

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra genetiky a šlechtění**



**Izolace DNA z různých typů biologických vzorků  
pro genetické analýzy huculských koní**

**Bakalářská práce**

**Pavína Čadová**

**Zoorehabilitace a asistenční aktivity se zvířaty**

**Ing. Vladimíra Sedláková, Ph.D.**

© 2020 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Izolace DNA z různých typů biologických vzorků pro genetické analýzy huculských koní" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8. června 2020

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Vladimíře Sedlákové, Ph.D. za cenné připomínky a vstřícnost při vedení mé bakalářské práce a Ing. Daniele Čílové za pomoc a trpělivost při laboratorní práci. Dále bych ráda poděkovala Farmě Hucul a Sdružení SRAZ za umožnění odebírání vzorků od jejich koní a ochotnou spolupráci.

# **Izolace DNA z různých typů biologických vzorků pro genetické analýzy huculských koní**

## **Souhrn**

Získání kvalitní DNA v dostatečném množství a čistotě je klíčové pro provádění veškerých molekulárně-genetických studií a analýz. Mezi důležité faktory procesu získávání DNA patří volba izolační metody a použitý biologický materiál. S ohledem na welfare koní je vhodné pro genetické studie využívat neinvazivně odebírané materiály, u jejichž odběru nedochází k nadměrnému stresu zvířat.

V teoretické části této bakalářské práce byly shromážděny poznatky o plemeni huculský kůň a o aktuální situaci jeho populace v České republice. Dále byly prezentovány a porovnány teoretické informace o různých typech biologického materiálu a o metodách využívaných k izolaci koňské DNA.

V experimentální části práce bylo úkolem izolovat DNA od vybraných 20 genotypů huculských koní. Izolace DNA od všech jedinců proběhla úspěšně. Od každého jedince byly získány tři typy neinvazivně odebíraných materiálů – žíně s chlupovými cibulkami, stěry bukální sliznice a exkrementy. Izolace DNA proběhla pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel, Německo) pro žíně a stěry bukální sliznice a kitu QIAamp® DNA Stool Mini Kit® (Qiagen, Nizozemsko) pro exkrementy.

U všech vzorků byla spektrofotometricky změřena koncentrace a čistota DNA bezprostředně po izolaci a následně po půl roce uchovávání vzorků při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Výsledky spektrofotometrického měření byly ověřeny pomocí agarózové gelové elektroforézy a po statistickém vyhodnocení byly předmětem diskuze. Jako nejvhodnější materiál pro izolaci DNA od koní byly stanoveny žíně s chlupovými cibulkami, ze kterých bylo získáno výrazně větší množství DNA než z ostatních typů vzorků.

**Klíčová slova:** huculský kůň, DNA, metody izolace, žíně, statistické vyhodnocení

# **DNA isolation from various types of biological material for genetic analyses of hucul horses**

## **Summary**

The gain of high-quality DNA in a sufficient amount and purity is key for the implementation of all studies and analyses in molecular genetics. Among the important factors for the process of obtainment of quality DNA are the biological material and the choice of the correct isolation method. With regard to equine welfare, it is appropriate to use non-invasively obtained materials for genetic studies, which do not cause excessive stress to the animals.

In the theoretical part of this bachelor thesis, knowledge about the hucul breed and its current population status in the Czech Republic have been gathered. Further on in the thesis, the theoretical information about different types of biological material and the methods used to isolate horse DNA have been compared and presented.

In the experimental part of the thesis, the aim was to isolate DNA from 20 chosen genotypes of hucul horses. The isolation of the DNA was successful in all 20 cases. Every subject had 3 types of non-invasive samples taken – horsehair with the hair bulb, swabs of the buccal mucosa and excrements. For the isolation of the horsehair and swabs the NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue XS (Macherey-Nagel, Germany) kit was used, for the excrements the QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen, The Netherlands) kit was used.

The concentration and purity of the DNA samples were spectrophotometrically measured right after DNA isolation and then half a year later, during which they were stored at a temperature of  $-20$  °C. The results were then further verified using agarose gel electrophoresis and after a statistical evaluation, they were the subject of discussion. The horsehair with the hair bulb was determined as the most appropriate material for DNA isolation from horses, because of the greatest DNA yield.

**Keywords:** hucul horse, DNA, methods of isolation, horsehair, statistical evaluation

# Obsah

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2. VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍL PRÁCE .....</b>	<b>9</b>
2.1 VĚDECKÉ HYPOTÉZY.....	9
2.2 CÍL PRÁCE.....	9
<b>3. LITERÁRNÍ REŠERŠE.....</b>	<b>10</b>
3.1 HUCULSKÝ KŮŇ.....	10
3.1.1 Historie plemene .....	10
3.1.2 Charakteristika plemene .....	10
3.1.3 Současný stav populace v ČR.....	11
3.2 GENOM KONĚ.....	13
3.3 IZOLACE DNA .....	14
3.3.1 Metody izolace DNA .....	15
3.4 METODY ANALÝZY DNA.....	19
3.4.1 Spektrofotometrie .....	19
3.4.2 Elektroforéza.....	20
3.4.3 PCR.....	21
3.5 TYPY VZORKŮ PRO IZOLACI DNA.....	23
3.5.1 Žíně.....	23
3.5.2 Stěry bukální sliznice.....	24
3.5.3 Exkrementy .....	25
3.5.4 Krev .....	26
<b>4. MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>28</b>
4.1 VZORKY.....	28
4.2 ODBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU .....	28
4.2.1 Žíně.....	28
4.2.2 Stěry bukální sliznice.....	28
4.2.3 Exkrementy .....	29
4.3 IZOLACE DNA .....	29
4.3.1 Izolace DNA z žíní .....	29
4.3.2 Izolace DNA ze stěrů bukální sliznice.....	31

4.3.3	Izolace DNA z exkrementů.....	32
4.4	STANOVENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY DNA.....	34
4.5	ELEKTROFORÉZA .....	34
4.5.1	Příprava agarózového gelu.....	34
4.5.2	Nanášení vzorků na gel.....	35
4.6	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ.....	35
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>36</b>
5.1	ŽÍŇĚ.....	36
5.2	STĚRY BUKÁLNÍ SLIZNICE .....	37
5.3	EXKREMENTY .....	38
5.3.1	Exkrementy čerstvé.....	38
5.3.2	Exkrementy zmražené.....	40
5.3.3	Porovnání čerstvých a zmražených exkrementů.....	41
5.4	ANOVA .....	42
<b>6.</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>43</b>
6.1	ŽÍŇĚ.....	43
6.2	STĚRY BUKÁLNÍ SLIZNICE .....	44
6.3	EXKREMENTY .....	46
6.4	ANOVA .....	48
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>50</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>52</b>
<b>9.</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>60</b>
<b>10.</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....</b>	<b>61</b>

# 1. Úvod

Huculský kůň je skromné a drsné plemeno, které je ceněno především pro svou houževnatost a odolnost vůči nepříznivým podmínkám. Pro tyto vlastnosti byl huculský kůň v roce 1993 zařazen do genových zdrojů ČR (Asociace chovatelů huculského koně 2009).

Aby bylo možné provádět genetické analýzy a dál hlouběji poznávat nejen toto plemeno, je třeba získat od jedinců biologický materiál, ze kterého lze izolovat DNA. Díky neustálému pokroku a vývoji v oblasti molekulární genetiky je možné využívat pro izolaci DNA materiály odebírané neinvazivními metodami a získávat z nich dostatečné množství kvalitní DNA (Beja-Pereira et al. 2009). Neinvazivní metody odběru vzorků jsou vyhovující i pro chovatele, jelikož ti mohou provádět odběr sami bez přítomnosti veterinárního lékaře.

Pro samotnou izolaci DNA a následné analýzy je nutné, aby odebraný biologický materiál obsahoval dostatečné množství DNA v uspokojivé čistotě. Získaná koncentrace DNA je závislá na zvolené metodě izolace DNA a na konkrétním typu materiálu.

V současnosti je k dispozici velké množství metod sloužících k izolaci DNA. Mezi faktory ovlivňující volbu metody je možné řadit časovou a finanční náročnost postupu, laboratorní vybavení jednotlivých pracovišť a také potřebné množství DNA k dalším analýzám. Nejčastěji využívané metody izolace DNA jsou např. fenol-chloroformová extrakce, izolace pomocí Chelexu, izolace pomocí magnetických částic a metoda adsorpce na silikát, na které je založena většina komerčně dostupných kitů. Před zahájením experimentu je vždy třeba pečlivě zvážit výběr vyhovující metody pro izolaci DNA.

S ohledem na welfare koní je vhodné pro získání DNA využívat neinvazivní metody odběru vzorků. Mezi nejčastěji používané materiály pro izolaci koňské DNA, získávané neinvazivním způsobem, patří žíně s chlupovými cibulkami, stěry bukální sliznice a exkrementy. Volba materiálu závisí na manuální a časové náročnosti odběru, podmínkách uchování vzorků, možnostech přepravy a zejména na množství a kvalitě vyizolované DNA.

Pro získání co nejlepších výsledků je třeba zvolit vhodnou kombinaci metod izolace DNA a užitého materiálu. V této práci byla provedena izolace DNA pomocí komerčních kitů ze tří typů vzorků a statistickým porovnáním výsledků byl stanoven nejvhodnější materiál pro izolaci koňské DNA.



## **2. Vědecké hypotézy a cíl práce**

### **2.1 Vědecké hypotézy**

Na začátku řešení bakalářské práce byly vytyčeny následující hypotézy:

1. Dlouhodobým uchováváním vzorků DNA při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nedochází k jejich degradaci a k fragmentaci DNA.
2. Dlouhodobým uchováváním vzorků exkrementů při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  se mění koncentrace izolované DNA.
3. Množství vyizolované DNA pomocí komerčních kitů nezávisí na jednotlivém zvířeti ani na typu odebraného materiálu.

### **2.2 Cíl práce**

Literární rešerše měla za cíl přinést současné literárně prezentované poznatky o plemeni huculský kůň, shromáždit teoretické informace o metodách využívaných k izolaci DNA a o metodách analýzy DNA. Zároveň bylo cílem získat a porovnat teoretické informace o různých typech biologických materiálů vhodných pro izolaci koňské DNA.

V experimentální části práce bylo cílem izolovat DNA ze třech typů neinvazivně odebíraných biologických materiálů od vybraných 20 genotypů huculských koní. Na základě naměřených výsledků bylo úkolem statisticky vyhodnotit kvalitu a kvantitu získané DNA a zjistit, zda množství vyizolované DNA závisí na typu materiálu a na konkrétním zvířeti. Pro využitelnost výsledků v praxi bylo cílem práce experimentálně ověřit, zda se u jednotlivých typů vzorků mění koncentrace DNA při jejím dlouhodobém skladování při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **3. Literární rešerše**

### **3.1 Huculský kůň**

#### **3.1.1 Historie plemene**

Huculský kůň je horské plemeno, pocházející z oblasti Karpatkého oblouku (Asociace chovatelů huculského koně 2009). Těžké horské podmínky měly vliv na jeho výšku a primitivní vzhled (Komosa & Purzyc 2009). Jedná se pravděpodobně o nejpřímějšího potomka divokého koně evropského – tarpana. Díky tomu, že místa obývaná huculy neležela na hlavních trasách asijských nájezdů do Evropy, zůstala dlouho krev huculů téměř nedotčena křížením (Leiský 1999).

Huculští koně se původně chovali v drsných a skromných podmínkách Karpat bez velkých zásahů člověka. V roce 1856 byl zřízen první huculský hřebčín Lučina, který měl za cíl zlepšovat vlastnosti tohoto horského plemene (Hučko 1996).

První polovina 20. století je považována za začátek systematického chovu huculů, hlavně pro účely armády. Huculové byli hojně využíváni v obou světových válkách, během kterých utrpělo toto plemeno obrovské ztráty. Po druhé světové válce hrozilo v Československu dokonce vyhynutí huculského koně (Leiský 1999). Za účelem zmožnění tělesného rámce koní docházelo k častému křížení s fjordskými hřebci. S genovou eliminací fjordské krve se chovatelé potýkají dodnes (Radvan 2001). V roce 1979 byl huculský kůň zapsán do genofondu původních a primitivních plemen hospodářských zvířat FAO a následně byl v roce 1993 zařazen do genových zdrojů ČR (Asociace chovatelů huculského koně 2009). V roce 1994 vznikla Mezinárodní organizace huculského koně HIF, jejíž cílem je vytvářet chovatelské cíle a podporovat a koordinovat čistokrevný chov tohoto plemene (Kusza et al. 2013).

#### **3.1.2 Charakteristika plemene**

Typický huculský kůň je dlouhověký, tvrdé konstituce, nesoucí co nejúplnější genetickou informaci svého plemene. Dospívá v pěti až šesti letech a dožívá se třiceti, výjimečně i více let (Asociace chovatelů huculského koně 2009). Ve srovnání s plemenem Konik mají huculští koně silnější kosti, kratší trup a jsou průměrně vyšší (Komosa & Purzyc 2009).

Nejčastějším zbarvením je mezi huculy hnědák nebo plavák, typickým znakem je výrazný úhoří pruh na hřbetě (Asociace chovatelů huculského koně 2009). U tohoto plemene

nejdou povoleny odznaky na hlavě ani na končetinách. Zbarvení ryzák je považováno za důkaz, že jde o jedince s příměsí cizí krve (Radvan 2000). Typický představitel plemene huculský kůň je zobrazen na obrázku 1.

Mezi ceněné povahové vlastnosti huculů patří psychická odolnost, vyrovnanost a klidnější temperament. Hucul je plemeno skromné a nenáročné, zároveň velmi vytrvalé a výkonné při práci hlavně v terénu nebo v tahu (Asociace chovatelů huculského koně 2009).



