TE pufr nebo milli q voda)

- postupně nanášet 2  $\mu\text{l}$  jednotlivých vzorků DNA (před nanášením je potřeba lehce promíchat, před samotným měřením v programu vzorek popsat)

Přístroj sám změří koncentraci a čistotu.

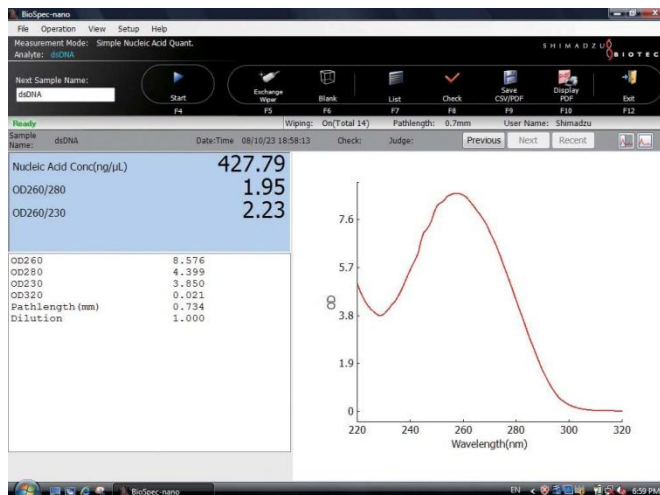
Výsledkem je přehledná tabulka, kterou lze uložit ve formátu PDF.

Obrázek 5: Ukázka aplikace



([https://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=biospec\\_nano](https://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=biospec_nano), 2015)

Obrázek 6: Ukázka grafického znázornění měření v počítačovém programu



(<http://www.bergman.no/getfile.php/Bilder/Artikelbilder/Shimadzu/C101E112%20BioSpec%20nano%20Chromato0012.jpg>, 2015)

## 4.5. Přečištění DNA

Pro další analýzy byla vybrána izolace chelexem, protože poskytovala největší výtěžnost DNA. Ale po zkušebních PCR reakcích i přes vysokou

koncentraci DNA se nedostavily uspokojivé výsledky. Jelikož byla po změření na přístroji SHIMADZU BioSpec-nano spektrofotometru vysoká koncentrace DNA ale horší čistota, byla zvolena jako možnost následné přečištění již vyizolovaného materiálu. Vzorek se tak zbaví i znečišťujících kuliček chelexu, které také mohou narušovat PCR reakci.

#### Metodika:

Chemikálie: Octan sodný (3 M), Ethanol – 96%, 70%, TE pufr

- vzorek DNA centrifugovat na 14 000 rpm/5 min
- do mikrocentrifugační zkumavky napipetovat: 20 µl roztoku DNA  
2 µl NaAc  
50 µl EtOH 96%
- promíchat, nechat stát při laboratorní teplotě 15 min
- centrifugovat 13 000 rpm/30 min
- opatrně odstranit supernatant, precipát není vidět
- přidat 250 µl EtOH 70%, promíchat, centrifugovat 13 000 rpm/15 min
- opatrně odstranit EtOH
- přidat 250 µl EtOH 70%, promíchat, centrifugovat 13 000 rpm/15 min
- dokonale stáhnout EtOH, úplně vysušit
- přidat 20 µl TE pufru

## **4.6. PCR reakce**

Pro optimalizaci bylo provedeno 6 rozdílných PCR reakcí:

1. Zkušební PCR pro ověření použitelnosti izolátů z různých metod (PRCD Progressive rod-cone degeneration)
2. PCR pro zjištění optimální teploty primerů (HC Hereditary Cataract, gen HSF4)
3. PCR pro další analýzu a detekci carrier jedinců
4. PCR vzorků carrier jedince a zdravého s použitím různého množství DNA



5. PCR s použitím prodlouženého a značeného primeru

6. PCR s použitím značeného primeru

Všechny reakce probíhaly v termocycleru XP cycler od firmy BIOER a byly použity primery firmy IDT® INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES.

Celkové množství 1 reakce u všech druhů PCR 25 µl.

Pro PCR č. 3, 4, 5, 6 byl stanoven teplotní profil uvedený v tabulce č. 2, pro PCR 1-2 je teplotní profil uveden u popisu příslušné PCR reakce.

Tabulka 2: Teplotní profil PCR reakcí s použitím primerů HSF4

	teplota °C	čas
počáteční denaturace	95	10 min
denaturace	95	30 s
annealing	59	30 s
extenze	72	1 min
finální extenze	72	10 min
	4	∞

32 cyklů

Pro PCR reakce č. 1, 2, 3, 4 a 6 se do reakční směsi používal Master Mix od firmy Top Bio s.r.o.

Složení Master Mixu od firmy Top Bio s.r.o.:

- 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 0,02% Tween 20
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>

- 400  $\mu$ M dATP
- 400  $\mu$ M dCTP
- 400  $\mu$ M dGTP
- 400  $\mu$ M dTTP
- 100 U/ml Taq-Purple DNA polymerázy
- stabilizátory a aditiva

Pro PCR č. 5 byl použit Master Mix od firmy New England BioLabs Inc.

Složení Master Mixu

- 20 mM Tris-HCl
- 22 mM KCl
- 22 mM NH<sub>4</sub>Cl
- 1.8 mM MgCl<sub>2</sub>
- 5% Glycerol
- 0.06% IGEPAL® CA-630
- 0.05% Tween® 20
- 0.2 mM dNTPs
- 1X Xylene Cyanol
- 1X Tartrazine
- 25 units/ml OneTaq® DNA Polymerase
- pH 8.9 (<https://www.neb.com/products/m0486-onetaq-quick-load-2x-master-mix-with-standard-buffer>, 2015)

#### 4.6.1. Zkušební PCR reakce pro ověření použitelnosti vzorků z různých metod izolace, optimalizovaná (Dostál et al., 2011)

**Použité vzorky:** stěr bukalní sliznice cytologickým kartáčkem, vatovou tyčinkou, chlupy

**Izolace:** CTAB-PVP (polyvinylpyrrolidon), chloroformová, chelexem, modifikovanou SDS metodou

##### Složení reakční směsi

- 12,5 µl 2x PPP Master Mix (firma TopBio)
- 9,5 µl PCR H<sub>2</sub>O
- 1 µl primer PRCDf
- 1 µl primer PRCDr
- 1 µl DNA

Tabulka 3: Teplotní profil

	teplota °C	čas
počáteční denaturace	94	1 min
denaturace	94	15 s
annealing	58	15 s
extenze	72	1 min
finální extenze	72	7 min
	4	∞

30 cyklů

##### Použité primery:

F: 5' - CCA GTG GCA GCA GGA ACC -3'

R: 5' - CCG ACC TGC TGC CCA CGA CTG -3'

#### 4.6.2. PCR reakce pro zjištění optimální teploty pro primery (HC Hereditary Cataract, gen HSF4)

Při této PCR reakci se zkouší teplotní profil tzv. teplotní gradient od 55-65°C a zjišťuje se ideální teplota pro nasedání primerů.

**Použité vzorky:** stěr bukalní sliznice cytologickým kartáčkem a vatovou tyčinkou

**Izolace:** Chelex

**Složení reakční směsi:**

- 12,5 µl 2x PPP Master Mix (firma TopBio)
- 10,5 µl PCR H<sub>2</sub>O
- 0,5 µl primer HSF4f
- 0,5 µl primer HSF4r
- 1 µl DNA

Tabulka 4: Teplotní profil

	teplota °C	čas
počáteční denaturace	95	10 min
denaturace	95	30 s
annealing	55-65	30 s
extenze	72	1 min
finální extenze	72	10 min
	4	∞

32 cyklů

**Použité primery:**

HSF4f: 5' - CGA GTG TGA CTT CTG CGT GA -3'

HSF4r: 5' - GTT CAG GCT GTT GGG CAT T -3'

### 4.6.3. PCR pro další analýzu a detekci carrier jedinců

**Použité vzorky:** stěr bukální sliznice cytologickým kartáčkem

**Izolace:** Chelex + přečištění

**Složení reakční směsi:**

- 12,5 µl 2x PPP Master Mix (firma TopBio)
- 10,5 µl PCR H<sub>2</sub>O
- 0,5 µl primer HSF4f
- 0,5 µl primer HSF4r
- 1 µl DNA

**Použité primery:**

HSF4f: 5'- CGA GTG TGA CTT CTG CGT GA -3'

HSF4r: 5'- GTT CAG GCT GTT GGG CAT T -3'

### 4.6.4. PCR vzorků carrier jedince a zdravého s použitím různého množství DNA v reakci

**Použité vzorky:** stěr bukální sliznice cytologickým kartáčkem

**Izolace:** Chelex + přečištění

Tabulka 5: Složení reakční směsi

	1 µl DNA	1,5 µl DNA	2 µl DNA	2,5 µl DNA	3 µl DNA
MM	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
primer HSF4f	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
primer HSF4r	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
PCR H <sub>2</sub> O	10,5	10	9,5	9	8,5
DNA	1	1,5	2	2,5	3

**Použité primery:**

HSF4f: 5'- CGA GTG TGA CTT CTG CGT GA -3'

HSF4r: 5'- GTT CAG GCT GTT GGG CAT T -3'

**4.6.5. PCR vzorků s použitím prodlouženého a značeného primeru**

**Použité vzorky:** stěr bukální sliznice cytologickým štětečkem

**Izolace:** Chelex + přečištění, CTAB, SDS

**Složení reakční směsi:**

- 12,5 µl Master Mix OneTaq®HS Quick-Load® (NEB)
- 1,6 µl primer HSF4f\_Ba08 (10 pmol)
- 0,4 µl primer HSF4r (2,5 pmol)
- 1,6 µl primer Ba08 značený (10 pmol)
- 0,2 µl BSA
- 0,2 µl MgCl<sub>2</sub>
- 8 µl H<sub>2</sub>O
- 0,5 µl DNA

**Použité primery:**

HSF4f\_Ba08: 5'- TGT TGC CGA CAC GAA TTG TCG AGT GTG ACT TCT GCG TGA -3'

HSF4r: 5'-GTT CAG GCT GTT GGG CAT T-3'

Ba08 : 5'- TGT TGC CGA CAC GAA TTG T -3'

**4.6.6. PCR vzorků s použitím značeného primeru po optimalizaci ředění značeného primeru**

**Použité vzorky:** stěr bukální sliznice cytologickým štětečkem

**Izolace:** Chelex + přečištění, CTAB, SDS, chloroform

**Složení reakční směsi:**

- 12,5 µl 2x PPP Master Mix (firma TopBio)
- 0,5 µl primer HSF4f\_56-FAM
- 0,5 µl primer HSF4r
- 0,2 µl BSA
- 10,3 µl H<sub>2</sub>O
- 1 µl DNA

**Použité primery:**

HSF4f 56-FAM: 5' - /56-FAM/CGA GTG TGA CTT CTG CGT GA – 3'

HSF4r: 5'-GTT CAG GCT GTT GGG CAT T - 3'

**4.7. Příprava agarosového gelu a elektroforéza**

Příprava 2% agarosového gelu o objemu 120 ml

**Postup:**

- do Erlenmayerovy baňky navážit 2,4 g agarosu
- v odměrném válci odměřit 120 ml 1x TBE
- rozpustit agaros v mikrovlnné troubě na střední výkon cca 5 min až nebudou v roztoku znatelná vlákénka, občas promíchat
- zchladit baňku s roztokem pod tekoucí vodou
- přidat v digestoři 8 µl ethidium bromid, promíchat
- nalít rozvařenou agarosu do připravené vany s hřebínkem, odstranit případné vzduchové bubliny a nechat dokonale ztuhnout
- poté opatrně vyjmout hřebínek a do vzniklých jamek napipetovat konkrétní množství vzorku (25 µl nebo 12,5 µl v případě dalšího použití vzorku ještě pro čipovou elektroforézu)
- do první a poslední jamky za vzorky napipetovat 12 µl 100 bp Ladderu (NEB)

- vložit agarosový gel pomalu a opatrně do elektroforetické vany s 1x TBE pufrem
- nastavit na 40V, po 5 minutách zvýšit na 100V
- délka elektroforézy cca 1 hodinu
- vyjmout gel z pufru a vyfotografovat v zařízení pro focení gelů pod UV světlem

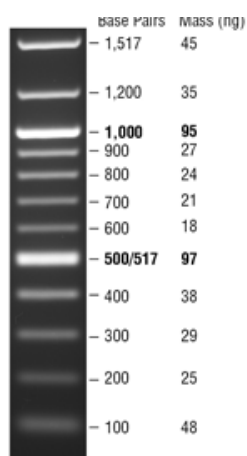
#### Složení 1x TBE:

- 54 g Tris-HCl
- 27,5 g kyseliny borité
- 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
- 5 l destilované vody

#### Složení 100 bp Ladderu (NEB):

- 2,5% Ficoll-400, 11mM EDTA
- 3,3 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 0,0017% SDS
- 0,15% bromophenol blue

Obrázek 7: Délky fragmentu ladderu, podle kterých se určuje délka fragmentu vzorku



(<https://www.neb.com/products/n3231-100-bp-dna-ladder>, 2015)



## 4.8. Čipová elektroforéza

Tato metoda byla zvolena z důvodu vyšší přesnosti detekce a možnosti rozlišit přenašeče díky vyšší citlivosti při amplifikaci fragmentů.

Analýza byla provedena na přístroji MultiNA SHIMADZU Biotech. Tento přístroj je vybaven LED-excitovaným fluorescenčním detektorem. Je více než desetkrát citlivější než barvení gelu ethidium bromidem.

Výhodou je vysoké rozlišení, citlivost, rychlost a práce v bezpečném prostředí oproti klasické elektroforéze.

Analýza je úplně odlišná než při klasické elektroforéze. Celý systém je plně automatizovaný. Už analyzované vzorky lze zobrazit a nemusí se čekat až konec celé operace.

