

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chovu hospodářských zvířat**



**Optimalizace metod analýzy genomické DNA prasat**

**Diplomová práce**

**Bc. Lucie Němcová**  
**Živočišná produkce**

**doc. Ing. Jaroslav Čítek, Ph.D.**

© 2020 ČZU v Praze



## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Optimalizace metod analýzy genomické DNA prasat" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Čítkovi, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné rady a řešení nastalých situací při zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala mému externímu poradci a senior metodikovi v laboratoři iGenetika, ČMSCH, a.s. Ing. Daniele Schröffelové, CSc. za odborné názory a zkušenosti v oblasti molekulární genetiky. Poděkování patří i kolegům z laboratoře iGenetika, ČMSCH, a.s. za jejich trpělivost. V neposlední řadě děkuji své rodině za bezmeznou trpělivost a podporu v průběhu celého studia.

# Optimalizace metod analýzy genomické DNA prasat

## Souhrn

Metodické zpracování diplomové práce je součástí projektu NAZV Č. QK1910217, kdy dílčí část výzkumu je stanovení správné metodiky analýzy genomické DNA prasat pro následné zpracování na SNP technologiích, kde cílem je získání potřebných dat k dalšímu zpracování v rámci výzkumu. Výzkum probíhal ve spolupráci Svazu chovatelů prasat, z.s., Výzkumného ústavu živočišné výroby v Uhřetěvsi, v.v.i a Českomoravské společnosti chovatelů, a.s.

Pro úspěšné stanovení metodiky bylo potřeba stanovit mnoho cílů. Ty se zakládaly na předešlých zkušenostech při sestavování metodiky u skotu. Cíle byly zaměřené na zjednodušení a optimalizování příjmu biologických vzorků do laboratoře, jejich následné zpracování, průběh izolace a následující testace SNP. Zdroj měl laboratoři procházet v tzv. industry modelu, aby mohlo být zpracováno desítky vzorků najednou a nenarušoval se kontinuální provoz laboratoře. Samozřejmě s navýšením průchodnosti vzorků se počítalo i se snížením ceny za vzorek za provedenou izolaci DNA. Současné provádění SNP testace je časově i finančně náročné. Ohled byl brán i na chovatele prasat, aby odběr biologického zdroje byl pro ně vyhovující, nenáročný, jasný a bez komplikací. V neposlední řadě, aby odběr zdroje DNA nenarušoval welfare zvířete.

Metodicky bylo stanoveno, že doposud preferovaný odběr krve bude nahrazen jiným, neinvazivním zdrojem DNA. Nabízel se zdroj štětinové cibulky a nasální stěry, které u skotu byly přijaty bez výhrad a u některých chovatelů se nasální stěry staly hlavním posílaným biologickým zdrojem DNA. Pro prasečí štětiny musela být vytvořena adekvátní odběrová sada, vyhovující chodu laboratoře i chovateli prasat.

Dále bylo nutné vyzkoušet, které alternativní zdroje bude možné využít v případě, že nebude moci být použito prasečích štětín. Tím se rozumí reziduální zdroje DNA, zmražené krve a spermatické dávky u zvířat již nežijících, ale pro šlechtění a vytvoření genotypizované populace významných. Jednalo se však i o nativní zdroje krve a sperma.

Na základě úspěšně provedené vstupní kontroly vzorků DNA, úspěšného stanovení metodiky izolace a určení správné kontroly izolátů DNA, byla provedena testace SNP na PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina. Konečné výsledky v tzv. "call rate" ukázaly, že izolace DNA a testace SNP technologií proběhla v pořádku ohledně štětinových cibulek, krve a spermatických dávek. Naopak zdroje DNA u nasálních stěrů se ukázaly jako

nevyhovující. Metodiku, která probíhala v manuálním procesu bylo možné převést do robotického procesu. Zpracování vzorků přes roboty TECAN FREEDOM EVO A HAMILTON Firefly NIMBUS 96 proběhla v pořádku. Mohlo se dál pokračovat v genotypování vybraných zvířat.

Výsledky budou prostřednictvím ČMSCH a SCHP implementovány do chovatelské praxe.

**Klíčová slova:** prase, SNP, DNA, izolace, Illumina BeadChip

# Optimization of methods for analysis of pig genomic DNA

## Summary

Methodological elaboration of the diploma thesis is a part of the project NAZV No. QK1910217, where a part of the research is to determine the correct methodology of analysis of the genomic DNA of pigs for subsequent processing on SNP technologies. The research was carried out in cooperation with the Association of Pig Breeders, z.s., Research Institute of Animal Production in Uhřetěves, v.v.i and the Czech-Moravian Breeders Association, a.s.

Many goals had to be set for a successful methodology. These were based on previous experience in compiling the methodology for cattle. The objectives were aimed at simplifying and optimizing the acceptance of biological samples to the laboratory, their subsequent processing, isolation process and subsequent SNP testing. The source had to go through the industry model in the laboratory so that dozens of samples could be processed at the same time and the laboratory's continuous operation would not be interrupted. Of course, increasing the throughput of the samples was also expected to reduce the cost of the sample for DNA isolation. Simultaneous implementation of SNP testing is both time and financially demanding. Consideration was also given to pig farmers, so that the collection of biological resources was convenient for them, unpretentious and without any further complication. Last but not least, the collection of the DNA source does not interfere with the animal's welfare.

It has been methodically determined that the previously preferred blood collection shall be replaced by another, non-invasive source of DNA. There was a source of bristly bulbs and popular nasal swabs, which were accepted without reservation in cattle, and for some breeders, nasal swabs became the main biological source of sent DNA. For pig bristles, an adequate collection set had to be created to suit both the laboratory and the pig breeder.

It was also necessary to test which alternative sources could be used in case if pig bristles could not be used. This means the residual sources of DNA, such as the frozen blood and sperm doses, in animals which are no longer alive yet exhibit a high importance for breeding and generating a genotyped population. However, these were also native sources of blood and semen.

SNP was tested via PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina based on a successfully performed initial check of DNA samples, successful determination of isolation methodology and determination of correct control of DNA isolates. The final results in the so-called “call

rate” showed that DNA isolation and SNP testing were all right for the pig bristle, blood and sperm doses. Conversely, the DNA sources in nasal swabs have proved to be unsatisfactory.

The methodology used in the manual process could be converted into a robotic process. Sample processing via TECAN FREEDOM EVO and HAMILTON Firefly NIMBUS 96 robots performed well. Genotyping of selected animals may continue.

The results will be implemented into the breeding practice throughout ČMSCH and SCHP.

**Keywords:** pig, SNP, DNA, izolation, Illumina BeadChip



# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1</b>	<b>SNP technologie</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2</b>	<b>Illumina Porcine SNP60 v2 Genotyping BeadChip</b> .....	<b>15</b>
<b>3.3</b>	<b>Výběr vhodného zdroje DNA prasat</b> .....	<b>17</b>
3.3.1	Zdroje DNA.....	18
<b>3.4</b>	<b>Chimerismus</b> .....	<b>18</b>
<b>3.5</b>	<b>Izolační metody</b> .....	<b>19</b>
3.5.1	Metody založené na inaktivaci enzymatických kofaktorů.....	19
3.5.2	Metody založené na vazbě DNA na pevnou fázi.....	20
<b>4</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>Kriteria pro výběr vhodného zdroje DNA prasat a možné zdroje DNA prasat s ohledem na chovatelskou praxi</b> .....	<b>21</b>
<b>4.2</b>	<b>Metody izolace genomické DNA v manuálním procesu</b> .....	<b>21</b>
4.2.1	Izolace DNA z prasečích štětín v manuálním procesu .....	22
4.2.2	Izolace DNA z nasálních stěrů v manuálním procesu .....	23
4.2.3	Izolace DNA z kančího spermatu v manuálním procesu.....	24
4.2.4	Izolace genomické DNA z archivních zdrojů v manuálním procesu .....	25
<b>4.3</b>	<b>Aplikace izolátů z manuálního procesu na první PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina</b> .....	<b>26</b>
<b>4.4</b>	<b>Přechod izolačních metod do robotického procesu</b> .....	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Zjištění z hlediska kritérií pro výběr vhodného zdroje DNA s ohledem na chovatelskou praxi</b> .....	<b>28</b>
<b>5.2</b>	<b>Výsledky izolace prasečích štětín v manuálním procesu</b> .....	<b>29</b>
<b>5.3</b>	<b>Výsledky izolace nasálních stěrů v manuálním procesu</b> .....	<b>31</b>
<b>5.4</b>	<b>Výsledky izolace kančího spermatu v manuálním procesu</b> .....	<b>33</b>
<b>5.5</b>	<b>Výsledky izolace zmražené genomické krve v manuálním procesu</b> .....	<b>35</b>
<b>5.6</b>	<b>Výběr metod izolace genomické DNA z vybraných zdrojů</b> .....	<b>37</b>
<b>5.7</b>	<b>Výsledky první aplikace DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina</b> .....	<b>39</b>
<b>5.8</b>	<b>Výsledky celého robotického procesu na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina</b>	<b>41</b>
5.8.1	Izolace DNA na robotu TECAN EVO Freedom.....	41
5.8.2	Izolace DNA na robotickém izolátoru HAMILTON Firefly NIMBUS 96.....	42
5.8.3	Výsledky aplikace DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina .....	44
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>50</b>

<b>6.1</b>	<b>Pilotní studie, použití 1. čipu .....</b>	<b>50</b>
<b>6.2</b>	<b>Stanové cíle .....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>Samostatné přílohy.....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

Molekulárně genetická analýza DNA u prasat se v posledních letech soustředila zejména na analýzu genotypů, tedy kandidátních genů, a hlavně na ověřování rodičovství. Dosavadní způsob ověření rodičovství v ČR probíhalo metodou STR. V zahraničí, v chovatelsky vyspělých zemích je základním genomickým hodnocením analýza SNP pomocí technologie microarray's, tzv. čipů. Tato metoda se postupně rozšiřuje globálně a zohledňuje podmínky a možnosti každé země (Krupa & Schröffelová et al. 2019).

V současnosti rychlý rozvoj účinné genotypizace otvírá nové možnosti v genetice. Ovšem na druhé straně dochází k hromadění obrovského množství dat ke zpracování a následně k problémům jejich ukládání. Do procesu testace SNP přicházejí nové, vylepšené, více dimenzované čipy a dochází k neustálému nárůstu dat. Tento fakt vede k dalšímu rozvoji speciálních databází, které by hodnocení dat provedly rychleji a zároveň měly větší úložný prostor k ukládání dat.

Než se bude moci provést zpracování a hodnocení genomických dat (GPH), je nutné vytvořit metodiku, která stanoví podmínky, za kterých bude možné provádět úspěšně molekulárně genetické hodnocení DNA přes SNP technologie.

Prvotním krokem musí být vybrána tzv. referenční populace, na kterou se v budoucnu bude navazovat. Referenční populace je analyzována na základě dat z kontroly užítkovosti (KU), které jsou k dispozici v Plemenné knize Svazu chovatelů prasat, z.s. Výběr musí být zohledněn z mnoha faktorů. Provedení testace DNA v laboratoři musí být zohledněna možnost získání biologického zdroje DNA, aby bylo možné provést testaci a následnou analýzu přes SNP technologie. Projekt si klade cíle, že určí genotypy SNP u zvířat zařazených do Českého šlechtitelského programu. Bude možné provést populační analýzy, analýzy vztahující se ke kontrole užítkovosti (KU), v současnosti velmi zkoumaným znakům zdraví a kvality masa. Veškeré informace přispějí k dalšímu vývoji úprav šlechtitelského programu a úpravě a návrhu systému pro výpočet plemenných hodnot prasat. Ohledně šlechtitelské práce je důležité v rámci SNP testace najít geny vázané na užítkovost. Najít a sledovat nositele nežádoucích, ale i zároveň žádoucích alel a v neposlední řadě, dále pokračovat v ověřování původu zvířete, tzv. paternity (Krupa & Schröffelová et al. 2019).

V rámci tohoto výzkumu se předpokládá, že bude do laboratoře iGenetika, ČMSCH, a.s. dodáváno pro genotypování několik stovek jedinců ročně (400-500). Z počátku budou počty jedinců vyšší, aby byla rychleji vytvořena referenční populace a projekt mohl pokračovat dál ve výzkumu. Projekt v rámci laboratoře iGenetika, ČMSCH, a.s. zahrnuje vývoj nové metodiky pro testování prasat přes SNP technologie, stanovení podmínek odběru biologických zdrojů DNA tak, aby systém odběru a zdroj DNA samotný vyhovoval účelům v laboratoři a pro chovatele byl uživatelsky příjemný, zvířatům zachoval welfare. Aby nedocházelo k opakování odběrů biologických zdrojů, a tím ke zdržení celého procesu genotypování zvířete. Dále přizpůsobit analýzu DNA a testaci přes SNP technologie režimu laboratoře. Začlenění do tzv. „industry modelu“, stanovit ideální biologický zdroj DNA, který by režimu laboratoře vyhovoval a v případě potřeby testace mimořádných zdrojů DNA mít možnost je zařadit do individuálního procesu ve speciálním režimu (Krupa & Schröffelová et al. 2019).

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotézy byly stanoveny na základě předešlých zkušeností s izolací biologických zdrojů DNA u skotu v rámci „Optimalizace odběru alternativních biologických vzorků pro návaznou kvalitní izolaci genomické DNA, Certifikovaná metodika vypracovaná v rámci výzkumného projektu MZe NAZV QK1910217“.

Hypotézy byly stanovené tyto:

1. Nejvhodnějším biologickým zdrojem DNA budou prasečí štětiny
2. Nejméně vhodným biologickým zdrojem DNA budou nasální stěry

Pro dosažení výsledků stanovených hypotéz, celkového kladného průběhu izolačních metod a postoupení vybraných SNP genotypů stanovené v rámci pilotní studie do dalšího bioinformatického zpracování pro vytvoření referenční populace a vývoj postupů pro odhad genomických plemenných hodnot znaků prasat zařazených do Českého národního šlechtitelského programu, musí být stanovené dílčí cíle. Cíle zasahují do celého procesu laboratoře a jsou nedílnou součástí celého procesu.

Cíle metodiky byly stanovené tyto:

- Tradiční biologický zdroj DNA, tedy odebranou nesraženou krev, nahradit méně invazivním odběrem tak, aby byl odběr zdroje uživatelsky příjemný pro chovatele a zároveň se zachoval welfare zvířete. Snížil se náklad na odběr vzorku, bylo snazší ho uchovat i dlouhodobě a jeho přeprava do laboratoře neznamena znehodnocení zdroje (Schröffelová & Němcová et al. 2019).
- Odůvodnit výhody vybraného biologického zdroje DNA na základě stanovených priorit a kritérií (Schröffelová & Němcová et al. 2019).
- Dle současného trendu vývoje metod molekulárně genomických analýz genomu prasat definovat volby biologického vzorku určeného k izolaci genomické DNA vhodné pro aplikaci v SNP technologiích, zejména pak k analýzám na microarray's – PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina (Schröffelová & Němcová et al. 2019).
- Při výběru vhodného zdroje DNA vycházet z potřeb chovatelů a zachovat komfort v chovatelské praxi při odběru vzorku, zároveň zohlednit potřeby laboratoře pro rutinní běh příjmu a následné zpracování vzorků, automatizace izolace DNA a následné využití v robotické praxi (Schröffelová & Němcová et al. 2019).
- Vyvinout a odzkoušet odběrovou sadu/sady pro vytipovaný zdroj/zdroje DNA, nebude-li vhodná odběrová sada komerčně dostupná (Schröffelová & Němcová et al. 2019).
- Nabídnout chovatelům prasat a zainteresovaným organizacím jednoduchý postup, podle kterého budou v chovech prasat plošně odebírány standardizované biologické vzorky do optimalizovaných odběrových sad (Schröffelová & Němcová et al. 2019).

- V procesu vytváření referenční populace využít nestandardních zdrojů DNA, pokud nebude k dispozici jiný biologický zdroj, tj. archivní a reziduální zdroje.
- Výběrem vhodného biologického zdroje DNA, zpracováním postupu odběru biologického zdroje, postupným vývojem odběrové sady dosáhnout komplexní optimalizace procesu odběru vzorků a snížit tím potřebu žádat o opakovaný odběr vzorku (Schröffelová & Němcová et al. 2019).
- Určit postup v prvotní analýze vzorku tak, aby se nekvalitní odběr biologického materialu DNA vyřadil ještě před jeho zařazením do procesu a jeho následném zpracováním na microarray's. Z toho vyplývá i snížení nákladů vynaložených na nekvalitní biologický zdroj (Schröffelová & Němcová et al. 2019).
- Pomocí kvalitní odběrové sady a primární analýzy vzorku, následné kontrole kvality izolované DNA před zařazením do procesu genomické SNP analýzy změřit výskyt nekvalitních a předvídatelných chyb, které by ovlivnily následný proces. Jedná se zejména o finální stránku SNP microarray's analýz a následně o narušení rutinního procesu v laboratoři (Schröffelová & Němcová et al. 2019).
- Po výběru efektivního biologického zdroje DNA stanovit, která metoda izolace z hlediska náročnosti na kvalitu izolované DNA je nejvhodnější, pro následné SNP analýzy (Schröffelová & Němcová et al. 2019).
- Po procesu manuální izolace DNA a prověření kvality izolované DNA, přejít na proces robotizace
- V robotickém procesu porovnat, zda pro SNP microarray's analýzu je vhodnější izolace prováděná na robotu TECAN EVO FREEDOM či robotu HAMILTON FIREFLY NIMBUS 96. Vhodnost robotické izolace vyhodnotíme v úplné závěrečné fázi hodnocení na iScan pomocí výsledků tzv. call rate.

### 3 Literární rešerše

Ověření rodičovství je zásadní pro optimální genetické řízení v chovatelství a chovu hospodářských zvířat. Tradičně byly příbuzenské záznamy uloženy do šlechtitelských programů. Pokud jsou však tyto genealogie neúplné nebo nepřesné, tato data mohou vést k odchylkám a chybám v analýze, které by mohly způsobit neočekávané nebo stochastické údaje produkce, což vede ke snížení ekonomických zisků. Pro dosažení stabilního šlechtění v požadovaném směru byly proto molekulární markery použity k rozlišení předků chovných populací. Krátké tandemové opakování (STR, mikrosatelity) byly nedávne i mezinárodní preferované molekulární markery ke sledování informací z plemenných knih od druhů až po individuální úroveň ve všech typech organismů (Lacombe et al. 2013).

Praktické využití molekulárně genetické analýzy DNA u prasat se v posledních třech desetiletích tradičně soustředilo zejména na analýzy genotypů tzv. kandidátních genů a na ověřování rodičovství. Plnému využití potenciálů SNP technologií a následných genomických analýz ve šlechtění prasat bránily limity „tradičních“ – méně výkonných analytických metod, které poskytují (zejména pokud jde o kvantitu) pouze omezené informace o genomu prasat (Ramos et al. 2009; Krupa & Schröffelová et al. 2019). Tento limit by mohl být odstraněn aplikací technologie microarray's – „DNA čipy“, která umožňuje detekovat desetitisíce SNP variant v rámci jedné analýzy (Ramos et al. 2009).

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

#### 3.1 SNP technologie

V posledních letech se ukázalo, že SNP jsou citlivější a přesnější než mikrosatelity a staly se výhodnějším alternativním markerem na celém světě (Pakstis et al. 2010; Kayser a de Knijff 2011; Kidd et al. 2011).

Jednonukleotidové polymorfismy (SNP), které se nacházejí v celém genomu, mají jak nízkou míru mutace ( $\sim 2,5 \times 10^{-8}$  na generaci), tak nízkou chybovost genotypování, a jsou snadno přenositelné skríníngem s vysokou propustností (Werner et al. 2004; Baruch & Weller 2008; Honda et al. 2009).

Kvalitně izolovaná DNA je nutnou podmínkou korektního výsledku všech DNA analýz, což dvojnásob platí pro vysoce výkonné SNP technologie. Kvalita DNA extraktu určuje míru úspěšnosti SNP genotypizace na microarray's vyjádřenou tzv. call rate. Call rate se rovná počtu SNP, u kterých byl při genotypizaci na čipu stanovený SNP genotyp, děleno celkovým počtem SNP na čipu (Huentelman et al. 2005; Schröffelová & Němcová et al. 2018).

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

Podle typu využití čipové analýzy je možné DNA technologie-microarrays rozdělit do dvou skupin. První na expresní čipy obsahující jako sondy buď dvouřetězcové úseky molekul cDNA (komplementární DNA) vzniklé reverzní transkripcí mRNA, nebo oligonukleotidové sondy sekvenčně specifické pro každý gen z genomu (Pospíšilová & Mayer 2005; Dvořáková 2011). Druhé na mutačně specifické oligonukleotidové čipy (čipy s uměle syntetizovanými oligonukleotidy o délce 25-70 bp), jež zahrnují nové sekvenační přístupy tzv. metody druhé či další generace. V současné době se tyto přístupy využívají pro celogenomové sekvenování a detekci nových SNP (Morozova & Marra 2008; Dvořáková 2011). Komerčně dostupné techniky z rodiny sekvenování nové generace (next generation sequencing – NGS) poskytují firmy, kterými jsou například Roche/454, Illumina/Solexa, Life/APG a Helicos BioSciences (Metzker 2009).

Úskalím techniky DNA čipů je samotná hybridizační reakce mezi DNA sondami imobilizovanými na čipu a vzorkem DNA. Čipy nejsou vhodné pro detekci inzerčních a delečních mutací v genech. Avšak i přes tato úskalí mají microarray's nesporný význam jak v rámci šlechtitelských programů prasat, tak v humánní medicíně (Gojová & Kozák 2006; Dvořáková 2011). Lze říci, že individuální identifikace založená na markerech SNP se stala důležitým nástrojem v biochemickém a fyziologickém výzkumu (Seeb et al. 2011; Goedbloed et al. 2013 a, b).