Obrázek 1: klisna Nadia Goral 71/786 (Zpravodaj HUCUL 2019)

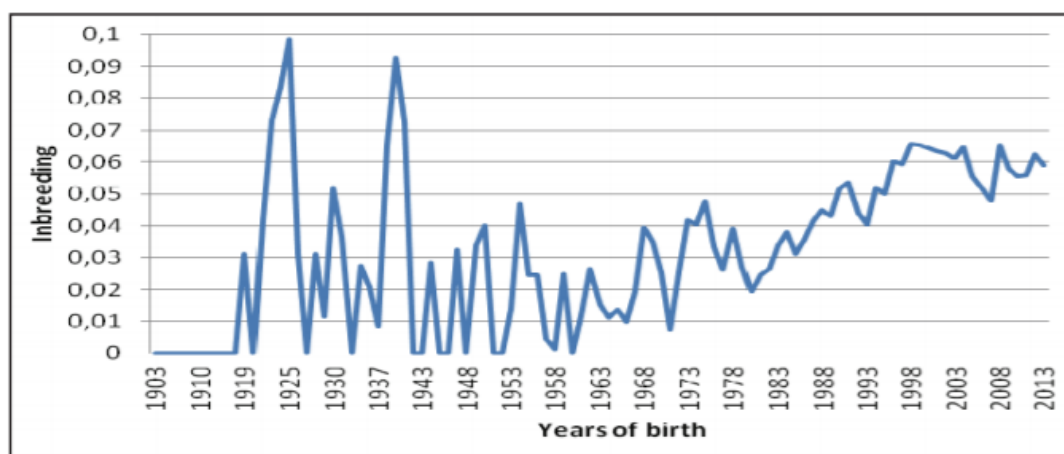
### 3.1.3 Současný stav populace v ČR

Mezi čistokrevné huculské koně lze dnes zařadit pouze klisny a hřebce, jejichž rodokmen v mateřské části směřuje až k mezinárodně uznaným zakladatelkám plemene (Jelínek 2016). Populace huculských koní zapsaných v plemenné knize České republiky se v současné době vrátila na úroveň roku 2003 a s počtem 422 klisen má nadále klesající charakter (Zpravodaj HUCUL 2019). Mezi lety 1990–2013 byl průměrný počet hřebců a klisen ročně zapsaných do plemenné knihy 47, respektive 81. Nejvíce hřebců (90) a klisen (143) bylo registrováno v roce 1997 (Vostrá Vydrová et al. 2015).

Věková struktura základního stáda klisen v roce 2018 byla 18,05 roků. Nepříznivý obrat stáda a stále se zvyšující věkový průměr patří mezi významné problémy současné populace huculů chovaných v České republice (Zpravodaj HUCUL 2019).

Průměrná hodnota stupně inbreedingu v populaci 501 huculských koní narozených na území ČR mezi lety 1996–2010 byla  $F_{(x)} = 5,35$  %. U více než 28 % huculů byl koeficient příbuznosti vyšší než 6,25 % a u 4 % populace byl vyšší než 12,5 % (Vostrá Vydrová et al. 2015). Podrobnější hodnocení koeficientu inbreedingu je zobrazeno v grafu 1. Graf zobrazuje průměrné hodnoty inbreedingu u huculských koní chovaných na našem území mezi lety 1903–2013. Na ose x jsou vyneseny roky narození koní, osa y zobrazuje hodnoty inbreedingu. Největší pokles byl zaznamenán v roce 1925, kdy došlo ke snížení průměrné hodnoty koeficientu inbreedingu v důsledku nízkého počtu registrovaných koní. Od roku 1988 je možné pozorovat trvalý nárůst průměrné hodnoty koeficientu inbreedingu, v roce 1998 byla překročena hranice 6,25 %.

Graf 1: Průměrné hodnoty koeficientu inbreedingu podle roku narození koní (Vostrá Vydrová et al. 2015)



Vysoké hodnoty inbreedingu značí ztrátu genetické variability, což vede k negativnímu ovlivnění kondičních vlastností a zvýšenému výskytu fenotypových vad (Vostrá Vydrová et al. 2015). Průměrný koeficient příbuznosti klisen zapsaných v plemenné knize v roce 2018 činil  $F_{(x)} = 2,878$  %. Ze zcela nepříbuzné plemenitby pocházelo z celého chovu pouze 12,55 % klisen (Zpravodaj HUCUL 2019).

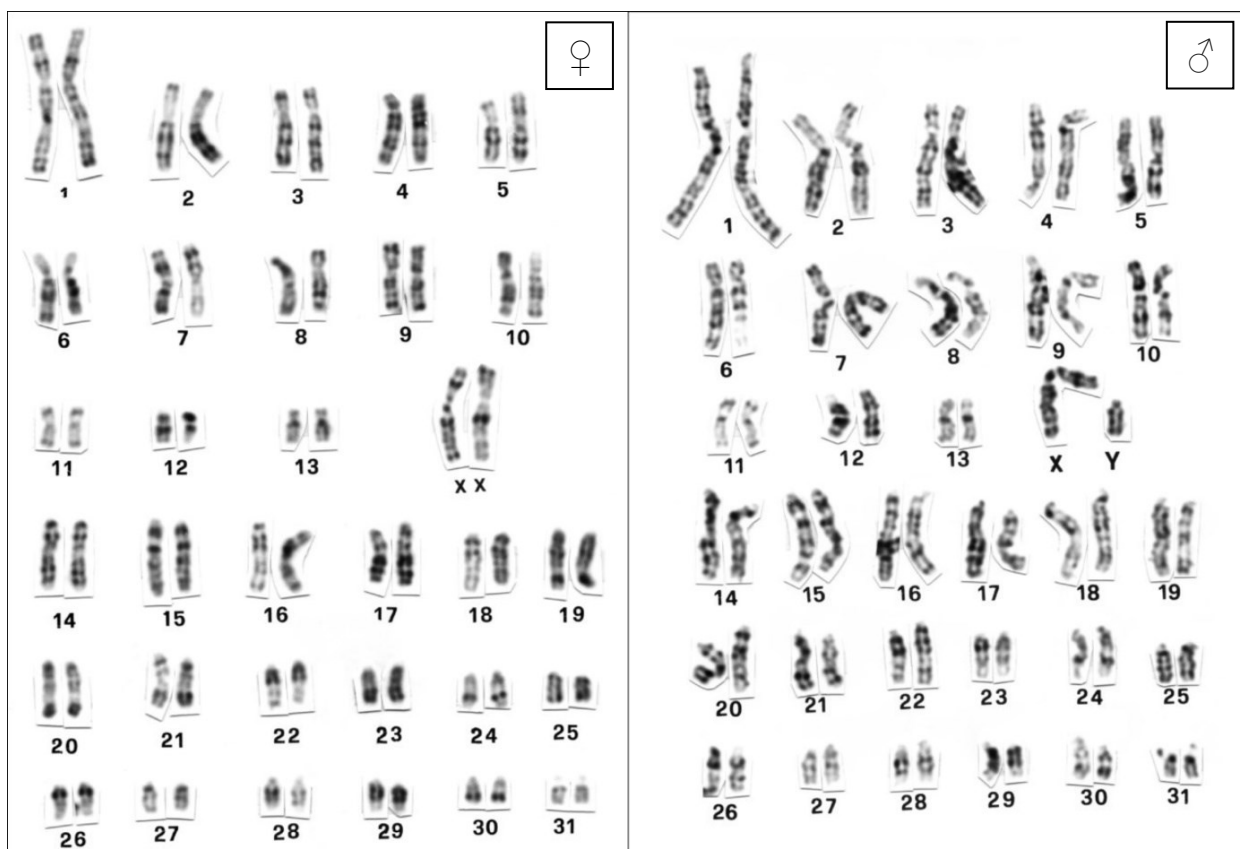
Naopak Kusza et al. (2013) popisují ve studii, prováděné na huculských koních z Maďarska, Rakouska a Slovenska, vysoký stupeň genetické variability. V jejich práci bylo testováno 71 jedinců, u kterých byl vypočítán stupeň heterozygotnosti  $h_0 = 0,706$ . Autoři poukazují na nízký koeficient inbreedingu, nízký nebo žádný selekční tlak a vysoký počet alel u sledované skupiny.

### 3.2 Genom koně

Veškerá DNA nacházející se v buňce tvoří genom. U eukaryotické buňky se genom skládá z několika částí. Největší část genomu je uložena v jádře a představuje jaderný genom. V buňce se dále nachází mimojaderná DNA, která je v případě živočišné DNA uložena v mitochondriích a nazývá se mitochondriální genom (Flegr 2009).

DNA je uložena na několika nezávislých nosičích – na jednotlivých chromozomech. Soubor všech chromozomů v buněčném jádře se nazývá karyotyp, přičemž každá somatická buňka v živočišném organismu má konkrétní, druhově specifický, počet párů autozomů a jeden pár gonozomů – pohlavních chromozomů (Flegr 2009; Snustad et al. 2017).

Karyotyp koně (*Equus caballus* Linnaeus, 1758) tvoří 64 chromozomů. Skládá se z 13 metacentrických autozomálních párů, 18 akrocentrických autozomálních párů a jednoho páru pohlavních chromozomů (Murray 2002). Obrázek 2 zobrazuje porovnání karyotypu klisny a hřebce.



Obrázek 2: Porovnání karyotypu klisny (♀) a hřebce (♂) (Iannuzzi et al. 2014)

První kompletní sekvenční genom koně byla zveřejněna v roce 2007 pod názvem EquCab 2 (Wade et al. 2009). Pro sestavení byly použity nejlepší dostupné metody genomového sekvenování té doby, i přes to však obsahovala určité nepřesnosti. V roce 2018 byla představena nová verze EquCab 3, která mnohonásobně snížila množství chybějících dat z 42 304 v EquCab 2 na 3 771 (Kalbfleisch et al. 2018).

Velikost koňského genomu je 2,5 miliardy párů bází (Gpb), je tedy o něco větší než psí genom (2,3 Gpb) a menší než lidský genom (2,9 Gpb) (Wade et al. 2009). Genom koně obsahuje 20 955 kódujících genů, 9014 nekódujících genů a 402 pseudogenů (Ensembl release 99 2020). Velká část genomu je tvořena repetitivními sekvencemi, které byly rozděleny na několik typů. Patří mezi ně minisatelity, mikrosatelity,  $\alpha$  satelity, SINEs, LINEs a telomerové sekvence. Tyto opakující se fragmenty jsou klíčově důležité při individuální identifikaci jedince, rodičovských analýzách nebo při studování vývoje plemen (Bowling & Ruvinsky 2000).

Mikrosatelity neboli short tandem repeats (STRs) jsou považovány za tradiční DNA markery. Jedná se o krátké repetitivní úseky dlouhé obvykle 2–4 bp, které jsou rozptýleny v celém genomu (Bowling & Ruvinsky 2000). V současnosti se stále častěji využívají jednonukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphisms – SNPs), které jsou vysoce multiplexní a umožňují snadnější standardizaci a sdílení mezi laboratořemi (Holl et al. 2017).

Holl et al. (2017) použili metodu jednonukleotidových polymorfismů při identifikaci skutečných párů rodičů a potomků u vzorku 388 koní 35 různých plemen. Identifikace proběhla s úspěšností 99,9 %, avšak autoři zmiňují potřebu využití sekundárního panelu DNA markerů v případě, že jsou rodiče blízcí příbuzní.

Ke zjištění otcovských linií se do nedávna používaly často neúplné nebo chybné údaje o původu. Felkel et al. (2019) aplikovali metodu kódování Y chromozomu ve stejném rozlišení, ve kterém je používána u lidí a položili tak základ pro studium otcovských linií předků koní v celosvětovém měřítku.

Ve studii Wade et al. (2009) byla při porovnání chromozomů koně a člověka zjištěna podobnost na 17 chromozomech (53 %). Kůň se tak jeví jako vhodný modelový druh pro výzkum dědičných onemocnění, kterých má s člověkem společných více než 90. Patří mezi ně například neplodnost, některá zánětlivá onemocnění nebo svalové poruchy.

### **3.3 Izolace DNA**

Izolace DNA je zásadním krokem ve většině molekulárně biologických studií, protože všechny další postupy závisí na kvalitě získané DNA (Beja-Pereira et al. 2009). Cílem izolace je získání vzorku DNA ze zkoumaného biologického materiálu pomocí kombinace

chemických a fyzikálních metod. Vzhledem k tomu, že existuje velké množství metod pro izolaci a purifikaci nukleových kyselin, volí se obvykle vhodná technika na základě více faktorů. Mezi tyto faktory patří cílová nukleová kyselina a její potřebné množství, organismus, ze kterého vzorky pochází, vlastnosti výchozí tkáně a také časová a finanční náročnost postupu (Roche Diagnostics 2011).

Bez ohledu na to, jaká metoda je zvolena, postupuje se při izolaci genomové DNA v několika určitých krocích. Základem izolačních metod je rozrušení buněk biologického materiálu, rozvolnění jejich obsahu, odstranění kontaminantů a všech ostatních složek kromě extrahované nukleové kyseliny (Brown 2016).

### **3.3.1 Metody izolace DNA**

#### **3.3.1.1 Fenol-chloroformová metoda**

Metoda fenol-chloroformové extrakce byla nejrozšířenější před 10–15 lety. V současnosti je používána jen zřídka, hlavně kvůli časové náročnosti postupu a práci s nebezpečnými organickými činidly (Beja-Pereira et al. 2009).

Fenol-chloroformová extrakce je tzv. liquid-liquid metoda. Principem je rozdílná rozpustnost DNA ve vodné fázi oproti rozpustnosti ostatních makromolekul a dalších buněčných složek v organické fázi (Zumbo 2012).

Postup izolace DNA začíná přidáním směsi fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu k vodnému roztoku lyzovaných buněk. Chloroform se jako organické rozpouštědlo nemísí s vodným roztokem buněčného lyzátu, a tak dojde k rozdělení směsi na dvě fáze. V horní vodné fázi se nachází nukleové kyseliny, ve spodní organické fázi jsou zbylé buněčné makromolekuly. Důkladným protřepáváním je docíleno denaturace proteinů ve vodné fázi fenolem. Fenol smíchaný s chloroformem je při srážení proteinů účinnější než fenol samotný. Následuje centrifugace roztoku, po jejímž skončení se mezi vodnou a organickou fází objevuje tzv. interfáze, tvořená bílým prstencem ze sražených proteinů. Horní vodná fáze s nukleovými kyselinami je přenesena do čisté zkumavky a celý proces se opakuje tak dlouho, dokud se nepřestane objevovat interfáze se sraženými proteiny. Stopy fenolu, které se mohou nacházet ve vodné fázi, je třeba extrahovat z roztoku směsí chloroformu a isoamylalkoholu, nejčastěji v poměru 24:1. Nukleové kyseliny jsou následně vysráženy pomocí koncentrovaného ethanolu nebo izopropanolu. Pokud je cílem získat čistou DNA, musí být RNA odstraněna působením RNázy (Sambrook et al. 1989; Zumbo 2012).