### Chemikálie:

Barva SYBR® Gold nucleic acid gel Stain

Ladder Phix 174/HaeIII Markers (výrobce PROMEGA)

DNA-1000 Separation Buffer (výrobce SHIMADZU)

DNA-1000 Marker solution for MultiNA (výrobce SHIMADZU)

### Postup:

- analýzu nastavit jen na 1 čip ze čtyř možných (záleží na uživateli)
- míchání alikvot – množství pro 23 vzorků
  - barva – 1  $\mu$ l SYBR® Gold + 99  $\mu$ l 1x TE pufr
  - Separation Buffer 990  $\mu$ l + naředěná barva SYBR® Gold 10  $\mu$ l, 10 s vortexovat
  - Ladder DNA-1000 – 1  $\mu$ l x174/HaeIII Markers + 99  $\mu$ l 1x TE pufr
  - Marker Solution – nemíchá se
- do přístroje se na správné místo vloží vzorky a namíchané chemikálie.
- do systému se navolí počet a umístění vzorků

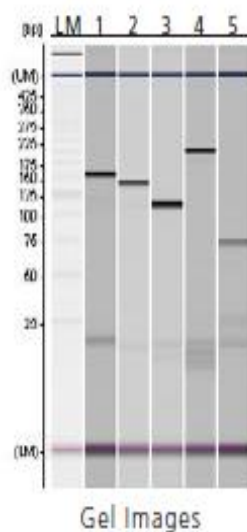
- výstupem je grafické znázornění a obrázek separovaných fragmentů shodný s výstupem gelové elektroforézy

Obrázek 8: Pohled na vnitřní uspořádání přístroje, kam se vkládají vzorky a alikvoty



(<http://www.shimadzu.com/an/lifescience/electrophoresis/mce/multina2.html>, 2015)

Obrázek 9: Výstup po dokončené analýze



(<http://www.shimadzu.com/an/lifescience/electrophoresis/mce/multina.html>, 2015)

## 4.9. Fragmentační analýza

Fragmentační analýza byla provedena na sekvenátoru ABI 3500 od firmy Applied Biosystem, který je součástí vybavení Biotechnologického centra na Katedře speciální produkce rostlinné.

Pro tuto analýzu je vždy nutné přidat do reakční směsi jeden značený primer. V tomto případě se jednalo o primer HSF4 značený barvou 6-FAM od firmy IDT<sup>®</sup> INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES. Tento primer je nutno vždy uchovávat v temnu, aby nedocházelo k jeho tzv. vysvícení.

**Postup:**

- před samotnou fragmentační analýzou se vzorky musí zdenaturovat
- složení denaturační směsi: 11  $\mu$ l směsi standardu a formamidu, 1  $\mu$ l PCR produktu
- denaturace 4 minuty při 94 °C
- okamžité zchlazení ve stratacooleru na 2 minuty

Takto zdenaturované vzorky je možné vložit do sekvenátoru a provést fragmentační analýzu.

## 5. VÝSLEDKY

Nejdříve byly provedeny 4 metody izolace odlišně odebraných vzorků DNA u psů plemene Stafordšírský bullterier.

Byly použité vzorky různého data odběru. Cílem bylo porovnat množství a čistotu vyizolované DNA a dle výsledku vybrat nejvhodnější metodu pro izolaci zbylých vzorků a také posoudit, jaká metoda odběru a jak staré vzorky je vhodné pro následující analýzy použít.

V následujících tabulkách (Tabulka 6, 7, 8, 9) jsou uvedeny výsledky měření koncentrace a čistoty DNA na přístroji BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spektrofotometr od firmy SHIMADZU.

Hodnota OD 260/280 – prvotní ukazatel znečištění

Hodnota OD 260/230 – udává údaje o dalším znečištění

Tabulka 6: Izolace DNA metodou CTAB

	<b>Metoda odběru</b>	<b>Jméno psa</b>	<b>Odběr</b>	<b>Konc. DNA (ng/μl)</b>	<b>OD 260/280</b>	<b>OD 260/230</b>
1	vat. tyčinka	Guisseppina FCH	čerstvý říjen 2014	33,48	2,35	1,61
2	cyt. kartáček	Guisseppina FCH	srpen 2014	52,18	2,43	1,74
3	vat. tyčinka	Churchill Walk Heart	duben 2013	9,42	3,59	0,97
4	vat. tyčinka	Sára z Brixiho Dvora	duben 2013	6,58	3,78	1,30

Tabulka 7: Izolace DNA metodou modifikovanou chloroformovou

	<b>Metoda odběru</b>	<b>Jméno psa</b>	<b>Odběr</b>	<b>Konc. DNA (ng/μl)</b>	<b>OD 260/280</b>	<b>OD 260/230</b>
1	vat. tyčinka	Guisseppina FCH	čerstvý listopad 2014	5,43	5,35	0,41
2	cyt. kartáček	Elvis Dark Element	srpen 2014	29,01	2,30	1,03
3	vat. tyčinka	Churchill Walk Heart	duben 2013	0,43	37,99	0,03
4	vat.tyčinka	Sára z Brixiho Dvora	duben 2013	0,89	N/A	0,08

Tabulka 8: Izolace DNA chelexem – vlastní modifikace

	<b>Metoda odběru</b>	<b>Jméno psa</b>	<b>Odběr</b>	<b>Konc. DNA (ng/μl)</b>	<b>OD 260/280</b>	<b>OD 260/230</b>
1	vat.tyčinka	Guisseppina FCH	čerstvý listopad 2014	248,66	1,15	0,26
2	cyt.kartáček	Cookki Queen Warriorbull	srpen 2014	60,66	1,40	0,35
3	vat.tyčinka	Darcy ze Zalab.samoty	květen 2013	35,29	1,26	0,33
4	chlup	Guisseppina FCH	listopad 2014	50,05	0,96	0,22

Tabulka 9: Izolace DNA modifikovanou SDS metodou

	<b>Metoda odběru</b>	<b>Jméno psa</b>	<b>Odběr</b>	<b>Konc. DNA (ng/μl)</b>	<b>OD 260/280</b>	<b>OD 260/230</b>
1	vat. tyčinka	Guisseppina FCH	čerstvý listopad 2014	62,76	1,68	0,66
2	cyt.kartáček	Atila Koubale	srpen 2014	31,49	1,65	0,68
3	vat. tyčinka	Abbi Garlin	duben 2013	6,68	7,35	1,16
4	chlup	Guisseppina FCH	čerstvý listopad 2014	5,37	12,23	12,23

Výsledky uváděné v tabulkách ukazují, že různé metody izolace, metody odběru i stáří vzorků daly velice rozdílné výsledky jak z hlediska koncentrace DNA tak čistoty. Proto byla u všech vzorků provedena zkušební PCR reakce, kde byly použity primery pro detekci jiné oční choroby u psů zvané PRCD (Progressive rod-cone degeneration) a byla tak posouzena použitelnost vzorků pro další analýzu (Obrázek 10).

Obrázek 10: Vizualizace vzorků po gelové elektroforéze (zkušební PCR PRCD)

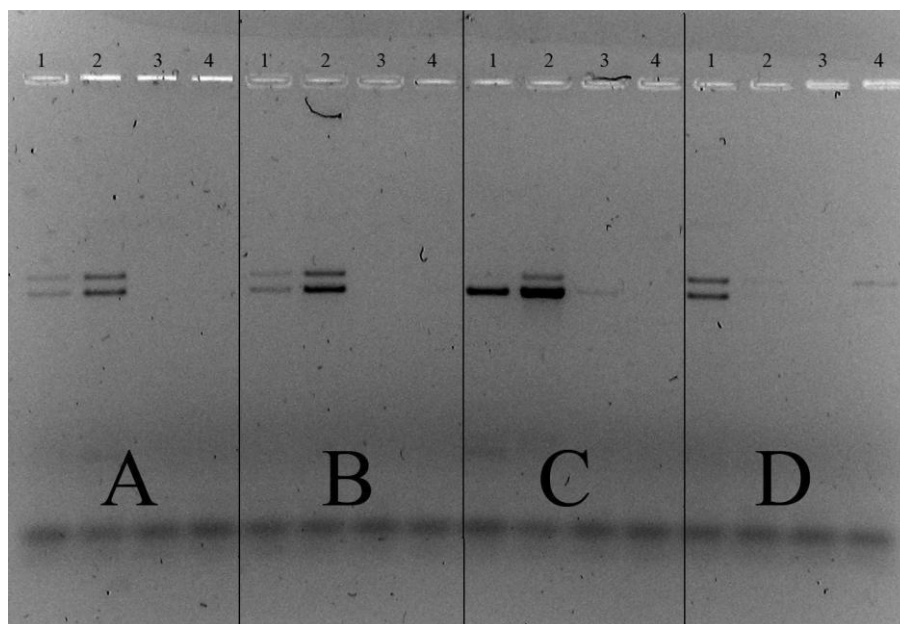


Foto: Barbora Farková

#### **A...izolace metodou CTAB**

A1 - čerstvý bukální stěr vatovou tyčinkou

A2 - bukální stěr cytologickým kartáčkem

A3 - starý stěr vatovou tyčinkou

A4 - starý stěr vatovou tyčinkou

#### **B...izolace chloroformovou**

B1 - čerstvý bukální stěr vatovou tyčinkou

B2 - bukální stěr cytologickým kartáčkem

B3 - starý stěr vatovou tyčinkou

B4 - starý stěr vatovou tyčinkou

#### **C...izolace chelexem**

C1 - čerstvý bukální stěr vatovou tyčinkou

C2 - bukální stěr cytologickým kartáčkem

C3 - starý stěr vatovou tyčinkou

C4 - čerstvě vytržený chlup

#### **D...izolace SDS metodou**

D1 - čerstvý bukální stěr vatovou tyčinkou

D2 - bukální stěr cytologickým kartáčkem

D3 - starý stěr vatovou tyčinkou

D4 - čerstvě vytržený chlup

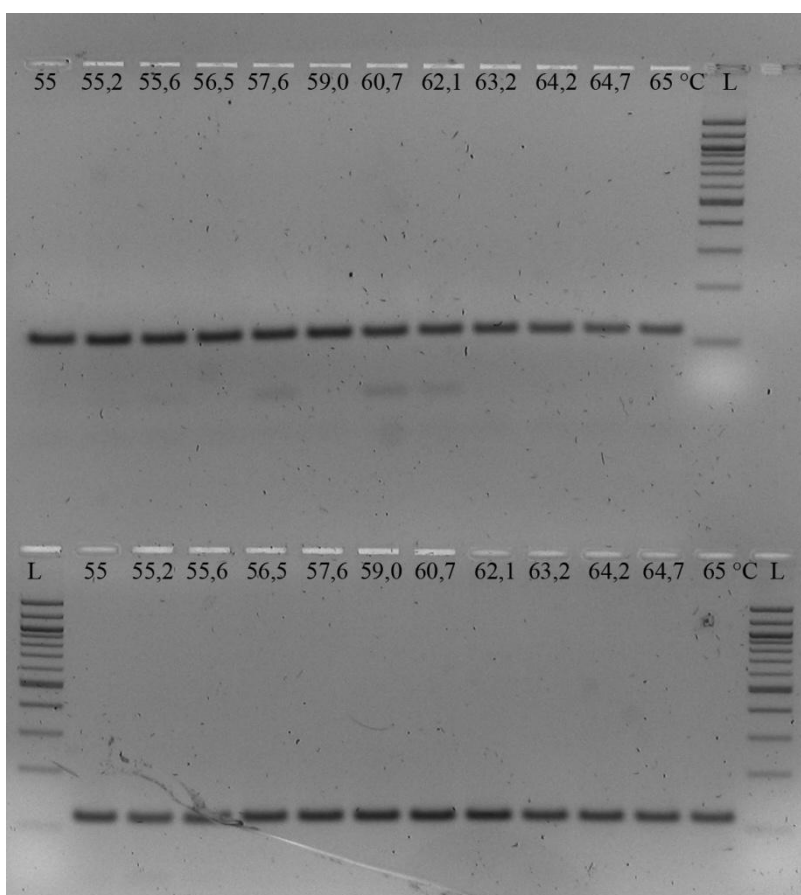
Z těchto výsledků je jasně patrné, že nejlepší amplifikace DNA je u vzorku C2 (bukální stěr cytologickým štětečkem a izolace telexem, viz Obrázek 10).

Proto byly pro další analýzy zvoleny vzorky DNA získané stěrem bukální sliznice cytologickým kartáčkem a izolace DNA chelexem.

Dalším pozitivem kromě výtěžnosti DNA a její vhodnosti pro PCR byla i nenáročnost odběru vzorku, a jeho uchovávání. Izolace chelexem vychází nejlépe jak z důvodu výtěžnosti DNA a časové nenáročnosti a jednoduchosti, tak i malé finanční nákladnosti.

Poté následovala teplotní optimalizace PCR reakce pro primery HSF4. Byl zvolen teplotní gradient 55 – 65 °C (Obrázek 11)

Obrázek 11: Vizualizace vzorků po gelové elektroforéze - PCR teplotní gradient



horní řada – čerstvý stěr vatovou tyčinkou, izolace chelex

dolní řada – cytologický kartáček, izolace chelex



Dle výsledků PCR a s ohledem na parametry primerů byla zvolena optimální teplota pro anealing 59 °C (Obrázek 11).

V tabulce 10 jsou uvedeny výsledky z hodnocení kvality/kvantity DNA izolované chelexem z cytologických kartáčků.