### **3.2 Illumina Porcine SNP60 v2 Genotyping BeadChip**

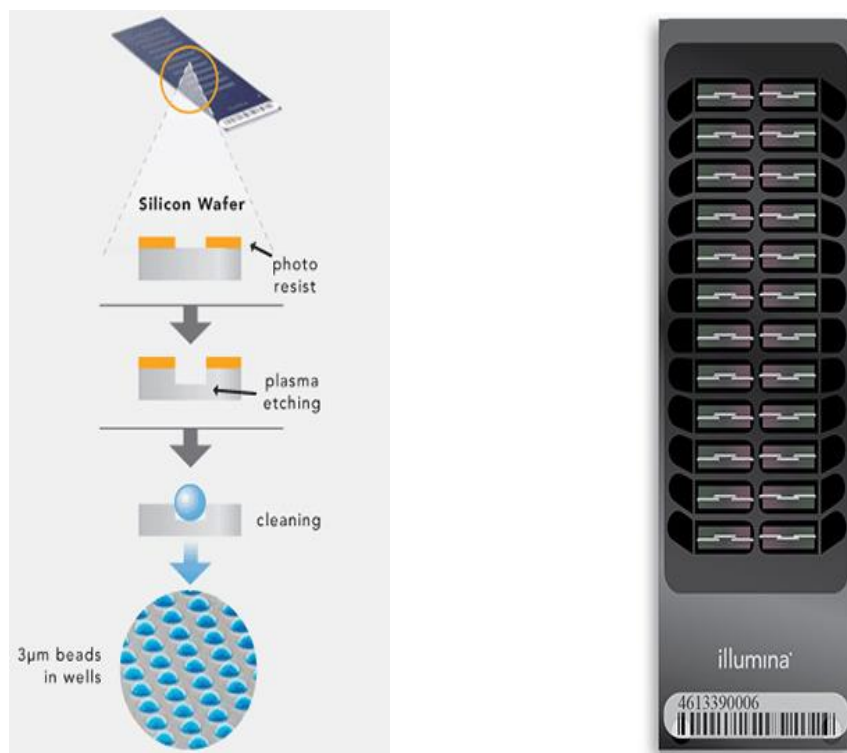
Princip techniky DNA čipů spočívá v hybridizační reakci mezi vzorkem DNA a sekvenčně specifickými DNA sondami, které jsou vázány na povrchu čipu. Na čipu může být imobilizováno až několik stovek tisíc sond specifických pro různé úseky DNA, což umožňuje analyzovat široké spektrum mutací (Gojová & Kozák 2006).

Jako velmi slibný nástroj v rámci předgenomické selekce či identifikace QTL mohou být právě mutačně specifické oligonukleotidové čipy, jež zahrnují detekci statisíců SNP (někdy nazýván jako SNP čip) (Meuwissen et al. 2001).

BeadChip PorcineSNP60 v2 (obrázek 1) je nejkompexnější genotypové pole genotypu pro prasečí genom, poskytující vynikající sílu k výsledku genetické variace napříč mnoha prasaty plemena, včetně Duroc, Landrace, Pietrain a Large White (Illumina2; Illumina3).

BeadChip PorcineSNP60 v2 obsahuje více než 64 232 SNP, které rovnoměrně překrývají prasečí genom. Čip umožňuje širokou škálu aplikací, jako je výběr genomu, identifikace kvantitativní vlastnosti loci, hodnocení genetické hodnoty, mapování křížení, studie vazebních nerovnováh, srovnávacích genetických studií a plemene charakterizace pro hodnocení biologické rozmanitosti (Illumina2; Illumina3).

PorcineSNP60 v2 BeadChip je kompatibilní s iScan® a HiScan® Systems. Tyto skenery pole mají vysoce výkonné lasery a výkonné optické systémy, které umožňují rychlé doby skenování a přesné detekce testu. V rámci pracovního postupu Infinium Assay jsou data zpracovávána přímo do softwaru Illumina GenomeStudio®, který poskytuje efektivní řešení call rate, analýzy a vykazování genotypu (Illumina1 datasheet porcinesnp60.pdf).



Obr. 1. BeadChip PorcineSNP60 v2

Zdroj: <https://www.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/porcine-snp60.html>  
<https://www.illumina.com/science/technology/beadarray-technology.html>

Infinium iSelect HD nebo HTS Custom Genotyping BeadChips je čip, který je na základě žádosti zákazníka individualizován. Výrobce čipů přijímá podmínky pro vytvoření speciálního, vlastního nadefinovaného čipu zákazníka. Čip obsahuje vlastní testované oblasti zákazníka a vytváří tak cílené, vysoce výkonné aplikace genotypizace přizpůsobené konkrétním potřebám projektu (Illumina2; Illumina3).

GGP Porcine je dalším čipem, který je možno využít pro genotypizaci prasat. GGP Porcine BeadChip je postaven na platformě Infinium společnosti Illumina a je jedním z nejkompexnějších řešení, která jsou k dispozici pro genotypizaci prasat v celém genomu. Tato vylepšená třetí generace BeadChip obsahuje více než 51 000 rovnoměrně distribuovaných SNP. SNP jsou rovnoměrně distribuovány v autosomech, ale jsou koncentrovanější v telomerách, aby odpovídaly za vyšší rychlosti rekombinace. Průměrná vzdálenost sondy je 43 kb. GGP Porcine BeadChip také zahrnuje několik genetických markerů, které mohou přímo ovlivňovat vlastnosti nemoci a výkonnosti u prasat, jako jsou:

- SNP WUR10000125, který má vliv na toleranci PRRS
- Defekt dystrofinu, který je spojen s prasečím stresovým syndromem
- Běžně využívané rodičovské/identitní SNP pro USDA
- Stresový syndrom prasat (HAL)
- Ryanodinový receptor (RN)
- Marker, který může odvodit rezistenci vůči E. coli (F4 ab/ac)



- SNP, u kterých bylo prokázáno, že mají vliv na příjem krmiva/konverzi/ přírůstek hmotnosti, chudý růst/obsah tuku a kvalitu masa ( Neogen1).

### 3.3 Výběr vhodného zdroje DNA prasat

Kvalitně izolovaná DNA je nutnou podmínkou korektního výsledku všech DNA analýz, což dvojnásob platí pro vysoce výkonné SNP technologie. Kvalita DNA extraktu určuje míru úspěšnosti SNP genotypizace na microarray's vyjádřenou tzv. call rate, který vyjadřuje podíl stanovených SNP genotypů k celkovému počtu genotypů na čipu (Huentelman et al. 2005).

Doposud byla klasickým biologickým zdrojem pro izolaci DNA krev. Jednalo se o nesrážlivou žilní krev, odebíranou do zkumavek s antikoagulačním roztokem. Antikoagulační roztoky, které se nejčastěji používají jsou citrát sodný čili Trisodium citrate, K<sub>2</sub>EDTA, K<sub>3</sub>EDTA, Na<sub>2</sub>EDTA atd. (Schröffelová & Němcová et al. 2018).

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

Výjimkou je DNA získaná z některých tkání dvouvaječných (fraternálních) dvojčat u vybraných druhů zvířat, především u skotu, u kterých byl zaznamenán výskyt tzv. chimerismu. Tento jev byl popsán v souvislosti s vícečetnou graviditou u skotu v souvislosti s ověřováním původu (Owen 1945; Verdonck et al. 1996; Ron et al. 1995). S ohledem na typ placenty prasnice, nebyl tento jev u druhu *Sus scrofa* ani *Sus scrofa f. domestica* pozorován, proto nemusí být při výběru vhodného zdroje DNA u prasat zohledněn. (Schröffelová & Němcová et al. 2018)

Ke vhodnému výběru zdroje DNA prasat přistupujeme s ohledem na více faktorů. Jednak z pohledu požadavků laboratoře, která musí zohlednit množství zpracovaných vzorků v budoucnu, jejich náročnost pracování v metodickém postupu, finální náročnost a fakt, že se v laboratoři bude postupovat v tzv. industry modelu. Dále z pohledu zvířete, aby byl při odběru vzorku zachován welfare zvířete. V neposlední řadě musíme zohlednit chovatele, abychom přihlíželi k zatížení z finální stránky a náročnost odběru vzorku DNA, potřeby dalšího kompetentního zaměstnance či veterináře. A nakonec, jakým způsobem bude vzorek uchováván, přepravován do laboratoře (Schröffelová & Němcová et al. 2018; Schröffelová & Němcová et al. 2019).

V případě biologického zdroje DNA krve je zapotřebí jednak přítomnosti erudovaných osob: chovatele, veterináře, dále fixování zvířete a invazivní odběr, narušení welfare zvířete. Následně odběr krve do speciální zkumavky s antikoagulačním roztokem a co nejdříve odeslat do laboratoře ke zpracování, aby nedošlo k degradaci vzorku. Velký vliv na kvalitu odebrané krve mělo zacházení majitele či veterinárního lékaře se vzorkem, následné uchovávání a doba uchovávání odebrané krve a klimatické podmínky. Odesílání krve do laboratoře před víkendem, v době horkých dní či naopak velkých mrazů vedlo taktéž k degradaci odebraného vzorku krve. Docházelo i k poškození zkumavek během manipulace balíčku v přepravních společnostech. Celkově lze říci, že odběr nesrážlivé krve je nekomfortní (Schröffelová & Němcová et al. 2018; Schröffelová & Němcová et al. 2019).

Odběr nesrážlivé krve poskytuje dostatečné množství kvalitního zdroje DNA, umožňujícího získat uspokojivý výtěžek izolované DNA v požadované koncentraci a čistotě, s možností aplikace řady alternativních izolačních metod v manuálních i robotických protokolech (Schröffelová & Němcová et al. 2018).

### 3.3.1 Zdroje DNA

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

DNA lze získat také z reziduálních, částečně biologicky degradovaných a jinak nestandardních zdrojů – tuby po inseminaci, dlouhodobě zmražené (archivní) krevní vzorky apod. Z nestandardních zdrojů je možné vhodně zvolenou a individuálně praktikovanou metodou izolovat genomickou DNA a následným nabožením výtěžku in vitro docílit možnosti aplikovat takto upravenou DNA na microarray. Tento složitý, časově náročný a finančně nákladný postup však nelze aplikovat při plošné genotypizaci velkého počtu vzorků (Beránek et al. 2012), nicméně je žádoucí tyto techniky metodicky rozpracovat pro případy, kdy bude nutné získat pro referenční skupinu genotypy cenných již nežijících jedinců, ze kterých nebude k dispozici standardní zdroj DNA v potřebné kvalitě a/nebo kvantitě (Schröffelová & Němcová et al. 2019).

## 3.4 Chimerismus

Termín chimerismus pochází z řeckého slova *Chimaira* (Χίμαιρα), které označovalo mytologickou bytost, která měla tělo lva, hlavu kozy a hadí ocas. V medicíně byl tento výraz poprvé použit Andersonem v roce 1951. Podle jeho „buněčné“ koncepce je chiméra organismus, který se skládá z buněk pocházejících ze dvou zygotických linií (Bader et al. 2005).

Chiméra je organismus, který je tvořen dvěma nebo více různými genotypy, často jako následek transplantací nebo při embryonálním vývoji, kdy kmenové buňky jednoho embrya jsou zachyceny jiným embryem geneticky odlišným. Rozlišení MZ dvojčat je v tomto případě problematické, neboť striktně řečeno, každá genetická různorodost je klasifikována jako mosaikismus. Nicméně někteří autoři používají termín chimérismus pro přenos kmenových buněk z jednoho dvojčete na druhé, jestliže toto nastalo během jejich vzniku. Např. dvojče A se mírně geneticky odlišuje od dvojčete B, a dvojče B má některé kmenové buňky od dvojčete A. Mosaikismus tedy popisuje různé buněčné linie, které vznikly jako výsledek mutace uvnitř jednoho dvojčete po rozdělení dvojčat (Rogers et al 1982; Fikejzlová 2009).

U monochorionických dvojčat, které sdílejí jednu placentu, se může vyskytnout transfuzní syndrom a kmenové buňky tak mohou být přenášeny z jednoho dvojčete do druhého pomocí placentárních anastomóz. Toto může být označováno jako pseudomosaikismus nebo chimérismus. Např. během fetálního vývoje jsou kmenové buňky jednoho dvojčete přenášeny do kostní dřeně. Pro genetické porovnání monochorionických MZ dvojčat je důležité provádět genotypování tkáně (např. kostní fibroblasty), nestačí spoléhat jen na krevní lymfocyty.

To naznačuje přítomnost chimérismu v krvi a kostní dřeni, ale ne v somatických buňkách (Rogers et al. 1982; Fikejzlová 2009).

DNA získaná z některých tkání fraternálních dvojčat u vybraných druhů zvířat, především u skotu, u kterých byl zaznamenán výskyt tzv. chimerismu, byl popsán v souvislosti s vícečetnou graviditou u skotu v souvislosti s ověřováním původu (Owen 1945; Verdonck et al. 1996; Ron et al. 1995). S ohledem na typ placenty prasnice, nebyl tento jev u *druhu Sus scrofa* ani *Sus scrofa f. domestica* pozorován, proto nemusí být při výběru vhodného zdroje DNA u prasat zohledněn (Schröffelová & Němcová et al. 2019).

Na základě praxe z ověřování původu u skotu to znamená, že v případě zaznamenání dvojčat je potřeba odebírat chlupy či ušní štěpy (TSU, nekontaminované krví). Krev a nasální stěry jsou nevyhovující a degradují následné výsledky v procesu ověření původu zvířete.

### 3.5 Izolační metody

Systém odběru vzorků určených k izolaci genomické DNA a její následné aplikaci na microarray's – PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina primárně vychází z nároků na kvalitu izolované DNA, která do analytického procesu vstupuje, přesně definovaného v rutinním protokolu Infinium HD technologie (Infinium® HD Assay Protocol Part # 11328087, Rev. B November 2009). Doporučené hodnoty čistoty a koncentrace DNA uvádí dodavatel PorcineSNP60 v2 BeadChips technologie, firma Illumina, Inc., v instrukčním manuálu: měřeno spektrofotometricky – NanoDrop2000. Ratio of the absorbance: A260/280 a A260/230 = 1,8 – 2,1 a limitní koncentrace: 50 ng/μL (Schröffelová & Němcová et al. 2019).

Vhodnou metodu izolace DNA volíme na základě souběžného posouzení několika různých kritérií, ke kterým patří vlastnosti výchozího biologického vzorku – zdroje DNA, předpokládaný výtěžek a kvalita DNA požadované následnou analytickou metodou, robustnost a opakovatelnost metody izolace a v neposlední řadě i časová a finanční náročnost metody izolace (Raška 2006; Beránek et al. 2006; Schröffelová & Němcová et al. 2019).

#### 3.5.1 Metody založené na inaktivaci enzymatických kofaktorů

Podstatou je separace buněčného lyzátu pomocí centrifugace, po které následuje přidání tzv. chelatačních činidel – látek, které jsou na sebe schopny vyvazovat některé typy iontů. V praxi je nejčastěji používán Chelex–100, iontoměničová pryskyřice, která vyvazuje dvojmocné ionty kovů. Přidáním Chelexu–100 k lyzátu dojde k vyvázání hořčnatých iontů z roztoku, které pak nemohou plnit funkci kofaktorů, a tudíž endonukleázy nemohou enzymaticky štěpit DNA; tím je izolát stabilizován. DNA nebývá z roztoku precipitována ani dále pročišťována (Walsh et al. 1991; Schröffelová & Němcová et al. 2019). Izolace DNA pomocí chelexu je velmi jednoduchá, rychlá, poměrně levná a účinná metoda nevyžadující použití organických rozpouštědel. Nejčastěji je tato metoda spojována s oblastí forenzní genetiky, kdy se DNA izoluje například ze zaschlých krevních vzorků, tkání, vlasů, kostí, vzorků slin ulpěných například na cigaretovém nedopalku nebo z bukálních stěrů. Nevýhodou této techniky je, že při ní nejsou z roztoku odstraňovány inhibitory, je tedy možné ji použít pouze v případě vzorků s malým množstvím inhibitorů (Šimková 2012).

### 3.5.2 Metody založené na vazbě DNA na pevnou fázi

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

V praxi jsou užívána dvě základní uspořádání postupu založeného na vazbě DNA na pevnou fázi:

- tzv. **silikátové kolonky**, kde je DNA zachycena na kolonce během centrifugace lyzátu, poté je přečištěna a následně uvolněna do čistého elučního roztoku – „**metoda KOLONKY**“ (Schröffelová & Němcová et al. 2019)
- tzv. **magnetosilikové partikule**, kde se DNA naváže na paramagnetické kuličky, které mohou být manipulovány pomocí magnetu – např. vyjmuty z roztoku, přeneseny do přečišťovacích roztoků a z nich nakonec do elučního roztoku, kde je DNA uvolněna – „**metoda MAGNETICKÉ KULIČKY**“ (Schröffelová & Němcová et al. 2019). Princip metody se odvíjí od fyzikálně-chemických vlastností částic, které jsou schopny navázat bioreaktivní molekuly díky reakci na vnější magnetické pole. V praxi to probíhá tak, že se magnetické částice přidají ke vzorku a dojde k navázání cílených molekul. Následně dojde pomocí magnetu k přitáhnutí takto modifikovaných částic ke stěně zkumavky a zbylý roztok s nenavázanými látkami je odstraněn. Po promytí dojde k uvolnění částic s navázanými molekulami do přidaného roztoku a následně díky následným krokům proběhne oddělení navázaných molekul od magnetických částic. Takto je možné získat samostatné cílené molekuly, vhodné pro použití k dalším analýzám (Hůska et al. 2008).

## 4 Metodika

U vybraného souboru prasat byly testovány různé zdroje DNA a jejich následné nejvhodnější izláty k získání DNA vhodné k analýze pro SNP technologie. K posouzení vhodnosti byly zvoleny zdroje: chlupové (štětinové) cibulky, mražené a nativní sperma, nasální stěry, nativní a mražená nesrážlivá krev. Hodnotila se náročnost zpracování zdrojů DNA, následně kvalita získané DNA. Dále se hodnotil, který zdroj DNA je nejvhodnější a nejspolehlivější pro následné zpracování v molekulárně genetických analýzách. Posouzeny byly kritéria nárokováná chovateli při odběru a laboratorní nároky. Metodické zpracování je součástí projektu NAZV Č. QK1910217.

### 4.1 Kritéria pro výběr vhodného zdroje DNA prasat a možné zdroje DNA prasat s ohledem na chovatelskou praxi

Pro výběr vhodného odběru biologického materiálu s úmyslem izolace genomické DNA prasat musíme stanovit několik kritérií, na jejichž základě můžeme posuzovat vhodnost odběru. Kritéria byla stanovená tato:

- INVAZIVITA ODBĚRU – úkon odběru zdroje byl posouzen s ohledem na welfare zvířete během odběru a nutnost asistence veterinárního lékaře při odběru – Vyhláška 19/2018 Sb. (Schröffelová & Němcová et al. 2019)
- POŘIZOVACÍ NÁKLADY NA ODBĚROVOU SADU SLOŽITOST PROVEDENÍ ODBĚRU – nutnost proškolení osob k provedení odběru, potřeba fixace zvířete, případně nutnost asistence dalších osob u odběru, časová náročnost apod. (Schröffelová & Němcová et al. 2019)
- NÁROKY NA UCHOVÁVÁNÍ ODBĚROVÉ SADY – posouzena možnost dlouhodobého uchovávání odběrových sad při pokojové teplotě před odběrem a po něm. (Schröffelová & Němcová et al. 2019)
- RIZIKO ZNEHODNOCENÍ VZORKU BĚHEM TRANSPORTU DO LABORATOŘE – posouzena odolnost vzorku vůči extrémním teplotám a vůči mechanickému poškození vzorkovnice během transportu (Schröffelová & Němcová et al. 2019)
- PROSTOROVÉ NÁROKY NA ARCHIVACI BIOLOGICKÝCH ZDROJŮ PO PROVEDENÍ IZOLACE GENOMICKÉ DNA – tato skutečnost je dána potřebou uchovávat původní zdroje DNA pro případnou nutnost revize provedených zkoušek, nebo jejich rozšíření o nové metodické postupy v návaznosti na expanzi využívání SNP technologií jako nástroje pro šlechtění prasat v ČR v budoucnu (Schröffelová & Němcová et al. 2019).

### 4.2 Metody izolace genomické DNA v manuálním procesu

Abychom zakončili testaci genomické DNA v rámci nových SNP technologií úspěšně, musíme zprvopočátku postupovat zcela bez robotických izolátorů a postupně navazovat na

robotické požadavky a jejich náročnosti z hlediska kvality zpracované DNA z odebraného vzorku.

Při manuální izolaci už musíme dopředu počítat s požadavky dané dodavatelem robotických izolátorů a následně BeadChips technologie v zastoupení firmy Illumina, Inc. Jedním ze zásadních požadavků je kvalita izolované DNA. Doporučené hodnoty čistoty a koncentrace DNA uvádí dodavatel PorcineSNP60 v2 BeadChips technologie, firma Illumina, Inc., v instrukčním manuálu: měřeno spektrofotometricky – NanoDrop2000. Ratio of the absorbance: A260/280 a A260/230 = 1,8 – 2,1 a limitní koncentrace: 50 ng/μL (Schröffelová & Němcová et al. 2019).

V současné době se nám významně zužuje množství izolačních metod, které můžeme efektivně využít a snadno aplikovat. Důvodem jsou specifické vlastnosti biologického zdroje, který vstupuje do procesu izolace DNA, dále to jsou vysoké požadavky na hodnoty čistoty a koncentrace vstupní DNA. A nesmíme opomenout stav laboratoře, která přechází do rutinního procesu tzv. industry modelu.

#### **4.2.1 Izolace DNA z prasečích štětín v manuálním procesu**

Základem pro úspěšnou izolaci DNA z prasečích štětín je kvalitní odběr zdroje. Tedy pro získání kvalitního výsledku použitelné koncentrace DNA potřebujeme kvalitně vytržené prasečí štětiny, které budou mít na koncích výrazné folikuly. U skotu se kvalitní odběr chlupových folikulů provádí z konce ocasu. U prasat se povětšinou trhá ze hřbetu či ocásku. V žádném případě se nesmí odebírat vytláčené štětiny. Nekvalitně odebrané prasečí štětiny ztěžují jednak izolační proces, kde musíme přistupovat ke vzorku individuálně, začíná se navyšovat cena izolačního procesu jak pro laboratoř, tak zejména pro chovatele. Také nastává problém s rutinním provozem, kdy se vzorek vyřazuje z rutinního procesu a vstupuje do dalších kroků izolace později.