Modifikaci této metody, přidáním roztoku pro odstranění inhibičních látek, použili Janabi et al. (2016) při izolaci DNA z exkrementů koní. Porovnávali ji s extrakcí pomocí PowerFecal<sup>®</sup> DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc., USA). Z výsledků jejich práce vyplývá výrazně vyšší koncentrace DNA při použití fenol-chloroformové metody. Také Ząbek et al. (2005) popsali vyšší výtěžnost DNA při izolaci z koňských žíní pomocí fenol-chloroformové metody než při izolaci komerčními kity.

Tuto metodu použili i Santos et al. (2010) při porovnávání výtěžnosti DNA z krve a plicní tkáně u koní. Ve svém výzkumu stanovili jako nejvhodnější kombinaci pro izolaci DNA fenol-chloroformovou metodu a použití vzorků z plicní tkáně. Tato kombinace přinesla nejvyšší koncentraci DNA a zároveň 100% úspěšnost amplifikace. Jako nevýhodu této metody autoři uvádí časovou náročnost postupu a práci s chemikáliemi.

### 3.3.1.2 Chelex

Extrakce DNA pomocí Chelexu je oblíbená hlavně pro svou rychlost a jednoduchost. Celý proces probíhá v jedné zkumavce, díky čemuž hrozí minimální riziko kontaminace vzorku. Při extrakci pomocí Chelexu není třeba používat organická rozpouštědla ani jiné toxické látky, proto je metoda šetrná k životnímu prostředí. Nevýhoda metody spočívá především v neschopnosti Chelexu odstranit inhibitory PCR, které mohou způsobovat komplikace při dalším zpracování DNA (Phillips et al. 2012).

Chelex je pryskyřice tvořena ze styren divinylbenzen kopolymeru. Obsahuje párové iminodiacetátové ionty, které působí jako chelátory a mají schopnost navázat polyvalentní kovové ionty. Afinity Chelexu ke dvojmocným iontům (jako je  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ ) je asi 5000× větší než k jednomocným (Bio-Rad Laboratories 2000).

Vazba Chelexu na kationty a jejich odstranění během procesu izolace DNA zabraňuje poškození nukleových kyselin při zahřátí na vyšší teplotu (95–100 °C). Navíc vychytáváním  $\text{Mg}^{2+}$  iontů dochází k inaktivaci nukleáz a tím je zamezeno degradaci DNA (Polski et al. 1998).

Princip izolace zahrnuje fyzickou homogenizaci vzorku a následné povaření suspenze buněk v 5% roztoku Chelexu. Alkalita roztoku Chelexu (pH 10–11) a vystavení teplotám 95–100 °C vedou k narušení buněčných membrán a k denaturaci DNA. Po centrifugaci se na dně zkumavky usadí pryskyřice se zbytky buněčných komponent a následně je možné odebrat supernatant obsahující DNA. Ten se dá použít přímo pro PCR amplifikaci, je však nutné zamezit kontaktu PCR reakce s pryskyřicí, jelikož Chelex PCR inhibuje (Walsh et al. 1991; Čapková Frydrychová et al. 2013).



Walsh et al. (1991) se ve své práci věnovali extrakci DNA ze spermatu a krve pomocí přípravku Chelex 100. Výsledky ukazují metodu stejně účinnou jako použití fenol-chloroformové extrakce.

### 3.3.1.3 Magnetické částice

Díky svým magnetickým schopnostem jsou magnetické částice široce využívány jako univerzální nástroj k izolaci nukleových kyselin, bílkovin a peptidů. Uplatnění nacházejí v řadě biomedicínských a biotechnologických oborů. Využívají se například k zobrazování pomocí magnetické rezonance, pro cílený transport léčiv, k reparaci tkání, magnetickému značení buněk a k izolaci biomolekul (Hsing et al. 2007).

Magnetické částice jsou kulovité útvary o velikosti 5 nm–100 μm, tvořené kovovým jádrem. Jádro se skládá nejčastěji z maghemitu ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) nebo magnetitu ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), ale může být tvořeno i zlatem. Okolo jádra se nachází tenká vrstva, většinou tvořená magnetizovatelnou celulózou, jejíž povrch je modifikován pro navázání specifických molekul (Hsing et al. 2007).

Princip této metody spočívá v tom, že za přítomnosti některých chemikálií a solí (NaCl) o určité koncentraci, jsou magnetické částice schopny adsorbovat nukleové kyseliny. Jako zdroj DNA mohou sloužit tělní tekutiny, tkáně, buňky nebo bakteriální lyzáty obsahující plasmidy (Nargessi 2005).

Izolace DNA začíná přidáním magnetických částic do vzorku, ve kterém se na ně navážou cílené nukleové kyseliny. Takto modifikované magnetické částice se magnetem přitáhnou ke stěně zkumavky a zbylý roztok, ve kterém zůstaly nenavázané molekuly DNA, se odstraní (Húska et al. 2008). V dalším kroku probíhá uvolnění magnetických částic s DNA z magnetu a opakované promývání promývacím pufrům. Po odstranění tohoto pufru následuje uvolnění DNA od magnetických částic v elučním pufru. Pomocí magnetického separátoru jsou odstraněny magnetické částice a eluční pufr s DNA je přenesen do nové zkumavky (Nargessi 2005).

Nespornou výhodou této metody je jednoduchost a rychlost, celý proces izolace je možné dokončit do 30 minut. Oproti konvenčním metodám založeným na centrifugaci a filtraci hrozí při této metodě menší riziko fyzikálního nebo biologického poškození molekul. Zároveň je tato metoda šetrná k životnímu prostředí, jelikož při ní není potřeba velké množství toxických chemikálií (Zhou et al. 2013).

#### **3.3.1.4 Adsorpce na silikát**

Metoda je založena na vysoké afinitě záporně nabitě DNA ke kladně nabitým silikátovým částicím. Kationt sodíku přitahuje negativně nabitý kyslík fosfátové skupiny nukleové kyseliny (Tan & Yiap 2009). Vazba DNA na silikátový povrch probíhá za přítomnosti chaotropních solí. Mezi nejčastěji používané soli patří jodid sodný (NaI), chloristan sodný (NaClO<sub>4</sub>), guanidin hydrochlorid (GuHCl) a guanidin isothiokyanát (GuSCN) (Melzak et al. 1996). Chaotropní soli zasahují do vnitromolekulárních interakcí nukleových kyselin a tím usnadňují vazbu DNA na silikát (Shaw et al. 2009).

Silikátová matrice může existovat ve 2 formách, buď ve formě volných silikátových částic nebo ve formě silikátové membrány v centrifugační kolonce.

Při izolaci DNA pomocí silikátových částic proces začíná homogenizací a purifikací vzorku. K roztoku nukleových kyselin jsou přidány chaotropní soli, suspenze silikátových částic a pufr pro udržení konstantní hodnoty pH. Pro usnadnění navázání DNA na částice je směs důkladně protřepána. Silikátové částice se nechají usadit na dně zkumavky (tento krok je možné urychlit centrifugací) a extrakční pufr se zbytky buněčného materiálu je odstraněn odsátím. Následuje opakované promývání pufrům s obsahem chaotropních solí. Znovu se zopakuje proces centrifugace, usazení částic na dně zkumavky a odsátí přebytečného pufru. Po odsátí zůstane na silikátových částicích čistá DNA. Tu je možné uvolnit promytím vodou nebo vhodným pufrům bez chaotropních solí. Po konečném odstředění zůstanou na dně usazené samotné silikátové částice a nad nimi čistý roztok DNA (Melzak et al. 1996; Shaw et al. 2009). Na principu absorpce na silikátovou membránu funguje většina komerčně dostupných kitů.

#### **3.3.1.5 Komerční kity**

K výraznému urychlení a usnadnění extrakce DNA přispěly komerční izolační kity. Jedná se o soupravy, které obsahují všechny pro extrakci potřebné roztoky a sterilní pomůcky, jako jsou zkumavky a kolonky. Návody k použití těchto souprav obvykle uvádějí detailní postup izolace z různých typů biologického materiálu (například z krve, chlupových cibulek nebo stěrů bukalní sliznice), časový rozpis úkonů a seznam potřebného přístrojového vybavení laboratoře. Nevýhodou komerčních kitů je jejich vyšší cena a nespolehlivost při potřebě vysoké výnosnosti a čistoty DNA.

## 3.4 Metody analýzy DNA

### 3.4.1 Spektrofotometrie

Nejjednodušší a nejvíce používaný způsob posouzení kvality a kvantity vyextrahovaných nukleových kyselin je spektrofotometrie. Tato metoda spočívá ve schopnosti látek absorbovat světlo při různých vlnových délkách. Pro zjištění čistoty DNA se používá měření poměru absorbance ultrafialového světla při vlnových délkách 260 a 280 nm, respektive 260 a 230 nm (Brown 2016). Vysoce čistá DNA je charakterizována jako taková, jejíž hodnota poměru absorbancí A260/280 se pohybuje v rozmezí 1,8–2,0. Při poměru A260/230 se za čistý vzorek DNA považuje ten s hodnotou mezi 2,0–2,2 (Wilfinger et al. 1997). Na množství UV záření absorbovaného roztokem je přímo závislá koncentrace DNA ve vzorku, udávána nejčastěji v ng/μl (Brown 2016).

Matlock (2015) uvádí několik obvyklých případů, kdy dochází ke změně hodnot absorbancí na základě kontaminace vzorku nečistotami. Ke snížení hodnot poměru absorbancí A260/230 dochází, pokud jsou po extrakci ve vzorku přítomna rezidua fenolu nebo guanidinu. Ke srážení vyextrahované DNA je často používán glykogen, jehož rezidua také snižují hodnotu tohoto poměru absorbancí.

Nízké hodnoty poměru absorbancí A260/280 naznačují, že byl vzorek kontaminován proteiny nebo reagenty použitými při extrakci, například fenolem. Dalším faktorem, který způsobuje snížení tohoto poměru, je velmi nízká koncentrace (> 10 ng/μl) nukleových kyselin ve vzorku.

Použití nevhodného roztoku pro kalibraci spektrofotometru může vést k odchýlkám od stanovených hodnot absorbancí.

Při izolaci RNA zkoumali Wilfinger et al. (1997) pH roztoku použitého pro spektrofotometrickou analýzu a jeho vliv na kvalitu a kvantitu extrahované RNA. Jejich práce prokázala, že pH a iontová síla pufru značně ovlivňují výnosnost nukleových kyselin. Roztoky použité při spektrofotometrii by měly mít dostatečnou pufrovací schopnost pro udržení pH > 8.

Zhou et al. (1996) zmiňují výrazné snížení poměrů A260/280 i A260/230 při zasolení vzorků, ke kterému dochází při některých technikách izolace nukleových kyselin.

## **3.4.2 Elektroforéza**

### **3.4.2.1 Gelová elektroforéza**

Gelová elektroforéza patří k nejpraktičtějším a nejvíce využívaným separačním technikám DNA, RNA a proteinů v molekulární biologii. Principem elektroforézy je pohyb fragmentů nukleových kyselin v elektrickém poli v závislosti na jejich velikosti (Brown 2016).

První krok elektroforézy spočívá v zatuhnutí gelu tak, aby se v něm vytvořily jamky, do kterých je následně umístěn vzorek se zkoumanými makromolekulami. Poté je gel ponořen do roztoku vodivého pufru a připojen k elektrickému zdroji (Snustad et al. 2017). Jelikož molekuly nukleových kyselin obsahují záporně nabitou fosfátovou skupinu, pohybují se gelem od katody k anodě (Hartwell et al. 2018).

Nejčastěji je využíván agarózový nebo polyakrylamidový gel. Gel si lze představit jako síť, přes kterou musí molekuly nukleových kyselin projít, aby se dostaly ke kladně nabitě elektrodě. Menší molekuly se pohybují gelem rychleji, proto se koncentrace a síla gelu volí v závislosti na předpokládané velikosti fragmentů (Ruml et al. 2002).

Agarózový gel se používá při separaci velkých makromolekul jako jsou právě nukleové kyseliny. Koncentrace gelu může být různá, běžně se používá 1% až 3%. Obecně platí, že čím vyšší je koncentrace agarózy, tím menší je rychlost separace molekul (Jeppson et al. 1979).

Pro separaci menších úseků DNA (> 100 bp) je užíván polyakrylamidový gel. Gelová matrice je zde tvořena volnými radikály, při jejichž vyšší koncentraci gelem prochází pouze malé fragmenty DNA (Lee et al. 2012).

### **3.4.2.2 Kapilární elektroforéza**

V molekulární genetice je kapilární elektroforéza využívána při fragmentační analýze a sekvenování DNA. Jedná se o modifikaci klasické gelové elektroforézy, při které jsou kapiláry naplněny elektrolytem nebo gelem, jak je tomu v případě separace nukleových kyselin. Princip metody je podobný jako u klasické gelové elektroforézy, jen se částice nepohybují v rovině, ale procházejí tenkou trubicí – kapilárou. Po připojení ke zdroji elektrického napětí vzniká v kapiláře elektroosmotický tok a složky roztoku jsou odděleny elektrickým polem (Kahl 2015).

Tato metoda byla využita při sekvenování lidského genomu, kde hrála velkou roli automatizace celého procesu a s tím spojená vysoká účinnost a rychlost metody (Karger & Guttman 2009).

### 3.4.2.3 Vizualizace gelu

Nejčastějším způsobem vizualizace molekul nukleových kyselin po dokončení elektroforézy je obarvení gelu. Gel se barví fluorescenčním barvivem zvaným ethidium bromid, který se specificky váže na nukleové kyseliny. Svojí plochou molekulou se začlení mezi ploché páry bází DNA a vytvoří tak společný komplex. Fragmenty DNA pak pod ultrafialovým zářením oranžově fluoreskují (Hartwell et al. 2018). Ačkoli je ethidium bromid hojně využíván, jedná se o mutagen a toxin. Řadí se mezi nebezpečný odpad a při manipulaci s ním je třeba dbát zvýšené opatrnosti (Huang & Fu 2005).