Tabulka 10: Výsledky měření koncentrace a čistoty DNA dalších vzorků metodou chelex

	<b>Jméno psa</b>	<b>Odběr</b>	<b>Konc. DNA (ng/μl)</b>	<b>OD 260/280</b>	<b>OD 260/230</b>
5	Mafia	srpen 2014	122,68	1,20	0,20
6	Connie Girl Impossant Bohemia	srpen 2014	134,28	1,32	0,22
7	Cloe z Hambalek Bušín	srpen 2014	123,20	1,28	0,23
8	Shelby Angelo Custode	srpen 2014	105,77	1,19	0,22
9	Dream of Hunter Fransimo Bohemia	srpen 2014	420,38	1,59	0,41
10	Debbie ze Zalabské samoty	srpen 2014	258,24	1,32	0,28
11	Lovable Babe of Eilatan	srpen 2014	35,35	1,13	0,20
12	Zaby Red Warrior Fransimo Bohemia	srpen 2014	205,50	1,29	0,29
13	Chily Wind Fransimo Bohemia	srpen 2014	444,88	1,58	0,40
14	Mascot Slade Czech	srpen 2014	138,46	1,35	0,30

Z této tabulky vyplývá, že izolace DNA chelexem z cytologických kartáčků poskytuje velice vysokou výtěžnost DNA, ale špatnou čistotu. Použitelnost vzorků byla následně ověřena PCR analýzou s primery HSF4 (Obrázek 12).

Obrázek 12: Vizualizace vzorků po gelové elektroforéze PCR s primery HSF4, všechny vzorky jsou odebrané cytologickým kartáčkem

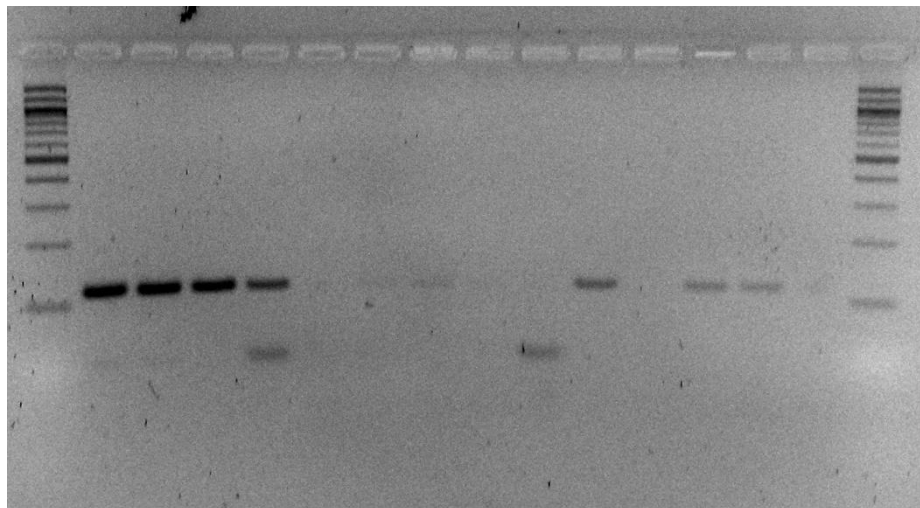


Foto: Barbora Farková

Vzorek 1 – CTAB izolace

Vzorek 2 – Chloroform izolace

Vzorek 3 – Chelex izolace

Vzorek 4 - SDS izolace

Vzorky 5-14 – Chelex izolace (vzorky byly izolovány najednou v jeden den)

Z těchto výsledků vyplývá, že izolace chelex sice poskytuje vysokou výtěžnost DNA, ale špatná čistota vzorků pravděpodobně způsobila selhání reakce.

Proto bylo zvoleno přečištění DNA a následně opětovná PCR. V tabulce 11 jsou uvedeny výsledky z měření koncentrace a čistoty DNA na nanodropu u vzorků, které byly přečištěny přerážením v octanu sodném a etanolu.

Tabulka 11: Výsledky měření koncentrace a čistoty DNA po přečištění

	<b>Metoda odběru</b>	<b>Jméno psa</b>	<b>Odběr</b>	<b>Konc. DNA (ng/μl)</b>	<b>OD 260/280</b>	<b>OD 260/230</b>
5	cytologický kartáček	Mafia	srpen 2014	8,35	1,59	0,58
6	cytologický kartáček	Connie Girl Impossant Bohemia	srpen 2014	6,22	1,56	1,27
7	cytologický kartáček	Cloe z Hambalek	srpen 2014	8,53	2,18	1,03
8	cytologický kartáček	Shelby Angelo Custode	srpen 2014	12,11	1,71	0,53
9	cytologický kartáček	Dream of Hunter FB	srpen 2014	71,66	2,10	1,63
10	cytologický kartáček	Debbie ze Zalabské samoty	srpen 2014	20,46	1,84	1,77
11	cytologický kartáček	Lovable Babe of Eilatan	srpen 2014	3,24	1,64	0,68
12	cytologický kartáček	Zaby Red Warrior FB	srpen 2014	27,32	2,35	1,40
13	cytologický kartáček	Chily Wind FB	srpen 2014	44,66	1,91	1,30
14	cytologický kartáček	Mascot Slade Czech	srpen 2014	25,52	2,13	1,36

Po přečištění jsou znatelné sice nižší hodnoty koncentrace DNA ale vyšší čistota vzorků.

Přečištěné vzorky DNA byly použity pro PCR analýzu, výsledky PCR analýzy jsou uvedeny na obrázku 13.

Obrázek 13: Vizualizace vzorků po gelové elektroforéze - PCR s primery HSF4 po přečištění izolátů

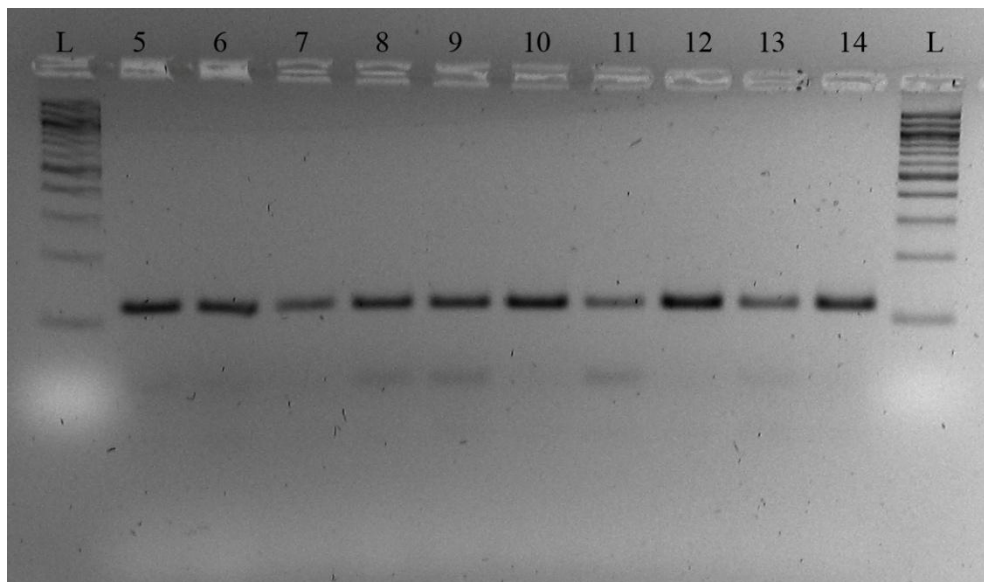


Foto: Barbora Farková

Všechny vzorky jsou izolované metodou chelex a přečištěné. Odběr DNA cytologickým kartáčkem.

PCR analýza po přečištění izolátů ukázala, že vzorky, které po izolaci chelexem nevycházely, po přečištění dávají v PCR reakci velice dobré výsledky (Tabulka 12).

Tabulka 12: Výsledky měření koncentrace a čistoty DNA izolované metodou chelex a následné přečištění

Číslo vzorku	Metoda odběru	Jméno psa	Odběr	Konc. DNA (ng/μl)	OD 260/280	OD 260/230
15	cytologický kartáček	Amazong Ellisar Black Jewels Bull	srpen 2014	27,70	1,93	0,73

16	cytologický kartáček	Abbie Honey Heart	srpen 2014	56,11	1,82	0,85
17	cytologický kartáček	Dance Stan Warriorbull	srpen 2014	73,73	1,74	1,22
18	cytologický kartáček	Jolly Pastaff Legion	srpen 2014	53,64	1,97	0,78
19	cytologický kartáček	Bertone Blitz Volksbull	srpen 2014	25,92	2,27	0,63
20	cytologický kartáček	Artie Koubale	srpen 2014	49,21	2,21	0,88
21	cytologický kartáček	Glanc of Sama Slody CZ	srpen 2014	52,22	2,16	0,85
22	cytologický kartáček	Chilli Proper Wizzard Bull	srpen 2014	48,28	2,10	0,92
23	cytologický kartáček	Heidy Olstaff	srpen 2014	11,53	3,42	1,34

Obrázek 14: Vizualizace dalších vzorků po gelové elektroforéze - PCR s primery HSF4 (izolaci chelex a přečištění izolátů, odběr DNA cytologickým kartáčkem)

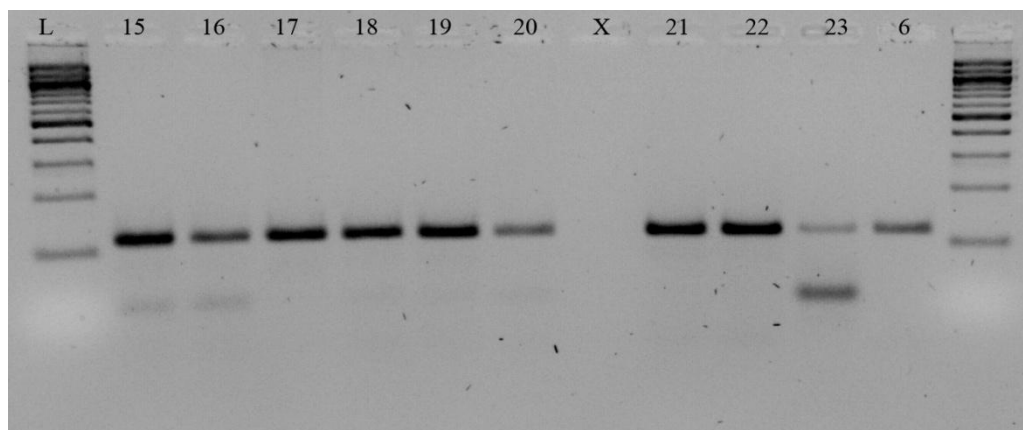
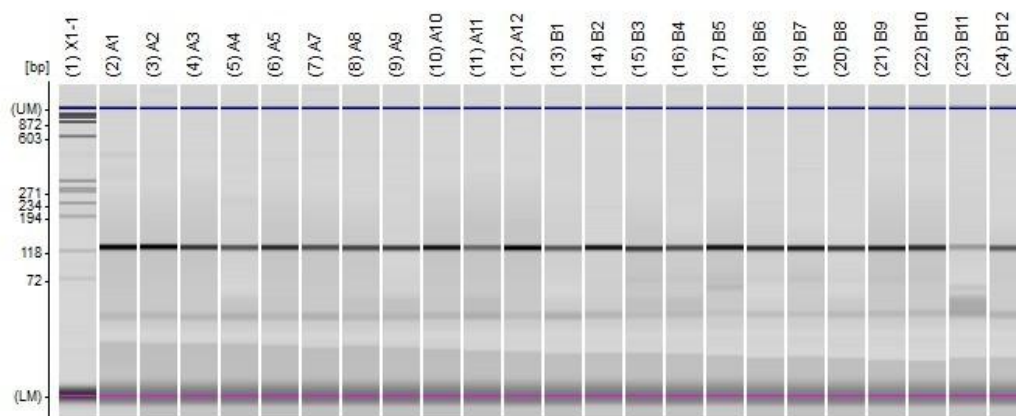


Foto: Barbora Farková

Získané PCR produkty byly separovány i pomocí čipové elektroforézy (MULTINA) a výsledky získané po elektroforéze jsou uvedeny na obrázku 15.

Obrázek 15: Vizualizace všech vzorků po čipové elektroforéze - PCR s primery HSF4



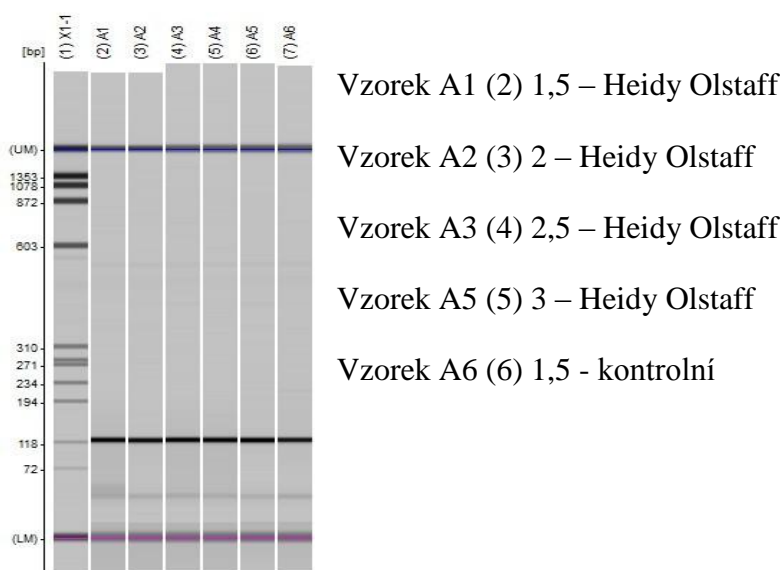
Tabulka 13: Seznam vzorků pro čipovou elektroforézu

Číslo vzorku	Metoda izolace	Jméno psa
2	modifikace CTAB	Guiseppina Felicity Cheer
3	modifikace chloroform	Elvis Dark Element
4	modifikace chelex	Cookki Queen Warriorbull
5	modifikace SDS	Atila Koubale
6	chelex + přečištění	Mafia
7	chelex + přečištění	Cloe z Hambalek Bušín
8	chelex + přečištění	Shelby Angelo Custode
9	chelex + přečištění	Dream of Hunter Fransimo Bohemia
10	chelex + přečištění	Debbie ze Zalabské samoty
11	chelex + přečištění	Lovable Babe of Eilatan
12	chelex + přečištění	Zaby Red Warrior Fransimo Bohemia
13	chelex + přečištění	Chily Wind Fransimo Bohemia

14	chelex + přečištění	Mascot Slade Czech
15	chelex + přečištění	Amazong Ellisar Black Jewels Bull
16	chelex + přečištění	Abbie Honey Heart
17	chelex + přečištění	Dance Stan Warriorbull
18	chelex + přečištění	Jolly Pastaff Legion
19	chelex + přečištění	Bertone Blitz Volksbull
20	chelex + přečištění	Artie Koubale
21	chelex + přečištění	Glanc of Sama Slody CZ
22	chelex + přečištění	Chilli Pepper Wizzard Bull
23	chelex + přečištění	Heidy Olstaff
24	chelex + přečištění	Connie Girl Impossant Bohemia

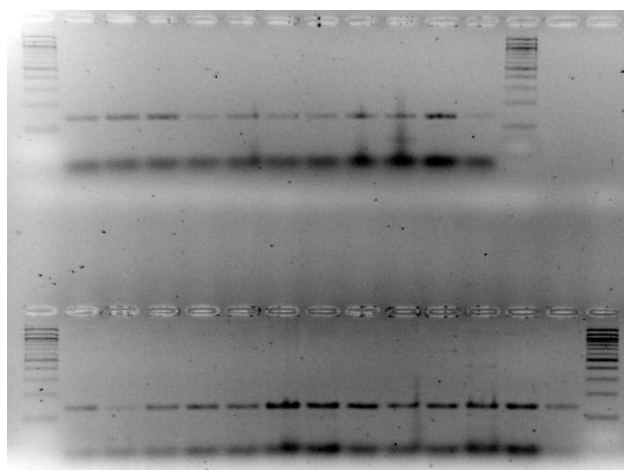
V předchozí analýze kontrolní vzorek č. 23 vyšel velice slabě, proto se provedla PCR s různou koncentrací DNA pro zoptimalizování. Jelikož vzorek č. 23 je kontrolní a je to už dříve testovaný přenašeč (heterozygot) a slouží po porovnání potenciálních heterozygotů (přenašečů).