- **Příprava a odběr štětínových cibulek**

Pro získání použitelného biologického materiálu je nutné prasečí štětiny zpracovat. Přijaté prasečí štětiny, nejlépe v odběrové sadě, značíme pořadovým číslem. Do připravené eppendorfovy zkumavky, opatřené přiřazeným číslem vzorku nastříháme 30-40 štětínových cibulek. Podle kvality biologického zdroje. U opravdu kvalitních folikulů stačí menší množství. Naopak u horších zdrojů musíme nastříhat větší počet cibulek, abychom dosáhli požadované koncentrace. Právě potřebná DNA je následně získávána ze štětínových cibulek.

Pro první manuální proces izolace DNA byly vybrány náhodné odběry z různých zdrojů, na základě výběru Svazu chovatelů prasat, z.s. Odběry jsou sestaveny v rámci řešení projektu MZe NAZV QK1910217. Odběry probíhaly ve třech vybraných šlechtitelských chovech. Do procesu izolace bylo vybráno, po přezkoumání kvality odebraného zdroje, 24 prasečích štětín. Dále byly vybrány další 3 zdroje prasečích štětín z Testační stanice Ploskov, Fakulty Agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, ČZU Praha.

- **Proteolýza štětínových cibulek**

Dalším krokem k úspěšné izolaci je tzv. proteolýza. Tento krok probíhal za použití kitu od firmy Omega Bio – Tek. Součástí izolačního kitu je proteolytický enzym a pufr.

- **Izolace DNA**

Izolace proteolyzované DNA probíhala v manuálním režimu podle návodu izolačního kitu. Jedná se o izolování metodou tzv. kolonky, od firmy Gene All. Při této metodě máme jistotu, že čistota a koncentrace bude v nejvyšší možné kvalitě. V manuálním provedení je metoda vcelku náročná na zajištění potřebných teplot a dodržení časových postupů.

- **Primární kontrola kvality izolované DNA**

Kontrola kvality izolované DNA probíhala na spektrofotometru NanoDrop 2000 od firmy ThermoScientific.

K dalšímu procesu analýzy byly puštěny všechny extrakty DNA, které měly koncentraci  $\geq 50$  ng/ $\mu$ L a čistotu  $A_{260}/_{280} \geq 1.8$ .

V případě, že naměřená DNA byla  $\leq 50$  ng/ $\mu$ L za současného zachování  $A_{260}/_{280} \geq 1.8$ , vzorek izolované DNA byl postoupen na dodatečnou kontrolu kvality pomocí využití metody multiplex PCR. Tato metoda je primárně určená k STRs genotypizaci prasat, za použití panelu Animaltype Pig PCR Amplification Kit (Robino et al., 2008).

#### 4.2.2 Izolace DNA z nasálních stěrů v manuálním procesu

Obdobně jako u prasečích štětín, tak i u nasálních stěrů je důležité odběr provést správně. Pro odběr nasálních stěrů byla vybrána komerční odběrová sada PG-100 Performagene firmy DNAgenotek Inc., Ottawa, Canada (Foley et al. 2011; Maclean et al. 2013).

Odběrový set je hojně využíván ve světě. U nás v ČR se násální (popř. bukální) stěr stal oblíbeným u skotu, psů.

Pro prasata tento neinvazivní odběr DNA dosud nebyl vyzkoušen. Proto byl v rámci projektu tento způsob odběru nasálního stěru navrhnout a za pomoci ČZU Praha, Fakulty Agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Testační stanice Ploskov, byly odebrány nasální stěry u 33 zvířat.

Odběr nasálních stěrů byl proveden podle návodu výrobce DNAgenotek Inc. a dle instrukcí z videa, které je k dispozici na: <https://www.youtube.com/watch?v=Cfva6IlzN2E>

Do procesu izolace DNA z nasálních stěrů není vhodné, aby prošly odběry, které jsou výrazně špinavé, plné zbytků z krmiva. Dále se stávalo, že přítomný roztok v tubě odběrové sady byl vylit. V tomto případě není možné izolaci DNA dále provést.

Problematické u nasálních stěrů je jejich konzistence. Stává se, že je odběr příliš řídký, a můžeme předpokládat mizivou přítomnost DNA. V dalším případě je naopak nasální stěr příliš hutný a je problém už ze začátku izolace. S takovým vzorkem DNA musíme po izolaci nadále individuálně postupovat, ředit jej, aby mohl pokračovat do dalšího procesu a nenastaly další potíže při aplikaci na PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina v protokolu Illumina HD Infinium technologie.

- **Izolace DNA**

Než dojde k izolaci extraktu z nasálního stěru, musíme stěrky nejprve vložit do lázně na 50 °C po dobu 1,5 h. Po vyjmutí stěrky z lázně a po jejich vychladnutí můžeme pokračovat v izolaci. Pokud pro izolaci není vhodná doba, můžeme odběrové sady vložit do mrazícího boxu na -20°C. Po rozmrazení s nimi nakládáme úplně stejně jako s čerstvě vyjmutými stěrky z lázně. Izolace nasálního stěru probíhala pomocí centrifugace a chelačních činidel. Od izolace prasečích štětín se metoda značně liší. Je výrazně jednodušší a levnější.

- **Primární kontrola kvality izolované DNA**

Kontrola kvality izolátů z nasálních stěrů je naprosto stejná jako je tomu u kontroly kvality DNA z prasečích štětín.

Kontrola kvality izolované DNA probíhala na spektrofotometru NanoDrop 2000 od firmy ThermoScientific.

K dalšímu procesu analýzy byly puštěny všechny extrakty DNA, které měly koncentraci  $\geq 50$  ng/ $\mu$ L a čistotu  $A_{260}/_{280} \geq 1.8$ .

V případě, že naměřená DNA byla  $\leq 50$  ng/ $\mu$ L za současného zachování  $A_{260}/_{280} \geq 1.8$ , vzorek izolované DNA byl postoupen na dodatečnou kontrolu kvality pomocí využití metody multiplex PCR. Tato metoda je primárně určená k STRs genotypizaci prasat, za použití panelu Animaltype Pig PCR Amplification Kit (Robino et al. 2008).

#### **4.2.3 Izolace DNA z kančího spermatu v manuálním procesu**

Kančí sperma je svým způsobem výrazně specifické. Od dosud námi izolovaného býčího sperma, se kančí odlišuje zřejmým rozdílem v množství ejakulátu. Velké množství ejakulátu obsahuje spermie, které jsou extrémně citlivé na teplotu vnějšího prostředí.

Pro použití v laboratorním prostředí tak, aby byl ejakulát použitelný jako jistý zdroj DNA, je důležité zachovat jeho vlastnosti. Tedy, aby během přepravy do laboratoře nedošlo k degradaci spermatu. Inseminační dávky v plastové tubě lze v průběhu převozu do laboratoře uchovávat při pokojové teplotě, aniž by došlo k poškození biologického zdroje. Dále je možné inseminační dávku před předpokládanou izolací a po proběhlé izolaci uchovávat při teplotě  $-20$  °C v mrazícím boxu.

Dalším důležitým krokem bylo zjistit, jak velké množství ejakulátu je potřeba k izolaci DNA. Kančí ejakulát je řidší než býčí, tudíž se nabízela myšlenka k použití většího množství zdroje DNA, než tomu je u býků. Při výběru jednoho kančího ejakulátu dodaného od Svazu chovatelů prasat, z.s, byl několikrát opakovaný postup izolace, tak abychom dostali co nejlepší koncentraci a čistotu izolované DNA. První postup začínal na vysoké dávce odebraného biologického zdroje a postupně, dle výsledků a průběhu izolace, se množství odebraného vstupního zdroje zmenšoval.

Dostali jsme se tak na vyhovující hodnotu odebíraného biologického zdroje a až k myšlence, že lze provést izolaci i z prázdné inseminační tuby, která byla použita k inseminaci prasnice. Ovšem, tuba nesměla být kontaminována hlenem či krví inseminované prasnice, jinak došlo ke smíšení zbylého rezidua kančího spermatu v tubě. Provádět následnou izolaci tak nemělo význam.

- **Izolace DNA**

Pro provedení izolace DNA z kančího spermatu byla po předešlé zkušenosti s býčím spermatem zvolena tzv. kolonková metoda. Na silikátové kolonce, díky kroku centrifugace lyzátu, je zachycena DNA. Poté probíhá proces přečištění zachycené DNA, a nakonec je centrifugací vytěsněna do elučního roztoku a sběrné zkumavky.

Pro izolaci kolonkovou metodou byly vyzkoušeny kity od firmy GeneAll Exgene DNA micro izolační kit firmy GeneAll GENERALL BIOLECHNOLOGY CO., LTD. Dále QIAamp DNA Mini Kit 250 firmy QIAGEN Group, Inc.



Získaná kvalita čistoty a koncentrace žádané izolované DNA byla z obou izolačních kitů srovnatelná. V tomto případě vstupuje do laboratorních postupů otázka financí. Pro rutinní provoz této metody i s ohledem na chovatele, kterému bude tato metoda poskytnuta, se rozhodlo, že k dalším izolacím budou využívány kity kolonek od firmy GeneAll.

Kolonky jsou finančně výhodnější jak z materiálních nákladů, tak i v přepočtu na jednotlivou izolaci.

- **Primární kontrola kvality izolované DNA**

Kontrola kvality izolátů z tzv. kolonkové metody je naprosto stejná jako je tomu u kontroly kvality DNA z předešlých izolačních pokusů.

Kontrola kvality izolované DNA probíhala na spektrofotometru NanoDrop 2000 od firmy ThermoScientific.

K dalšímu procesu analýzy byly puštěny všechny extrakty DNA, které měly koncentraci  $\geq 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$  a čistotu  $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ .

V případě, že naměřená DNA byla  $\leq 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$  za současného zachování  $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ , vzorek izolované DNA byl postoupen na dodatečnou kontrolu kvality pomocí využití metody multiplex PCR. Tato metoda je primárně určená k STRs genotypizaci prasat, za použití panelu Animaltype Pig PCR Amplification Kit (Robino et al., 2008).

#### 4.2.4 Izolace genomické DNA z archivních zdrojů v manuálním procesu

Archivní zdroje jsou důležitou součástí vývoje metodiky pro SNP technologie. Nejčastějším archivním zdrojem bývá zmražená krev. Dříve se krev testovala formou tzv. STR genotypizace, pro ověření původu zvířete a zároveň pro stanovení MHS testu. Tedy stanovení tendence zvířete ke stresu RYR1 – ryanodinový receptor.

V současné době lze říci, že se jednalo o první pokus použití zmražené nesrážlivé krve, která byla ozkoušena v analýze SNP technologie na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina.

Pro tuto studii byla vybrána zmražená nesražená krev, která byla uchovávána v laboratoři iGenetiky, v mrazícím boxu o teplotě  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ , od roku 2015. Důvod k výběru této krve bylo stáří zmražené krve a dobrý výsledek izolace při tehdejší spracování STR metodou.

Kvůli vysokým nákladům na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina technologie, byla pro první pokus vybrána pouze jedna krev.

- **Izolace DNA**

Pro izolaci dlouho uchovávané krve byl vybrán izolační kit GeneAll Exgene DNA micro firmy GeneAll GENERALL BIOLECHNOLOGY CO., LTD. Z předešlých zkušeností tento kit zcela vyhovuje pro použití na archivní či mírně degradované zdroje. Během procesu izolace nenastaly žádné překážky, které by průběh izolace mohly narušit a vzorek tak během procesu znehodnotit.

- **Primární kontrola kvality izolované DNA**

Kontrola kvality izolátu zmražené krve proběhla stejným procesem jako u předešlých vzorků.

Kontrola kvality izolované DNA probíhala na spektrofotometru NanoDrop 2000 od firmy ThermoScientific.

K dalšímu procesu analýzy byly puštěny všechny extrakty DNA, které měly koncentraci  $\geq 50$  ng/ $\mu$ L a čistotu A260/280  $\geq 1.8$ .

V případě, že naměřená DNA byla  $\leq 50$  ng/ $\mu$ L za současného zachování A260/280  $\geq 1.8$ , vzorek izolované DNA byl postoupen na dodatečnou kontrolu kvality pomocí využití metody multiplex PCR. Tato metoda je primárně určená k STRs genotypizaci prasat, za použití panelu Animaltype Pig PCR Amplification Kit (Robino et al., 2008).

### **4.3 Aplikace izolátů z manuálního procesu na první PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina**

Po provedených izolacích na vybraných biologických zdrojích, kontrole kvality a čistoty izolátů, můžeme postoupit k dalším významným krokům v průběhu procesu pro pokus provedení prvního čipu ProcineSNP60 v2 BeadChip Illumina.

V této fázi procesu se postupuje zásadně dle pokynů výrobce v tzv. Infinium HD Lab Tracking Form, Manual Protocol. Tento postup trvá 3 dny a vyžaduje přesnost, dodržení předepsaných postupů, časů, teplot atp. K procesu jsou firmou Illumina poskytnuty veškeré chemie, vybavení pro možnost provedení postupu a čipy, na které se ve druhém dni aplikuje DNA. V neposlední řadě, nejdůležitější součástí SNP technologie jsou roboti TECAN EVO Freedom, na kterých probíhají PreAmplifikační a PostAmplifikační procesy, a iScan čtečka, kde ve finále celého procesu dochází ke čtení BeadChips a jejich vyhodnocování ve formě tzv. call rate.

ProcineSNP60 v2 BeadChip Illumina obsahuje 24 pozic pro aplikaci DNA. Tedy možnost vybrat 24 vzorků pro testování. Pro první pokus byly vybrány izoláty z nasálních stěrů, prasečí štětiny a archivní genomická krev.

S izoláty se v procesu pracuje v deep well plate destičce o 96 jamkách. Musíme tedy izoláty přepipetovat do destičky, pozice řádně zaznamenat do připravené tabulky. Dále se pracuje se vzorky podle zaznamenaných souřadnic, které jsou následně využity i v loadingu DNA na BeadChip a samozřejmě v konečném vyhodnocování čipu v tzv. samplesheet.

Pro ověření správných výsledků byly vybrány 3 vzorky DNA z prasečích štětín a byly odeslány do zahraniční laboratoře, kde prošly také aplikací na ProcineSNP60 v2 BeadChip Illumina. Na základě poslaných výsledků zpět ze zahraniční laboratoře jsme mohli konstatovat, že náš postup izolace a aplikace na BeadChip byl správný a můžeme přestoupit do pokusu o celý robotický proces.

### **4.4 Přejít z izolačních metod do robotického procesu**

Pro uplatnění robotického procesu, aby byl vyhovující jak z finančního, tak laboratorního ohledu, je potřeba izolovat ve velkých počtech vzorků. Tedy izolovaná destička, která prochází celým procesem obsahuje 96 pozic/jamek, to znamená ve finále 4ks BeadChip. Musíme zohlednit rutinní provoz laboratoře a využít k izolaci co největší počet vzorků. Ty musejí být ovšem násobkem 24, aby se zaplnil celý jeden čip. Jedno místo na čipu je významně finančně nákladné, a je tedy nemyslitelné, aby se proces dělal, aniž by se nezaplnila všechna místa na

čipu. Izolace tedy nejlépe probíhá v počtech 96 vzorků/ 4čipy, 192 vzorků/ 8čipů, 288 vzorků/ 12 čipů, 384 vzorků/ 16 čipů atd.

Pro robotický proces izolace máme v laboratoři iGenetika, CMSCH, a.s. k dispozici 2 izolační roboty. Robot TECAN EVO Freedom a od firmy Hamilton izolační robot HAMILTON Firefly NIMBUS 96. Oba dva stroje fungují na izolační metodě tzv. magnetických kuliček.

V případě izolačního skriptu na robotu TECAN EVO Freedom se jedná o proces magnetických kuliček, kde ve finální části procesu dochází k promývání magnetických kuliček s navázanou DNA. U izolačního robota HAMILTON Firefly NIMBUS 96 je proces ve finální části místo promývání nahrazen krokem vysušování zbylé chemie, zejména ethanolu. V obou případech izolace funguje a splňuje potřebné limity čistoty a kvality izolované DNA. Izolační metoda byla prověřena v rutinním procesu při získávání kvalitní DNA u skotu a následně tedy i prasat.

V rámci robotického izolačního procesu byl na oba dva roboty vybrán určitý počet vzorků. Výsledky izolace byly zkontrolovány na spektrofotometru NanoDrop 2000 od firmy ThermoScientific a vzájemně porovnány. Kontrolovalo se, zda je významný rozdíl v čistotě a kvalitě získané DNA.

Po vyhodnocení kvality DNA mohly být vzorky zařazeny do dalšího postupu v procesu SNP technologie.

Do procesu tzv. PreAmplifikačního byly vybrány prasečí štětiny izolované na robotech TECAN EVO Freedom a HAMILTON Firefly NIMBUS 96. Dále byly vybrány izoláty krve a štětín poskytnuté MZLU v Brně. Dalším izolátem DNA vhodným k dalšímu pocesu bylo vybráno kančí sperma a starší mražené izoláty krve ze zdrojů laboratoře iGenetiky.

## 5 Výsledky

### 5.1 Zjištění z hlediska kritérií pro výběr vhodného zdroje DNA s ohledem na chovatelskou praxi

Hodnocení výsledků bylo prováděno na základě vzájemného srovnávání stanovených kritérií, které byly vymezeny pro jednotlivé zvažované biologické zdroje.

Měřítka byla stanovena na 3 relativní stupně: vysoký – střední – nízký; nebo ANO – NE.

Tab. 1 Hodnocení výsledků podle stanovených kritérií pro vhodný výběr zdroje DNA

	<b>NESRÁŽLIVÁ KREV</b>	<b>PRASEČÍ ŠTĚTINY</b>	<b>NASÁLNÍ STĚRY</b>	<b>KANČÍ SPERMA</b>
<b>INVAZIVITA ODBĚRU</b>	ANO	NE	NE	NE
<b>SPECIÁLNÍ ODBĚROVÉ POMŮCKY</b>	ANO	NE	NE	ANO
<b>NÁKLADY NA ODBĚROVOU SADU</b>	STŘEDNÍ	NÍZKÉ	VYSOKÉ	STŘEDNÍ
<b>SLOŽITOST PROVEDENÍ ODBĚRU</b>	VYSOKÁ	NÍZKÁ	NÍZKÁ	VYSOKÁ
<b>NÁROKY NA UCHOVÁVÁNÍ ODBĚROVÉ SADY</b>	VYSOKÉ	NÍZKÉ	NÍZKÉ	VYSOKÁ
<b>RIZIKO ZNEHODNOCENÍ VZORKU BĚHEM TRANSPORTU</b>	VYSOKÉ	NÍZKÉ	NÍZKÉ	VYSOKÉ
<b>PROSTOROVÉ NÁROKY NA ARCHIVACI</b>	VYSOKÉ	NÍZKÉ	VYSOKÉ	STŘEDNÍ

Vzhledem ke všem stanoveným hodnoceným kritériím, která byla zařazena do tabulky a ohodnocena, jako nejlepší biologický zdroj DNA se vykazují prasečí štětiny. Když zohledníme náročnost zpracování prasečích štětín v laboratorním procesu, můžeme prasečí štětiny jako zdroj DNA zařadit do rutinního procesu (Neary et al. 2014).

Jako další možný alternativní zdroj DNA v dalším pořadí vychází nasální stěr ze sliznice prasečího rypáku. Tento způsob odběru zdroje DNA pro chovatele není nijak náročný, nenárokuje příliš drahé vybavení, ani veterinárního lékaře a zvířeti nijak nenarušuje jeho welfare.

Kančí sperma hodnotíme také jako dobrý zdroj DNA. Významnou roli u zachování kvality zdroje sehrává náročnost odběru, jeho uchovávání, a hlavně významné riziko

znehodnocení zdroje během přepravy. Přesto kančí sperma zařazujeme do izolačního procesu, nicméně mimo rutinní režim izolace v laboratoři. Tedy jako možný, náhradní zdroj DNA.

Nesrážlivé žilní krve hodnotíme negativně. Zde negativum výrazně převyšuje pozitivum. Odběr krve je náročný proces, kde ve výsledku nemůžete zaručit, že během přepravy dojde zdroj do laboratoře v pořádku a bude z něj moci být provedena izolace. S ohledem na náročnost odběru, nebudeme krev udávat jako možný zdroj pro větší počet vzorků pro následnou izolaci genomické DNA, tedy nebude zařazena do rutinního procesu laboratoře.

Zdroje DNA jako kančí sperma a krev budou do laboratoře přijímány jako alternativní zdroj, v mimořádných případech. Jejich izolace bude mimo rutinní systém laboratoře. Tedy v čistě individuálních podmínkách a dle možností postupně zařazovány do procesu SNP technologie.

## **5.2 Výsledky izolace prasečích štětín v manuálním procesu**

Výběr prasečích štětín proběhl na základě kontroly kvality odebraného vzorku. Tedy jedná se o kvalitní štětiny, v dostatečném množství, s výraznými folikuly. Jemné štětiny bez viditelných cibulek nebyly do procesu puštěny.

Izolace byla vybrána na bázi předešlých zkušeností s izolací u skotu, formou tzv. Kolonek, od firmy Gene All.

Za pomoci spektrofotometru NanoDrop 2000 byla následně provedena primární kontrola kvality izolované DNA.