Je nutné počítat s tím, že navázáním barviva na molekulu DNA je ovlivněn její náboj a pohyblivost v gelu až o 15 % (Lee et al. 2012).

Alternativou pro barvení nukleových kyselin je skupina fluorescenčních kyaninových barviv, známých pod komerčním označením SYBR. SYBR Gold a SYBR Green I jsou vysoce citlivá barviva s menší toxicitou než ethidium bromid, jsou ovšem výrazně dražší. Skupina SYBR barviv nefunguje optimálně, pokud je přidávána přímo do gelu, je tedy nutné gel po proběhlé elektroforéze obarvit dodatečně (Lee et al. 2012). Mezi výhody SYBR barviv patří odrážení pod modrým světlem, čímž odpadá riziko poškození DNA UV zářením (Huang & Fu 2005).

### 3.4.3 PCR

PCR neboli polymerázová řetězová reakce je jednoduchá amplifikační technika, která umožňuje získat dostatečnou zásobu specifického segmentu DNA z velmi malého množství výchozího materiálu. Tato metoda se stala nepostradatelným nástrojem v biologické vědě. Uplatnění nachází při klonování genů pro další biochemické analýzy, ve forenzní genetice a velmi důležitou roli hraje také v prenatální diagnostice (Lorenz 2012).

Princip metody spočívá v mnohonásobném zkopírování krátkého úseku molekuly DNA pomocí enzymu DNA polymeráza (Brown 2016). Zmnožení genů a dalších sekvencí DNA je prováděno v in vitro podmínkách, což umožňuje amplifikovat sekvence více než milionkrát během několika hodin (Snustad et al. 2017).

Metodu lze použít pro libovolný úsek libovolné molekuly DNA, podmínkou je však znalost okrajových sekvencí tohoto úseku. Na základě znalosti těchto sekvencí se navrhnou krátké oligonukleotidy neboli primery, které se v rámci komplementarity bází párují s templátovou DNA, jeden z každé strany dvoušroubovice. Primery zároveň ohraničují úsek, který bude amplifikován (Brown 2016). Navrhnutí vhodných primerů je pro úspěšnou PCR

reakci klíčové. Mají obvykle délku 15–30 bází a je třeba zvolit je tak, aby nasedaly co nejbližší z obou stran amplifikovaného úseku (Lorenz 2012).

Polymerázová řetězová reakce obsahuje tři základní kroky, které se v rychlém sledu mnohokrát opakují. Celá reakce probíhá v automatickém přístroji zvaném termocykler.

Prvním krokem PCR je denaturace, při níž jsou rozrušeny vodíkové můstky a dochází k rozdělení řetězců dvoušroubovice DNA. Denaturace probíhá zahříváním při teplotě 92–95 °C, doba se liší podle délky primerů, řádově se jedná o desítky sekund. První zahřívání trvá většinou delší dobu, aby došlo k úplnému oddělení řetězců (Brown 2016).

V druhém kroku dochází k zchlazení vzorku na 50–60 °C a navázání oligonukleotidových primerů na denaturovaná vlákna DNA (annealing). Ideální teplota pro připojení primerů závisí na počtu a sekvenci bází, ze kterých jsou složeny. Příliš nízká teplota zapříčiňuje nasedání primerů na sekvence, které jsou komplementární pouze z části, vysoká teplota zase zamezuje amplifikaci (Snustad et al. 2017). Innis et al. (1990) se při standardní PCR reakci přiklání ke zchlazování vzorků na teplotu 55 °C. Doba annealingu se pohybuje v desítkách sekund v závislosti na délce primerů.

Třetí krok spočívá v prodlužování nových řetězců DNA (fáze elongace). Nejprve dojde ke zvýšení teploty na 70–72 °C a následně je zahájena syntéza řetězců termostabilní polymerázou. DNA-polymeráza připojuje k jednomu konci každého primeru volné nukleotidy a vlákno denaturované DNA slouží jako templát (Innis et al. 1990; Brown 2016).

Celý cyklus, složený z výše popsaných kroků, se opakuje obvykle 20–30×. Počet kopií roste exponenciálně, jelikož v dalších cyklech jako templáty slouží i nově nasyntetizované řetězce DNA. Po třiceti cyklech je tedy možné získat až miliardu kopií dané sekvence DNA (Snustad et al. 2017).

K syntéze řetězců DNA se dříve používala DNA-polymeráza I získávaná z bakterie *Escherichia coli* (Migula, 1895), ta však byla vždy během denaturace inaktivována vysokou teplotou a v průběhu třetího kroku každého cyklu se musela opětovně přidávat. Automatizaci a zdokonalení PCR techniky přinesl objev termostabilní DNA-polymerázy Taq-polymeráza, která je získávána izolací z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* Brock & Freeze, 1955 (Lorenz 2012).

## 3.5 Typy vzorků pro izolaci DNA

### 3.5.1 Žíně

Sběr žíní a chlupů patří mezi často používané neinvazivní metody odběru vzorků pro molekulární analýzy. Pro analýzy u volně žijících zvířat je sběr chlupů v terénu často jediná možnost, jak získat jejich DNA (Taberlet & Luikart 1999).

Pro získání dostatečného množství DNA je doporučováno využívat pouze chlupy s viditelnou chlupovou cibulkou, která však u vylínalých chlupů často chybí. U domestikovaných zvířat se přistupuje k metodě vytrhávání chlupů či žíní, která je ve srovnání s odběrem krve bezbolestná a také méně časově i finančně náročná (Goossens et al. 1998).

Dříve bylo za značnou nevýhodu této metody považováno získání menšího množství DNA o nízké kvalitě a zároveň přítomnost inhibitorů PCR ve vzorku (Goossens et al. 1998; Taberlet & Luikart 1999). Moderní metody izolace nukleových kyselin však umožňují získávat z chlupových cibulek dostatečné množství kvalitní DNA stejně jako z krve (Beja-Pereira et al. 2009).

Roon et al. (2003) zkoumali degradaci DNA při dlouhodobém skladování chlupových cibulek. Autoři doporučují provádět izolaci DNA do půl roku od odebrání vzorků a zároveň poukazují na potřebu chránit vzorky před UV zářením a vlhkostí. Obecně je skladování žíní a chlupů doporučováno v suchu při pokojové teplotě (Taberlet & Luikart 1999).

Žíně jsou často využívaným zdrojem DNA pro určování rodičovství pomocí mikrosatelitních markerů. Ząbek et al. (2005) porovnávali několik metod izolace DNA z koňských žíní. Z jejich výzkumu vychází jako nejvhodnější metoda fenol-chloroformové extrakce s následným srážením DNA absolutním ethanolem a octanem sodným.

Sato et al. (2006) ve své práci uvádějí žíně jako vhodný materiál pro izolaci mRNA. Zároveň zmiňují, že množství vyextrahované RNA z chlupových cibulek vytržených z ocasu bylo signifikantně větší než z cibulek pocházejících z hřívy.

DNA z chlupových cibulek izolovanou pomocí metody Chelex, využili ve své studii Kusza et al. (2013). Pomocí sekvenování stanovili 18 haplotypů u 71 huculských koní, přičemž dominance haploskupiny A byla pozorována téměř u 50 % koní zahrnutých ve studii. Ovchinnikov et al. (2018) využili chlupové cibulky pro zkoumání genetického původu divokých koní z národního parku Theodore Roosevelt.

### 3.5.2 Stěry bukální sliznice

Stěry bukální sliznice patří mezi často využívané metody ve forenzní genetice a epidemiologii (Beja-Pereira et al. 2009). Jedná se o bezbolestnou metodu, při které není vyžadován odběr vzorků specializovanou osobou. Buňky z dutiny ústní mohou být získávány různými způsoby. Mezi nejčastější formy patří získávání pomocí tamponů, cytologických kartáčků nebo v humánní medicíně výplachem dutiny ústní vodou se solnými roztoky (Garbieri et al. 2017). Existuje mnoho komerčních souprav přímo pro izolaci DNA z bukální sliznice, které obsahují všechny komponenty potřebné pro sběr, konzervaci a transport vzorku. Kity jsou často využívány pro svou jednoduchost a pohodlné použití, nevýhodou je jejich vysoká cena.

Pro zjištění kvality a kvantity DNA získané z bukálních stěrů byla v humánní medicíně uskutečněna studie, která porovnávala dva typy vzorků – sliny a krev. Množství DNA získané ze slin (7,8 µg/0,5 ml) bylo srovnatelné s množstvím DNA získaným z krve (7,4 µg/0,5 ml). Zároveň byla u obou druhů vzorků naměřena optimální hodnota čistoty ( $A_{260}/A_{280} > 1,70$ ) (Looi et al. 2012).

Provést stěr bukální sliznice je u divoce žijících zvířat téměř nemožné. Pro získání slin bez přímého kontaktu se zvířetem je u býložravců možné využít čerstvě rozžvýkané rostlinné krmivo (Nichols et al. 2012), zatímco u masožravců lze odebrat vzorky z čerstvě ulovené kořisti (Sundqvist et al. 2008). Další možností odběru slin je přilákání zvířat k objektům se speciální strukturou, která udrží sliny po olíznutí nebo žvýkání předmětu zvířetem (Lobo et al. 2015).

Metoda bukálních stěrů je často využívána pro determinaci pohlaví u ptáků jako alternativa k odběru krve (Wellbrock et al. 2012). U savců je tato metoda častěji využívána u masožravců než u býložravců (Sundqvist et al. 2008; Lobo et al. 2015).

Brooks et al. (2003) ve své studii použili metodu jemného seškrabávání bukálních buněk pomocí vatového tamponu. Výsledné hodnoty koncentrace DNA z bukálních stěrů pak porovnávali s hodnotami získanými z krve. Výzkum ukázal, že koncentrace DNA izolované z bukální sliznice byla několikanásobně nižší než z krve.

U koní se stěry bukální sliznice provádí hlavně v souvislosti se zjišťováním hladiny hormonů. Jacobsen et al. (2014) zkoumali přítomnost proteinů ve slinách koní se systémovým zánětem. Schmidt et al. (2010) popsali metodu odběru vzorků slin pomocí vatového tamponu. Tampon se přiloží na jazyk koně po dobu jedné minuty, dokud dostatečně nenasákne slinami, následně je doporučováno krátkodobé uchování vzorků při 4 °C, než dojde k centrifugaci a poté standardní skladování při teplotě -20 °C.



### 3.5.3 Exkrementy

DNA extrahovaná z exkrementů může poskytnout cenné informace o genetických a ekologických vlastnostech organismu (King et al. 2018). Jedná se o jednoduchý a neinvazivní způsob odběru materiálu, který je hojně využíván u volně žijících zvířat. Z trusu lze zjistit o zvířeti mnoho informací jako například hladinu stresových hormonů, reprodukční stav, parazitární onemocnění a další (Beja-Pereira et al. 2009).

Odběr vzorků exkrementů pro izolaci DNA lze provádět odběrem přímo z konečníku živých (Janabi et al. 2016) nebo uhynulých zvířat (Brinkman et al. 2010), sběrem ihned po defekaci (Frantzen et al. 2002; Renan et al. 2012; Liu et al. 2014) nebo sběrem sušených nebo zmrzlých exkrementů (Kohn et al. 1999).

Častým problémem při izolaci DNA z tohoto typu materiálu je přítomnost inhibitorů PCR ve vzorku. Nejčastěji se objevují komplexní polysacharidy, produkty degradace potravy (kyseliny, sekundární rostlinné produkty, enzymy), RNA a bakterie (Renan et al. 2012).

Názory na nejvhodnější metodu konzervace a uchovávání vzorků se liší. Liu et al. (2014) porovnávali tři metody konzervace exkrementů koní Převalského (*Equus ferus przewalskii* Poliakov, 1881). Autoři zjistili, že faktory jako způsob a doba uchování vzorků významně ovlivňují úspěšnost amplifikace. Za nejvhodnější metodu konzervace vzorků považují uchovávání v ethanolu, které vedlo k úspěšnosti amplifikace 66,1 %. Naopak King et al. (2018) a Kebede et al. (2014) považují za nejúčinnější metodu usušení a uchovávání exkrementů v papírových sáčcích.

Dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje úspěšnost izolace a amplifikace DNA, je teplota prostředí. Vzorky odebírané v zimě mají obecně tendenci k lepším výsledkům amplifikace než vzorky odebírané v létě. Velmi dobré výsledky přináší sběr zmrzlých vzorků z polárních oblastí (Panasci et al. 2011). Brinkman et al. (2010) zmiňují výrazné zvýšení rychlosti degradace DNA při působení dešťových srážek.

Hart et al. (2015) se ve své práci zabývají porovnáním dvou metod izolace DNA z exkrementů koní. Autoři poukazují na výrazně vyšší výtěžnost DNA při použití isopropanolové metody ve srovnání s izolací DNA pomocí komerčních kitů. Janabi et al. (2016) popisují vyšší hodnoty koncentrace i čistoty DNA při použití fenol-chloroformové metody v porovnání s komerčními kity.

Většina studií se nevěnuje vzájemnému působení faktorů jako jsou metody sběru, konzervace vzorků a způsob extrakce DNA, ale zkoumá je odděleně. Renan et al. (2012) se zaměřili izolaci DNA z exkrementů oslů asijských (*Equus hemionus* Pallas, 1775). Autoři

zkoumali ovlivnění kvality DNA a úspěšnost amplifikace při použití různých kombinací metod sběru, uchování a extrakce DNA. Jako nejlepší metodu zhodnotili kombinaci zmrazení vzorků ihned po odběru a následnou extrakci pomocí kitu QIAamp® DNA Stool Mini Kit® (Qiagen, Nizozemsko) s modifikacemi podle Archie et al. (2003).

#### 3.5.4 Krev

Množství a kvalita DNA získané ze vzorku jsou zásadním požadavkem pro velkou škálu genetických studií. Pro tyto účely je obvykle využívána periferní krev, díky vysokému obsahu DNA. Mezi hlavní nevýhody odběru krve patří riziko přenosu infekce, bolestivost metody a poměrně rychlá degradace DNA, pokud vzorky nejsou uchovávány v chladu. Odběr krve by měl být prováděn zásadně veterinárním lékařem (Garbieri et al. 2017).