Obrázek 16: Vizualizace po čipové elektroforéze - PCR s různou koncentrací DNA vzorků s primery HSF4 (izolace chelex a přečištění izolátů)



Byla provedena i PCR analýza s prodlouženým a značeným primerem. Pro PCR analýze byla provedena separace fragmentů na genetickém analyzátoru (fragmentační analýza) s negativním výsledkem. Pro ověření správného průběhu PCR analýzy byly vzorky analyzovány na gelové elektroforéze - kontrola, zda vůbec došlo k nasednutí primerů a amplifikaci. Vzhledem k charakteru výsledků se lze domnívat, že nedošlo k nasednutí značeného primeru (Obrázek 17).

**Obrázek 17: Vizualizace všech vzorků po gelové elektroforéze – PCR s prodlouženým a značeným primerem**

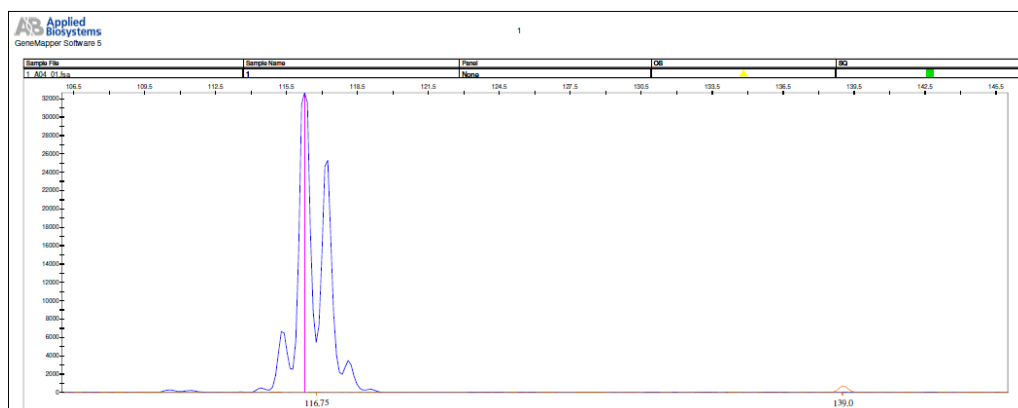


Po opakované PCR byly vzorky podrobeny fragmentační analýze, ukázka výsledků analýzy je uvedena na obrázku 17.

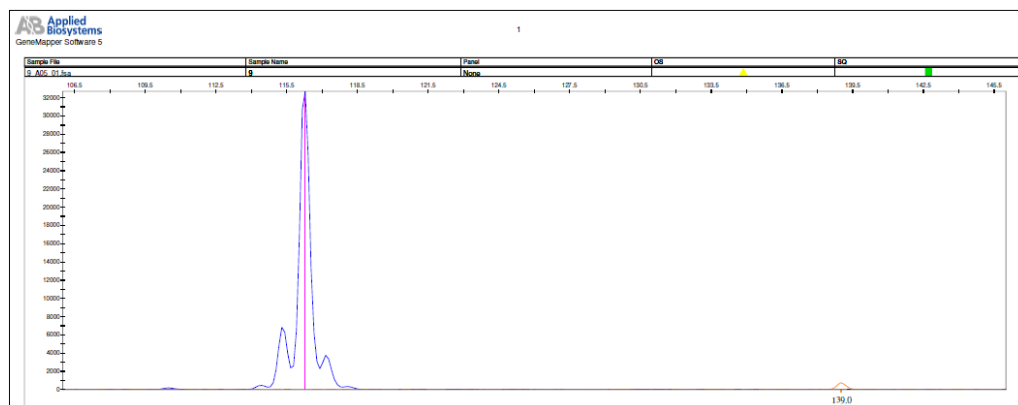


Obrázek 17: Ukázka charakteristického zobrazení analyzovaného vzorku v programu SEQUENCE SCANNER SOFTWARE po fragmentační analýze (PCR s použitím značeného HSF4f 56-FAM)

Carrier – 2 píky, jelikož je heterozygot (skrytý přenašeč HC)



Clear – 1 pík, jelikož je dominantní homozygot (zdravý jedinec)



Tabulka 14: Výsledky detekce homozygotů (clear) a heterozygotů (přenašečů - carrier HC) po fragmentační analýze

Číslo vzorku	Jméno psa	Detekce
1	Guisseppina Felicity Cheer	carrier
2	Elvis Dark Element	clear
3	Cookki Queen Warriorbull	clear
4	Atila Koubale	clear
5	Mafia	clear

6	Connie Girl Impossant Bohemia	clear
7	Cloe z Hambalek Bušín	clear
8	Shelby Angelo Custode	clear
9	Dream of Hunter Fransimo Bohemia	clear
10	Debbie ze Zalabské samoty	clear
11	Lovable Babe of Eilatan	clear
12	Zaby Red Warrior Fransimo Bohemia	clear
13	Chily Wind Fransimo Bohemia	clear
14	Mascot Slade Czech	clear
15	Amazing Ellisar Black Jewels Bull	clear
16	Abbie Honey Heart	clear
17	Dance Swan Warriorbull	clear
18	Jolly Pastaff Legion	clear
19	Bertone Blitz Volksbull	clear
20	Artie Koubale	clear
21	Glanc of Sama Slody CZ	clear
22	Chilli Proper Wizzard Bull	clear
23	Heidy Olstaff	carrier

Vzorek číslo 1 Guiseppina Felicity Cheer byl potenciální přenašeč HC, jelikož její otec byl HC carrier (přenašeč, heterozygot), takže měla 25% šanci, že bude také carrier a nebyla předtím testovaná.

Vzorek číslo 23 Heidy Olstaff byl kontrolní, již dříve testovaný carrier.

Všechny ostatní vzorky vyšly HC clear, což znamená, že nenesou mutaci v genu HSF4 pro dědičnou kataraktu.

## 6. DISKUSE

Ačkoliv se v České republice v dnešní době nevyskytuje žádný pes plemene Stafordšírský bullteriér s průkazem původu postižený dědičnou kataraktou, dále se v chovu vyskytují skrytí přenašeči této nemoci. Při netestování chovného páru hrozí opětovné zavlečení nemoci do populace.

Pro odběr vzorků pro účely genetického testování je používána řada postupů. Mellersh (2006) pro detekci dědičné katarakty u Stafordšírského bullteriéra používal vzorky DNA z krve konzervované v EDTA. Při studiu jiné dědičné oční choroby psů zvané PRCD (Progressive Rod-Code Degeneration, Progresivní retinální atrofie) se používaly též vzorky DNA izolované z krve (Dostál et al., 2011). Odběr vzorků krve ale představuje celkem komplikovaný postup jak z hlediska náročnosti, tak nákladnosti, diskomfortu zvířat a vyžaduje i nutnost návštěvy veterinárního lékaře.

Pro účely mé práce se jednalo o nevhodný postup, protože většina chovatelů mi z těchto důvodů odmítla vzorky poskytnout. Hledala jsem proto alternativu odběru. Nejdříve jsem použila bukalní stěry vatovou tyčinkou, ale izolace z těchto vzorků byla neuspokojivá i z důvodu, že vzorky pro analýzu nebyly čerstvé a odebrala jsem málo biologického materiálu.

V některých komerčních laboratořích zaměřujících se na genetické analýzy zvířat se dnes již využívají i vzorky DNA odebrané cytologickým kartáčkem (např. Genomia), touto metodou jsem se inspirovala. Přišla mi jako nejvhodnější alternativa pro potřeby mé práce. Používala jsem cytologické kartáčky používané pro cervikální stěry u žen. Jinak se v laboratořích provádějí izolace převážně ze vzorků z krve, stěru sliznice ústní dutiny, vlasových cibulek, peří nebo jiné tkáně (kůže, placenta, sval, vnitřní orgány apod.) (<http://www.genomia.cz/cz/pokyny/>, 2015)

Spolehlivým zdrojem dostatečného množství kvalitní DNA je krev. Odběr krve může provádět pouze lékař na rozdíl od stěru sliznice ústní dutiny, který provede každý jednoduše sám. Aby stěr sliznice poskytl dost buněk k izolaci DNA, musí být prováděn maximálně pečlivě, jelikož existuje riziko kontaminace vzorku DNA jiného zvířete (Petersen-Jones, 2001).

Rovněž pro izolaci DNA existuje celá řada různých metod. Často jsou používané komerční kity pro izolaci genomické DNA. Tento postup zvolila Mellersh et al. (2006) v práci zabývající se výzkumem dědičné katarakty u stafordšírského bullteriéra a používala DNA extrakčního kitu od výrobce Tepnel, Manchester, UK.

Při výzkumu PRCD autoři využívali chloroformové izolace. V práci je uvedeno, že izolace pomocí chelexu nebyla úspěšná (Dostál et al., 2011).

Já jsem izolovala DNA pomocí metod CTAB, chloroform, chelex a SDS. Mnou modifikovaná chelexová izolace pro cytologické kartáčky poskytovala největší výtěžnost DNA, ale nejhorší čistotu. Proto jsem vzorky přečistila a následné analýzy (PCR, elektroforéza, fragmentační analýza) vycházely velice dobře. U výzkumu PRCD vidím jako důvod neúspěchu izolace chelexem nepřečištění izolátů nebo kontaminaci vzorků pro PCR kuličkami chelexu.

Oproti práci Mellersh et al. (2006) jsem optimalizovala teplotní profil PCR reakce a použila jinou teplotu pro nasedání primeru. Rozdíl v teplotách může být způsoben použitím jiného termocycleru nebo rozdílným složením reakční směsi.

V mé práci jsem se pokusila detekovat heterozygoty pouze na základě separace amplifikovaných fragmentů pomocí gelové a následně čipové elektroforézy. Výsledky byly neuspokojivé, neboť nebyl žádný rozdíl mezi kontrolním heterozygotem/přenašečem a ostatními vzorky. Dle mého názoru nedokonalou separaci fragmentů způsobil rozdíl pouze jedné báze (1 bp) v analyzovaném fragmentu DNA. Použité metody separace DNA fragmentů nejsou natolik citlivé, aby dokázaly tento malý rozdíl v délce fragmentů rozeznat. Z tohoto důvodu jsem použila metodu fragmentační analýzy (Mellersh et al., 2006).

Fragmentační analýza poskytuje velmi vysokou rozlišovací schopnost. Obdobně jako např. metoda separace DNA fragmentů na sekvenančním gelu - denaturační elektroforéza a detekce fragmentů na základě barvení stříbrem, což je postup používaný při analýze mikrosatelitů (Van der Schoot, 2000)

## 7. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo nalezení nejvhodnější metody odběru vzorku DNA, jednoduché a levné metody izolace DNA, která se běžně nevyužívá pro daný typ izolátů a zhodnocení její vhodnosti jako alternativy používání drahých komerčních izolačních kitů a možnost jejího používání jako rutinní pro potřeby výzkumu. Dále se řešila optimalizace nejvhodnější metody izolace DNA, PCR analýzy a separace amplifikovaných fragmentů. Testovaly se různé metody analýz pro detekci skrytých přenašečů dědičné katarakty v populaci.

V případě hodnocení vhodnosti metod izolace DNA hlavními kritérii byly: časová náročnost, kvalita a množství izolované DNA a finanční hledisko. Dle těchto kritérií se vybrala nejvhodnější metoda izolace, která se komerčně zatím nevyužívá a je doporučeno její případné budoucí využití jako možné alternativy komerčně používaným postupům. Z výsledků méj diplomové práce vyplývají tyto závěry:

- Pro odběr vzorků DNA se stěry bukální sliznice ukázaly jako vhodná a jednoduchá metoda odběru vzorků pro izolaci DNA, kterou zvládne i chovatel sám doma a vzorek lze zaslat poštou k dalšímu zpracování v laboratoři. Odpadá tak nutnost návštěvy veterináře pro odběr vzorků krve.
- Pro stěr bukální sliznice jsou vhodnější cytologické kartáčky z důvodu setření většího množství buněk ze sliznice a tím pádem je více biologického materiálu pro izolaci DNA.
- Vzorky starší než půl roku se již nepodařilo analyzovat. Jednalo se o stěry vatovou tyčinkou.
- DNA získaná z chlupových cibulek se nepodařila analyzovat.
- DNA ze stěrů bukální sliznice lze izolovat i jinými metodami. V mé práci se podařilo DNA vyizolovat všemi použitými metodami a to i těmi, které se používají na izolaci z rostlinných pletiv, masa, krve i chlupových cibulek.
- Jako nejvhodnější metodu z důvodu jednoduchosti, malé časové náročnosti a nízké finanční nákladnosti jsem zvolila izolaci pomocí chelexu. DNA ze stěrů bukální sliznice je ale velice znečištěna pravděpodobně zbytky potravy a jinými

látkami, které se vyskytují v tlamě psa. Po izolaci chelexem muselo následovat přečištění DNA, které bylo ale opět časově i finančně nenáročné. Vzhledem k vysoké výtěžnosti DNA nedochází při přečištění ani k významné ztrátě DNA.