Tab. 2 výsledky měření prasečích štětín po izolaci na spektrofotometru NanoDrop 2000

Číslo vzorku	Metoda izolace	Nucleic Acid	Unit	260/280	260/230	následný postup/kontrola
KR26/19	Gene All	48,8	ng/μl	1,95	2,57	GRUB *
KR27/19	Gene All	93,8	ng/μl	2,08	2,23	GRUB *
KR28/19	Gene All	151,2	ng/μl	2,08	2,07	GRUB *
KR29/19	Gene All	72,6	ng/μl	2,09	2,19	
KR30/19	Gene All	121	ng/μl	2,03	1,86	
KR31/19	Gene All	104,2	ng/μl	2,04	2,05	
KR32/19	Gene All	103,1	ng/μl	2,07	2,06	
KR33/19	Gene All	322,4	ng/μl	2,11	2,13	
KR34/19	Gene All	53,2	ng/μl	1,98	1,6	
KR35/19	Gene All	55,9	ng/μl	2,07	2,31	PCR ** o.k.
KR36/19	Gene All	58,7	ng/μl	2,05	2,57	
KR37/19	Gene All	67,1	ng/μl	2,05	2,16	
KR38/19	Gene All	338,4	ng/μl	2,09	1,98	
KR39/19	Gene All	35,4	ng/μl	1,9	1,36	PCR ** o.k.
KR40/19	Gene All	42,4	ng/μl	2,05	2,19	
KR41/19	Gene All	47,4	ng/μl	1,99	1,77	
KR42/19	Gene All	131,2	ng/μl	2,06	2,09	
KR49/19	Gene All	13,6	ng/μl	1,95	7,07	PCR ** o.k.

Poznámka: \* - vybrané vzorky odeslány na druhou kontrolu do laboratoře v Grubu

\*\* - vybrané vzorky s nízkou koncentrací či čistotou pro kontrolu DNA přes PCR metodu

Aby mohly být izoláty postoupeny dál do procesu, musí splňovat podmínky dané pro další proces v SNP technologii. To znamená, že izolovaná DNA musí splňovat určitou hodnotu kvality a čistoty. Kvalita je stanovena na všechny DNA extrakty s koncentrací  $\geq 50$  ng/μL a čistotou  $A_{260/280} \geq 1.8$  do 2.0.

Z výsledků primární kontroly kvality DNA vyplývá, že izolace prasečích štětín s odpovídající kvalitou, splňují podmínky kvality a čistoty. Některé až několikanásobně nad limit, jako je tomu u vzorku KR 38/19 kde kvalita DNA činí 338,4 ng/μl.

Od vzorků KR 26/19, KR 27/19 a KR 28/19 byly odeslány alikvoty do laboratoře v Grubu, Německo. Důvod byl ověření a porovnání našich výsledků v SNP technologii s výsledky v jiné laboratoři.

Vzorky KR 35/19, KR 39/19 a KR 49/19 byly kvůli nízké koncentraci DNA a čistotě analyzovány přes multiplex PCR metodou. Primárně je tato metoda určena k STRs genotypizaci prasat za použití panelu Animaltype Pig PCR Amplification Kit (Robino et al., 2008). Kontroly se provádí u takto sporných vzorků kvůli přezkoumávání kvality DNA, zda není kontaminovaná. PCR metoda je velmi citlivá a pokud přes fragmentační analýzu sporné izoláty nevykáží požadované výsledky, nemůžeme s nimi dále pracovat.

Z výsledků vyplývá, že štětínové cibulky splňují požadavky pro vstup do dalšího procesu v SNP technologii.

### 5.3 Výsledky izolace nasálních stěrů v manuálním procesu

Pro nasální stěry byla vybrána oblíbená stěrová sada PG-100 Performagene firmy DNAgenotek Inc., Ottawa, Canada. U skotu se stal nasální stěr oblíbeným zdrojem pro získání vzorku DNA. U prasat tento stěr zatím nikdo neprovedl, ale předpokládali jsme, že by se mohl stát vyhovujícím alternativním zdrojem k prasečím štětinám a zařazen do rutinního běhu laboratoře.

Pro provedení pilotní studie bylo k dispozici 33 nasálních stěrů. Z toho 5 bylo vyřazeno pro nekvalitní a příliš kontaminovaný odběr, kde na základě zkušenosti u skotu, nemělo význam stěrůvku dále nechávat v procesu. Další 3 stěrůvky byly vyřazeny pro absenci roztoku v tubě, který je důležitý pro uchování nabraného vzorku DNA. S roztokem se nadále pracuje a bez něj nemůžeme izolovanou DNA získat.

Tab. 3 Výsledky měření nasálních stěrů po izolaci na spektrofotometru NanoDrop 2000

Číslo vzorku	Metoda izolace	Nucleic Acid	Unit	260/280	260/230	následný postup/kontrola
KR1/19	žavesch	148	ng/μl	1,08	0,29	
KR2/19	žavesch	78,4	ng/μl	1,06	0,21	
KR3/19	žavesch	96,2	ng/μl	1,1	0,24	
KR4/19	žavesch	65,3	ng/μl	0,99	0,19	
KR5/19	žavesch	135,8	ng/μl	1,13	0,3	
KR6/19	žavesch	153	ng/μl	1,13	0,31	PCR ** neúplné
KR7/19	žavesch	71,7	ng/μl	1,03	0,2	
KR8/19	žavesch	77,9	ng/μl	1,1	0,22	PCR ** slabší ale komplet
KR9/19	žavesch	64,9	ng/μl	1,03	0,19	
KR10/19	žavesch	78,9	ng/μl	1,12	0,23	
KR11/19	žavesch	66,5	ng/μl	1,01	0,19	
KR12/19	žavesch	78	ng/μl	1,07	0,22	
KR13/19	žavesch	105,6	ng/μl	1,08	0,25	
KR14/19	žavesch	105,3	ng/μl	1,08	0,25	
KR15/19	žavesch	149,8	ng/μl	1,29	0,34	PCR **
KR16/19	žavesch	64,5	ng/μl	1,02	0,19	
KR17/19	žavesch	78,7	ng/μl	1,05	0,21	PCR ** o.k.
KR18/19	žavesch	154,7	ng/μl	1,18	0,32	
KR19/19	žavesch	70	ng/μl	1,04	0,2	
KR20/19	žavesch	95,2	ng/μl	1,07	0,23	
KR21/19	žavesch	73,1	ng/μl	1,06	0,21	
KR22/19	žavesch	65,6	ng/μl	1,02	0,19	
KR23/19	žavesch	72,6	ng/μl	1,05	0,2	
KR24/19	žavesch	77,7	ng/μl	1,05	0,21	
KR25/19	žavesch	70,4	ng/μl	1,03	0,2	

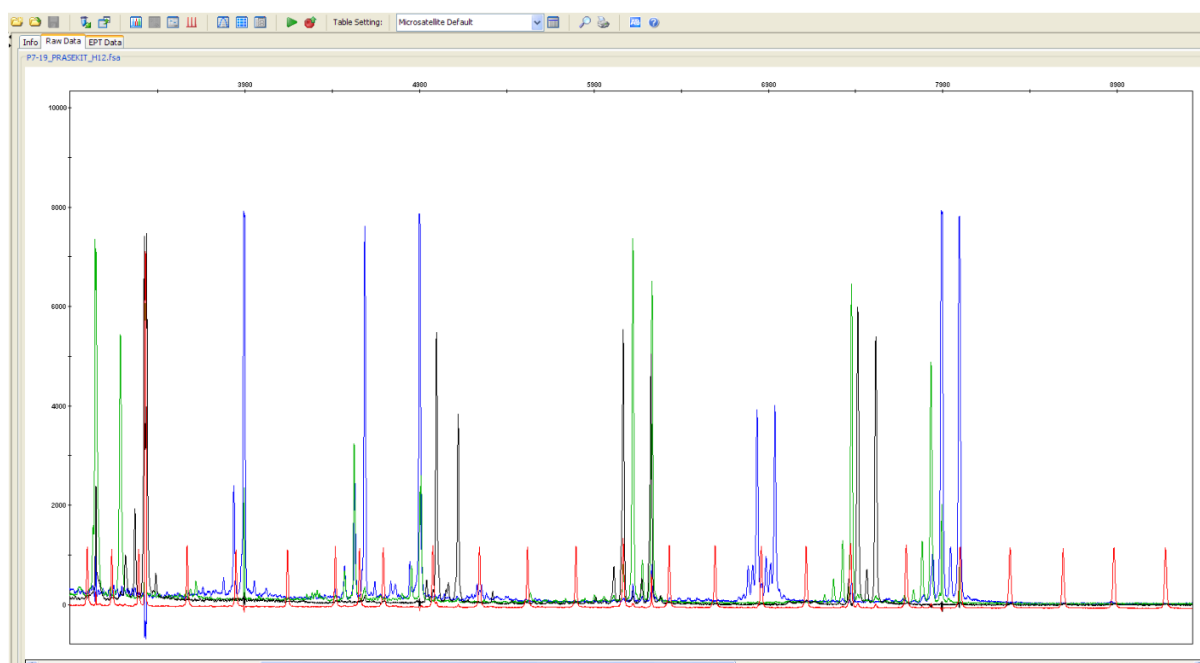
Poznámka: \*\* - vybrané vzorky s nízkou koncentrací či čistotou pro kontrolu DNA přes PCR metodu

Do izolačního procesu bylo vybráno 25 odběrových sad pro nasální stěry. Postup izolace byl v souladu s navrženým postupem od firmy Performagene sample PG-100 collection kit.

Dle výsledků primární kontroly přes spektrofotometru NanoDrop 2000 se může zdát, že koncentrace byly naměřené dobré, zcela vyhovující. Přihlédneme-li k ukazateli čistoty, tam se hodnoty pohybují níže, než je stanovená požadovaná hranice. Pro připomenutí, rozmezí čistoty je  $A_{260/280} \geq 1,8$  do 2,0. Pokud je hodnota čistoty naměřená nižší, vykazuje informaci, že je vzorek kontaminovaný proteiny nebo v izolátu zůstaly zbytky extrakčních roztoků.

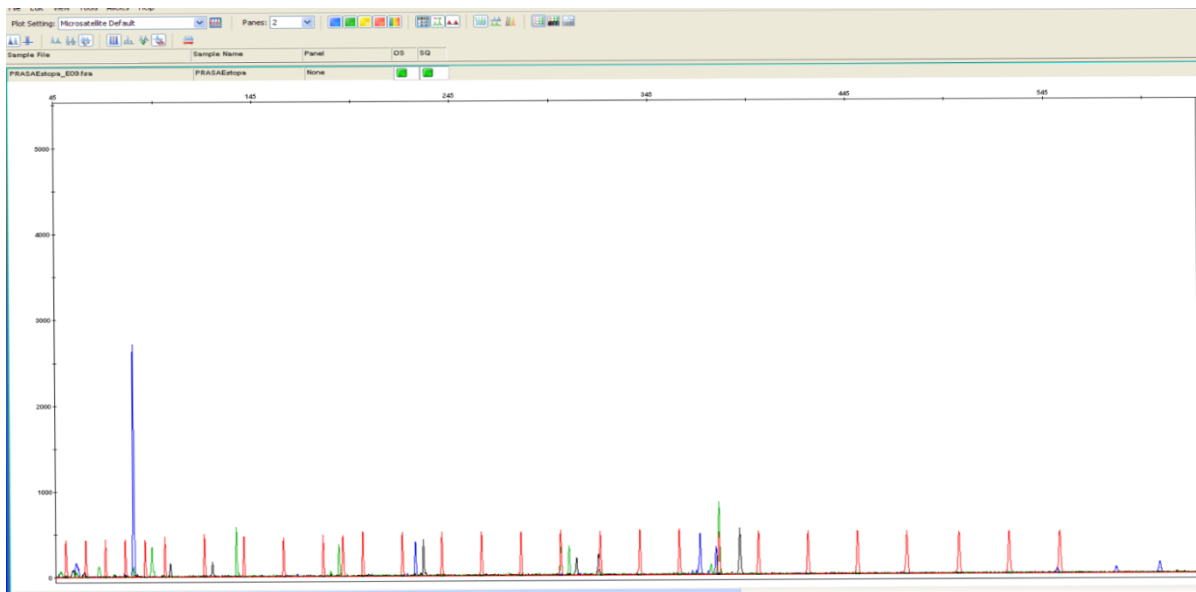
Izoláty vzorků KR 6/19, KR 8/19, KR 15/19 a KR 17/19 byly s ohledem na jejich vykazující hodnoty udělány přes multiplex PCR pro prasata. Vzorek KR 6/19 vyšel po sekvenování neúplně. Další vzorky KR 8/19 a KR 17/19 vyšly přes fragmentační analýzu uspokojivě. Poslední vzorek KR 15/19 nebylo možné přes multiplex PCR stanovit. Tento vzorek byl z následného procesu ihned vyřazen.

*Obr. 2 úspěšná PCR metoda pro nasální stěr*





Obr. č.3 špatný výsledek PCR metody u nasálního stěru



#### 5.4 Výsledky izolace kančího spermatu v manuálním procesu

Pro izolaci DNA z kančího sperma byla vybrána metoda tzv. silikátové kolonky, kde DNA je zachycena na kolonce během procesu centrifugace lyzátu, následně je fixovaná DNA přečištěna a přidáním elučního pufru uvolněna. Pro tzv. metodu kolonkou byl vybrán kit od firmy GeneAll GENERAL BIOTECHNOLOGY CO., LTD. Konkrétně izolační kit GeneAll Exgene DNA micro.

Pro izolaci bylo použito nativní kančí sperma i mražené sperma, uchovávané v mrazícím boxu při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Kančí sperma je na rozdíl od býčího sperma uchováváno ve větším objemu. Proces odběru vzorku byl zprvu stanoven na větší objem a vlivem nastalých skutečností při průběhu izolace se objem postupně snižoval. Největším problémem při izolaci kančího sperma byla přítomnost velkého množství bílkovinné frakce, tedy sekretu přídatných pohlavních žláz. V průběhu centrifugace docházelo k úplnému utěsnění kolonky a nebylo možné dál pokračovat v procesu. Neboť krok čištění DNA na kolonce, kdy reziduum promývacího pufru mělo projít kolonkou do sběrné zkumavky, nebylo možné kvůli utěsnění kolonky provést. Bylo nutné bílkovinnou část eliminovat a nejnashší možností se nabízelo odebrat menší množství vstupního zdroje. Tím se dosáhlo nižšího podílu bílkovinné frakce a nastartování úspěšné izolace.

Tato zkušenost vedla k myšlence o pokus vyzkoušet jako další možný zdroj DNA reziduum spermatu v použité tubě po procesu inseminace.

Tab. 3 Výsledky optimalizace izolace DNA z kančího spermatu

	Průměrná KONCENTRAC E DNA ng/μL	Průměrná ČISTOTA DNA A260/280	Počet izolovaných vzorků	Kontrola kvality DNA PCR_FA
<b>Nativní sperma 500 μl</b>	870.5	0.85	5	negativní
<b>Zmražené sperma 500 μl</b>	521.4	1.02	4	negativní
<b>Nativní sperma 100 μl</b>	37.4	1.65	5	pozitivní
<b>Zmražené sperma 100 μL</b>	32.1	1.74	4	pozitivní
<b>Nativní sperma 25 μL</b>	15.4	2.01	5	pozitivní
<b>Zmražené sperma 25 μL</b>	18.2	2.11	4	pozitivní
<b>Vypláchnutá tuba po inseminaci</b>	9.6	2.00	5	pozitivní

Z výsledků tabulky vyplývá, že vhodně zvolenou metodou pro izolaci DNA z kančího spermatu je metoda purifikace buněčných lyzátů na tvz. silikátových kolonkách. Významným přínosem zjištění je, že v laboratoři lze využívat méně nákladové kolonky GeneAll Exgene DNA.

Zásadním problémem izolační metody je přítomnost bílkovinových frakcí z ejakulátu, které byly eliminovány snížením množstvím odebíraného vstupního zdroje DNA k izolaci. Bohužel, tímto postupem se při snížení výchozího objemu spermatu zároveň snižuje absolutní finální výtěžek DNA. Naopak tímto krokem dosahujeme zvýšení čistoty extraktu. Pro vstupní zdroj tedy je možno stanovit za optimální množství 25 μl spermatu.

Pro uchování sperma musíme zohlednit i možnost zmražení zdroje. K zmražení může dojít před dodáním do laboratoře, nebo v laboratoři jako možnost uchování, než dojde k jeho použití a izolaci. Mražení spermatu dle tabulky 3. ovlivňuje pozitivně a v následné izolaci nebrání k získání kvalitní DNA.

Genomickou DNA, po zkušenostech u skotu, můžeme vcelku úspěšně izolovat i z reziduálního zůstatku spermatu v tubě po inseminaci. Samozřejmě platí zásada, že tuba nesmí být kontaminována cervikálním hlenem ani krví inseminované prasnice. Při kontaminaci nelze stanovit následně ani mikrosatelity fragmentační analýzou ani stanovit SNP.

Kvalitu extraktu DNA, případnou kontaminaci a jeho použitelnost k následné analýze na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina lze spolehlivě prověřit v STR\_FA analýze.

Všechna zjištění ohledně izolace kančího sperma je nutné dále v rámci projektu, ale i pro budoucí analýzy ověřit na větší skupině zdrojů spermatu. To vše za předpokladu, že bude tento zdroj DNA dále vyžadován a částečně preferován.

V současné době můžeme tento zdroj DNA zařadit mimo rutinní běh laboratoře.

Do procesu izolace kančího sperma byly zařazeny inseminační dávky v odběrových pytlíkových sadách s umělohmotným výstřkem, zahraniční francouzské firmy Yxia.

Inseminační dávky jsou barvené podle plemene zvířete. K dispozici byly dávky: pietrain – bílé ředidlo, landrasa – modré ředidlo, duroc – červené/růžové ředidlo, large white – zelené ředidlo. K dispozici pro testaci bylo 6 inseminačních dávek a jedna reziduální dávka.

Na začátku izolace bylo důležité odebrat vzorek promýt promývacím pufrem. Důvodem promývání je zbavit vzorek barevného ředidla tak, aby barva narušovala průběh izolace a výsledky SNP testace co nejméně.

Pro pozitivní výsledek izolace bylo odebráno 50 µl spermatu. Následná izolace probíhala metodou kolonkovou, tedy kitem od firmy GeneAll GENERALL BIOTECHNOLOGY CO., LTD. Konkrétně izolační kit GeneAll Exgene DNA micro.

Dle tabulky č. 4 lze konstatovat, že izolace kolonkovou metodou proběhla úspěšně a kančí sperma s barevným ředidlem můžeme postoupit k SNP testaci. Hodnoty čistoty jsou v pořádku a koncentrace jsou vyhovující. Vzorky KR 104/20 a 105/20 mají druhou hodnotu čistoty horší, ale přesto budou zařazeny do dalšího procesu testace. Vzorek KR 105/20 je reziduální zdroj, kde k získání alikvotu se přistupovalo promýváním a odsáváním přímo z odběrové sady. Výsledek koncentrace DNA a čistoty reziduálu je akceptovatelný.

*Tabulka č.4 Výsledky optimalizace izolace DNA z barveného kančího spermatu*

Sample ID	Nucleic Acid	Unit	260/280	260/230
KR99/20 SPERMA GALL	16,6	ng/µl	1,98	2,93
KR100/20 SPERMA GALL	15,8	ng/µl	1,96	2,62
KR101/20 SPERMA GALL	11,1	ng/µl	2,08	2,47
KR102/20 SPERMA GALL	20,2	ng/µl	1,88	2,33
KR103/20 SPERMA GALL	13,6	ng/µl	2,1	2,96
KR104/20 SPERMA GALL	9,6	ng/µl	2,22	5,06
KR105/20 SPERMA GALL rezidual	11,7	ng/µl	2,07	3,37

## 5.5 Výsledky izolace zmražené genomické krve v manuálním procesu

V rámci projektu byla prověřena možnost izolovat z archivních zdrojů DNA. Do pilotní studie byla zařazena malá skupina archivních vzorků. Jsou to vzorky nesrážlivé krve uchovávané v laboratoři iGenetiky v mrazícím boxu při -20 °C minimálně 1, nejdéle 3 roky.

Celkový počet vzorků byl stanoven na 12 s ohledem na vysoké náklady izolace.

DNA z mražené krve byla izolována izolačním kitem GeneAll Exgene DNA micro od firmy GENERALL BIOTECHNOLOGY CO., LTD. Tento kit dle zkušeností z předešlých izolačních postupů vyhovuje pro forenzní, archivní a degradované krevní zdroje vzorků.

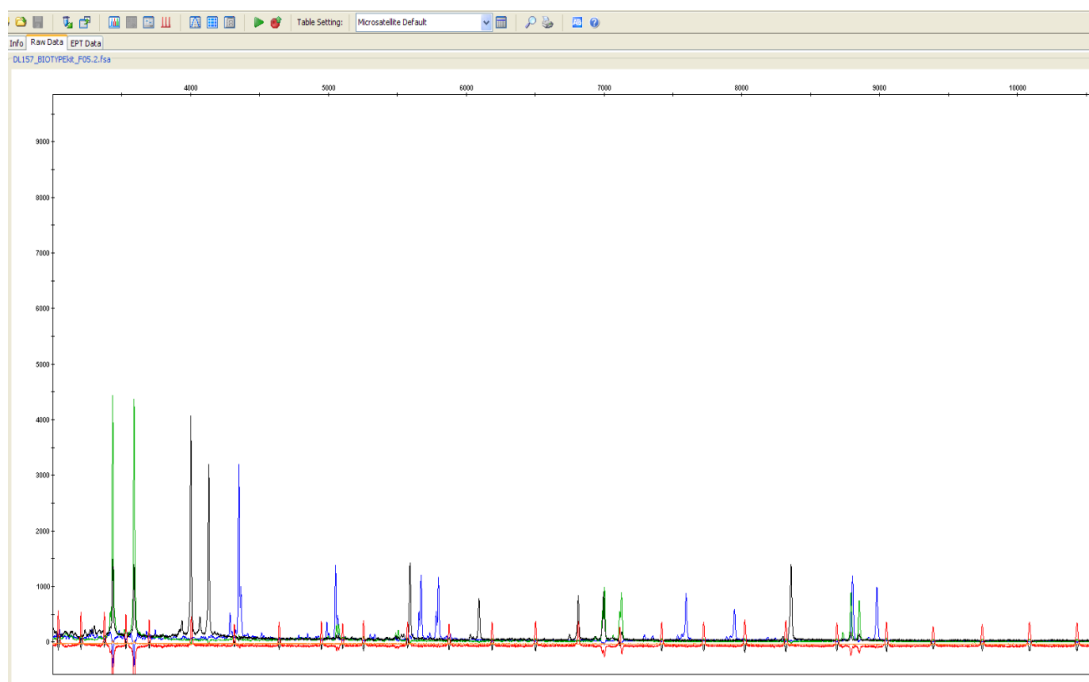
Do skupiny byly vybrány náhodné vzorky, různé vizuální kvality. Archivní skupiny byly z roku 2016, 2017 a 2018 a byly vybrány 4 vzorky zmražené krve. Výběr byl dle vizuální kontroly, kdy se vzorky jeví jako vysoce kvalitní před jejich archivací. Z této řady byly vybrány 2 vzorky. Další 2 vzorky byly vybrány na základě vizuální a senzorické kontroly, kdy

se předpokládalo, že kvalita vzorku před archivací byla nižší. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č.5

*Tabulka č.5 Výsledky studie izolace DNA archivních zdrojů zmražená nesrážlivá krev*

	<b>Průměrná KONCENTRACE DNA ng/μL</b>	<b>Průměrná ČISTOTA DNA A260/280</b>	<b>Počet izolovaných vzorků</b>	<b>Kontrola kvality DNA PCR_FA</b>
<b>Kvalitní krve 2018</b>	57.5	1.85	2	pozitivní
<b>Nekvalitní krve 2018</b>	7.4	1.02	2	negativní
<b>Kvalitní krve 2017</b>	49.4	1.90	2	pozitivní
<b>Nekvalitní krve 2017</b>	2.1	0.74	2	negativní
<b>Kvalitní krve 2016</b>	29.9	2.01	2	pozitivní
<b>Nekvalitní krve 2016</b>	1.2	neměřitelný	2	negativní

*Obr. č.4 pozitivní výsledek PCR metody u zmražené krve*



Výsledky možnosti izolace archivního zdroje DNA, tedy mražené krve jsou následující. Pokud zvolíme vhodnou metodu izolace, v našem případě GeneAll Exgene DNA micro, získáme uspokojivý výtěžek genomické DNA. Koncentrace i čistota, která je následně nárokována pro aplikaci na čipy je uspokojivá.