V humánní medicíně je hojně využívána metoda krevních skvrn nanesených na filtrační papír. Dříve byla tato metoda používána hlavně k neonatálnímu screeningu, v současnosti je to běžný postup pro zjišťování vrozených a infekčních poruch plodu. Výhodou této metody je potřeba pouze několika kapek plné krve (Sirdah 2014).

Metoda krevních skvrn poskytuje přijatelnou kvalitu DNA, obvykle však nezajistí dostatečné množství DNA pro populační analýzy nebo systematický výzkum (Seutin et al. 1991). Vzorky krve na filtračních papírech se snadno přepravují i skladují bez potřeby chlazení. Love Stowell et al. (2018) tuto metodu využili u několika druhů zvířat. Porovnávali tři druhy filtračních papírů včetně různých metod izolace DNA. Jako nejúčinnější kombinaci stanovili použití Whatman® FTA® Cards (Sigma-Aldrich Corporation, USA) s následnou izolací DNA pomocí kitu QIAamp® DNA Mini Kit® (Qiagen, Nizozemsko). Autoři však dodávají, že metoda izolace DNA z plné krve v antikoagulačních zkumavkách s roztokem EDTA poskytla několikanásobně více DNA než krevní skvrny.

Pro získání dostatečného množství DNA ke genetickým studiím se doporučuje využívat vzorky plné krve a metodu krevních skvrn použít jako doplňkovou nebo v pouze v případě, kdy nelze od zvířete získat plnou krev (Love Stowell et al. 2018).

Vzorky plné krve jsou jedním z hlavních zdrojů, využívaných k získávání DNA. Existuje mnoho druhů protokolů, které se zabývají izolací DNA z krve (Griffiths & Chacon-Cortes 2014).

Sahib & Mohammed (2017) se pokusili vytvořit metodu, která by byla vhodná pro izolaci DNA z plné krve savců i ptáků, ačkoli každý druh má specifické vlastnosti. Na rozdíl

od ptačích erytrocytů neobsahují savčí erytrocyty jádra, proto se obvykle využívají pro tyto druhy rozdílné metody izolace DNA (Love Stowell et al. 2018).

Při postupu Sahib & Mohammed (2017) byla krev umístěna do vody, která pomocí osmózy rychle vstoupila do krvinek a způsobila, že buňky hemolýzou praskly. Tato metoda byla úspěšně testována na desítkách savců a ptáků. Seutin et al. (1991) porovnávali několik metod konzervace ptačí krve. Zjistili, že množství DNA získané z krevních skvrn uchovávaných na skle při pokojové teplotě se nelišilo od množství z čerstvé krve ani z krve uložené při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Metoda zmrazení vzorků patří mezi konvenční způsoby uchovávání krve. Seutin et al. (1991) zmiňují, že není třeba přistupovat ke konzervaci krve při extrémně nízkých teplotách ( $< -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), jelikož k zamezení degradace stačí teplota  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Při uchovávání krve po dobu tří let při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebyl pozorován žádný rozdíl ve výnosnosti DNA oproti vzorkům čerstvé krve.

Senju et al. (2017) ve své práci odebrali krev od 78 koní ke stanovení genetické rozmanitosti populace a současně ke genotypizaci jedinců. Escobar et al. (2020) použili vzorky periferní plné krve 192 koní ke zjišťování přítomnosti infekce *Leishmania* Ross, 1903. Odběr periferní krve autoři doporučují pro jeho rychlost a dobrou výtěžnost DNA.

## **4. Materiál a metody**

### **4.1 Vzorky**

V experimentální části této bakalářské práce byly použity vzorky biologického materiálu od 20 huculských klisen. Podrobnosti o jednotlivých jedincích jsou uvedeny v příloze 2. Od každého jedince byl odebrán vzorek žíní, exkrementů a proveden stěr bukální sliznice.

### **4.2 Odběr biologického materiálu**

Vzorky byly odebírány se souhlasem chovatele. K izolaci DNA byly použity tři druhy biologického materiálu – žíně, stěry bukální sliznice a exkrementy. Odběr vzorků byl prováděn jedním člověkem, vždy byly použity jednorázové rukavice pro zamezení kontaminace vzorků.

Odběr vzorků probíhal v časovém období duben–červen 2019. Vzorky čerstvých exkrementů byly označeny 1A–20A, vzorky exkrementů určených k zamrazení 1AI–20AI, vzorky žíní 1B–20B a vzorky stěrů bukální sliznice 1C–20C.

#### **4.2.1 Žíně**

Žíně byly jedincům odebírány z ocasu. Kůň byl asistentem držen u hlavy a bylo mu opatrně vytrhnuto několik žíní naráz, vždy s viditelnou chlupovou cibulkou. Postup byl opakován, dokud nebylo získáno cca 50 chlupových cibulek od jednoho jedince. Koncové části žíní byly asepticky spojeny lepícím štítkem a vloženy do označeného sáčku se zipovým uzávěrem. Všechna zvířata, od kterých byly odebírány vzorky, nebyla po dobu jednoho měsíce před odběrem ošetřována žádnými chemickými přípravky, včetně antiparazitárních přípravků.

#### **4.2.2 Stěry bukální sliznice**

Ke stěru bukální sliznice byly použity cytologické kartáčky značky Lotus Global Co., Ltd. (Velká Británie). Podle protokolu NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel, Německo) by jedinci neměli 30 minut před odběrem přijímat krmivo ani vodu. Toto kritérium se podařilo dodržet pouze u jedinců č. 1–8, zbytek koní se pohyboval na pastvině, kde nebylo možné zamezit přijímání potravy. Při samotném odběru bylo postupováno asepticky, člověk se nikdy nedotýkal odběrové části kartáčku. Koni byla přidržena hlava ve vhodné pozici a kartáček byl opatrně vložen do tlamy. U některých jedinců byla potřeba asistence, při níž asistent vložil koni prst do koutku tlamy, a tím se podařilo rozevřít pysky a vložit kartáček.

Následně byla kartáčkem po dobu 1 minuty důkladně stírána vnitřní strana dásně všemi směry a zároveň bylo kartáčkem otáčeno kolem jeho osy. Poté byl kartáček opatrně vyjmut z tlamy a ponechán na vzduchu k uschnutí tak, aby nedošlo ke kontaminaci. Následně byl uložen do označené papírové obálky a uchován v pokojové teplotě.

### **4.2.3 Exkrementy**

Vzorky exkrementů byly odebírány bezprostředně po defekaci jedince. Ihned po defekaci byla část exkrementu pomocí lžičky na víčku přesunuta do nádoby na odběr stolice. Vždy byla odebírána část vrchní i hluboké vrstvy exkrementu. Bylo dbáno na to, aby nedošlo ke kontaminaci hmyzem či jinými vlivy. Vzorek byl vždy řádně označen. Popsané nádoby byly do 2 hodin od odběru uloženy do mrazicího boxu a při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  skladovány do doby izolace DNA.

## **4.3 Izolace DNA**

Pracovní plocha a potřebné náčiní bylo před začátkem izolace DNA ošetřeno 70% ethanolem. Manipulace se vzorky probíhala vždy v jednorázových latexových rukavicích pro zamezení případné kontaminace DNA.

### **4.3.1 Izolace DNA z žíní**

Izolace DNA z chlupových cibulek žíní probíhala pomocí kitu NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue XS (Macherey-Nagel, Německo) následujícím způsobem:

- Koncové části žíní s chlupovými cibulkami byly sterilními nůžkami nastříhány do nové 1,5 ml polypropylenové zkumavky. Do každé zkumavky bylo nastříháno přibližně 50 kusů chlupových cibulek.
- Do zkumavky bylo napipetováno 150  $\mu\text{l}$  pufru T1.
- Zkumavky byly pomocí sterilizované pinzety nejprve krátce ponořeny do nádoby s tekutým dusíkem a následně vloženy do vodní lázně nahřáté na teplotu  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po roztátí byly vzorky promíchány. Pinzeta byla po každém vzorku důkladně sterilizována. Celý postup byl opakován 4 $\times$ .
- Po roztátí bylo do zkumavky přidáno 25  $\mu\text{l}$  Proteinázy K (Macherey-Nagel, Německo) a proběhlo promíchání vzorku pomocí vortexu TK3S TechnoKartell (Hertz, Německo) po dobu  $2 \times 10$  sekund.

- Zkumavky byly následně uloženy do termálního bloku TDB-120 (Biosan, Litva) nahřátého na teplotu 56 °C po dobu 6 hodin.
- Po uplynutí stanovené doby bylo do zkumavek přidáno 200 µl pufru B3, vzorky byly důkladně protřepány a ponechány 10 minut v termostatu nahřátém na 70 °C. V polovině inkubace byly vzorky lehce promíchány pomocí vortexu.
- Do zkumavek bylo přidáno 210 µl 96% ethanolu za účelem vysrážení molekul DNA. Zkumavky byly několikrát jemně překlopeny, aby došlo k důkladnému promísení roztoků.
- V dalším kroku byly připraveny kolonky označené výrobcem kitu jako NucleoSpin® Tissue Column. Nejprve byly původní zkumavky s roztokem odstředěny v centrifuze 5430 R (Eppendorf, Německo) po dobu 1 minuty při 11000 × g, aby došlo k usazení chlupových cibulek. Následně byl celý objem roztoku postupně přepipetován z původních zkumavek na nové kolonky. Bylo dbáno na to, aby byl přenesen pouze supernatant bez zbylých chlupových cibulek.
- Po přenesení roztoku byly zkumavky centrifugovány 1 minutu při 11000 × g. Molekuly izolované DNA zůstaly zachyceny na filtru a kapalina nahromaděná ve sběrné zkumavce byla vylita. Stejný postup byl opakován, dokud filtrem neprošel veškerý objem roztoku s lyzovanými buňkami.
- Následovalo první promývání kolonky pomocí 500 µl promývacího pufru BW a centrifugace po dobu 1 minuty při 11000 × g.
- Druhé promývání proběhlo pomocí 600 µl pufru B5, který byl předem smíchan s ethanolem. Následovalo odstředění pomocí centrifugy 1 minutu při 11000 × g.
- Zbytek kapaliny, který utkvěl v sběrné zkumavce, byl odstraněn a kolonky byly ponechány 2 minuty při laboratorní teplotě. Následně byla provedena závěrečná centrifugace po dobu 2 minut při 11000 × g za účelem usušení kolonky a odstranění zbytků promývacích roztoků.
- Byly připraveny a označeny nové sterilní 1,5 ml zkumavky, do kterých byl přenesen filtr. Následovalo finální promytí pufrům BE, který byl předehřátý na 70 °C, v množství 100 µl. Zkumavky byly ponechány 1 minutu při laboratorní teplotě a následně odstředěny v centrifuze po dobu 1 minuty při 11000 × g.
- Filtr byl následně ze zkumavky odstraněn a ve zkumavce zůstalo 100 µl roztoku obsahujícího nukleové kyseliny.

### 4.3.2 Izolace DNA ze stěrů bukální sliznice

K izolaci DNA ze stěrů bukální sliznice byl použit univerzální kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel, Německo).

Samotná izolace DNA probíhala podle následujícího postupu:

- Kartáček byl pomocí sterilní pinzety vyjmut z papírové obálky a následně byla sterilními nůžkami odstrižena odběrová část kartáčku. Tato část byla přenesena do označené polypropylenové 1,5 ml zkumavky. Pinzety a nůžky byly pro každý vzorek důkladně sterilizovány 70% ethanolem.
- Do zkumavky, obsahující odběrovou část kartáčku, bylo napipetováno 180  $\mu$ l pufru T1 a 25  $\mu$ l Proteinázy K (Macherey-Nagel, Německo). Následně došlo k důkladnému promíchání kartáčku s roztokem pomocí vortexu TK3S TechnoKartell (Hertz, Německo) po dobu  $2 \times 10$  sekund. Bylo dbáno na to, aby byl kartáček zcela pokryt napěněným roztokem.
- Zkumavka s kartáčkem byla následně uložena do předem nahřátého blokového termostatu TDB-120 (Biosan, Litva) na 56 °C po dobu jedné hodiny. V průběhu inkubace docházelo každých 10 minut k promíchání pomocí vortexu, které mělo za cíl smýt buňky zachycené na štětinách kartáčku.
- Po hodinové inkubaci v termostatu bylo do zkumavky přidáno 200  $\mu$ l pufru B3 a proběhlo lehké promíchání pomocí vortexu po dobu 5 sekund. Následovala 10 minutová inkubace zkumavek i s kartáčky ve vyhřívaném bloku při teplotě 70 °C. Po 5 minutách byly vzorky vortexovány po dobu 5 sekund a vráceny zpět do termostatu.
- Po uplynutí stanovené doby inkubace byly zkumavky vyjmuty z termostatu a ponechány k vychladnutí několik minut při laboratorní teplotě. Sterilní pinzetou byl z každé zkumavky vyjmut odběrový kartáček.
- Do zkumavky, která obsahovala roztok lyzovaných buněk, bylo napipetováno 210  $\mu$ l 96% ethanolu, který byl přidán s cílem vysrážet izolované molekuly DNA. Zkumavky byly následně několikrát protřepány v ruce, aby došlo k důkladnému promíchání roztoků.
- Pro další postup byly připraveny zkumavky s filtrem označené výrobcem jako NucleoSpin® Tissue Column. Z původních zkumavek bylo přepipetováno 450  $\mu$ l roztoku a následovalo odstředění v centrifuze 5430 R (Eppendorf, Německo) při  $11000 \times g$  po dobu 1 minuty. Izolované molekuly DNA byly po centrifugaci zachyceny

na filtru a odstředěnou kapalinu, která zůstala ve sběrné zkumavce, bylo možné vylít. Stejný postup byl opakován, dokud filtrem neprošel veškerý objem roztoku.