- Skryté přenašeče nelze detekovat jinou metodou než fragmentační analýzou s použitím značeného primeru z důvodu rozdílu pouze jedné báze u heterozygota (skrytého přenašeče – „carrier“). Což gelová ani čipová elektroforéza nerozeznala.
- Výsledky již dříve komerčně testovaných psů se od mých analýz nelišily.
- Promořenost testovaného vzorku skrytými přenašeči jsou 2 jedinci z 23, kdy jeden byl už dříve testovaný. Pro mou práci byl použit jako kontrolní přenašeč. Celkový počet přenašečů dědičné katarakty u Staffordšírského bullteriéra je v České republice obecně velice nízký, což se i mou prací potvrdilo.

Stěr bukalní sliznice cytologickým kartáčkem se ukázal jako velice vhodná metoda pro odběr vzorku, ale nehodí se pro dlouhodobé uchování DNA. Jako alternativu ke komerčním izolačním kitům a pro využívání jako rutinní pro potřeby výzkumu se nejlépe jeví izolace chelexem s následným přečištěním.

Celou práci jsem vypracovala na osobně odebraných vzorcích a podařilo se mi optimalizovat jak izolaci DNA chelexem tak i PCR s použitím primeru HSF4, jelikož ani jedna oslovená laboratoř mi nesdělila svůj komerčně využívaný postup analýzy.

## 8. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ

### Literární zdroje

- Aguirre, G. D., Acland, G. M. 1988. Variation in retinal degeneration phenotype inherited at the pcr locus. *Exp. Eye Resy.* 46: 663 – 87.
- Anzenbacher, P., Kovář, J. 1986. *Metody chemického výzkumu pro biochemiky.* Praha VN MON.1: 199.
- Barnett, K. C. 1976. Comparative aspects of canine hereditary eye disease. *Advance in Veterinary Science and Comparative Medicine.* 20: 39 - 67.
- Barnett, K. C. 1978. Hereditary Cataract in the Dog. *Journal of Small Animal Practice.* 19: 109 – 120.
- Borges, A. 2009. CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. *Sci. Agric.: Piracicaba, Brazil.* 66: 529 - 534.
- Breen, M., Switonski, M., Binns M. M. 2000. Cytogenetics and Physical Chromosome maps. In: Ruvinsky, A., Dampson, J.: *The Genetics of the dog.* CAB International, Oxon, United Kingdom. 299 – 328.
- Butler, J. M., 2005. *Forensic DNA Typing, Biology, Technology, and Genetics of STR Markers.* Elsevier Academic Press. 2: 680.
- Davidson, M. G., Nelms, S. R. 1999. Disease of the lens and cataract formation. *Veterina Ophtalmology.* 3. vyd (ed. Gelatt). Philadelphia: Lippincott/Williams & Wilkins. 3: 797 – 825.
- Dolf, B., R., Bäumle, E., Binns, M., Brening, B., Bull, B. et al. 1999. Dog Map: An internal Collaboration Toward a Low-Resolution Canine Genetic Marker Map. *J. Hered.* 90: 3 – 6.
- Dostál, J. 1995. *Chov psů – genetika v kynologické praxi.* Dona, České Budějovice. 206 s. ISBN 80-85463-58-X.
- Dostál, J. 2007. *Genetika a šlechtění psů.* Dona, České Budějovice. 261 s.. ISBN: 978 – 80 – 7322 – 104.
- Feng, X.; Du, W.; Luo, Q.; Liu, B. Microfluidic chip: 2009. Next-generation platform for systems biology. *Analytica Chimica Acta.* 650: 83–97.
- Francisco, L. V., Langston, A. A., Mellersh, C. S., Neal, C. L., Ostrander, E. A. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome.* 7: 359–362.

- Goddard, M. E. 2003. Animal breeding in the (post-) genomic era. *Animal Science*. 76: 353 – 65
- Gorg A., Weiss W., Dunn M. 2004. Current Two-Dimensional Electrophoresis Technology for Proteomics. *Proteomics*. 4: 3665-3685.
- Greenspoon, S.A., Scarpetta, M.A., Drayton M.L., Turek, S.A. 1998. Qiaamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework. *Journal for Forensic Sciences*. 43:1024–1030.
- Greer, K. A., Cargill, E. J., Cox, M. L., Clark, L. A., Tsai, K. L., Credille, K. M., Dunstan, R. W., Venta, P. J., Murphy, K. E. 2003. Digging up the canine genome – a tale to wag about. *Cytogenet. Genome Res*. 102: 244 – 48.
- Heaton, M. P., Harhay, G. P., Bennett, G. L., Stone, R. T., Grosse, W. M., Casas, E., Keele, J. W., Smith, T. P. L., Chitko-Mckown, C. G., Laegreid, W. W. 2002 Selection and use of SNP markerks for animal identification and paternity analysis in U. S. beef cattle. *Mammalian Genome*. 13: 272 - 281.
- Helper, L. C. 1989. *Magrane's Canine Ophthalmology*. 4. vyd. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Hruban, V., Majzlík, I. 2005. *Obecná genetika*. ČZU Praha. 316 s. ISBN 80-213-0600-9.
- Hyun, C., Filippich, L. J., Lea, R. A., Shepherd, G., Huhes, I. P., Griffiths, L. R. 2003. Prospects for whole genome linkage disequilibrium mapping in domestic dog breeds. *Mamm. Genome*. 14: 640 – 49.
- Chen, G.; Lin, Y.; Wang, J. 2006. Monitoring environmental pollutants by microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Talanta*. 68: 497–503.
- Kim, K. S., Lee, S. E., Jeong, H. K., Ha, J. H. 1998. The Complete nukleotidy semence of domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. *Mol. Phylogenet. Evol*. 10 (2): 210 – 20.
- Kirkness, E. F., Bafna, V., Halpern, A. L., Levy, S., Remington, K., Rusch, D. B., Delcher, A. L., Pop, M., Wang, W., Fraser, C. M., Venter, J. C. 2003. The dog genome: Survey sequencing and komparative analysis. *Science* 301: 1898 – 1903.
- Klug W. S., Cummings M. R., Spencer CH. A. 2006. *Concepts of Genetic*, Pearson Education, Inc., 8. vyd., p. 784.
- Klukowska – Rotzler, J., Szczerbal, I., Braunschweig, M., Switonski, M., Schelling, C., Dolf, G. 2005. Mapping and development of four microsatellite



markers for the canine 5<sup>'</sup> – hydroxytryptamine serotonin receptor 2A (HTR2A). *Anim. Genet.* 36(2): 173 – 5.

- Köchl, S., Niedestätter, H., Parson, W. 2005. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR, *Methods in molecular biology.* 297: 13 – 30.
- Kumar, N. S., Gurusubramanian, G. 2011. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Science Vision* 11. 3: 116 – 124.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680 - 685.
- Lauer, H. H.; Rozing, G. P. 2010. High Performance Capillary Electrophoresis. Germany. Agilent Technologies, 174 p. 5990-3777EN.
- Li, R., Mignot, E., Faraco, J., Kodata, H., Cantanese, J. J., Zhao, B. H., Lin, X., Hinton, L., Ostrander, E. A., Patterson, D. F., de Jong, P. 1999. Construction and characterization of an eight fold redundant dog genomic bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 58: 9 – 17.
- Lin, C. T., Gould, D. J., Petersen – Jones, S. M., Sargan, D. R. 2002. Canine inherited retinal degenerations: update on molecular genetics research and its clinical application. *J. Small Anim. Pract.* 43: 426 – 432.
- Lindblad, T. K. 2004. Preliminary analysis of a high – quality draft of the dog genome.
- Lindblad, T. K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S. 2005. Genome sequence, comparative analysis and holotype structure of the domestic dog. *Nature.* 438: 803 – 819.
- Lingaas, F., Aarskaug, T., Gerlach, J. A., Juneja, R. K., Fredholm, M., Sampson, S., Suter, N., Holmes., N. G., Binns, M. M., Ryder, E. J., VanHaeringen, W. A., Venta, P. J., Brouillete, J. A., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Wilton, A. N., Bredbacka, P., Koskinen, M., Dunner, S., Parra, D., Schmutz, S., Schelling, C., Schläpfer, J., Dolf, G. 2001. *J. Anim. Breed. Genet.* 118: 3 - 19.
- Lingaas, F., Sorensen, A., Juneja, R. K., Johansson, S., Fredholm, M., Wintero, A., K., Sampson, J., Mellersh, C., Curzon, A., Holmes, N. G., Binns, M. M., Dickens, H. F., Ryder, E. J., Gerlach, J., Bäumle, E., Dolf, G. 1997. Towards construction of a canine linkage map: establishment of 16 linkage Gross. *Mamm. Genome.* 8: 218 – 221.
- Mellersh, C. S., Graves, K. T., McLaughlin, B., Ennis, R. B., Pettitt, L., Vaudin, M., Barnett, K. C. 2007. Mutation in HSF4 associated with early but

not late-onset hereditary cataract in the Boston terrier. *Journal of Heredity*. 98: 531 - 533.

- Mellersh, C. S., Hitte, C., Richman, M., Vignaux, F., Priat, C., Jouquand, S., Werner, P., André, C., De Rose, S., Patterson, D. F., Ostrander, E. A., Galibert, F. 2000. An integrated linkage – radiation hybrid map of the canine genome. *Mamm. Genome*. 11: 120 – 30.
- Mellersh, C. S., Langston, A. A., Acland, G. M., Fleming, M. A., Ray, K., Wiegand, N. A., Francisco, L. V., Gibbs, M., Aguirre, G. D., Ostrander, E. A. 1997. A linkage map of the Canine genome. *Genomics*. 46: 326 – 336.
- Mellersh, C. S., Pettitt, L., Forman, O. P., Vaudin, M., Barnett, K. C. 2006. Identification of mutations in HSF4 in dogs of three different breeds with hereditary cataracts. *Veterinary Ophthalmology*. 9:369 - 378.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S. Saiki, R., Horn, G., Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology*. 51: 263–273.
- Murray, M.G., Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 19: 4321 - 4326.
- Naylor, S. L. 1997. Construction and use of static cell hybrids. In: Dear, P. H.. *Genome mapping – A practical approach*. Oxford university press inc. New York.
- Ornstein L. 1964. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann N Y Acad Sci*. 121: 321 - 349.
- Ostrander, E. A., Galibert, F., Mellersh, C. S. 2001. Linkage and radiation. In: Ruvinsky, A., Dampson, J.: *The Genetics of the dog*. CAB International, Oxon, United Kingdom. 329 - 369.
- Patterson, D. F. 2000. Companion animal medicine in the age of animal genetics. *J. Vet. Intern. Med.* 14: 1- 9.
- Peter, F. R. Little. 2005. Structure and function of the human genome. *Genome Research*. 15:1759–1766. ISSN 1088-9051/05.
- Petesen – Jones, S. M. 1998. A review of research to elucidate the cause of the generalized progressive retinal atrophies. *Vet. J.* 155: 5 – 18.
- Petersen-Jones, S. M. 2001. Current DNA-based tests for hereditary eye disease. *Veterinary Ophthalmology*. 4: 233 - 236.

- Priat, C., Hitte, C., Vignaux, F., Renier, C., Jiang, Z., Jouquand, S., Cheron, A., Andre, C., Galibert, F. 1998. A whole-genome radiation hybrid map of the dog genome. *Genomics*. 54: 361 – 78.
- Rasmussen, H. B. 2012. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. 315 – 334.
- Rubin, L. F. 1989. *Eye Disease in Purebred Dogs*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Schäger H., von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 166: 368 - 79.
- Schelling, C., Billault, A., Colomb, B., Pineroli, B., Guziewicz, K., Piasecka, A., Gmür, A., Klukowska, J., Gaillard, C., Stranzinger, G., Dolf, G. 2004. Characterization and applications of an expanded canine BAC library with fourfold genome coverage. *J. Anim. Brees. Genet*. 121: 345 – 9.
- Schelling, C., Schläpfer, J., Billault, A., Guziewicz, K., Gmür, A., Katmann, I., Pineroli, B., Colomb, B., Rickli, O., Witwer, C., Piasecka, A., Dolf, G. 2002. Construction of a canine bacterial artificial chromosome library for screening PCR. *J. Anim. Breed. Geneti*. 119: 400 – 401.
- Schröffelová, D. 2001. Můj táta? Kde je a kdo ho zná.? *Svět myslivosti*. 2: 18. ISSN:1212–8430.
- Slatter, D. 2001. *Fundamentals of Veterinary Ophtalmology*. 3rd edition. Philadelphia: W. B. Saunders.
- Snustad, D. P, Simmons, M. J. 2011. *Principles of genetics*. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. 6th edition. ISBN 978-0-470-90359-9.
- Spies, Z. 2005. *Staffordšírský bulteriér*. 1. vyd. Vašut. ISBN 80-7236-393-X.
- Stabej, P., Imholz, S., Versteeg, S. A., Zijlstra, C., Stokkhof, A. A., Dornanjko-Petric, A., Leegwater, P. A, van Oost, B. A. 2004. Characterization of the canine desmin (DES), gene and evaluation as a candidate gene for dilated cardiomyopathy in the Dobermann. *Gene*. 340: 241 – 249.
- Van der Schoot, J., Pospíšková, M., Vosman, B., Smulders, M. J. M. 2000: Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.). *Theor. Appl. Genet*. 101: 317–322.