Zmražení krve a její délka uchovávání při -20 °C nemá vliv na úspěšné provedení izolace. Je možná pravděpodobnost klesání absolutního výtěžku, což je nutné ještě dále prověřit na více vzorcích.

Kvalitu získané DNA lze prověřit metodou ELFO v agarozovém gelu a STR\_FA analýzou. Tato metoda je vysoce spolehlivá, méně finálně náročná.

Veškerá zjištění v rámci archivních zdrojů je nutno dále prověřit na větším počtu archivních zdrojů, starších 3 let. Dále pokračovat ve zpracovávání archivních zdrojů, pokud budou nadále k dispozici.

## 5.6 Výběr metod izolace genomické DNA z vybraných zdrojů

Na základě již zmíněných dostupných izolačních metod pro rutinní provoz laboratoře, byly metody hodnoceny z hlediska následujících kritérií:

- Pracnost – požadavky na pracovní sílu
- Časová náročnost – doba trvání procesu izolace
- Finanční náklady – množství potřebného spotřebního plastu, nákup komerčních izolačních kitů, nákupní cena nezbytných chemikálií
- Robotizace – možnost přizpůsobit manuální protokol izolační metody pro roboty TECAN EVO Freedom
- Kvalita izolátu – hodnocení izolátu DNA z hlediska čistoty, koncentrace a absolutního výtěžku izolátu

Tabulka č.6: Hodnocení kritérií vhodnosti metod izolace DNA v provozu rutinní laboratoře

	METODA PRECIPITAČNÍ	METODA CHELEX	METODA KOLONKY	METODA MAGNETICKÉ KULIČKY
<b>PRACNOST</b>	vysoká	nízká	střední	střední
<b>ČASOVÁ NÁROČNOST</b>	vysoká	nízká	střední	střední
<b>FINANČNÍ NÁKLADY</b>	nízké	střední	vysoké	střední
<b>KVALITA IZOLÁTU</b>	vysoká	střední	vysoká	vysoká
<b>ROBOTIZACE</b>	NE	NE	NE	ANO

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

Na základě provedeného hodnocení vhodnosti izolačních metod v rutinním procesu lze konstatovat, že jako nejvhodnější metoda se jeví purifikace buněčných lyzátů na magnetických kuličkách. Tato izolace je rozumný kompromis s ohledem na vynaložené náklady pro provedení

celého procesu izolace, dále i spolehlivost metody produkovat DNA izoláty v požadované kvalitě a kvantitě. Výrazné pozitivum této metody je možnost přechodu na robotický proces.

Naopak nejméně vyhovující metodou je precipitační metoda.

Další hodnocené metody, tedy Chelex a kolonková metoda nelze zcela vyloučit. Ovšem ani doporučit. Obě metody a jejich možnost využití v izolaci genomické DNA prasat bude nutné posoudit v souvislosti s navrhovanými biologickými zdroji a jejich možnostmi je kombinovat v průběhu izolačních procesů.

V návaznosti na vybrané použitelné izolační metody DNA byla posouzena vhodnost jejich využití v laboratorním procesu v rámci vybraných biologických zdrojů DNA prasat. Posuzovány byly prasečí štětinové cibulky, nasální stěry, nesrážlivá krev, sperma a reziduální, archivní, nestandardní zdroje DNA.

*Tabulka č.7: Hodnocení vhodnosti metod izolace DNA ve vztahu k jednotlivým zdrojům*

	<b>METODA PRECIPITAČNÍ</b>	<b>METODA CHELEX</b>	<b>METODA KOLONKY</b>	<b>METODA MAGNETICKÉ KULIČKY</b>
<b>ŠTĚTINOVÉ CIBULKY</b>	NE	NE	ANO	ANO
<b>NASÁLNÍ STĚRY</b>	NE	ANO	+/-	ANO
<b>NESRÁŽLIVÁ KREV</b>	ANO	+/-	ANO	ANO
<b>SPERMA</b>	ANO	+/-	ANO	ANO
<b>REZIDUÁLNÍ, ARCHIVNÍ, NESTANDARDNÍ ZDROJE</b>	NE	NE	ANO	+/-

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

Z celkového hodnocení vhodnosti vybraných biologických zdrojů, vhodných k odběru pro účel izolace genomické DNA prasat, jejich kombinovatelnosti s možnými izolačními metodami, se jako nejvhodnější biologický zdroj ukazují štětinové cibulky. Do hodnocení biologického zdroje byla promítána i provozní a ekonomická hlediska.

Další možná alternativa biologického zdroje DNA prasat budou zařazeny do robotického procesu nasální stěry. U nasálních stěrů zohledňujeme jednoduchost odběru u chovatele a nízké náklady na následnou izolační metodu.
























Stanovené zdroje kančí sperma, nesrážlivá krev a reziduální, archivní, nestandardní zdroje budou zapojeny do procesu v případě, že nebude jiná možnost odebrání standardního zdroje DNA. Tyto odběry jsou však vyřazeny z rutinního procesu laboratoře, zpracovány budou

individuálně, vhodně zvolenou metodou izolace, dostupnou v laboratoři. Poté budou dle možností zakomponovány do dalšího robotického procesu.

## 5.7 Výsledky první aplikace DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina

K provedení první aplikace DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina byly vybrány izoláty skládající se z 5x nasální stěr, 1x genomická krev zmražená, 18x prasečí štětiny.

Tab. č. 8 seznam vybraných izolátů pro první aplikaci na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina se stanovenou kvalitou/koncentrací a čistotou DNA

Sample ID	Nucleic Acid	Unit	260/280	260/230
KR1/19 PRASE NASAL	 148	ng/μl	1,08	0,29
KR7/19 PRASE NASAL	 71,7	ng/μl	1,03	0,2
KR9/19 PRASE NASAL	 64,9	ng/μl	1,03	0,19
KR16/19 PRASE NASAL	 64,5	ng/μl	1,02	0,19
KR18/19 PRASE NASAL	 154,7	ng/μl	1,18	0,32
KR26/19 PRASE CHLUP GA	 48,8	ng/μl	1,95	2,57
KR27/19 PRASE CHLUP GA	 93,8	ng/μl	2,08	2,23
KR28/19 PRASE CHLUP GA	 151,2	ng/μl	2,08	2,07
KR29/19 PRSE CHLUP GENALL	 72,6	ng/μl	2,09	2,19
KR30/19 PRASE CHLUP GENALL	 121	ng/μl	2,03	1,86
KR31/19 PRASE CHLUP GENALL	 104,2	ng/μl	2,04	2,05
KR32/19 PRASE CHLUP GENALL	 103,1	ng/μl	2,07	2,06
KR33/19 PRASE CHLUP GENALL	 322,4	ng/μl	2,11	2,13
KR34/19 PRASE CHLUP GENALL	 53,2	ng/μl	1,98	1,6
KR35/19 PRASE CHLUP GENALL	 55,9	ng/μl	2,07	2,31
KR36/19 PRASE CHLUP GENALL	 58,7	ng/μl	2,05	2,57
KR37/19 PRASE CHLUP GENALL	 67,1	ng/μl	2,05	2,16
KR38/19 PRASE CHLUP GENALL	 338,4	ng/μl	2,09	1,98
KR39/19 PRASE CHLUP GENALL	 35,4	ng/μl	1,9	1,36
KR40/19 PRASE CHLUP GENALL	 42,4	ng/μl	2,05	2,19
KR41/19 PRASE CHLUP GENALL	 47,4	ng/μl	1,99	1,77
KR42/19 PRASE CHLUP GENALL	 131,2	ng/μl	2,06	2,09
KR49/19 PRASE CHLUP GENALL	 13,6	ng/μl	1,95	7,07
P16/15 PRASE genom.krev/izolát	✖	✖	✖	✖

Výběr izolované DNA byl na základě preferovaných zdrojů, které vyšly nejlépe v průběhu izolací, dále dle koncentrace. Pro stanovení, jaké jsou možnosti k získání hodnot z čipů, byly zařazeny vzorky s nízkou koncentrací – KR 49/19 a naopak s vysokou koncentrací KR 33/19, KR 38/19. Pro budoucí možnost využití zdrojů ze zmražených zásob genomických krví byla vybrána nejstarší uchovaná krev v laboratoři – P 16/15.

Aplikace izolované DNA proběhla v rámci robotického procesu nastaveného na Illumina LIHA TECAN. K dispozici byl čip s identifikačním číslem: 203225160002, s 24 pozicemi pro aplikaci DNA.

Výsledné snímání PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina proběhlo ve čtečce čipů iScan a hodnocení v programu GenomeStudio.

Hodnocení výsledků je na základě tzv. Call rate, kdy nejlepší výsledek je hodnocen hodnotou 0,99. V podstatě můžeme říci, že vzorek byl přečten z 99 %. Pokud hodnota call rate klesá, znamená to, že vzorek není v pořádku a počítají se mu chybně načtené SNP. Jako limitní koncentrace pro aplikaci na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina byla stanovena hodnota  $\geq 9.5$  ng/ $\mu$ L a  $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ .

Tab. č. 9 výsledky z první aplikace na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina a stanovené call rate

DNA Report on D:\iScan_data\chip_porc_203225160002\chip_porc_203225160002_DNAReport.csv					
Row	DNA_Name	#No_Calls	#Calls	Call_Rate	
1	KR1900001	5444	53875	0.9082	nasal
2	KR1900007	1382	57937	0.9767	nasal
3	KR1900009	4183	55136	0.9295	nasal
4	KR1900016	21495	37824	0.6376	nasal
5	KR1900018	1349	57970	0.9773	nasal
6	KR1900026	333	58986	0.9944	štětiny CZU
7	KR1900027	382	58937	0.9936	štětiny CZU
8	KR1900028	356	58963	0.994	štětiny CZU
9	KR1900029	283	59036	0.9952	štětiny
10	KR1900030	219	59100	0.9963	štětiny
11	KR1900031	216	59103	0.9964	štětiny
12	KR1900032	221	59098	0.9963	štětiny
13	KR1900033	179	59140	0.997	štětiny
14	KR1900034	239	59080	0.996	štětiny
15	KR1900035	228	59091	0.9962	štětiny
16	KR1900036	299	59020	0.995	štětiny
17	KR1900037	292	59027	0.9951	štětiny
18	KR1900038	243	59076	0.9959	štětiny
19	KR1900039	324	58995	0.9945	štětiny
20	KR1900040	244	59075	0.9959	štětiny
21	KR1900041	274	59045	0.9954	štětiny
22	KR1900042	202	59117	0.9966	štětiny
23	KR1900049	467	58852	0.9921	štětiny
24	P1500016	228	59091	0.9962	gen.krev

Z prvních výsledků aplikace DNA na čip vyplývá, že favorizované zdroje pro odběr DNA – *nasální stěry* pro aplikaci na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina jsou zcela nevyhovující.



Pro další procesy v izolaci a aplikaci na čipy se již nebudou používat a nebudou chovatelům poskytována jako alternativa odběru vzorku ke štětinovým cibulkám.

Odběry štětinových cibulek jsou dle „call rate“ zcela vyhovující, a tedy do budoucna budou pro industry systém v laboratoři podporovány.

Rozhodující vliv na úspěšnou analýzu DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina, která se vyjadřuje call rate, má čistota izolátu DNA (Ratio absorbance A260/280). Nikoli však absolutní výtěžek izolace (ng/μL). Velmi důležité je zachování neporušeného DNA extraktu.

Relativně nízká koncentrace izolátu DNA při současném zachování vysoké čistoty a přiměřené integrity DNA izolátu nemá negativní vliv na výsledný call rate.

## **5.8 Výsledky celého robotického procesu na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina**
















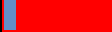








Pro celkové zhodnocení procesu robotizace, jednak v izolačním procesu a dále PreAmplifikační a PostAmplifikační části, je nutné provést izolaci v celé plné deep well plate destičce a v plném počtu 4 čipů. V dalším běhu byly vybrány rozmanitější zdroje DNA.

První skupinou štětiny izolované na TECAN EVO Freedom, druhá skupina byly štětiny izolované na HAMILTON Firefly NIMBUS 96, třetí skupina byly izoláty krve a štětin zaslané od MZLU v Brně. Pátou částí do PreAmplifikačního procesu byla vybrána kančí sperma a poslední skupinou mražené izoláty krve ze zdrojů laboratoře iGenetiky.

### **5.8.1 Izolace DNA na robotu TECAN EVO Freedom**

Pro izolační proces na robotu TECAN EVO Freedom bylo vybráno 47 vzorků štětinových cibulek. Výběr proběhl na základě kvality odebraných štětin, kde už se soustředilo pouze na nejkvalitnější odběry, ale do procesu byly puštěny i štětiny horšího stavu. Špinavé, slabé, špatně uložené v odběrové sadě (tj. folikuly nalepené do lepící části), obarvené od značící barvy. Výsledky izolace byly zkontrolovány na spektrofotometru NanoDrop 2000 od firmy ThermoScientific.

Tab. č. 10 výsledky z kontroly kvality a čistoty DNA v izolačním procesu na TECAN EVO Freedom

Sample ID	Nucleic Acid	Unit	260/280	260/230
KR44/19 PRASE ŠT TECAN A1	 194	ng/μl	2,09	1,99
KR45/19 PRASE ŠT TECAN B1	 90,9	ng/μl	2,03	1,89
KR47/19 PRASE ŠT TECAN C1	 88,3	ng/μl	2,05	1,87
KR50/19 PRASE ŠT TECAN D1	 139,5	ng/μl	2,04	1,94
KR51/19 PRASE ŠT TECAN E1	 60,1	ng/μl	2,08	1,88
KR52/19 PRASE ŠT TECAN F1	 33,9	ng/μl	2	1,77
KR53/19 PRASE ŠT TECAN G1	 368,6	ng/μl	2,08	2,09
KR55/19 PRASE ŠT TECAN H1	 79,9	ng/μl	2,06	1,95
KR56/19 PRASE ŠT TECAN A2	 25,8	ng/μl	2	1,6
KR58/19 PRASE ŠT TECAN B2	 150,6	ng/μl	2,04	1,91
KR69/19 PRASE ŠT TECAN E2	 104,6	ng/μl	1,99	1,68
KR73/19 PRASE ŠT TECAN H2	 32,6	ng/μl	1,94	1,51
KR83/19 PRASE ŠT TECAN C3	 398,9	ng/μl	2,02	2,05
KR87/19 PRASE ŠT TECAN E3	 134,8	ng/μl	2,05	1,97
KR93/19 PRASE ŠT TECAN B4	 27,8	ng/μl	2,05	1,64
KR95/19 PRASE ŠT TECAN D4	 181,8	ng/μl	2,03	1,87
KR98/19 PRASE ŠT TECAN G4	 22,4	ng/μl	2	1,5
KR100/19 PRASE ŠT TECAN A5	 35,9	ng/μl	2,01	1,77
KR104/19 PRASE ŠT TECAN E5	 50	ng/μl	1,95	1,83
KR125/19 PRASE ŠT TECAN F5	 86,5	ng/μl	2,02	1,79
KR128/19 PRASE ŠT TECAN A6	 118,3	ng/μl	2,01	1,88
KR132/19 PRASE ŠT TECAN E6	 103,1	ng/μl	2,02	1,79
KR133/19 PRASE ŠT TECAN F6	 33,7	ng/μl	1,97	1,81
KR134/19 PRASE ŠT TECAN G6	 38,7	ng/μl	1,45	1,74

Z výsledků měření koncentrace a kvality izolované DNA vyplývá, že všechny izoláty jsou vhodné k zařazení do PreAmplifikačního procesu a dále k aplikaci na čipy.

Vzorky izolované DNA KR 53/19 a KR 83/19 vykazují větší hodnotu koncentrace DNA, a proto na ně byl v průběhu hodnocení na iScanu brán větší ohled. Stejný postup byl u vzorku s nejmenší naměřenou koncentrací DNA KR 98/19.

### 5.8.2 Izolace DNA na robotickém izolátoru HAMILTON Firefly NIMBUS 96

Z důvodu zavedení do procesu nového robotického izolátoru HAMILTON Firefly Nimbus 96 bylo nutné provést izolaci i na něm. Robot se kvůli své nesporné výhodě provést izolaci v kratším čase, stane hlavní složkou, přes kterou budou probíhat veškeré izolace.

Pro izolaci bylo vybráno 24 vzorků ze štětinových cibulek. Opět byly vybrány štětiny rozdílné kvality jako u izolace u TECANU. Výsledky izolace byly zkontrolovány na spektrofotometru NanoDrop 2000 od firmy ThermoScientific.

Tab. č. 11 výsledky z kontroly kvality a čistoty DNA v izolačním procesu HAMILTON Firefly NIMBUS 96

Sample ID	Nucleic Acid	Unit	260/280	260/230
KR78/19 PRASE NIMBUS	184,6	ng/μl	1,82	1,23
KR79/19 PRASE NIMBUS	228,3	ng/μl	1,96	1,69
KR80/19 PRASE NIMBUS	126,7	ng/μl	1,92	1,56
KR81/19 PRASE NIMBUS	113,1	ng/μl	1,9	1,64
KR82/19 PRASE NIMBUS	108,7	ng/μl	1,84	1,32
<b>KR85/19 PRASE NIMBUS</b>	<b>560,2</b>	<b>ng/μl</b>	<b>2,02</b>	<b>2</b>
KR86/19 PRASE NIMBUS	97,8	ng/μl	1,96	1,89
KR89/19 PRASE NIMBUS	68,3	ng/μl	1,92	1,69
KR43/19 PRASE NIMBUS	200,2	ng/μl	2,01	1,87
KR46/19 PRASE NIMBUS	83,8	ng/μl	1,74	0,91
KR48/19 PRASE NIMBUS	90,9	ng/μl	1,9	1,32
<b>KR54/19 PRASE NIMBUS</b>	<b>27,9</b>	<b>ng/μl</b>	<b>1,86</b>	<b>1,15</b>
KR57/19 PRASE NIMBUS	101,4	ng/μl	2	1,74
KR59/19 PRASE NIMBUS	143,7	ng/μl	2	1,9
KR60/19 PRASE NIMBUS	164,6	ng/μl	1,88	1,24
KR62/19 PRASE NIMBUS	48,7	ng/μl	2,01	1,66
KR63/19 PRASE NIMBUS	109,3	ng/μl	1,9	1,62
KR64/19 PRASE NIMBUS	65,1	ng/μl	1,97	1,71
KR65/19 PRASE NIMBUS	98,8	ng/μl	1,87	1,36
KR66/19 PRASE NIMBUS	65,8	ng/μl	1,93	1,51
KR68/19 PRASE NIMBUS	103,5	ng/μl	1,83	1,33
KR71/19 PRASE NIMBUS	49,4	ng/μl	1,96	1,77
KR74/19 PRASE NIMBUS	128,4	ng/μl	1,88	1,77
KR76/19 PRASE NIMBUS	91,5	ng/μl	1,99	1,69

Z výsledků naměřené koncentrace a kvality DNA vyplývá, že izolace štětin na robotickém izolátoru proběhla v pořádku. Naměřené koncentrace DNA jsou vyhovující a není potřeba izoláty nijak dále prověřovat přes PCR metodu.

Nejvyšší koncentraci DNA vykazuje vzorek KR 85/19, naopak nejnižší koncentraci DNA z celé skupiny má KR 54/19 – přesto je koncentrace zcela vyhovující. Všechny izoláty mohou jít do dalšího procesu Pre a PostAmplifikačního.

### 5.8.3 Výsledky aplikace DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina

K izolátům štětín z Tecan Evo Freedom a HAMILTON Firefly Nimbus 96 byly doplněny izoláty kančího sperma, izolát zmražené krve a izoláty krve a štětín od MZLU v Brně.

Kančí sperma bylo izolováno tzv. kolonkovou metodou, bez nároku dostat jej do rutinního běhu laboratoře.

Izoláty krve a štětín poskytnuté MZLU v Brně byly přeměřené pro stanovení kvality a koncentrace DNA pro budoucí hodnocení v rámci výsledných call rate.