- Další krok zahrnoval první promývání filtru pomocí 500 µl pufru BW. Kolonky byly následně odstředěny v centrifuze při 11000 × g po dobu 1 minuty a roztok zachycený ve sběrné zkumavce byl vylit.
- Druhé promývání filtru probíhalo pomocí 600 µl pufru B5 s předem přidaným ethanolem. Zkumavky byly opět centrifugovány při 11000 × g po dobu 1 minuty a zbylá kapalina ze sběrné zkumavky byla odstraněna.
- Zkumavky byly ponechány 2 minuty při laboratorní teplotě a následně byla provedena centrifugace na sucho při 11000 × g po dobu 2 minut pro odstranění zbytků všech promývacích roztoků.
- Filtr byl přenesen do nové sterilní 1,5 ml zkumavky a přímo k filtru bylo napipetováno 100 µl pufru BE, za účelem vymytí molekul zachycených na filtru. Pufr BE byl 10 minut předem inkubován v termostatu při 70 °C. Zkumavky byly ponechány 1 minutu při laboratorní teplotě a následovala finální centrifugace při 11000 × g po dobu 1 minuty.
- V posledním kroku byl filtr ze zkumavky odstraněn. Ve zkumavce zůstalo 100 µl roztoku obsahujícího nukleové kyseliny.

#### 4.3.3 Izolace DNA z exkrementů

Pro izolaci DNA z exkrementů byl použit kit QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Nizozemsko). Pro následné analýzy změn kvality a kvantity DNA byl každý vzorek izolován dvakrát. První izolace DNA proběhla bezprostředně po odběru vzorků, podruhé byla DNA izolována po půl roce ze zmrazeného materiálu.

Příprava vzorků a extrakce DNA probíhala následovně:

- Nádobky, v nichž byly skladovány exkrementy, byly vyjmuty z mrazáku a z každého vzorku bylo na analytických vahách (Boeco, Německo) naváženo 180–220 mg. Postup byl opakován pro 2 sady kontrolních vzorků (zálohy), které byly příslušně označeny a uloženy zpět do mrazáku.
- Do zkumavek se vzorky určenými pro izolaci DNA bylo napipetováno 1000 µl pufru Inhibite EX Buffer a bylo provedeno důkladné promísení pufru s exkrementy pomocí vortexu TK3S TechnoKartell (Hertz, Německo).



- Následně byly zkumavky vloženy do centrifugy 5430 R (Eppendorf, Německo) a odstředěny při  $11000 \times g$  po dobu 1 minuty.
- Do nové sterilní 1,5 ml zkumavky bylo pomocí pipety přeneseno 600  $\mu$ l supernatantu z původních zkumavek. Bylo dbáno na to, aby supernatant obsahoval co nejméně usazených částí exkrementů. K roztoku bylo přidáno 25  $\mu$ l Proteinázy K (Qiagen, Nizozemsko) a dále 600  $\mu$ l pufru Buffer AL.
- Zkumavky byly lehce vortexovány po dobu 15 sekund, aby došlo k promísení roztoků.
- Následovala inkubace vzorků v předehřátém termobloku TDB-120 (Biosan, Litva) na 70 °C po dobu 10 minut, během inkubace byly vzorky několikrát promíchány vortexem.
- Po vyjmutí z termobloku byly zkumavky ponechány 3 minuty při laboratorní teplotě, aby vychladly. Následně bylo do zkumavek přidáno 600  $\mu$ l 96% ethanolu a vzorky byly vortexovány po dobu  $2 \times 5$  sekund, aby došlo k vysrážení molekul DNA.
- Následně byly připraveny a popsány nové zkumavky s filtrem, do kterých bylo přeneseno 600  $\mu$ l vzniklého roztoku. Zkumavky byly centrifugovány 1 minutu při  $11000 \times g$  a kapalina, zachycená ve sběrné zkumavce, byla odstraněna. Tento postup byl opakován, dokud nedošlo k přenesení veškerého objemu roztoku z původních zkumavek.
- Do zkumavek s filtrem bylo přidáno 500  $\mu$ l promývacího pufru Buffer AW1. Následovala centrifugace 1 minutu při  $11000 \times g$  a odlití kapaliny zachycené ve sběrné zkumavce.
- K druhému promývání bylo použito 500  $\mu$ l promývacího pufru Buffer AW2, který byl pipetován přímo k filtru. Vzorky byly odstředěny v centrifuze při  $11000 \times g$  po dobu 3 minut.
- V dalším kroku byl filtr přenesen do nové 1,5 ml zkumavky a následovala centrifugace na sucho při  $11000 \times g$  po dobu 1 minuty, pro odstranění případných zbytků promývacích pufrů.
- Nakonec byl filtr přenesen do nové sterilní 2 ml zkumavky a přímo k filtru bylo napipetováno 200  $\mu$ l pufru Buffer ATE. Vzorky byly ponechány 1 minutu při laboratorní teplotě a následně byla provedena finální centrifugace při  $11000 \times g$  po dobu 1 minuty.
- Po centrifugaci následovalo odstranění filtru ze zkumavky, ve které zůstalo 200  $\mu$ l roztoku obsahujícího nukleové kyseliny.

## 4.4 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Pro stanovení čistoty a koncentrace genomické DNA byla použita metoda UV-spektrofotometrie. K analýze byl využit automatický přístroj NanoPhotometer (Implen, Německo), který pracuje na principu proměrování vzorku při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm. Poměr absorbancí A<sub>260</sub>/280 se u vzorků, které jsou považovány za čisté, pohybuje v intervalu od 1,8 do 2.

Pro následné analýzy změn kvality a kvantity DNA byl každý vzorek změřen dvakrát. První měření proběhlo bezprostředně po izolaci DNA, poté byl vzorek zmražen a podruhé změřen po půl roce.

Množství DNA bylo stanoveno z objemu 3  $\mu$ l vzorku následujícím způsobem:

- Nejprve proběhla kalibrace přístroje tzv. slepým vzorkem. Za slepý vzorek je považován pufr, ve kterém byla rozpuštěna DNA v posledním kroku izolace.
- Před přenesením vzorku na kyvetu bylo třeba vzorek důkladně promíchat, aby se zamezilo rozdílné koncentraci makromolekul DNA na hladině a u dna roztoku. Promíchání probíhalo pomocí opakovaného pomalého nasávání roztoku pipetou.
- Na jamku měřící kyvety byly přeneseny 3  $\mu$ l vzorku a kyveta byla zakryta speciálním kovovým uzávěrem. Pro měření byl použit uzávěr s parametry: faktor 10, LP 1 mm.
- Následovalo automatické proměření vzorku a odečtení koncentrace extrahované DNA [ng/ $\mu$ l] a poměru absorbancí A<sub>260</sub>/280.
- Před měřením nového vzorku byly měřící ploška i uzávěr vždy důkladně očištěny tamponem z buničiny.

## 4.5 Elektroforéza

Pro ověření vysokomolekularity DNA byla provedena agarózová gelová elektroforéza. Hustota gelu byla stanovena na 1 %.

### 4.5.1 Příprava agarózového gelu

- Na analytických vahách (Boeco, Německo) byly naváženy 2 g agarózy.
- Do Erlenmeyerovy baňky byla přenesena agaróza společně s 200 ml 1 $\times$  TBE pufru (dle Sambrook et al. 1989). Do baňky bylo umístěno magnetické míchadlo pro odhalení skrytého varu, roztok byl kroužením krátce promíchán a poté 3 minuty zahříván až do rozpuštění agarózy.

- Baňka byla přenesena do laboratorní digestoře a roztok byl několik minut promícháván pomocí magnetické míchačky, přičemž došlo k zchlazení roztoku přibližně na 60 °C.
- K roztoku bylo přidáno 12 µl ethidium bromidu, došlo k důkladnému promíchání a následně byl roztok přenesen do připravené formy s hřebeny.
- Po 45 minutách gel zatuhl, hřebeny byly vyjmuty a gel byl přenesen do elektroforetické vany, kde byl zalit 1500 ml pufru 1× TBE.

#### 4.5.2 Nanášení vzorků na gel

- Pro elektroforetický test bylo použito 10 µl od každého vzorku. Tento objem byl přenesen do sterilních PCR zkumavek (0,2 ml) a do každé zkumavky bylo přidáno 2 µl nanášecího pufru 6x Loading Dye (Fermentas, Litva).
- Dále byl připraven hmotnostní standart z 8 µl H<sub>2</sub>O, 1 µl GeneRuler100 bp DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific, USA) a 2 µl nanášecího pufru 6x Loading Dye (Fermentas, Litva).
- Pomocí mikropipety byly vzorky nanесeny do vytvořených jamek v agarózovém gelu. Na konec každé řady byl nanесen hmotnostní standart k orientačnímu stanovení velikosti produktů.
- Elektroforetická separace probíhala v cele SubCell (BioRad, USA) po dobu 60 minut při napětí 120 V. Po uplynutí stanovené doby byl gel vyjmut a vzorky byly vizualizovány pomocí UV Transiluminátoru (BioRad, USA). Výsledky v podobě elektroforeogramu byly zaznamenány pomocí digitální kamery, která je součástí systému GelDoc.

#### 4.6 Statistické vyhodnocení

Pro vyhodnocení rozdílů mezi dvěma termíny měření koncentrace DNA u jednotlivých typů vzorků byl použit párový t-test. Pro celkové zhodnocení byla použita analýza rozptylu hlavních efektů ANOVA. Závisle proměnnou byla koncentrace DNA a třídícími faktory kůň a typ vzorku. Pro podrobnější vyhodnocení analýzy rozptylu bylo provedeno hodnocení Tukeyho HSD testem. Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí programu STATISTICA Cz 12 (StatSoft, Inc., USA).

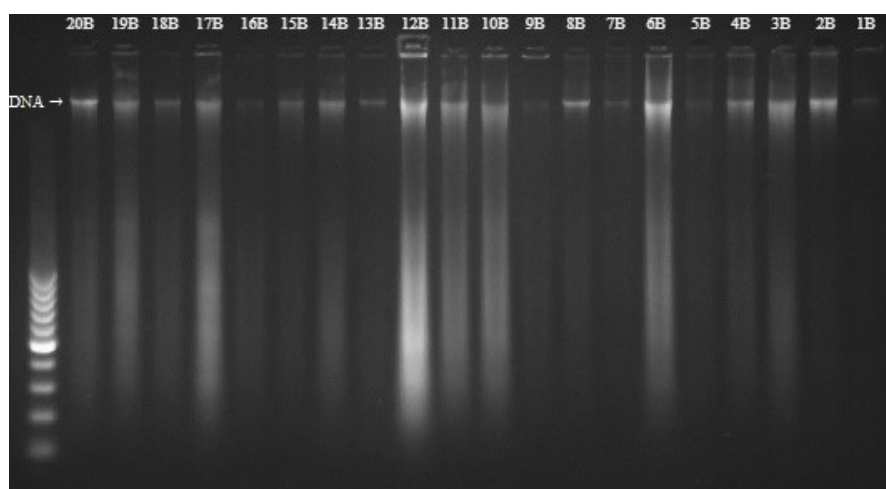
## 5. Výsledky

### 5.1 Žíně

Izolace DNA byla provedena pomocí kitu NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel, Německo). Hodnoty byly změřeny pomocí přístroje UV-spektrofotometr NanoPhotometer (Implen, Německo). Pro slepý vzorek byl použit pufr, ve kterém byla rozpuštěna DNA – Buffer BE. První měření koncentrace a čistoty DNA proběhlo bezprostředně po izolaci DNA, druhé měření bylo provedeno po půl roce od izolace DNA.

Hodnoty koncentrace DNA se při prvním měření pohybovaly od 9,5 do 289 ng/μl, průměrná hodnota byla 63,675 ng/μl. Při druhém měření byla průměrná hodnota koncentrace DNA 64,275 ng/μl. Poměr absorbancí A260/280 nabýval hodnot od 1,848 do 2,05. Průměrná hodnota poměru absorbancí A260/280 při prvním měření byla 1,952. Při druhém měření byla průměrná hodnota 1,961. Všechny naměřené hodnoty koncentrace DNA a poměru absorbancí A260/280 jsou uvedeny v příloze 1.

Na obrázku 3 jsou výsledky izolace DNA vizualizovány pomocí agarózové elektroforézy. Na elektroforeogramu je možné pozorovat silný signál genomové DNA u všech vzorků. Nejsilnější signál vykazují vzorky 6B, 10B–12B, což potvrdily i vysoké hodnoty koncentrace DNA naměřené pomocí spektrofotometrie. Nejvyšší hodnota byla naměřena u vzorku 12B (289 ng/μl). Vzorky 1B a 7B naopak obsahovaly nejméně izolované DNA (9,5 ng/μl, resp. 10,5 ng/μl), což je na elektroforeogramu patrné jako slabý band DNA. U většiny vzorků je možné pozorovat za bandem viditelnou stopu, která představuje menší molekuly a fragmenty nukleových kyselin. Jedná se především o molekuly RNA, jelikož při izolaci DNA nebyl použit enzym RNAsa, který tyto molekuly degraduje.



Obrázek 3: Elektroforeogram – žíně

Výsledky statistického šetření jsou uvedeny v tabulce 1. Mezi dvěma měřeními nebyl nalezen statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  ( $p > 0,05$ ).