- Veske, A., Nilsson, S. E. G., Narfstrom, K., Gal, A. 1999. Retinal dystrophy of swedish briard and briard-beagle dog sis due to a 4 – bp deletion in RPE65. *Genomics*. 57: 57 – 61.
- Vignaux, F., Hitte, C., Priat, C., Chuat, J. C., Andre, C., Galibert, F. 1999b. Construction and optimization of dog whole genome radiation hybrid panel. *Mamm. Genome*. 10: 888 – 894.
- Vignaux, F., Priat, C., Jouquand, S., Hitte, C., Jiang, Z., Cheron, A., Renier, C., Andre, C., Galibert, F. 1999a. Toward a dog radiation hybrid map. *J. Hered.* 90: 62 – 7.
- Vos, P., Kuiper, M. 1997. AFLP analysis. p. 115 – 131 in Caetano – Anollés G. And P:M: Gresshoff eds. *DNA markers: protokol, aplicaciones and overviews*. Wiley – VCH, New York.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger a R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 10: 506 - 513.
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P. et al. 2002. Initial sequencing and komparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 420: 520 – 562.
- Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. 1992. Genetics analysis using RAPD markers. *Method Enzymol*. 260: 335 - 348.
- Wu, D.; Qin, J.; Lin, B. 2008. Electrophoretic separations on microfluidic chips. *Journal of Chromatography A*. 1184: 542 – 559.
- Yakely, W. L., Wyman, M., Donovan, E. F., Fechheimer, N. S. 1968 Genetic transmission of an ocular fundus anomaly in Collies. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 152: 457 - 461.

### Internetové odkazy

- The NHGRI Dog Genome Project [online] [cit. 20. 2. 2015]  
Dostupné z: [http://research.nhgri.nih.gov/dog\\_genome/](http://research.nhgri.nih.gov/dog_genome/)
- Chmelíková, E., Lánská, V., Sedmíková, M., Hartlová, H. a Petr, J. Strašák zvaný CEA. *Planeta rough*. [online] © 2003 – 2010 [cit. 20. 2. 2015]  
Dostupné z: [http://www.planetarough.wz.cz/CZ/collie\\_rough/cea\\_flash.htm](http://www.planetarough.wz.cz/CZ/collie_rough/cea_flash.htm).

- Pokyny k odběrům zvířecích vzorků. [online]. [cit. 19. 2. 2015]. Dostupné z: <http://www.genomia.cz/cz/pokyny/>

## **Obrázky**

- Obr. č. 1

BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer: Designed for the Modern Life Science Laboratory. [online]. [cit. 2015-01-16].

Dostupné z:

[https://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=biospec\\_nano](https://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=biospec_nano)

- Obr. č. 2

BioNordikaBergman AS. Biospec. [online]. [cit. 2015-01-27].

Dostupné z:

<http://www.bergman.no/getfile.php/Bilder/Artikkelbilder/Shimadzu/C101E112%20BioSpec%20nano%20Chromato0012.jpg>

- Obr. č. 3

100 bp DNA Ladder. In: New ENGLAND BioLabs Inc. [online]. [cit. 2015-01-29].

Dostupné z: <https://www.neb.com/products/n3231-100-bp-dna-ladder>

- Obr. č. 4

Microchip Electrophoresis System for DNA/RNA Analysis MCE®-202 MultiNA: Operation of the technology [online]. [cit. 2015-01-14].

Dostupné z:

<http://www.shimadzu.com/an/lifescience/electrophoresis/mce/multina2.html>

- Obr. č. 5

Microchip Electrophoresis System for DNA/RNA Analysis MCE®-202 MultiNA: Wide Range of Applications. [online]. [cit. 2015-01-14].

Dostupné z:

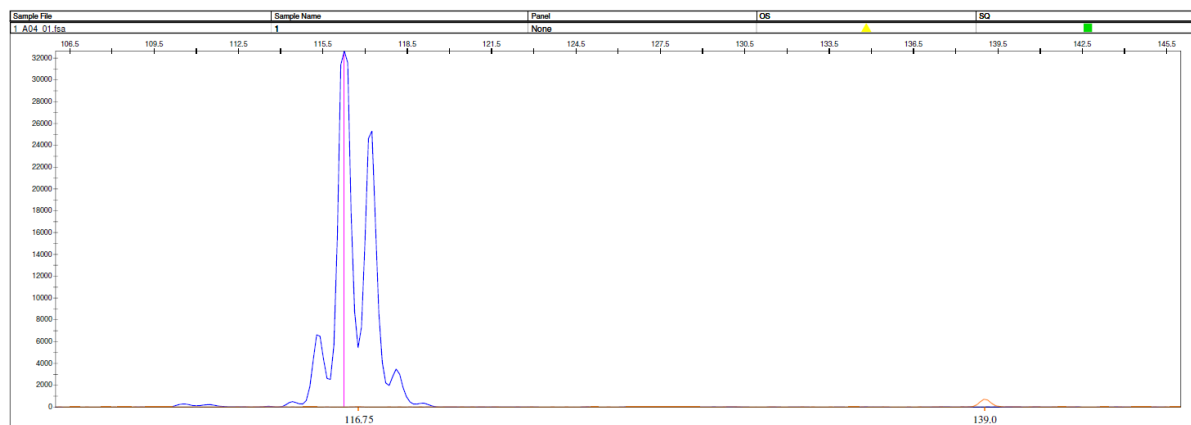
<http://www.shimadzu.com/an/lifescience/electrophoresis/mce/multina.html>

# PŘÍLOHY

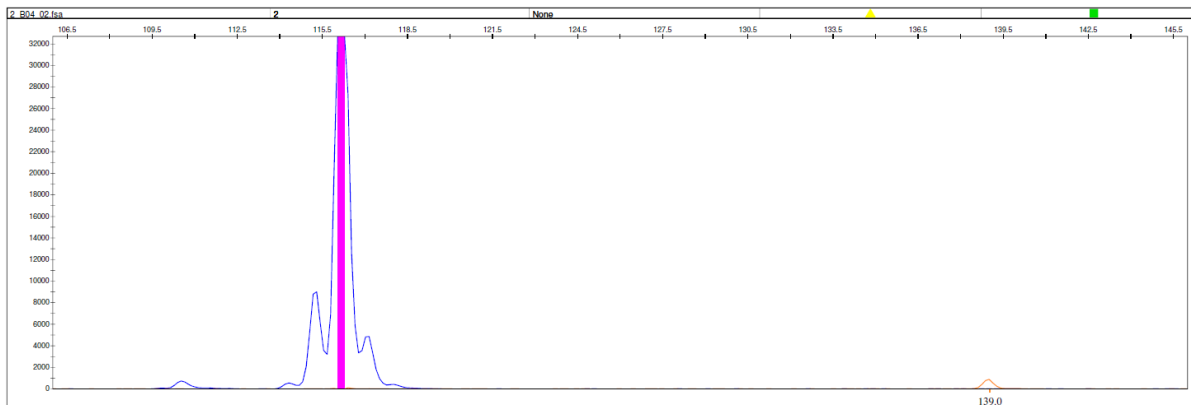
Zobrazení všech analyzovaných vzorků v programu SEQUENCE SCANNER SOFTWARE po fragmentační analýze (PCR s použitím značeného HSF4f 6-FAM)

## 1. vzorek – Guiseppina Felicity Cheer - carrier

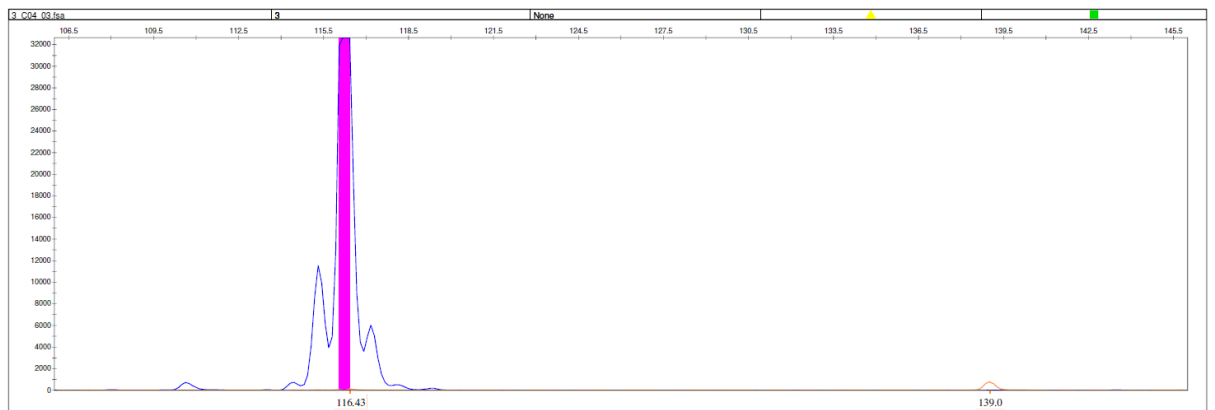
Applied Biosystems  
GeneMapper Software 5