Zmražené izoláty krve byly vybrány: nejstarší izolát krve uchovávaný v laboratoři iGenetiky z r. 2018 a dále izoláty krve prasete dělané v průběhu roku 2019 při běžném příjmu vzorků v laboratoři.

Tab. č. 12 výsledky z kontroly kvality a čistoty DNA kančího spermatu, izoláty krve a štětín z MZLU v Brně a zmražené izoláty krve z laboratoře iGenetika

Sample ID		Nucleic Acid	Unit	260/280	260/230	doředěno	poznámka
KR105/19	IZOLÁT BRNO1/krev	83,1	ng/μl	1,93	3,4		
KR106/19	IZOLÁT BRNO2/krev	104,2	ng/μl	1,92	3,28	10μl	
KR107/19	IZOLÁT BRNO3/krev	197,2	ng/μl	1,82	2,28	15μl	
KR108/19	IZOLÁT BRNO4/krev	176,4	ng/μl	1,92	2,53	15μl	
KR109/19	IZOLÁT BRNO5/krev	103,3	ng/μl	1,93	3,24	10μl	
KR110/19	IZOLÁT BRNO6/krev	99	ng/μl	1,97	3,9	10μl	
KR111/19	IZOLÁT BRNO7/krev	69,4	ng/μl	1,96	6,14		
KR112/19	IZOLÁT BRNO8/krev	89,5	ng/μl	1,94	3,64		
KR113/19	IZOLÁT BRNO9/krev	88	ng/μl	1,94	3,93		
KR114/19	IZOLÁT BRNO10/krev	187,2	ng/μl	1,93	2,88	15μl	
KR115/19	IZOLÁT BRNO11/štětín	165,3	ng/μl	2,05	3,26	15μl	
KR116/19	IZOLÁT BRNO12/štětín	19,4	ng/μl	1,81	-3,46		
KR117/19	IZOLÁT BRNO13/štětín	16,4	ng/μl	2,29	-0,95		
KR118/19	IZOLÁT BRNO14/štětín	26,3	ng/μl	2,12	-2,29		
KR119/19	IZOLÁT BRNO15/štětín	36	ng/μl	2,03	-83,05		
KR120/19	IZOLÁT BRNO16/štětín	121,2	ng/μl	1,94	3,31	10μl	
KR121/19	IZOLÁT BRNO17/štětín	28,1	ng/μl	2,23	-2,49		
KR122/19	IZOLÁT BRNO18/štětín	22,7	ng/μl	2,02	-1,83		
KR123/19	IZOLÁT BRNO19/štětín	43	ng/μl	1,98	7,39		
KR124/19	IZOLÁT BRNO20/štětín	60,2	ng/μl	2,05	14,04		
KR135/19	kančí sperma FNA027	13,4	ng/μl	1,93	-7,24		menší vstup.zdroj: 50μl
KR136/19	kančí sperma 022 (1)	15,4	ng/μl	1,97	2,08		ucpaná kolonka
KR137/19	kančí sperma 022 (2)	81,9	ng/μl	1,89	2,84		přepipetovaná kolonka
KR 138/19	PRASE(P1/18) KREV	93	ng/μl	1,07	0,35		
KR139/19	PRASE(P7/19) KREV	56,2	ng/μl	0,93	0,28		

Izoláty poskytnuté MZLU v Brně, které dosahovaly koncentrace vyšší nebo se rovnaly 100 ng/μl, byly naředěny Elučním pufrem. Důvodem ředění je neznámý postup izolace laboratoře, a tedy nejistota, zda vzorek s takovou koncentrací bude akceptován v průběhu čtení na iScanu a nenastane chyba v podobě nepřechzení vzorku.

Kančí sperma bylo zařazené z jednoho zdroje 2x – KR 135/19 a KR 136/19. Důvodem byly nastalé potíže během izolace přes kolonkovou metodu (viz. 5.4 Výsledky izolace kančího spermatu), kdy se kolonka během prvního pokusu izolace ucpala a při druhém pokusu byl odstředěný extrakt přepipetován na jinou kolonku a dále zpracován dle daného izolačního postupu.

Výsledné koncentrace a kvalita DNA byly vyhovující pro aplikaci na PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina.

Do procesu PreAmplifikačního a dále PostAmplifikačního, loadingu vzorků na čipy bylo zaevidováno 96 vzorků, což znamená, že ve výsledku byly k dispozici 4 čipy.

Výsledky musíme rozdělit do 4 tabulek podle čísla čipu a vytvořeného SampleSheet:

Tab. č. 13 výsledky aplikace DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina a stanovené call rate – čip 203734380001

DNA Report on D:\iScan_data\prasechip_203734380001\prasechip_203734380001_DNAReport.csv					
Row	DNA_Name	#No_Calls	#Calls	Call_Rate	
1	KR1900044	440	58879	0.9926	štětiny
2	KR1900045	575	58744	0.9903	štětiny
3	KR1900047	602	58717	0.9899	štětiny
4	KR1900050	537	58782	0.9909	štětiny
5	KR1900051	577	58742	0.9903	štětiny
6	KR1900052	418	58901	0.993	štětiny
7	KR1900053	500	58819	0.9916	štětiny
8	KR1900055	6885	52434	0.8839	štětiny
9	KR1900056	622	58697	0.9895	štětiny
10	KR1900058	519	58800	0.9913	štětiny
11	KR1900061	577	58742	0.9903	štětiny
12	KR1900067	594	58725	0.99	štětiny
13	KR1900069	600	58719	0.9899	štětiny
14	KR1900070	569	58750	0.9904	štětiny
15	KR1900072	587	58732	0.9901	štětiny
16	KR1900073	667	58652	0.9888	štětiny
17	KR1900075	595	58724	0.99	štětiny
18	KR1900077	445	58874	0.9925	štětiny
19	KR1900083	578	58741	0.9903	štětiny
20	KR1900084	615	58704	0.9896	štětiny
21	KR1900087	526	58793	0.9911	štětiny
22	KR1900088	595	58724	0.99	štětiny
23	KR1900090	537	58782	0.9909	štětiny
24	KR1900091	586	58733	0.9901	štětiny

Z výsledků prvního čipu „001“ můžeme vyčíst, že aplikace DNA a její hodnocení v GenomeStudio proběhlo úspěšně. Vzorek KR 55/19 dosáhl call rate pouhých 0,88. Pokud zkontrolujeme namerenou kvalitu a koncentraci DNA daného vzorku, která je 79,9 ng/μl, můžeme konstatovat, že chyba ve vyhodnocení je náhodná/biologická a vzorek v dalším běhu čipů zařadíme zpátky do procesu.

Tab. č. 14 výsledky aplikace DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina a stanovené call rate – čip 203203010002

DNA Report on D:\iScan_data\prasechip_203203010002\prasechip_203203010002_DNAReport.csv					
Row	DNA_Name	#No_Calls	#Calls	Call_Rate	
1	KR1900092	456	58863	0.9923	štětiny
2	KR1900093	559	58760	0.9906	štětiny
3	KR1900094	532	58787	0.991	štětiny
4	KR1900095	444	58875	0.9925	štětiny
5	KR1900096	585	58734	0.9901	štětiny
6	KR1900097	504	58815	0.9915	štětiny
7	KR1900098	549	58770	0.9907	štětiny
8	KR1900099	545	58774	0.9908	štětiny
9	KR1900100	537	58782	0.9909	štětiny
10	KR1900101	531	58788	0.991	štětiny
11	KR1900102	561	58758	0.9905	štětiny
12	KR1900103	434	58885	0.9927	štětiny
13	KR1900104	509	58810	0.9914	štětiny
14	KR1900125	477	58842	0.992	štětiny
15	KR1900126	502	58817	0.9915	štětiny
16	KR1900127	521	58798	0.9912	štětiny
17	KR1900128	452	58867	0.9924	štětiny
18	KR1900129	486	58833	0.9918	štětiny
19	KR1900130	498	58821	0.9916	štětiny
20	KR1900131	497	58822	0.9916	štětiny
21	KR1900132	446	58873	0.9925	štětiny
22	KR1900133	481	58838	0.9919	štětiny
23	KR1900134	510	58809	0.9914	štětiny
24	KR1900135	541	58778	0.9909	kančí sperma

Druhý vyhodnocený čip „002“ vykázal naprosto vyhovující hodnoty pro pozitivní uzavření této sady vzorků. Jedná se o vzorky štetinových cibulek izolované na TECAN EVO Freedom.

Kančí sperma, které bylo izolováno z menšího vstupního objemu 50 μl, a který vykazoval nízkou koncentraci DNA 13,4 ng/μl má hodnoty Call rate 0,9909 a počty nepřechtených 541 SNP, což je výborný výsledek.

Tab. č. 15 výsledky aplikace DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina a stanovené call rate – čip 203225160003

DNA Report on D:\iScan_data\prasechip_203225160003\prasechip_203225160003_DNAReport.csv					
Row	DNA_Name	#No_Calls	#Calls	Call_Rate	
1	KR1900078	422	58897	0.9929	šťětiny
2	KR1900079	454	58865	0.9923	šťětiny
3	KR1900080	424	58895	0.9929	šťětiny
4	KR1900081	370	58949	0.9938	šťětiny
5	KR1900082	317	59002	0.9947	šťětiny
6	KR1900085	286	59033	0.9952	šťětiny
7	KR1900086	479	58840	0.9919	šťětiny
8	KR1900089	522	58797	0.9912	šťětiny
9	KR1900043	396	58923	0.9933	šťětiny
10	KR1900046	424	58895	0.9929	šťětiny
11	KR1900048	355	58964	0.994	šťětiny
12	KR1900054	475	58844	0.992	šťětiny
13	KR1900057	542	58777	0.9909	šťětiny
14	KR1900059	447	58872	0.9925	šťětiny
15	KR1900060	510	58809	0.9914	šťětiny
16	KR1900062	500	58819	0.9916	šťětiny
17	KR1900063	394	58925	0.9934	šťětiny
18	KR1900064	411	58908	0.9931	šťětiny
19	KR1900065	544	58775	0.9908	šťětiny
20	KR1900066	436	58883	0.9926	šťětiny
21	KR1900068	452	58867	0.9924	šťětiny
22	KR1900071	448	58871	0.9924	šťětiny
23	KR1900074	424	58895	0.9929	šťětiny
24	KR1900076	788	58531	0.9867	šťětiny

Čip „003“ a jeho hodnocení proběhlo opět v pořádku. V této sadě vzorků se jedná o izoláty, které byly izolovány na druhém robotu HAMILTON Firefly Nimbus 96. Z výsledků vyplývá, že Nimbus je pro SNP hodnocení též vyhovujícím robotem.

Poslední 4. čip se skládá z kančího spermatu, krví a izolátů krve a štětín. Jelikož se nejedná o vzorky, které by měly v budoucnu laboratoří iGenetika procházet v rutinním běhu, musely se izoláty ručně aplikovat v průběhu procesu PreAmplifikačního.

Tab. č. 16 výsledky aplikace DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina a stanovené call rate – čip 203734380010

DNA Report on D:\iScan_data\chip_203734380010\chip_203734380010_DNAReport.csv					
Row	DNA_Name	#No_Calls	#Calls	Call_Rate	
1	KR1900136	523	58796	0.9912	kančí sperma
2	KR1900137	560	58759	0.9906	kančí sperma
3	KR1900138	5452	53867	0.9081	krev
4	KR1900139	584	58735	0.9902	krev
5	KR1900105	559	58760	0.9906	izolát krev Brno
6	KR1900106	528	58791	0.9911	izolát krev Brno
7	KR1900107	529	58790	0.9911	izolát krev Brno
8	KR1900108	652	58667	0.989	izolát krev Brno
9	KR1900109	566	58753	0.9905	izolát krev Brno
10	KR1900110	555	58764	0.9906	izolát krev Brno
11	KR1900111	542	58777	0.9909	izolát krev Brno
12	KR1900112	392	58927	0.9934	izolát krev Brno
13	KR1900113	489	58830	0.9918	izolát krev Brno
14	KR1900114	531	58788	0.991	izolát krev Brno
15	KR1900115	696	58623	0.9883	izolát štětiny Brno
16	KR1900116	795	58524	0.9866	izolát štětiny Brno
17	KR1900117	2669	56650	0.955	izolát štětiny Brno
18	KR1900118	998	58321	0.9832	izolát štětiny Brno
19	KR1900119	1429	57890	0.9759	izolát štětiny Brno
20	KR1900120	571	58748	0.9904	izolát štětiny Brno
21	KR1900121	756	58563	0.9873	izolát štětiny Brno
22	KR1900122	687	58632	0.9884	izolát štětiny Brno
23	KR1900123	821	58498	0.9862	izolát štětiny Brno
24	KR1900124	734	58585	0.9876	izolát štětiny Brno

Výborný výsledek kančího spermatu ukazuje na další možnou nízkou hranici koncentrace izolované DNA při aplikaci na čipy. Rozhodující vliv na úspěšnou analýzu DNA spermatu na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina, má čistota izolátu DNA (A260/280). Tedy nikoliv absolutní výtěžek izolace (ng/μl). Pokud je relativně nízká koncentrace izolované DNA, avšak je zachována vysoká čistota, nemá to negativní vliv na konečný výsledek call rate a případnou negaci výsledku v podobě nepřečtení vzorku na čipu.



Krev KR 138/19 byla nejstarším uchovávaným zmrazeným izolátem v iGenetice, pod původním čílem P1/18. Koncentrace DNA byla vyhovující 93 ng/μl, zřejmě nevyhovovala kvalita čistoty izolátu.

V roce 2020 proběhla úspěšná izolace kančího sperma, dodaného do laboratoře v odběrových sadách francouzské firmy Yxia. Dávky byly uchovávané s barevným ředidlem.

Na základě kladných výsledků izolace DNA byly vzorky postoupeny dále k SNP testaci, kde se očekávalo, zda barevnost inseminačních dávek nějak ovlivní konečný výsledek a nenaruší průběh čtení čipů v iScan. Z tabulky č. 17 můžeme vyčíst, že barevný stav inseminačních dávek nijak neovlivnil průběh testace a může do laboratoře přijímat i takové zdroje DNA. Call rate u všech kančích spermat se pohybují na hodnotě 0,99.

*Tab. č. 17 vybrané výsledky aplikace DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina a stanovené call rate – čip 203734380020, barvené kančí sperma*

DNA Report on D:\iScan_data\chip_203734380020\chip_203734380020_DNAReport.csv					
Row	DNA_Name	#No_Calls	#Calls	Call_Rate	
18	2000099KR	363	58956	0.9939	kančí sperma
19	2000100KR	359	58960	0.9939	kančí sperma
20	2000101KR	389	58930	0.9934	kančí sperma
21	2000102KR	415	58904	0.993	kančí sperma
22	2000103KR	402	58917	0.9932	kančí sperma
23	2000104KR	403	58916	0.9932	kančí sperma
24	2000105KR	360	58959	0.9939	kančí sperma rezidua

## 6 Diskuze

### 6.1 Pilotní studie, použití 1. čipu

Štětinové cibulky, k provedení prvního pilotního PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina, byly vybrány z náhodných odběrů. Byly provedeny dle zadání Svazu chovatelů prasat, z.s. v rámci řešení projektu. Odběr probíhal ve třech šlechtitelských chovech prasat.

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

U štětín i nasálních stěrů byla provedena vizuální kontrola a na jejím základě byly vyloučeny vzorky DNA, které neodpovídaly požadovanému standardu.

DNA byla izolována vybranými metodami: Magnetické kuličky – u štětínových cibulek a metoda CHELEX u nasálních stěrů. Dále proběhlo zhodnocení kvality izolátu DNA a byly vybrány izoláty pro aplikování na PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina v protokolu Illumina HD Infinium technologie.

Tab. č. 18 Sumární výsledky pilotní studie odběru vybraných biologických zdrojů DNA u prasat (zdroj Schröffelová & Němcová et al. 2019)

	ŠTĚTINOVÉ CIBULKY	NASÁLNÍ STĚRY
POČET ODEBRANÝCH VZORKŮ	115	33
POČET NESTANDARDNÍCH ODBĚRŮ VYLOUČENÝCH Z DALŠÍ ANALÝZY PO PRVOTNÍ VIZUÁLNÍ KONTROLE	6	8
% ÚSPĚŠNOSTI ODBĚRU	94,7 %	75,8 %
ROZMEZÍ KONCENTRACE IZOLOVANÉ DNA ng/μL	338,4 – 13,6	154,7 – 64,5
PRŮMĚRNÁ KONCENTRACE ng/μL	102,5	247,1
PRŮMĚRNÁ ČISTOTA IZOLOVANÉ DNA A260/280 (NanoDrop)	2,01	1,09
ROZMEZÍ DOSAŽENÝCH „call rate“ PO APLIKACI REPREZENTATIVNÍCH VZORKŮ DNA NA PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina	0,997 – 0,992	0,977 – 0,637
PRŮMĚRNÁ HODNOTA „call rate“	0,994	0,807

V rámci pilotní studie bylo zjištěno, že štětínové cibulky jsou nejvhodnějším biologickým zdrojem genomické DNA u prasat. Rozhodnutí je na základě posouzení celého průběhu procesu. Tedy, nízký počet opakování odběru štětínových cibulek z dodaných zdrojů tj. 6 vyřazených štětín z celkového počtu 115 přijatých biologických vzorků. Vysoká úspěšnost

izolace, kde výsledkem je kvalitní izolát DNA v rozmezí 338,4 – 13,6 µl, koncentrace a čistota DNA v průměru hodnoty 2,01. Výsledky korespondují se Sironem et al. 2011. Dále je vysoká úspěšnost analýzy DNA extraktů na PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina, která je vyjádřena tzv. call rate.

Na základě výsledků „call rate“ je možné zařadit SNP genotypy stanovené v rámci pilotní studie do dalšího bioinformatického zpracování pro vytvoření referenční populace a vývoj postupů pro odhad genomických plemenných hodnot znaků prasat zařazených do Českého národního šlechtitelského programu.

Na podkladě zjištěných skutečností můžeme potvrdit hypotézu, že „nejvhodnějším biologickým zdrojem DNA budou prasečí štětiny.

Z předešlých zkušeností z kladného testování nasálních stěrů u skotu byl předpoklad, že i u prasat bude tento způsob odběru zdroje DNA kvalitní a vyhovující. U nasálních stěrů se očekával kladný výsledek. Další pozitivum měly mít nasální stěry v podobně neinvazivního odběru a snadného provedení.

Nasální stěry byly odebrány v Testační stanici Ploskov, Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, ČZU Praha. Již na počátku se začaly objevovat první negativní názory na tuto metodu odběru DNA. Pro technika byl proces odběru u zvířete komplikovaný, nevyhovující. Dále byly potíže s následnou kvalitou odběru nasálního stěru. Odběry se musely ve vysokém počtu opakovat. Následná izolace proběhla s nízkou úspěšností, zejména čistota výsledné DNA byla nevyhovující. Pro analýzu izolované DNA na Porcine SNP60 v2 BeadChips Illumina bylo možné použít nízký počet ucházejících izolátů. Výsledkem je nízká úspěšnost analýzy na čipu vyjádřená „call rate“. Pouze u 4 vzorků bylo dosažené call rate, které umožňuje zařazení výsledných SNP genotypů do dalšího bioinformatického zpracování. Obvykle uváděná hraniční hodnota pro zařazení SNP analýzy do výpočtu GPH u prasat je >0,90, lépe >0,95 (Uimari et al. 2011; Bovo et al. 2019).

Příčinou nekvalitních odběrů a následných negativních výsledků SNP testace je zřejmě na základě anatomického rázu. Jedná se o charakter utváření nozder u prasat. Z anatomického – funkčního hlediska nozder prasete ve srovnání s jinými zvířaty (skot, malí přežvýkavci, kůň), jsou charakterizovány jako nejméně poddajné a ze srovnaných druhů nejtvrďší (Reece 2009). Z tohoto důvodu, z nozder prasete nelze získat dostatečné množství biologického materiálu nasální stěrovkou, kde nedochází k narušení sliznice. Z této skutečnosti a následné zkušenosti během izolace nelze nasální stěr doporučovat jako alternativní zdroj DNA k prasečím štětinám a nelze jej uvádět do praxe.

Nasální stěry tedy nejsou vhodným biologickým zdrojem gDNA u prasat a potvrzují hypotézu, že „nejméně vhodným biologickým zdrojem DNA budou nasální stěry“.

Stanovení mezní hodnoty „call rate“ pro zhodnocení úspěšnosti SNP testace a poskytnutí dat pro výpočet GPH prasat, se stanoví na základě kolektivního rozhodnutí. Tedy řešitelé projektu a jeho kolezích podílejících se na projektu, na Svazu chovatelů prasat. Vycházet se bude z průběžného dosahovaného call rate z výzkumu a z mezních hodnot publikovaných v literatuře. Zejména ze studií SNP na prasatech ze zahraničí, ale i ze zkušeností kolegů z hodnocení dojného skotu v ČR. Z jedné ze zahraničních studií, kde testovali SNP u populace bílých prasat na PorcineSNP80 BeadChip stanovili na základě vlastního výzkumu mezní cal

rate na 0,9 (Wang et al. 2018) a vzorky pod hodnotu 0,9 vyloučili. Použili ovšem čip, který obsahuje více SNP, než obsahuje čip využívaný v našem výzkumu. Další studie ohledně testování SNP pro odhalování kandidátních genů pro růst relevantní vlastnosti u prasat (Tang et al. 2019) uvádí, že bylo genotypováno pomocí Illumina PorcineSNP50 Bead Chip, což je čip s menším obsahem SNP a call rate stanovili na  $> 0,9$ , přičemž call rate SNP  $< 0,9$  vyřadili.

Na základě zkušenosti z genotypování zvířat v laboratoři víme, že mezní hranice call rate u dojeného skotu v ČR je stanovena na hodnotu 0,92.

V současné chvíli se jeví jako mezní hranice call rate u prasat na 0,96, čemuž vyhovují prozatím všechny provedené SNP testy na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina.

## 6.2 Stanové cíle

Na základě postupu metodiky a výsledků z celého procesu testace prasečích zdrojů můžeme zhodnotit stanovené cíle, které byly stanoveny na začátku dílčí části projektu pro oblast laboratoře a SNP genotypizace vybraných jedinců prasat, potřebných pro tvorbu referenční populace.