Tabulka 1: Přehled výsledků t-testu – koncentrace DNA z žíní

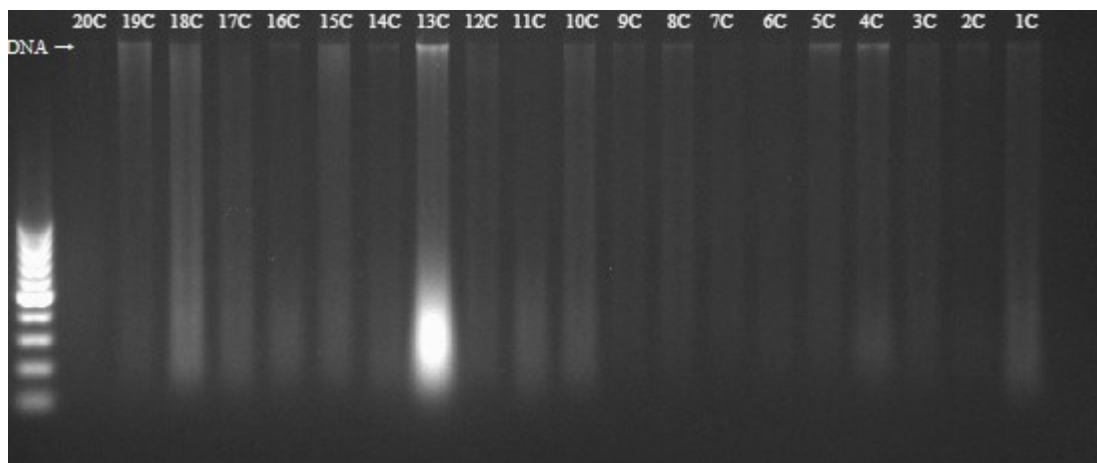
Proměnná	t-test pro závislé vzorky									
	Průměr	Sm. odch.	N	Rozdíl	Sm. odch. rozdílu	t	sv	p	Int. spolehl. -95,000%	Int. spolehl. +95,000%
koncentrace [ng/μl] žíně 1. měření	63,67500	64,97981								
koncentrace [ng/μl] žíně 2. měření	64,27500	63,95012	20	-0,600000	3,106021	-0,863897	19	0,398420	-2,05366	0,853663

## 5.2 Stěry bukální sliznice

Izolace DNA z bukálních stěrů byla provedena pomocí kitu NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel, Německo). Hodnoty byly změřeny pomocí přístroje UV-spektrofotometr NanoPhotometer (Implen, Německo). Pro slepý vzorek byl použit pufr, ve kterém byla rozpuštěna DNA – Buffer BE. První měření proběhlo ihned po izolaci DNA, druhé bylo provedeno po půl roce od izolace DNA.

Průměrná hodnota koncentrace DNA pro bukální stěry při prvním měření byla 30,825 ng/μl, při druhém měření 31,475 ng/μl. Poměry absorbancí A260/280 při prvním měření nabývaly hodnot od 1,745 do 2,3 a jejich průměrná hodnota byla 1,917. U druhého měření byla průměrná hodnota 1,864. Naměřené hodnoty koncentrace DNA a poměru absorbancí A260/280 všech vzorků jsou uvedeny v příloze 1.

Na obrázku 4 je elektroforeogram, který zobrazuje izolovanou DNA z bukální sliznice. U všech vzorků je možné pozorovat za bandem DNA viditelnou stopu, která značí, že vzorek obsahuje fragmenty nebo menší molekuly nukleových kyselin. Jedná se zejména o molekuly RNA, které nebyly při procesu izolace DNA degradovány RNAsou. Na obrázku je jasně patrný vzorek 13C, který vykazuje nejsilnější genomový signál. Vysoké množství DNA ve vzorku potvrzuje i naměřená koncentrace DNA, která byla nejvyšší ze všech vzorků bukálních stěrů (172 ng/μl). Zároveň je u tohoto vzorku nejvýrazněji vidět stopa za bandem DNA. Naopak u vzorku 20C byla naměřena koncentrace DNA pouze 9 ng/μl a na elektroforeogramu není band téměř patrný. To samé platí u vzorku 7C, u kterého byla naměřena koncentrace DNA pouze 7 ng/μl.



Obrázek 4: Elektroforeogram – stěry bukální sliznice

V tabulce 2 jsou uvedeny hodnoty porovnání dvou termínů měření koncentrace vyizolované DNA z bukálních stěrů. U tohoto typu vzorku nebyl nalezen statisticky průkazný rozdíl mezi dvěma měřeními na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  ( $p > 0,05$ ).

Tabulka 2: Přehled výsledků t-testu – koncentrace DNA ze stěrů bukální sliznice

Proměnná	t-test pro závislé vzorky									
	Průměr	Sm. odch.	N	Rozdíl	Sm. odch. rozdílu	t	sv	p	Int. spolehl. -95,000%	Int. spolehl. +95,000%
koncentrace [ng/μl] stěry bukální sliznice 1. měření	30,82500	35,58543								
koncentrace [ng/μl] stěry bukální sliznice 2. měření	31,47500	32,73638	20	-0,650000	3,900405	-0,745279	19	0,465224	-2,47545	1,175446

## 5.3 Exkrementy

### 5.3.1 Exkrementy čerstvé

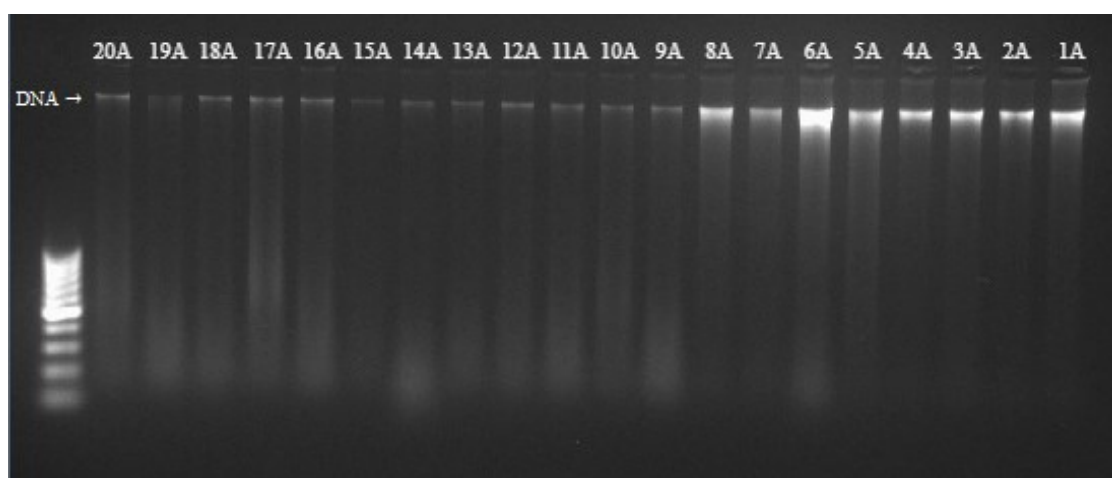
Izolace DNA byla provedena pomocí kitu QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit<sup>®</sup> Kit (Qiagen, Nizozemsko). Hodnoty byly změřeny pomocí přístroje UV-spektrofotometr NanoPhotometer (Implen, Německo). Pro slepý vzorek byl použit pufr Buffer ATE. První měření proběhlo bezprostředně po izolaci DNA, druhé bylo provedeno půl roku po izolaci DNA.

Hodnoty koncentrace DNA se u tohoto typu vzorku pohybovaly při prvním měření od 13,5 do 50 ng/μl. Průměrná hodnota koncentrace DNA při prvním měření byla 22,275 ng/μl. Při druhém měření byla průměrná hodnota koncentrace DNA 22,9 ng/μl.

Hodnoty poměru absorbancí A260/280 se pohybovaly v rozmezí od 1,727 do 2,533. Průměrná hodnota poměru absorbancí A260/280 byla při prvním měření 2,052 a při měření

po půl roce 1,974. Podrobnější hodnoty koncentrace DNA a poměru absorbancí A260/280 jsou uvedeny v příloze 1.

Na obrázku 5 jsou výsledky izolace DNA vizualizovány pomocí agarózové elektroforézy. Na elektroforeogramu je možné pozorovat silný signál genomové DNA u vzorků 1A–8A, nejsilnější signál vykazuje vzorek 6A. Vizualizace na gelu koresponduje s naměřenými hodnotami koncentrace DNA, která byla u vzorku 6A nejvyšší (50 ng/μl). U všech vzorků na obrázku 5 je možné za bandem DNA pozorovat rozostřenou stopu, která může naznačovat kontaminaci či fragmentaci DNA, ale zejména poukazuje na přítomnost RNA ve vzorcích.



Obrázek 5: Elektroforeogram – exkrementy čerstvé

V tabulce 3 je možné sledovat porovnání dvou termínů měření koncentrace vyizolované DNA z čerstvých exkrementů. Nebyl nalezen statisticky průkazný rozdíl mezi dvěma měřeními při hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Dlouhodobým zmražením vyizolované DNA z čerstvých exkrementů se nemění její koncentrace.

Tabulka 3: Přehled výsledků t-testu – koncentrace DNA z čerstvých exkrementů

Proměnná	t-test pro závislé vzorky									
	Průměr	Sm. odch.	N	Rozdíl	Sm. odch. rozdílu	t	sv	p	Int. spolehl. -95,000%	Int. spolehl. +95,000%
koncentrace [ng/μl] čerstvé exkrementy 1. měření	22,27500	8,283584								
Koncentrace [ng/μl] čerstvé exkrementy 2. měření	22,90000	9,349360	20	-0,625000	2,855627	-0,978799	19	0,339979	-1,96147	0,711475

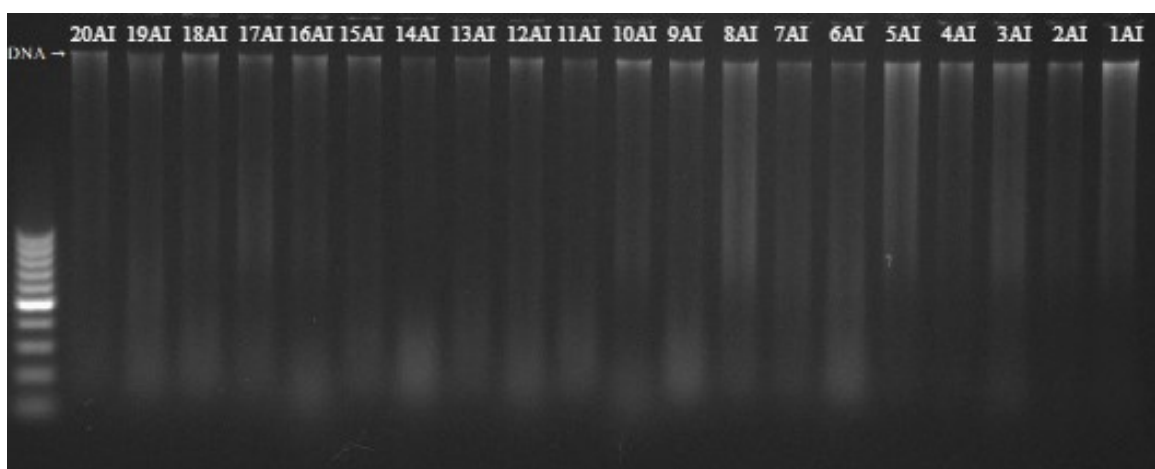
### 5.3.2 Exkrementy zmražené

Izolace DNA proběhla ze vzorků, které byly ihned po odběru zmražené a půl roku skladované při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Postupy izolace DNA i spektrofotometrického měření se shodovaly s postupy použitými pro čerstvé exkrementy. Vzorky mražených exkrementů byly také změřeny dvakrát, první měření proběhlo bezprostředně po izolaci DNA, druhé po půl roce od izolace.

Průměrná hodnota koncentrace DNA při prvním měření byla  $28,9\text{ ng}/\mu\text{l}$ . Při druhém měření byla průměrná koncentrace DNA  $35,075\text{ ng}/\mu\text{l}$ . Nejnižší hodnota koncentrace DNA při prvním měření byla  $14\text{ ng}/\mu\text{l}$  u vzorku 2AI, nejvyšší hodnota byla  $52\text{ ng}/\mu\text{l}$  u vzorku 5AI.

Hodnoty poměru absorbancí  $A_{260}/A_{280}$  se při prvním měření pohybovaly od 1,674 do 2,143, průměrná hodnota tohoto poměru byla 1,931. U druhého měření byla průměrná hodnota čistoty 1,963. Hodnoty koncentrace i čistoty DNA všech vzorků jsou uvedeny v příloze 1.

Na obrázku 6 je vizualizována extrahovaná DNA ze zmražených exkrementů. U všech vzorků je patrný band DNA, za kterým se objevuje poměrně výrazná stopa. Ta může naznačovat fragmentaci DNA, ale zejména přítomnost molekul RNA ve vzorcích.



Obrázek 6: Elektroforeogram – exkrementy zmražené

Výsledky statistického šetření jsou uvedeny v tabulce 4. U tohoto typu vzorků byl nalezen statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi dvěma měřeními. Lze tedy říci, že koncentrace DNA, získaná z dlouhodobě zmražených vzorků exkrementů, se při dlouhodobém zmražení mění, v tomto případě zvyšuje.



Tabulka 4: Přehled výsledků t-testu – koncentrace DNA ze zmražených exkrementů

Proměnná	t-test pro závislé vzorky									
	Průměr	Sm. odch.	N	Rozdíl	Sm. odch. rozdílu	t	sv	p	Int. spolehl. -95,000%	Int. spolehl. +95,000%
koncentrace [ng/μl] zmražené exkrementy 1. měření	28,90000	8,01906								
koncentrace [ng/μl] zmražené exkrementy 2. měření	35,07500	10,54723	20	-6,17500	11,99372	-2,30249	19	0,032785	-11,7882	-0,561766

### 5.3.3 Porovnání čerstvých a zmražených exkrementů

V tabulce 5 jsou uvedeny výsledky statistického šetření, ve kterém byly porovnávány rozdíly v koncentraci DNA mezi vzorky čerstvých a mražených exkrementů při prvním termínu měření. Z výsledků vyplývá, že byl nalezen statisticky velmi významný rozdíl ( $p \ll 0,05$ ).

Tabulka 5: Přehled výsledků t-testu – porovnání čerstvých a zmražených exkrementů (1. měření)

Proměnná	t-test pro závislé vzorky									
	Průměr	Sm. odch.	N	Rozdíl	Sm. odch. rozdílu	t	sv	p	Int. spolehl. -95,000%	Int. spolehl. +95,000%
koncentrace [ng/μl] čerstvé exkrementy 1. měření	22,27500	8,283584								
koncentrace [ng/μl] zmražené exkrementy 1. měření	28,90000	8,019056	20	-6,62500	9,293284	-3,18810	19	0,004842	-10,9744	-2,27561

Na stejném principu byly porovnány hodnoty koncentrací DNA získané při druhém měření. Tabulka 6 zobrazuje hodnoty získané při porovnání druhého termínu měření koncentrace vyizolované DNA z čerstvých a zmražených exkrementů. V tomto případě byl rovněž nalezen statisticky velmi významný rozdíl ( $p \ll 0,05$ ).