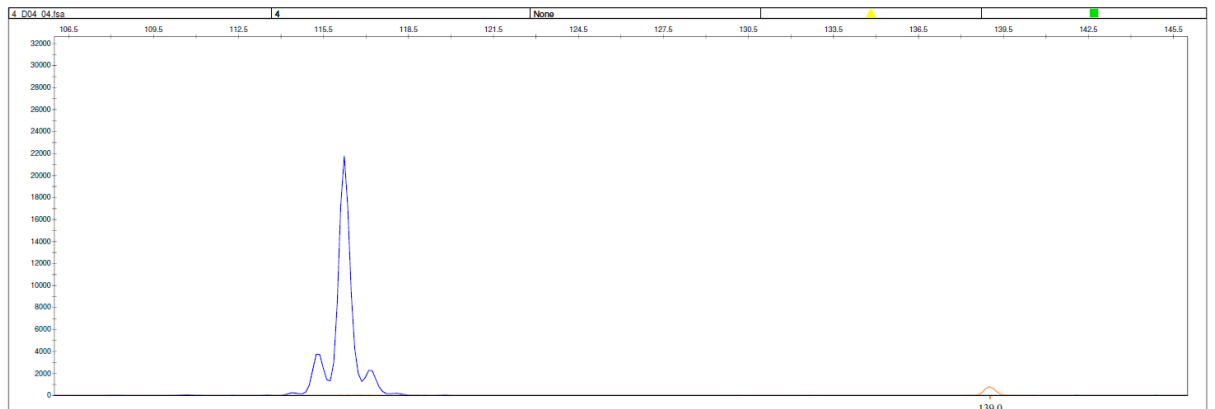
## 2. vzorek Elvis Dark Element - clear



### 3. vzorek Cooki Queen Warriorbull - clear



### 4. vzorek Atila Koubale - clear



Tue Feb 17, 2015 10:36AM, CET

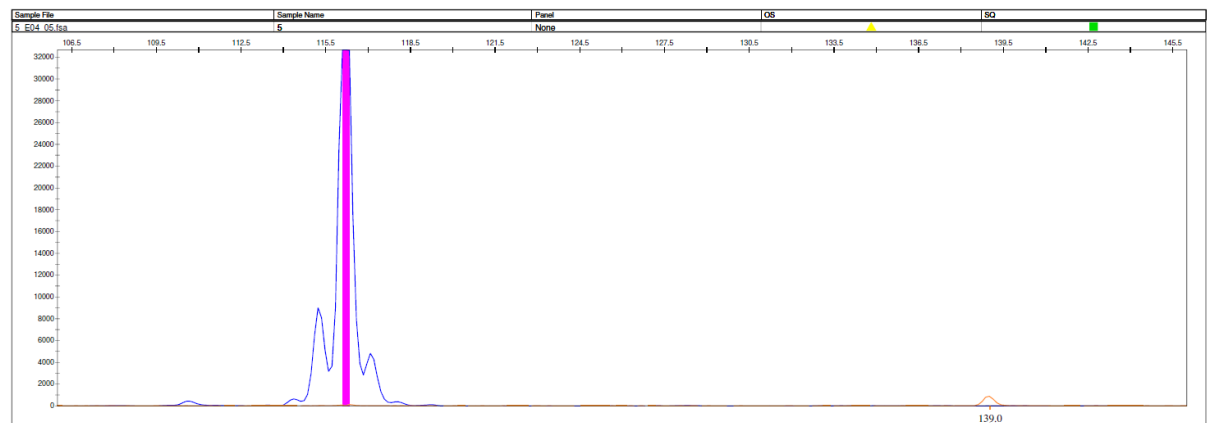
Printed by: gm

Page 1 of 6

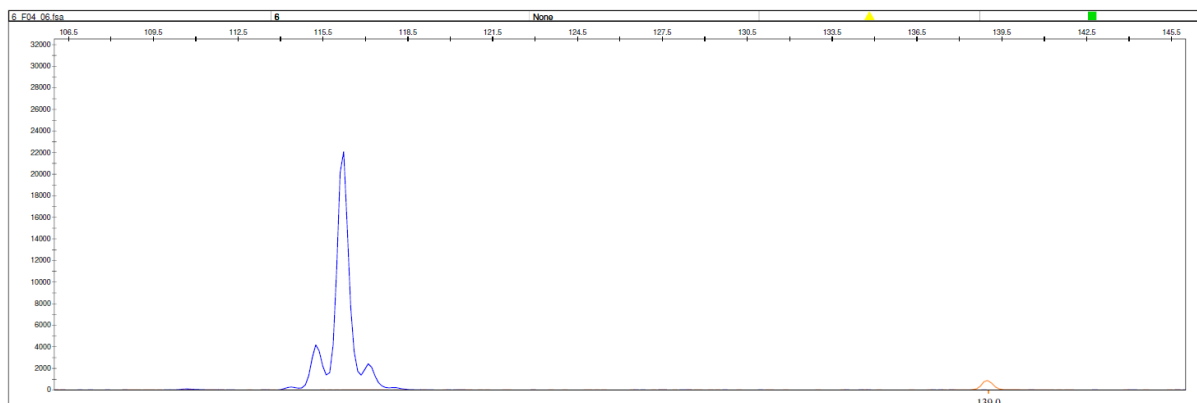
### 5. vzorek Mafia - clear

Applied Biosystems  
GeneMapper Software 5

1



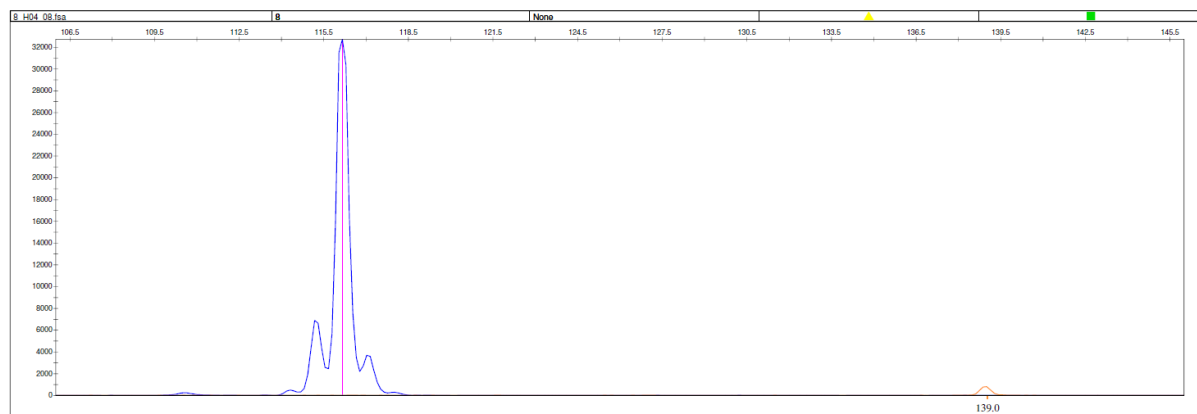
### 6. vzorek Connie Girl Impossant Bohemia - clear



### 7. vzorek Cloe z Hambalek Bušín - clear



### 8. vzorek Shelby Angelo Custode - clear

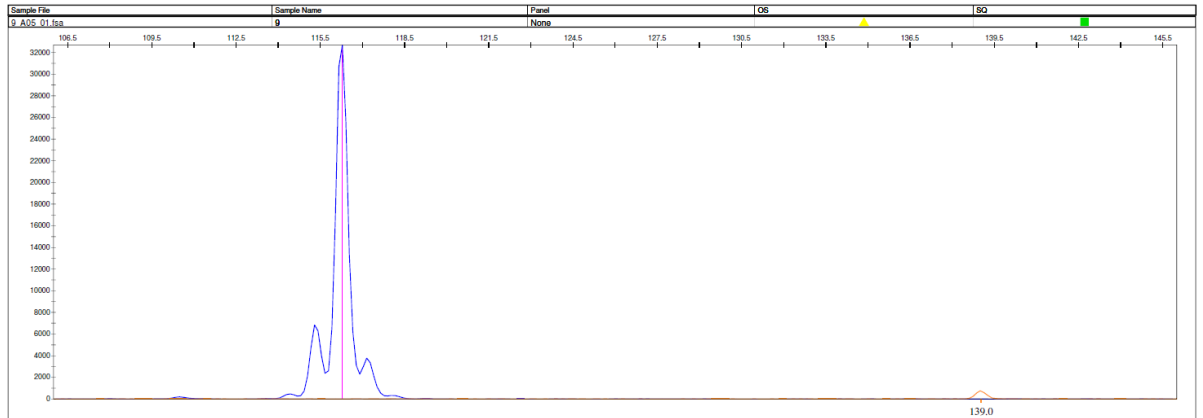




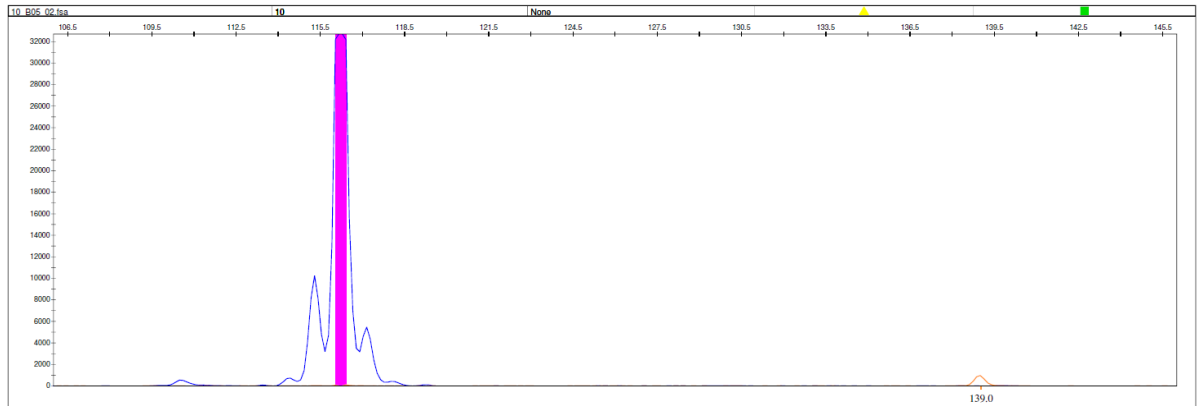
### 9. vzorek - Dream of Hunter Fransimo Bohemia - clear

Applied Biosystems  
GeneMapper Software 5

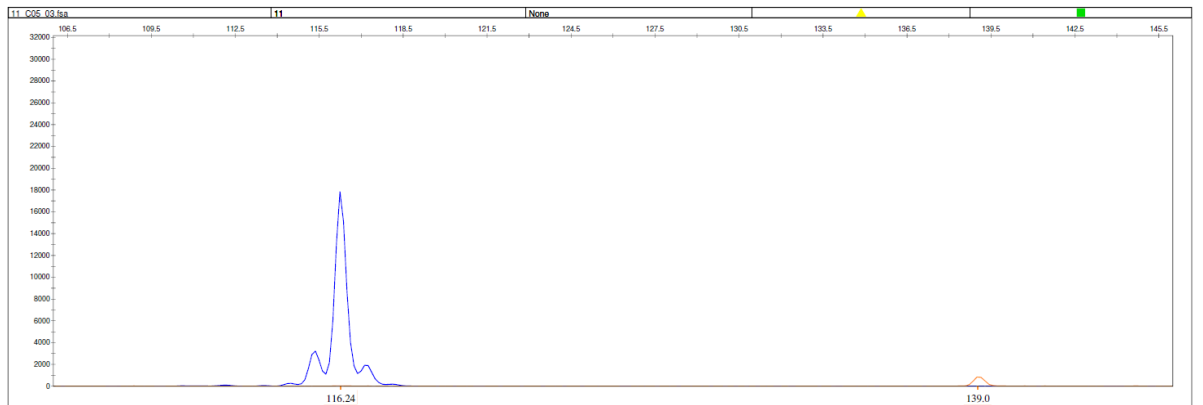
1



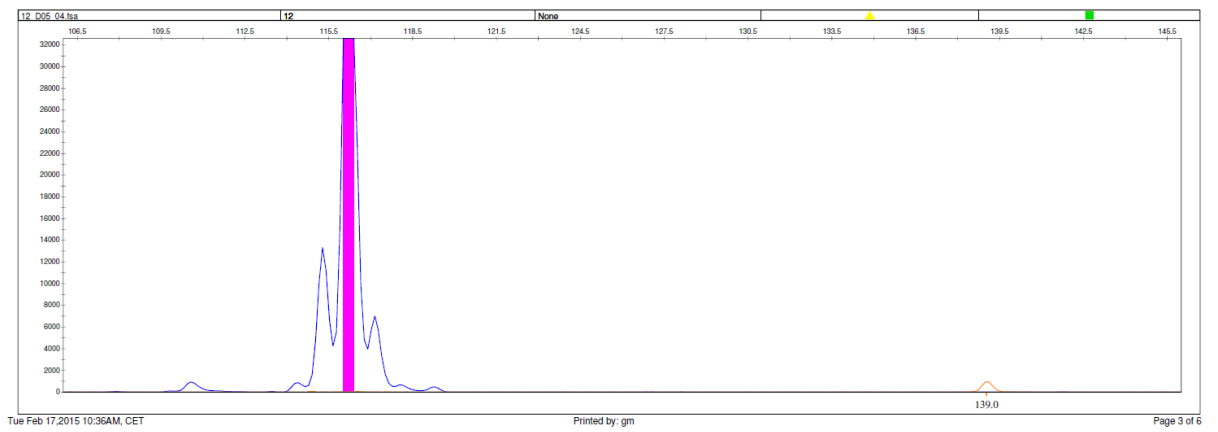
### 10. vzorek Debbie ze Zalabské samoty - clear



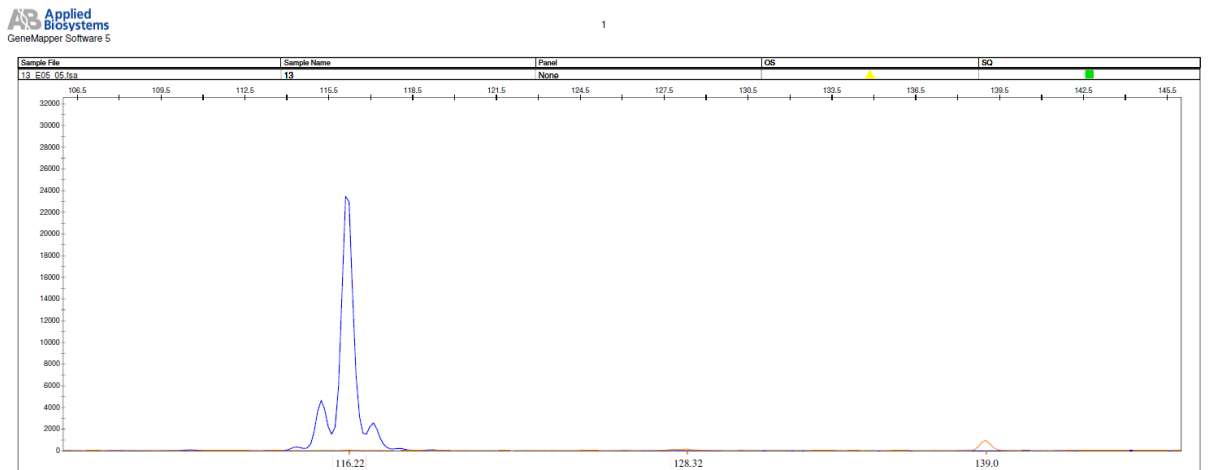
### 11. vzorek Lovable Babe of Eilatn - clear



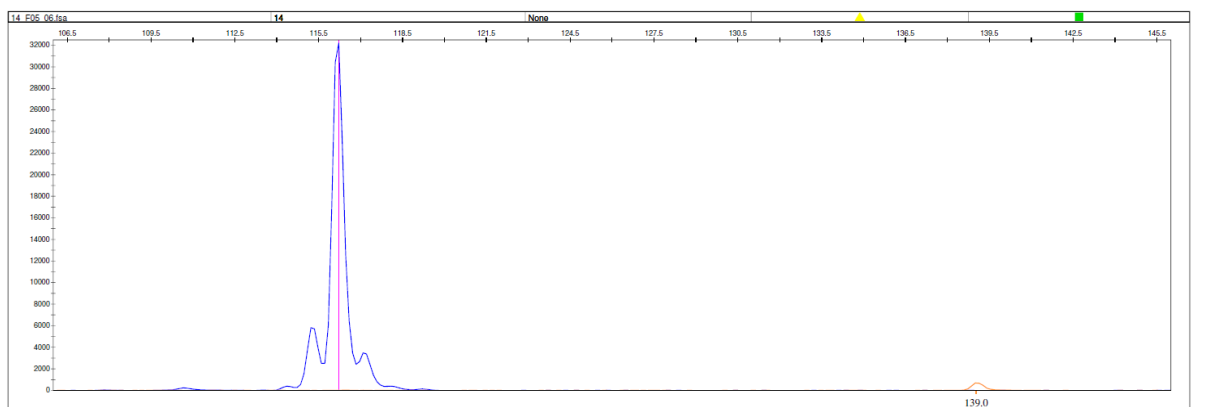
### 12. vzorek - Zaby Red Warrior Fransimo Bohemia - clear



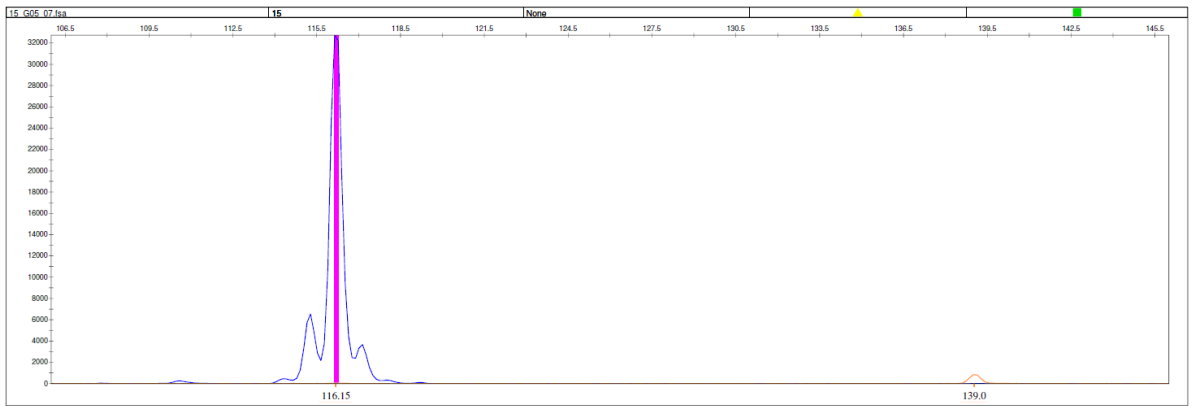
### 13. vzorek Chilly Wind Fransimo Bohemia - clear