Zásadním cílem bylo nahradit tradiční biologický zdroj DNA – odebraná nesražená krev, méně invazivním odběrem, s ohledem na náročnost odběru, zacházení s ním, uchováváním a aby byl zdroj uživatelsky příjemný, bylo zachováno welfare zvířete. V návaznosti na zdroj se snížil náklad na odběr vzorku DNA a přeprava vzorku do laboratoře neznamenal znehodnocení zdroje. Pro uskutečnění těchto nároků bylo vycházeno z předešlé metodiky stanovené na skot (Schröffelová & Němcová et al. 2018) a zkušenosti z ní. Z hlediska všech hodnocených kritérií nejvíce vyhovovaly prasečí štětiny s folikuly, u skotu tomu byly chlupy (Schröffelová & Němcová et al. 2018).

Dále testovaná krev a spermatické dávky vyžadují u chovatele již invazivní zásah, vyškolený personál, přítomnost veterinárního technika či přímo veterinárního lékaře. Tedy cena provedení odběru zdroje DNA se na rozdíl od odběru stětinových cibulek zvyšuje. DNA ze zmíněných zdrojů (krev, tkáň ucha, kančí sperma) bude v důvodných případech DNA dále izolována, mimo rutinní režim za individuálně stanovených podmínek (Schröffelová & Němcová et al. 2018). V případě ověření zvířete, které již není na živu bude možné využít reziduálních a archivních zdrojů. Opět mimo rutinní provoz laboratoře za speciálních stanovených podmínek.

Metoda izolace DNA ze štětinových cibulek na základě metody „magnetických kuliček“ byla zvolena vhodně. Vybraná metoda má benefity v možnosti uplatnit automatizaci a robotizaci izolačního procesu, a následně tak navýšit průchodnost vzorků laboratoří a tím dosáhnout výhodných ekonomických podmínek, snížení cen izolačního procesu a dosáhnout výhodných ekonomických podmínek pro plošné SNP genotypování prasat.

Dalším cílem bylo vytvoření odběrové sady pro chovatele prasat. Opět se vycházelo z předešlé zkušenosti u skotu, kde byla odběrová sada úspěšně vytvořena (Schröffelová & Němcová et al. 2018) a v současné době téměř výhradně využívána. V průběhu přijímání vzorků k izolaci DNA byla sada poskytnuta Svazu prasat a řešiteli projektu, kteří sadu předávali dále chovatelům a zootechnikům. V rámci vytvoření odběrové sady byla napsána a nabídnuta chovatelům prasat a zainteresovaným organizacím jednoduchý postup, podle

kterého budou v chovech prasat plošně odebírány standardizované biologické vzorky do optimalizovaných odběrových sad (viz příloha) (Schröffelová & Němcová et al. 2018, Schröffelová & Němcová et al. 2019). Odběrová sada byla zvolena vhodně a přes prvotní problémy se správným provedením odběru, se zainteresovaní chovatelé naučili s odběrovou sadou zacházet a do laboratoře tak přicházely standardizované vzorky vhodné k izolaci a minimalizovala se žádost o nový, opakovaný odběr. Odběrová sada zachovává komfort při odebírání štětín v chovu a v laboratoři usnadňuje proces zpracování zdroje k izolaci a následnou archivaci vzorku.

Dle předešlé metodiky pro skot (Schröffelová & Němcová et al. 2018) navržený odběrový set musí zamezit možnosti vzájemné kontaminace vzorků během odběru, transportu do laboratoře, prvotní evidence a zadávání zakázky do laboratorního systému, a též během prvního kroku laboratorního zpracování, kterým je odebrání aliquotu chlupových cibulek na začátku izolačního procesu. Chlupové cibulky se od chlupů oddělují manuálně – ustřížením. Dále je nutné, aby navržený odběrový set umožnil archivaci zbytku nepoužitého zdroje DNA pro možnost opakování izolace DNA. Což odběrová sada pro prasečí štětiny zcela naplňuje (viz příloha).

Aby proces genotypování zvířat probíhal kontinuálně, musela být v počátku příjmu biologického zdroje prováděna jeho primární kontrola. Fyzická kontrola na základě zkušeností z provozu laboratoře. Důvodem je zamezení následných chyb v průběhu izolace, znehodnocení izolace, jeho následném zpracování na microarray's, a tím znehodnocení místa na čipu, opakování testace a v té návaznosti snížení nákladů vynaložených na nekvalitní zdroj DNA (Schröffelová & Němcová et al. 2018). Proces genotypizace gDNA prasat na PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina je finančně nákladný a časově náročný. Je nutná důsledná eliminace nekvalitních izolátů DNA z analytických procesů ještě před aplikací na microarray's tak, aby se minimalizovaly zbytečné finanční a časové ztráty (Schröffelová & Němcová et al. 2019). V rámci projektu byl vytvořený systém kontroly DNA izolátů získaných z vybraných zdrojů. Při posuzování kvality izolátu je nutné hodnotit současně čistotu, koncentraci a zároveň na tyto hodnoty nahlížet jako na celek. Pokud se budeme soustředit pouze na jednu z hodnot, nebo ji nadřazovat druhé, můžeme se vystavit riziku, že provedeme chybné rozhodnutí. Buď můžeme z procesu analýzy na čipu vyloučit zcela zbytečně použitelný biologický zdroj, chovatele tak zbytečně žádáme o opakovaný odběr biologického zdroje. Anebo do dalšího procesu postoupíme izoláty, které neodpovídají kvalitou nárokům procesu SNP testace na PorcineSNP60 v2 Illumina BeadChips. Proces genotypizace proběhne nestandardně a konečným výsledkem je nízký call rate. Celý proces se bude muset opakovat a navýší se cena izolace a testace, naruší se rutinní proces laboratoře, kdy bude muset být opakovaný odběr zařazen do jiné cílšené řady vzorků.

Základní stupeň kontroly kvality gDNA je spektrofotometrické měření DNA izolátů na NanoDrop (ThermoScientific). Spektrofotometrické vyhodnocování roztoku nukleových kyselin probíhá při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Nukleové kyseliny pohlcují UV záření na maximální absorbanci v oblasti 260 nm, proteiny mají maximum absorbance v oblasti 280 nm. Absorbance při 260 nm odráží „absolutní“ koncentraci nukleové kyseliny, absorbance při 280 nm odráží její čistotu, tj. míru přítomnosti proteinů. Poměr A260/A280 poskytuje informaci o čistotě extraktu. Čistá DNA obvykle vykazuje hodnotu tohoto poměru okolo

1,8 - 2,0. Pokud hodnota poměru je výrazně nižší, je roztok kontaminován proteiny či rezidui extrakčních roztoků (Barbas et al. 2007). Na základě těchto informací do dalšího procesu testace byly bez další kontroly kvality DNA postoupeny všechny izoláty DNA s koncentrací  $\geq 50$  ng/ $\mu$ L a čistotou  $A_{260}/_{280} \geq 1.8$  (Schröffelová & Němcová et al. 2019).

DNA izoláty s koncentrací  $\leq 50$  ng/ $\mu$ L a čistotou  $A_{260}/_{280} \geq 1.8$  jsou postoupeny dodatečné kontrole kvality DNA pomocí metody multiplex PCR. Primárně je PCR metoda určena k starší metodě, STR genotypizaci prasat s užitím panelu Animaltype Pig PCR Amplification Kit (Robino et al. 2008). Bylo zjištěno, že plnohodnotná amplifikace všech 11 tetranukleotidových STRs zahrnutých v Animaltype Pig kitu je rovněž ukazatelem předpokládané úspěšnosti aplikace takto prověřeného DNA extraktu na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina s možností dosažení dostatečně vysokého call rate (Schröffelová & Němcová et al. 2019). Na základě zkušeností z kontroly přes STR metodu a následné testaci SNP jako limitní koncentrace pro aplikaci na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina byla stanovena hodnota  $\geq 9.5$  ng/ $\mu$ L a  $A_{260}/_{280} \geq 1.8$ .

Posledním, důležitým cílem pro laboratoř byl přechod z manuálního procesu izolace do robotického a zvýšit tak průchodnost vzorků v laboratoři. Proces robotizace vycházel opět ze zkušeností metodiky pro skot (Schröffelová & Němcová et al. 2018), kde se postupovalo manuální cestou a na základě výsledků izolací se postupně přecházelo na robotickou izolaci DNA a SNP testování. Zcela obdobně tomu tak bylo u izolování biologických zdrojů prasat. Velký důraz se kladl na kvalitu vstupního biologického zdroje. Chlupové cibulky u skotu i prasečí štětiny musí vykazovat kvalitní odběr v odběrové sadě, jinak se izolace nepodaří. Nebo bude muset být izolace DNA provedena mimo rutinní proces, ve speciálním režimu, a tím se značně navyšuje cena za provedení genotypizace zvířete.

Na závěr můžeme konstatovat, že bez kvalitního odběru biologického zdroje DNA není možné provést úspěšnou izolaci DNA a následně provést úspěšné genotypování zvířat tak, aby se mohly výsledky využít v dalším postupu ve zpracování pro GPH prasat.

## 7 Závěr

- Z výsledků plyne, že jako nejvýhodnější biologický zdroj DNA jsou štetinové cibulky. V případě nutnosti je možné provést analýzu DNA ze vzorků kančího sperma, krve a reziduálních zdrojů či poskytnutých izolátů. I zde jsou výsledky vyhovující.
- Jako nejvhodněji zvolená metoda pro získání izolátu DNA je metoda „magnetické kuličky“. Alternativní forma pro mimořádné zdroje DNA pak kolonková metoda.
- Nasální stěry nevykázaly potřebné hodnoty, aby byly zařazené jako rovnocenný biologický zdroj DNA k prasečím štetinám. Na základě tohoto zjištění formát nasálních stěrů u prasat není již dále podporován.
- Základním, stále se opakujícím faktorem je, že bez kvalitního biologického zdroje DNA nelze provést kvalitní izolaci DNA a dále provést testaci pomocí SNP technologií.
- Proces izolace DNA a její testace přes SNP technologie na PorcineSNP60 v2 BeadChips Illumina je časově i finančně náročný proces, a proto je nutné hned v provopočátku vyřadit nevyhovující zdroje DNA, provést úspěšnou kontrolu izolované DNA, aby nedocházelo ke zbytečným chybám a prodražení testovaného vzorku. V současném průběhu výzkumu metodiky kontrola vzorků probíhá s kladnými výsledky.
- Stanovení mezní hodnoty „call rate“ ve výsledcích bude v rámci zhodnocení průběžných dosažených výsledků na čipech a spolupráce řešitele projektu, podílejících se kolegů a SCHP.
- Industry model laboratoře byl nastaven na izolaci DNA z prasečích štetin. Momentálně režimu laboratoře tento systém vyhovuje. A je možné testaci SNP prasat zařadit k ostatním testovaným skupinám v laboratoři iGenetika, ČMSCH, a.s.
- Vyvinutá odběrová sada je vyhovující, nezasahuje do welfare zvířete a chovateli je uživatelsky příjemná. Odběr vzorků v této sadě vyhovuje i přepravě do laboratoře, nedochází k degradaci vzorku během přepravy, ani k jeho kontaminaci.
- Výzkum probíhal v komplexním projektu ve spolupráci VÚŽV, ČMSCH, ČZU a SCHP. Poskytuje odbornost molekulární a kvantitativní genetiky, informatiky.
- Výsledky budou prostřednictvím ČMSCH a SCHP implementovány do chovatelské praxe.

## 8 Literatura

19/2018 Sb., Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 342/2012 Sb., o zdraví zvířat a jeho ochraně, o přemísťování a přepravě zvířat a o oprávnění a odborné způsobilosti k výkonu některých odborných veterinárních činnostech, ve znění pozdějších předpisů.

AZoNano: Schematic representation of DNA extraction from blood using MagSi-DNA beads. In: azonano.com [online]. 2013 [cit. 2015-4-3]. Dostupné z: [http://www.azonano.com/images/Article\\_Images/ImageForArticle\\_3459%281%29.jpg](http://www.azonano.com/images/Article_Images/ImageForArticle_3459%281%29.jpg)

Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel A T. 2005. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplantation*. **35**:107-119.

Barbas C F, Burton D R, Scott J K, Gregg A, Silverman J. 2010. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2007(11). DOI: 10.1101/pdb.ip47. ISSN 1940-3402. Dostupné také z: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.ip47>

Baruch E, Weller J I. 2008. Estimation of the number of SNP genetic markers required for parentage verification. *Animal Genetics*. **39**: 474-479.

Beránek M, Hegerová J, Drastíková M. 2012. „Alternativní“ biologický materiál pro rutinní analýzu nukleových kyselin – validace preanalytické fáze vyšetření DNA. *Klin. Biochem. Metab.* **20**:31–37.

Beránek M, Vlčková J, Hypiusová V, Živný P, Palička V. 2006. Comparison of various methods used for extraction of genomic DNA from human plasma. *Klin. Biochem. Metab.* **14**:21–24.

Bovo S, Mazzoni G, Bertolini F, Schiavo G, Galimberti G, Gallo M, Dall'olio S, Fontanesi, L. 2019. Genome-wide association studies for 30 haematological and blood clinical-biochemical traits in Large White pigs reveal genomic regions affecting intermediate phenotypes. *Scientific Reports* **9**: 7003.

Schröffelová D, Němcová L, a kol. 2019. Systém odběru vzorků DNA, ISBN 978-80-87633-03-8.

Dvořáková V. 2011. Analýza růstu a jatečné hodnoty moderních genotypů prasat ve vztahu k vybraným kandidátním genům. Praha. Dizertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů.

Foley C, O'farrelly C, Meade K G. 2011. Technical note: Comparative analyses of the quality and yield of genomic DNA from invasive and noninvasive, automated and manual extraction methods. *J. Dairy Sci.*, **94**:3159–3165.



- Fikejzlová M. 2009. Identifikační analýza DNA u dvojčat. Praha. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra antropologie a genetiky člověka. Vedoucí práce Stenzl, Vlastimil.
- Gielda Lindsay A, Rigg S. 2017. Extraction of amplifiable DNA from embalmed human cadaver tissue. *BMC Research Notes*. 10(1). DOI: 10.1186/s13104-017-3066-y. ISSN 1756-0500.
- Goedbloed D J, Megens H J, Van Hooft P, et al. 2013a. Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals recent genetic introgression from domestic pigs into Northwest European wild boar populations. *Molecular Ecology*. **22**: 856-866
- Goedbloed D J, Van Hooft P, Megens H J, et al. 2013b. Reintroductions and genetic introgression from domestic pigs have shaped the genetic population structure of Northwest European wild boar. *BMC Genetics*. **14**:1.
- Gojová L, Kozák L. 2006. Možnosti využití DNA čipů v molekulární diagnostice dědičných onemocnění (Potency of application of DNA microarrays in molecular diagnostics of inherited diseases). *Klin. Biochem. Metab., Česká lékařská společnost J.E.P.*, 2006, vol. **14**:89-95.
- Honda T, Katsuta T, Mukai A F. 2009. Simulation Study on Parentage Analysis with SNPs in the Japanese Black Cattle Population. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. **22**: 1351-1358.
- Huentelman M J, Craig W, Shieh A D, Corneveaux J J, Hu-Lince D, Pearson J V, Dietrich A, Stephan A. 2005. SNIper: improved SNP genotype calling for Affymetrix 10K GeneChip microarray data. *BMC Genomics*. **6**:149.
- Hůska D, Baloun J, Trnková L, Adam V, Kizek R. 2008. Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA. *CHEMagazín*, **18**: 14-15.
- Infinium® Hd Assay Protocol Guide, Illumina Proprietary Part # 11328087, Rev. B November 2009.
- Illumina1. Dostupné z: [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet\\_porcinesnp60.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_porcinesnp60.pdf)
- Illumina2. Dostupné z: [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina\\_sequencing\\_introduction.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf)
- Illumina3. Dostupné z: <https://www.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/porcine-snp60.html>

- Jochová K. 2019. Vztah genů pro imunitní systém k funkčním vlastnostem (reprodukce a zdraví) u skotu. Praha. Doktorská disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů.
- Kamanová V. 2016: Zhodnocení kanců působících na inseminační stanici. Diplomová práce, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Agronomická fakulta.
- Kandalcová J. 2008: Analýza polymorfizmů DNA pomocí sady mikrosatelitů pro určování rodičovství u prasat. Diplomová práce, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Agronomická fakulta.
- Kayser M, De Knijff P. 2011. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nature Reviews Genetics*. **12**:179-192.
- Keijzer H, Endenburg S C, Smits M G, Koopmann M. 2010. Automated genomic DNA extraction from saliva using the QIAextractor. *Clin. Chem. Lab. Med.* **48**:641–643.
- Kidd J R, Friedlaender F R, Speed W C, Pakstis A J, De La Vega F M, Kidd K K. 2011. Analyses of a set of 128 ancestry informative single-nucleotide polymorphisms in a global set of 119 population samples. *Investigative Genetics*. 2(1).
- Krupa E, Schroeffelová D, Žáková E., Němcová L, Krupová Z, Vrtková I. 2019. Možnosti sběru, analýzy a správy SNP dat pro potřeby genomického hodnocení prasat, *Náš Chov*, **11**:31-34.
- Kubíček V. 2010. Spermatologické vyšetření. *Urologie pro praxi. Centrum andrologické péče, České Budějovice*, **11**:204–210.
- Lacombe T, Boursiquot J M, Laucou V, Di Vecchi-Staraz M, Péros J P, This P. 2013. Large-scale parentage analysis in an extended set of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. **126**:401-414.
- Maclean E J, Niles J O, James C M, Iwasiow R M. 2013. Microsatellite and SNP analysis for parentage verification using bovine nasal samples with Performagene™. DNA Genotek Inc., Ottawa, Canada Patent ([www.dnagenotek.com/legalnotices](http://www.dnagenotek.com/legalnotices)) MK-00195 Issue 1/2013-05.
- Metzker M L. 2010. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*. **11**:31-46.
- Meuwissen T, Hayes B, Goddard M. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* **157**:1819-1829.

- Miller D N, Bryant J E, Madsen E L, Ghiorse W C. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**:4715–4724.
- Miller K D, Ellis M, Mckeith F K, Bidner B S, Meisinger D J. 2000. Frequency of the Rendement Napole RN – allele in a population of American Hampshire pigs. *Journal of Animal Sciences*. **78**:1811-1815.
- Morozova O, Marco A, Marra A. 2008. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*. **92**:255-264.
- Neary M T, Neary J M, Lund G K, Garry F B, Holt T N, Mohun T J, Breckenridge R A. 2014. Technical note: A comparison of DNA collection methods in cattle and yaks. *J. Anim. Sci.* **92**:3811–3815.
- Neogen1. Dostupné z: <https://genomics.neogen.com/en/ggp-porcine>
- Owen R D. 1945. Immunogenetic Consequences Of Vascular Anastomoses Between Bovine Twins. *Science*. **102**:400-401.
- Pakstis A J, Speed W C, Fiona F R, Hyland C L, Furtado M R, Kidd J R, Kidd K K. 2010. SNPs for a universal individual identification panel. *Human Genetics*. **127**:315-324.
- Pospíšilová Š, Mayer J. 2005. DNA čipy – moderní metodika analýzy diferenciální genové exprese a její význam pro diagnostiku a léčbu nádorových onemocnění. *Časopis českých lékařů. Centrum molekulární biologie a genové terapie – Interní hematologická klinika FN, Brno, CZ*, **144**:11-17.
- Ramos A M, Crooijmans R P, Affara N A, Amaral A J, Archibald A L, Beever J E, Bendixen, C, Churcher C, Clark R, Dehais P, Hansen M S, Hedegaard J, Hu Z L, Kerstens H H, Law A S, Megens H J, Milan D, Nonneman D J, Rohrer G A, Rothschild M F, Smith T P, Schnabel R D, Van Tassell C P, Taylor J F, Wiedmann R T, Schook L B, Groenen M A. 2009: Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. *PLoS One*. **4**:e6524.
- Raška M. 2006. Základní postupy práce s nukleovými kyselinami. Dostupné on-line: <http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/II.workshop/II.%20workshop%20Milan%20Raska.doc>
- Reece W O. 2009. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat – 2., rozšířené vydání. Grada, 480 stran, ISBN: 978-80-247-3282-4.

- Robino C, Menegon S, Caratti S, Sona B, Gino S, Torre C. 2008. Forensic application of a multiplex PCR system for the typing of pig STRs. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. **1**:614-615.
- Rogers J G, Voullaire L, Gold H, Opitz J M. 1982. Monozygotic twins discordant for trisomy 21. *American Journal of Medical Genetics*. **11**:143-146.
- Ron M, Blank Y, Band M. 1995. Determination of the optimal tissue source and number of microsatellites for detection of zygotic origin of cattle twins. *Animal Biotechnology*, **6**:27-39.
- Samorè A B, Fontanesi L. 2016. Genomic selection in pigs: state of the art and perspectives. *Italian Journal of Science*. **15**: 211-232.
- Sebastianelli A, Sen T, Bruce I J. 2008. Extraction of DNA from soil using nanoparticles by magnetic bioseparation. *Letters in Applied Mikrobiology*, Apr, s. 488-491.
- Seeb L W, Templin W D, Sato S, Abe S, Warheit K, Park J Y, Seeb J E. 2011. Single nucleotide polymorphisms across a species' range: implications for conservation studies of Pacific salmon. *Molecular Ecology Resources*. **11**:195-217.
- Schröffelová D, Němcová L, Hromádková J, Kučera J, Lipovský D, Šteiger V, Příbáňová M. 2018. Optimalizace odběru alternativních biologických vzorků pro návaznou kvalitní izolaci genomické DNA. Certifikovaná metodika vypracovaná v rámci výzkumného projektu MZe NAZV QK1810253, ISBN 978-80-87633-01-4
- Schröffelová D, Němcová L, Kučera J, Lipovský D, Hromádková J, Šteiger V, Příbáňová M. 2019. Systém odběru vzorků DNA, Vytvoření referenční populace a vývoj postupů pro odhad genomických plemenných hodnot znaků prasat zařazených do Českého národního šlechtitelského programu, Metodika byla vypracovaná v rámci výzkumného projektu MZe NAZV QK1910217, ISBN 978-80-87633-03-8
- Sironen A, Uimari P, Vilkki A J. 2011 Comparison of different DNA extraction methods from hair root follicles to genotype Finnish Landrace boars with the Illumina PorcineSNP60 BeadChip. *Agricultural and Food Science*. **20**:143-150.
- Stratz P, Wellmann R, Bennewitz J. 2014. Strategies to implement genomic selection in pig breeding using vary low marker density. Manuscript n. 925. Proceedings of the 10th World Congress Genet Appl Livest Prod, August 2014, Vancouver BC, Canada.
- Šimková H. 2012. Breviář forenzní genetiky: forenzní DNA analýza v otázkách a odpovědích. Brno: Tribun EU. ISBN 978-802-6302-476.


- Šteiger V. 2018. Molekulární diagnostika ptačích schistosom při nákaze přirozených i náhodných hostitelů, Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, s. 33.
- Tang Z, Xu J, Yin L, Yin D, Zhu M, Yu M, Li X, Zhao S, Liu X. 2019. Genome-Wide Association Study Reveals Candidate Genes for Growth Relevant Traits in Pigs. *Frontiers in genetics*, **10**:302.
- Uimari P, Sironen A, Sevón-Aimonen A M. 2011. Whole-genome SNP association analysis of reproduction traits in the Finnish Landrace pig breed. *Genetics Selection Evolution*. **43**:42.
- Verdonck L F, Van Blokland W T M, Bosboomkalsbeek E K, Van Heugten H G, Tilanus M G J, De Weger R A. 1996. Complete donor T cell chimerism is accomplished in patients transplanted with bone marrow grafts containing a fixed low number of T cells. *Bone Marrow Transplant.*, **18**:389 – 395.
- Veselá H. 2009. Odebírání vzorků DNA, nakládání s nimi a následná identifikace osob. Srovnávací studie č. 5.286, Parlament České republiky, Parlamentní institut.
- Walsh P S, Metzger D A, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, **10**:506–513.
- Wang Y, Ding X, Tan Z, et al. 2018. Genome-wide association study for reproductive traits in a Large White pig population. *Animal Genetics*. **49**:127-131.
- Wellmann R, Preuß S, Tholen E, Heinkel J, Wimmers K, Bennewitz J. 2013. Genomic selection using low density marker panels with application to a sire line in pigs. *Genet Sel Evol*. **45**:28.
- Werner F A, Durstewitz O G, Habermann F A, et al. 2004. Detection and characterization of SNPs useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds. *Animal Genetics*. **35**:44-49.
- Wu H, De Gannes M K, Luchetti G, Pilsner J R. 2015. Rapid method for the isolation of mammalian sperm DNA. *Biotechniques*; **58**:293–300.
- Xiang T, Ma P, Ostersen T, Legarra A, Christensen O F. 2015. Imputation of genotypes in Danish purebred and two-way crossbred pigs using low-density panels. *Genet Sel Evol*. **47**:54.
- Yu G C, Tang Q Z, Long K R, Che T D, Li M Z, Shuai S R. 2015. Effectiveness of microsatellite and single nucleotide polymorphism markers for parentage analysis in European domestic pigs. *Genetics and Molecular Research*. **14**:1362-1370.




## 9 Samostatné přílohy

### Odběrový set pro odběr štětinových cibulek


**Složený odběrový set pro odběr štětinových cibulek**



**Kit pro odběr štětinových cibulek pro izolaci DNA**



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



Návod na odběr a manipulaci s odběrovou sadou:

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


**Odběrový kit vložte do obálky, zabráníte kontaminaci odebraného vzorku!**

**ŠTĚTINOVÉ CIBULKY**

AM číslo zvířete:

**Kód pro elektronickou objednávku:**


### Odběrový set pro odběr štětinových cibulek – obálka




**Postup odběru:**

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

**ŠTĚTINOVÉ CIBULKY**



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



Tel: 257 896 329  
imunogenetika@cmsch.cz

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

Set má dvě nedílné části:

- vzorkovnici určenou k fixaci odebraných štětín. Ta je opatřena čárovým kódem a místem pro jednoznačnou identifikaci zvířete (AM číslo), od kterého byl vzorek odebrán.
- Druhou částí setu je obálka, do které se vzorkovnice vkládá, aby byl vzorek chráněn před znehodnocením a možností kontaminace. Přímo na obálce je natištěn jednoduchý návod k odběru vzorku.

## Typy odběru biologického zdroje DNA



Odběr chrupavky TSU (tissue sample unit)



Nasální stěr – použitý, odebraná DNA z nozder prasete  
(v tomto případě vylitý, nepoužitelný, neobsahuje modrou tekutinu pro macerování DNA)







Kančí sperma v odběrové inseminační tubě



Inseminační dávky kančího sperma v odběrové inseminační sadě od francouzské firmy Yxia. Kančí sperma barvené dle plemene prasete:

- Duroc – červená/růžová
- Pietrain – bílá
- Landrase – zelená
- Large white – modrá

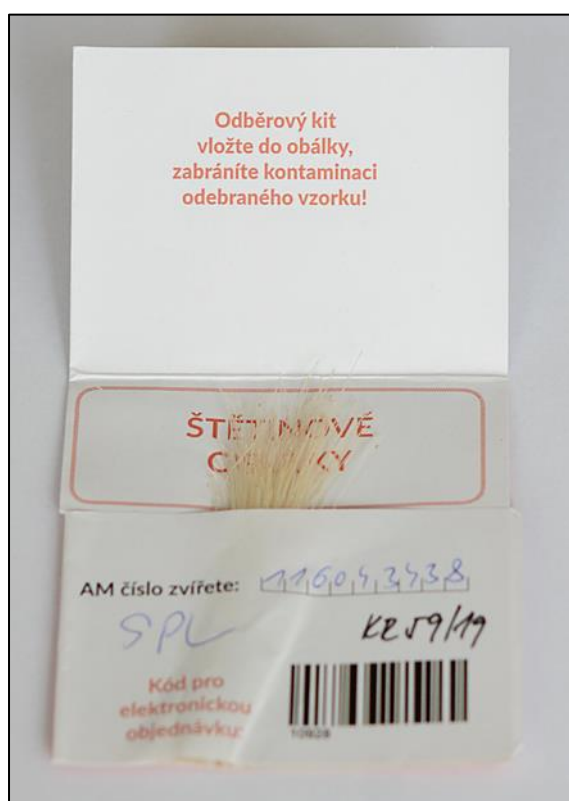


Izoláty krve

**Kvalitně odebrané štětinové cibulky**

×

**Nekvalitně odebrané štětinové cibulky**



### Postup odběru – prasata:

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



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

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

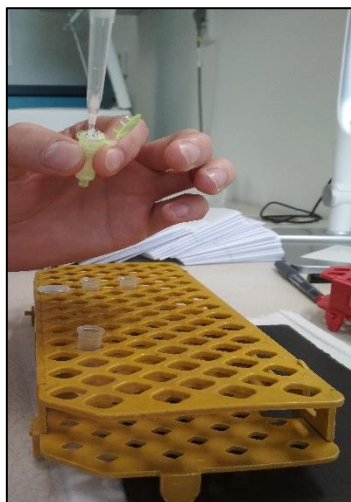
## Průběh izolace a testace přes SNP technologie

### 1. den

Izolace DNA kolonkovou metodou

×

Izolace DNA magnetickými kuličkami



### 2. den

PreAmplifikační proces pro genotypování na robotu TECAN FREEDOM EVO



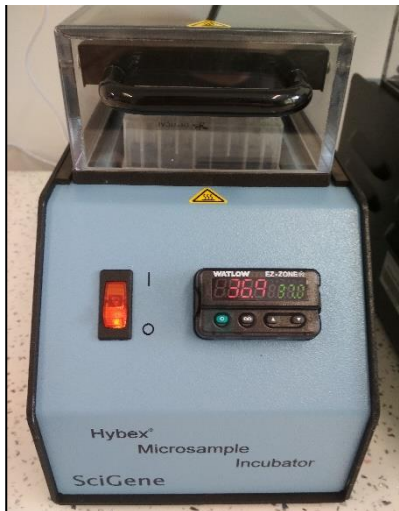
Uložení destičky do inkubátor na 20 – 24 h



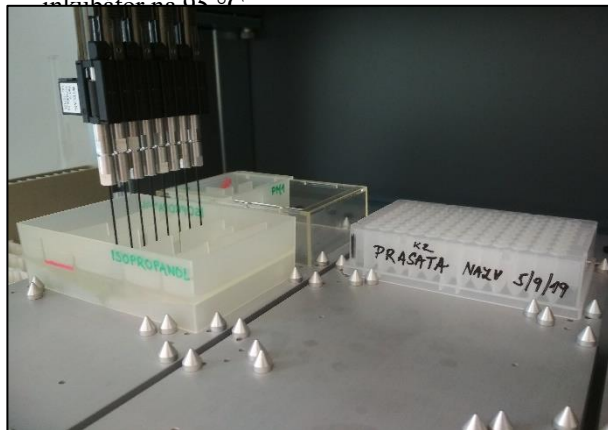
### 3. den

#### PostAmplifikační proces na robotu Tecan Freedom Evo LIHA

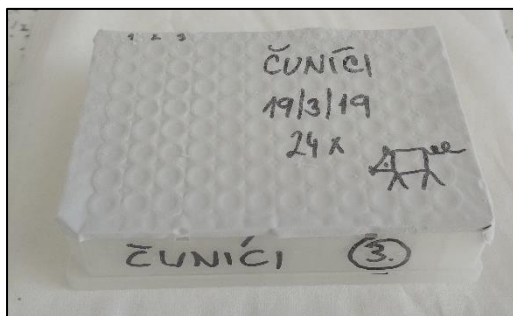
Proces fragmetování DNA a zahřívání destičky se vzorky na 37 °C v Hybex



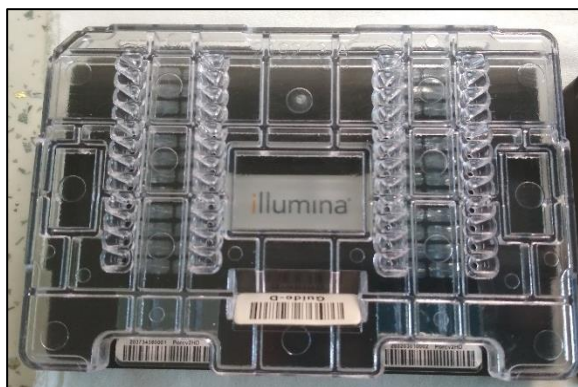
Proces precipitace DNA, sušení pelettek. Následuje proces resuspendace, dále denaturace v Hybex inkubátoru na 95 °C



Ukázka destiček s připravenou DNA k aplikaci na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina



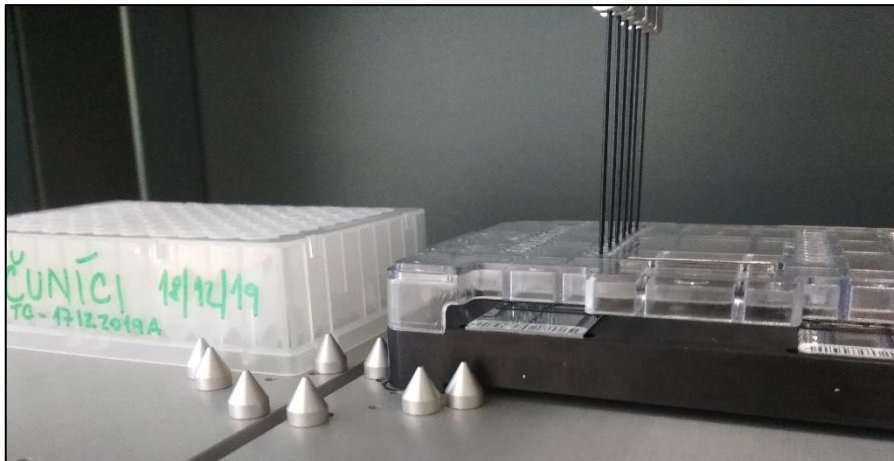
## Příprava čipů pro loading DNA



## PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina



Loading DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChip na TECAN FREEDOM EVO LIHA

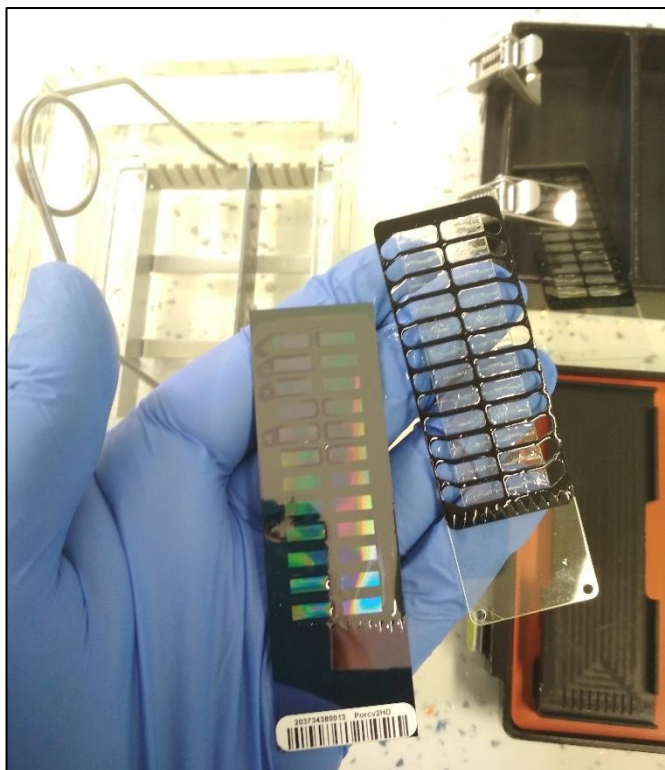


Aplikovaná DNA na PorcineSNP60 v2 BeadChip Illumina a přemístění čipu do komory k inkubaci na 16–24 hod

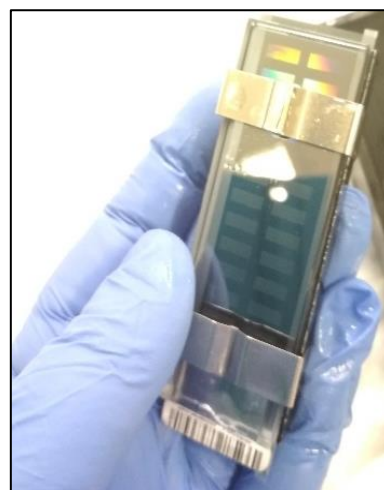


#### 4. den

Vyndání čipů z komory, odstranění folie

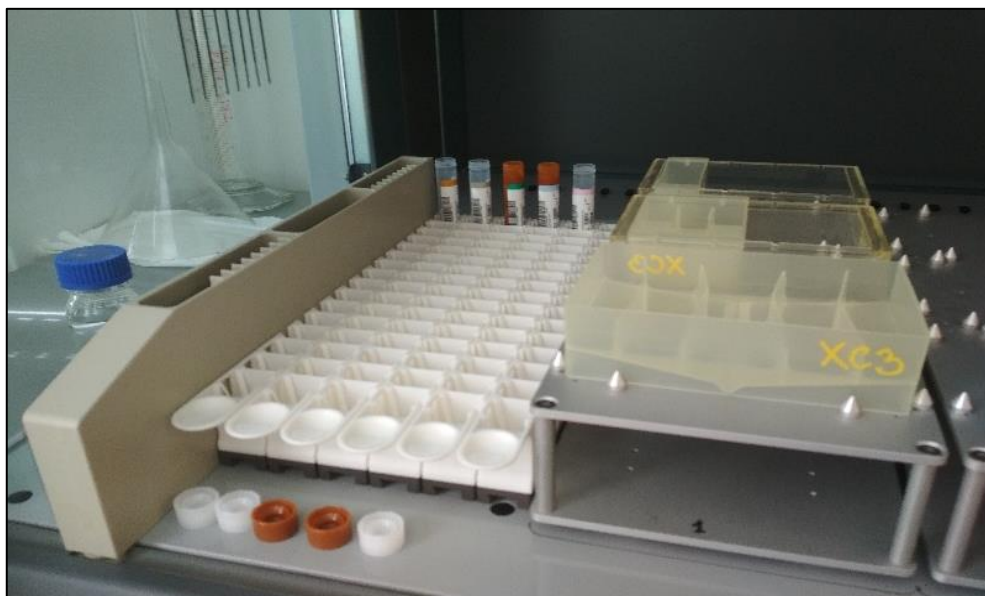


Umývání čipů a příprava „sendviče“ k promývání a barvení

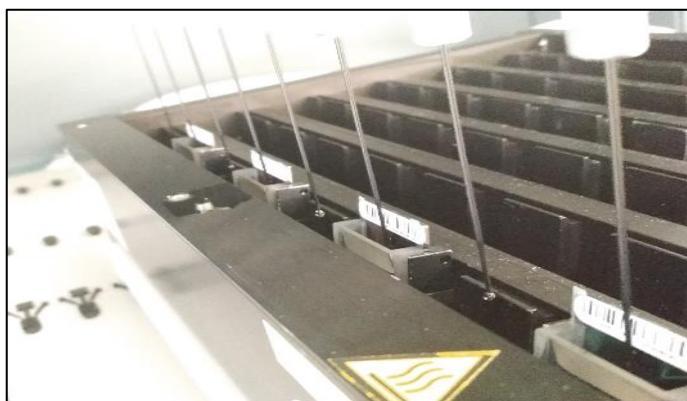




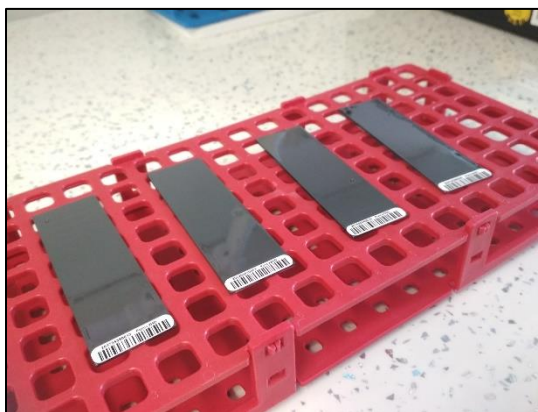
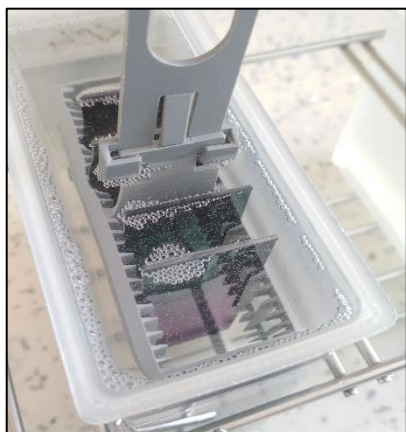
Připravený „probarvovací stůl“, aplikace na čipy na robotu TECAN FREEDON EVO LIHA



Tzv. „barvení“ čipů v Teflow



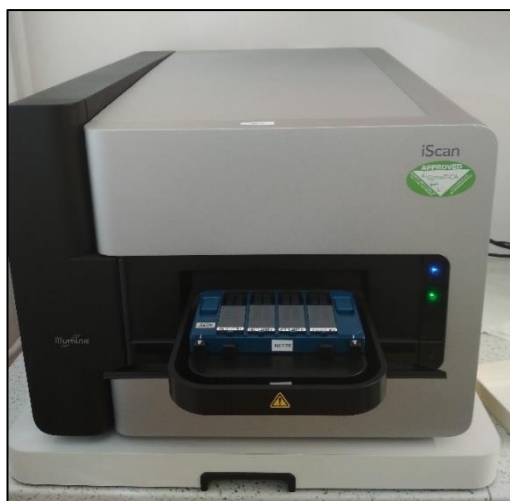
Odstranění „sendviče“, umytí čipů od rezidua chemie, ponoření do „lepidla“, odložení čipů na stojánek k sušení



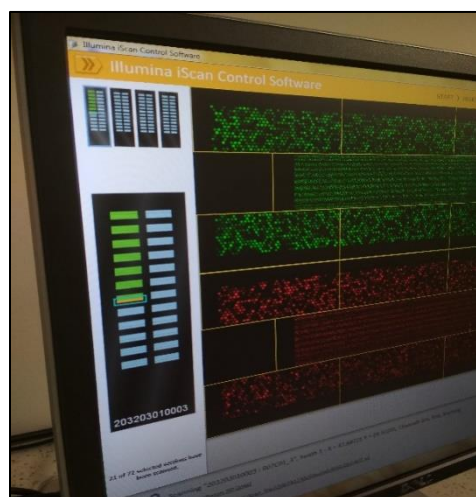
Sušení čipů ve vakuovém desikatoru (0,68 bar) na 50–60 min



Hodnocení čipů pomocí iScan a GenomeStudio – vložení čipů



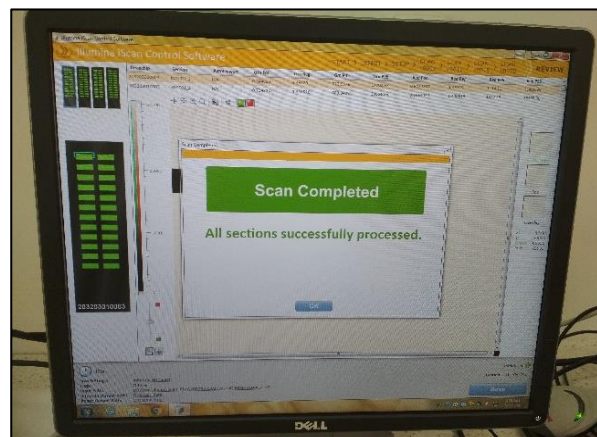
Načítání signálů a vizuální přenesení do pc



Nasnímaný chybný vzorek  
(v dalším hodnocení jeho hodnoty  
budou vykazovat nízký call rate)



Úspěšné dokončení skenování čipů



Zpracování dat a získání výsledných „call rate“ v GenomeStudio