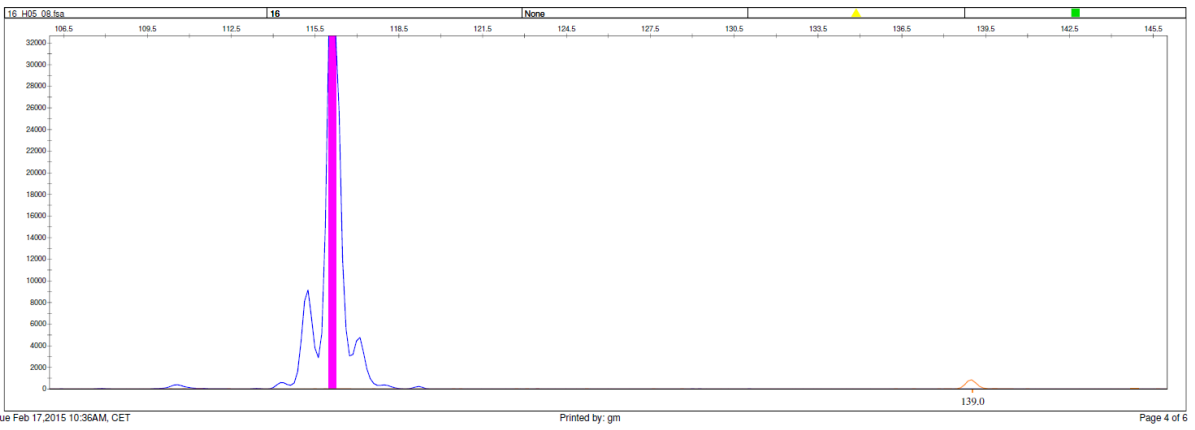
### 3. vzorek Mascot Slade Czech - clear



**15. vzorek Amazing Ellisar Black Jewels Bull - clear**



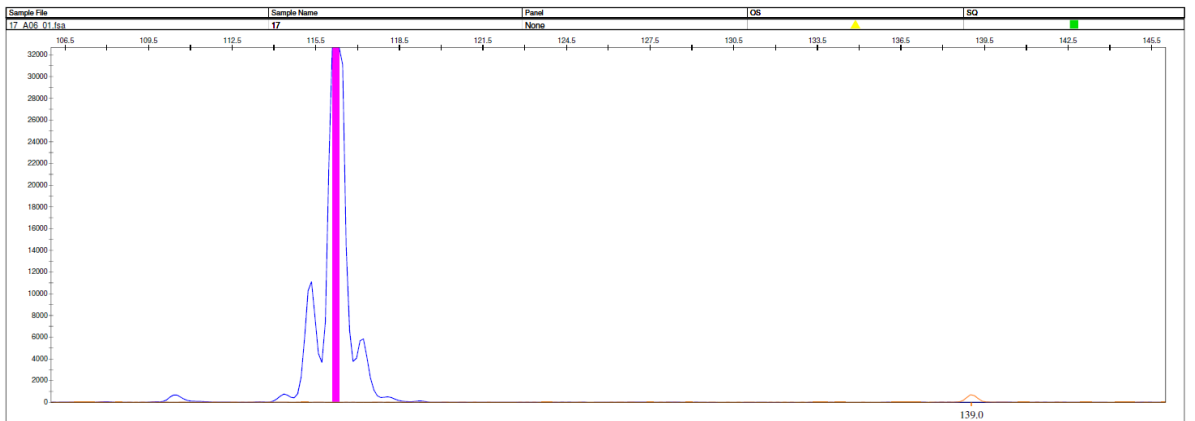
**16. vzorek - Abbie Honey Heart - clear**



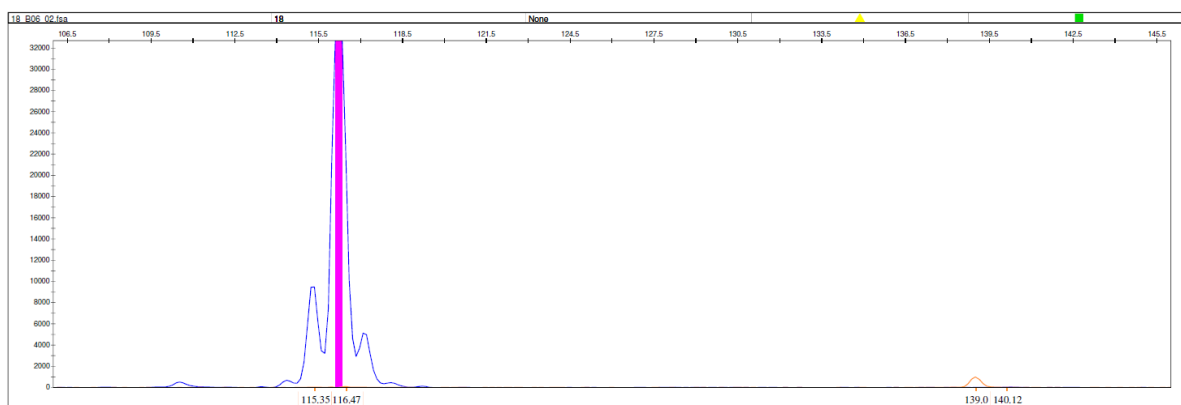
**17. vzorek - Dance Swan Warriorbull - clear**

Applied Biosystems  
GeneMapper Software 5

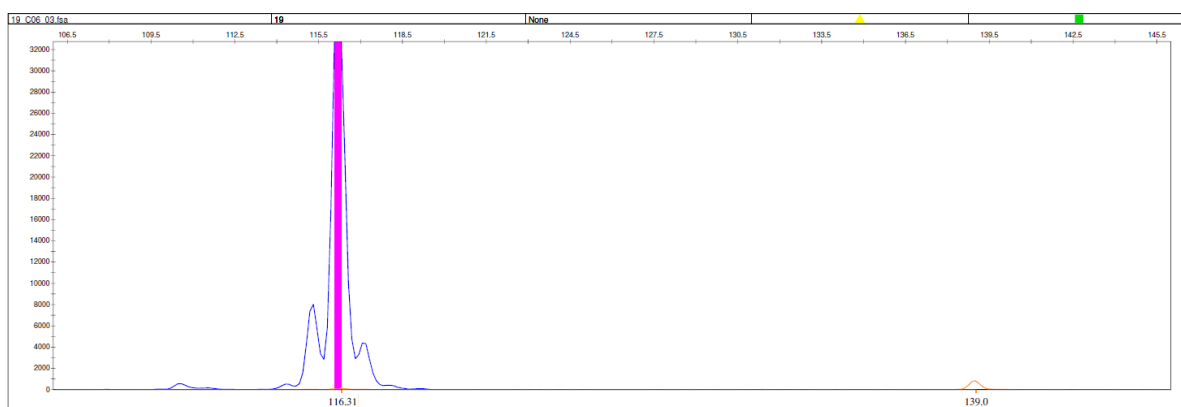
1



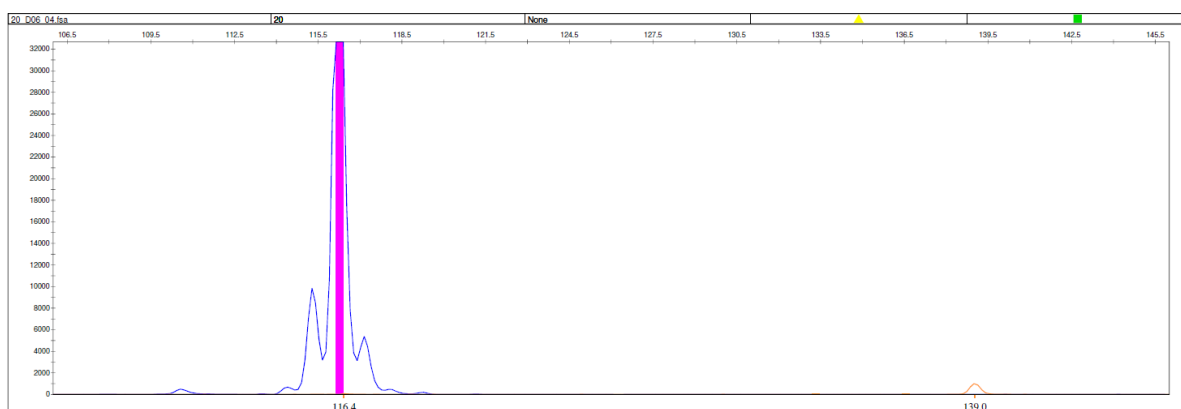
### 18. vzorek Jolly Pastaff Legion - clear



### 19. vzorek Bertone Blitz Volksbull - clear



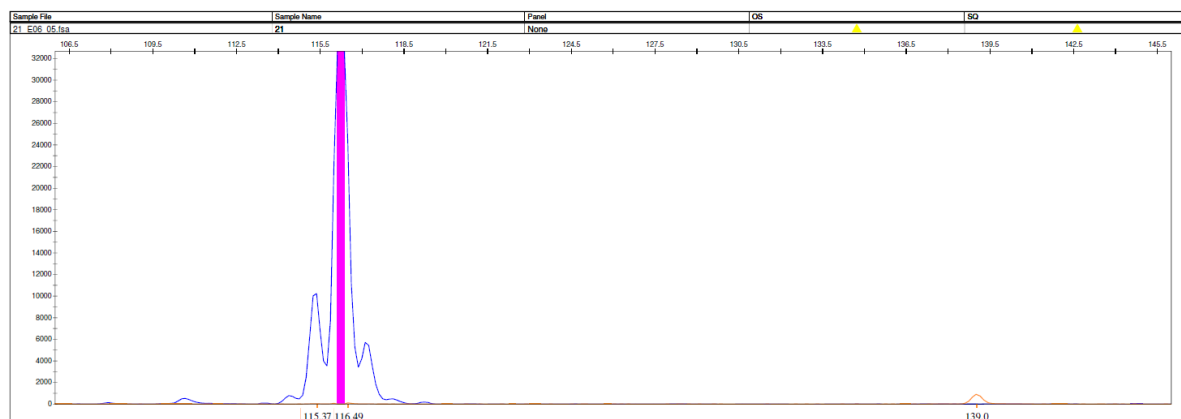
### 20. vzorek Artie Koubale - clear



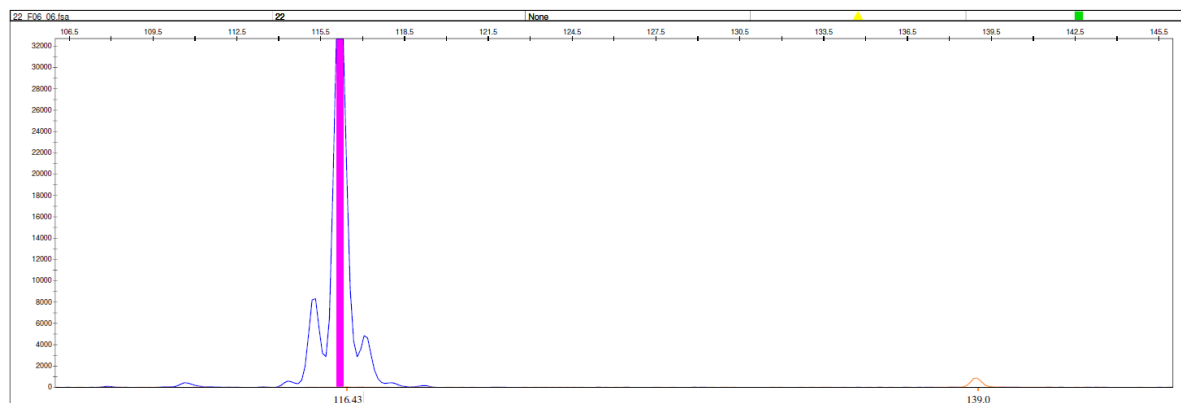
## 21. vzorek Glanc of Sama Slody CZ - clear

Applied Biosystems  
GeneMapper Software 5

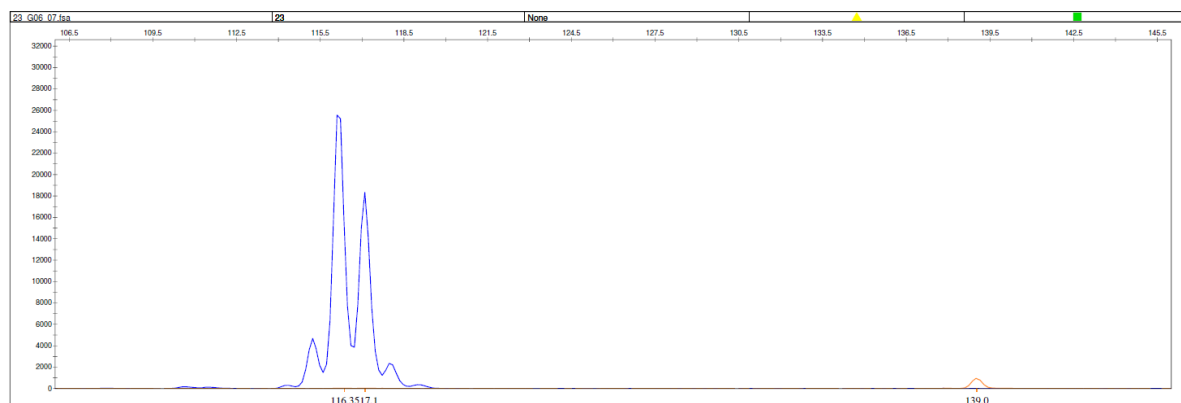
1



## 22. vzorek Chilli Pepper Wizzard Bull - clear



## 23. vzorek Heidy Olstaff - kontrolní carrier



## 24. vzorek - slepý