Tabulka 6: Přehled výsledků t-testu – porovnání čerstvých a zmražených exkrementů (2. měření)

Proměnná	t-test pro závislé vzorky									
	Průměr	Sm. odch.	N	Rozdíl	Sm. odch. rozdílu	t	sv	p	Int. spolehl. -95,000%	Int. spolehl. +95,000%
koncentrace [ng/μl] čerstvé exkrementy 2. měření	22,90000	9,34936								
koncentrace [ng/μl] zmražené exkrementy 2. měření	35,07500	10,54723	20	-12,1750	14,81311	-3,67568	19	0,001606	-19,1077	-5,24225

## 5.4 ANOVA

Statistické vyhodnocení by mělo ukázat, zda existují signifikantní rozdíly mezi úspěšností izolace DNA od konkrétních jedinců a také mezi jednotlivými typy vzorků. Údaje uvedené v příloze 1 byly vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu hlavních efektů, kde závisle proměnnou byla koncentrace DNA a třídícími faktory kůň a typ vzorku. Cílem analýzy bylo prokázat, zda tyto faktory mají statisticky významný vliv na množství izolované DNA na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Z tabulky 7 vyplývá, že třídící faktor kůň nemá vliv na koncentraci DNA. U třídícího faktoru typ vzorku bylo zjištěno, že se alespoň jedna dvojice typů vzorků statisticky významně liší. Z tohoto důvodu bylo pro faktor typ vzorku provedeno podrobnější hodnocení Tukeyho HSD testem.

Tabulka 7: Přehled výsledků analýzy rozptylu

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro DNA koncentrace [ng/μl]				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	106106,0	1	106106,0	72,77711	0,000000
Kůň	23707,2	19	1247,7	0,85582	0,634707
Typ vzorku	20615,4	3	6871,8	4,71330	0,005236
Chyba	83103,7	57	1458,0		

Podrobnějším hodnocením bylo zjištěno, že průměrná koncentrace DNA u exkrementů čerstvých, exkrementů mražených a stěrů bukální sliznice se statisticky průkazně neliší (tabulka 8). Průměrná koncentrace DNA u typu vzorku žíně se statisticky významně liší od všech ostatních typů vzorků. Žíně mají prokazatelně nejvyšší koncentraci DNA ze všech použitých materiálů.

Tabulka 8: Tukeyův HSD test

č. buňky	Typ vzorku	Tukeyův HSD test			
		{1} 22,275	{2} 28,900	{3} 30,825	{4} 63,675
1	exkrementy čerstvé		0,946606	0,893558	0,006163
2	exkrementy zmražené	0,946606		0,998608	0,027924
3	stěry bukální sliznice	0,893558	0,998608		0,041807
4	žíně	0,006163	0,027924	0,041807	

## 6. Diskuze

V koňské chovatelské praxi není jasně stanoveno, jaký biologický materiál je pro genetické analýzy nejvhodnější. Díky neustálému vývoji v oblasti molekulární genetiky a širokému spektru neinvazivních technik odběru vzorků je možné provádět analýzy z různých typů materiálů ve srovnatelné kvalitě s vysoce kvalitními zdroji DNA jako je krev (Beja-Pereira et al. 2009). Cílem této práce bylo porovnat tři typy biologických vzorků odebraných neinvazivními metodami odběru a doporučit vhodnou alternativu ke krevním vzorkům.

### 6.1 Žíně

V této práci byly použity žíně z ocasu na základě tvrzení Sato et al. (2006), kteří uvádí, že množství DNA z chlupových cibulek vytržených z ocasu bylo mnohonásobně vyšší než množství DNA získané z hřívy.

Žíně jako vhodný materiál k izolaci DNA doporučují ve své studii Goossens et al. (1998), kteří popisují totožné hodnoty koncentrace DNA z chlupových cibulek a z krve. Oproti odběru krve lze u odběru žíní vyzdvihnout hlavně psychickou pohodu zvířat při získávání vzorků a také fakt, že žíně může chovatel jednoduše vytrhnout sám bez asistence veterinárního lékaře.

Díky těmto výhodám jsou žíně využívány laboratořemi ke genetickým analýzám, jako je stanovení genetického typu koně či zjištění barvy a kvality srsti. Pro majitele koní je tato forma odběru vzorků vhodná, jelikož hrozí pouze malé riziko kontaminace a zároveň není nutné žíně speciálně skladovat či konzervovat. Laboratoř Genomia (2008) doporučuje vytrhávat žíně i s chlupovými cibulkami, kterých by mělo být minimálně 20. V této práci byl doporučený postup dodržen u všech vzorků žíní.

Pro účely této bakalářské práce byla extrahovaná DNA spektrofotometricky změřena ihned po izolaci, poté byla uchována půl roku v mrazáku a změřena znovu. Průměrná hodnota koncentrace DNA z žíní při prvním měření byla 63,675. Ząbek et al. (2005) zmiňují problematiku nadměrného množství DNA ve vzorku (~200 ng/ $\mu$ l), což může způsobit inhibici PCR reakce. V této práci překročila naměřená hodnota 200 ng/ $\mu$ l pouze u jednoho vzorku (B12 = 289 ng/ $\mu$ l).

Naměřené hodnoty absorbancí A280/260 se pohybovaly v rozmezí od 1,848 do 2,05. Průměrná hodnota poměru absorbancí A280/260 při prvním měření (1,95) je téměř shodná s hodnotou (1,99) uváděnou Alhaddad et al. (2019). Podle Wilfinger et al. (1997) je možné

považovat hodnoty absorpance získané při prvním i druhém měření za vysoce čisté, proto v této práci nebylo provedeno statistické porovnání těchto dvou měření.

Při statistickém porovnání naměřených hodnot koncentrace DNA pomocí párového t-testu bylo zjištěno, že dlouhodobým zmražením extrahované DNA se nemění její koncentrace a je tedy možné ji skladovat při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (tabulka 1). S tímto tvrzením souhlasí i Roon et al. (2003), kteří při následných analýzách DNA pozorovali až 10% nárůst úspěšnosti amplifikace u vzorků skladovaných při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  na rozdíl od vzorků uchovávaných při pokojové teplotě.

Extrahovaná DNA byla na gelu vizualizovaná jako dobře viditelný band (obrázek 3). Za bandem je možné pozorovat rozostřenou stopu, která může značit fragmentaci DNA, ale zejména poukazuje na přítomnost molekul RNA ve vzorcích. Molekuly RNA se ve vzorcích nacházejí, protože při procesu extrakce DNA nebyl použit enzym RNAsa, který je degraduje. Stejně výsledky vizualizace DNA na gelu pozorovali i Alhaddad et al. (2019), ačkoli průměrná hodnota koncentrace DNA v jejich práci byla podstatně nižší ( $10,19\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  z 50 chlupových cibulek).

## 6.2 Stěry bukální sliznice

Izolace DNA ze stěrů bukální sliznice není u koní příliš rozšířená. Tato metoda je u kopytníků využívána převážně k zjišťování hladiny stresových hormonů (Schmidt et al. 2010; Bonelli et al. 2019). Cílem této bakalářské práce však bylo porovnat několik druhů biologických materiálů bez ohledu na typy následných analýz DNA. Z tohoto důvodu byly do studie zařazeny i stěry bukální sliznice, ačkoli se v praxi u koní příliš nevyužívají.

Odběr DNA pomocí cytologického kartáčku není pro zvířata bolestivý, ale může být pro některé jedince nepříjemný. Získání DNA touto metodou vyžaduje nejen zručnost, ale také spolupráci koně, který musí být zvyklý na manipulaci v oblasti tlamy. Jelikož všichni jedinci, kteří byli využiti pro experimenty v této práci, byli navyklí na pravidelné odčervení pomocí odčervovací pasty podávané perorálně, nebyl při použití odběrového kartáčku zaznamenán žádný problém. Mírné komplikace způsobil fakt, že stěr musí být prováděn dostatečně dlouhou dobu, aby se na kartáčku zachytil dostatek buněk pro izolaci DNA. Pro některé koně nebylo jednoduché zůstat po dobu odběru v klidu, proto byl využit asistent, který pomohl udržet hlavu jedince ve vhodné pozici po celou dobu odběru.

Při samotném odběru bylo nutné některým jedincům vsunout prst do koutku tlamy a přimět je tak otevřít pysky, aby bylo možné opatrně vložit kartáček. Z tohoto důvodu byl odběr prováděn vždy v jednorázových rukavicích, aby nedošlo ke kontaminaci kartáčku lidskou DNA. Z hlediska náročnosti odběru jsou stěry bukální sliznice ze zde uváděných metod

nejkomplikovanější. Tato metoda vyžaduje přímou manipulaci s koněm a poměrně blízký kontakt s koňskou tlamou a zuby, což může být pro člověka, který se u koní nepohybuje, nepříjemné. Pokud však odběr provádějí sami chovatelé, kteří své koně znají, není tato metoda nijak zvlášť problematická.

Dalším důležitým faktorem pro získání kvalitní DNA z bukálních stěrů je správné vysušení a skladování kartáčků. Je doporučováno ponechat cytologické kartáčky vyschnout při pokojové teplotě, následně je uložit do papírových obálek a poté z nich v co nejbližší době extrahovat DNA (Beja-Pereira et al. 2009). Manipulace se vzorky v této práci proběhla v souladu s postupy uváděnými výše zmíněnými autory.

I přes dodržení všech zásad správného odběru bývají ve vzorcích DNA získaných z bukálních stěrů přítomny bakterie, enzymy a orální mikrobiota (Kidd et al. 2014). Obecně se uvádí, že zvířata by neměla 30 minut před odběrem přijímat potravu. V souvislosti s koňmi není toto opatření vždy možné dodržet. V této práci byly bukální stěry u klisen z Janovy Hory (příloha 2) prováděny přímo na pastvině, tudíž nebylo možné zamezit jedincům v přijímání potravy. Ačkoli nebyl u všech jedinců při odběru DNA dodržen ideální postup, byla průměrná hodnota poměru absorbancí A280/260 u prvního měření 1,92 a u druhého měření 1,86. Obě tyto hodnoty podle Wilfinger et al. (1997) značí čistou DNA, proto nebylo třeba provádět statistické porovnání výsledků čistoty DNA.

U vzorku č. 8 byla naměřena vyšší hodnota poměru absorbancí A280/260 (2,3), ovšem Matlock (2015) uvádí, že vyšší hodnoty tohoto poměru absorbancí nenaznačují problém. Srovnatelnou průměrnou hodnotu čistoty (1,91) naměřili ve své práci i Lanci et al. (2012).

Naměřená průměrná hodnota koncentrace DNA při prvním měření byla v této práci 30,825 ng/μl. Tato hodnota je srovnatelná s hodnotou získanou ze vzorků čerstvých i mražených exkrementů, jak je uvedeno dále. Podobné hodnoty průměrné koncentrace z bukálních stěrů získali i Asawakarn et al. (2018) u ptáků (28.813 ng/μl) a Picazo & García-Olmo (2015) u hlodavců (20 ng/μl).

Pro vizualizaci vzorků byla provedena gelová agarózová elektroforéza. Na elektroforeogramu bylo možné pozorovat přítomnost molekul RNA ve vzorcích v podobě stopy za bandem DNA (obrázek 4), což ve své práci uvádí i Alhaddad et al. (2019).

V tabulce 2 jsou uvedeny hodnoty získané statistickým porovnáním dvou termínů měření koncentrace vyizolované DNA ze stěrů bukální sliznice. Při tomto porovnání nebyl nalezen statisticky průkazný rozdíl. Lze tedy tvrdit, že skladováním vyizolované DNA při teplotě -20 °C nedochází k její degradaci a nesnižuje se tak její využitelnost k dalším genetickým analýzám.

### 6.3 Exkrementy

V této práci byl k izolaci DNA z exkrementů použit komerční kit QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Nizozemsko). Exkrementy, ze kterých byla DNA izolována bezprostředně po odběru, byly označeny jako „čerstvé“. U tohoto typu vzorků byla průměrná koncentrace DNA při prvním měření 22,275 ng/μl. Vzorky označené jako „zmražené“ byly uchovávány 6 měsíců při teplotě -20 °C a poté z nich byla izolována DNA. U těchto vzorků byla při prvním měření naměřena průměrná hodnota koncentrace DNA 28,9 ng/μl.

Mezi čerstvými a zmraženými exkrementy (první měření) byl párovým t-testem nalezen statisticky velmi významný rozdíl ( $p \ll 0,05$ ), jak je podrobněji uvedeno v tabulce 5. Stejný výsledek přineslo i statistické porovnání druhého termínu měření (tabulka 6). Z těchto výsledků je patrné, že dlouhodobé zmražení vzorků exkrementů má vliv na koncentraci vyizolované DNA.

Jedním z faktorů, způsobujících vyšší průměrnou hodnotu koncentrace DNA u zmražených vzorků, může být fragmentace DNA. Studie Deagle et al. (2006) a Kolodziej et al. (2013) ukazují, že fragmentace DNA u vzorků exkrementů vedla k výraznému snížení úspěšnosti amplifikace.

Zcela opačný výsledek než byl popsán v této bakalářské práci, přinesla studie Metzler-Zebeli et al. (2016). Tito autoři popisují při izolaci DNA ze zmražených exkrementů snížení množství získané DNA průměrně o 25–30 ng ve srovnání s čerstvými exkrementy. Výsledky Bahl et al. (2012) pak ukazují, že u lidských exkrementů nebyly pozorovány rozdíly v koncentracích DNA při porovnání čerstvých a zmražených vzorků.

Průměrná čistota DNA izolované z čerstvých exkrementů byla 2,05. Podobných výsledků dosáhli i Janabi et al. (2016), kteří uvádí průměrnou hodnotu čistoty 2,11. Při izolaci DNA ze vzorků uložených půl roku při teplotě -20 °C byla naměřena průměrná čistota 1,93. V této práci nebylo třeba provádět statistické porovnání čistoty DNA, jelikož ve všech případech byly naměřeny hodnoty, které podle Wilfinger et al. (1997) značí dostatečně čistou DNA.

U vzorků exkrementů je obtížné kvantifikovat množství extrahované DNA pomocí konvenčních metod jako je spektrofotometrie, protože tyto metody nejsou schopny odhalit degradaci DNA ani rozeznat DNA cílového druhu od DNA střevní mikroflóry (Beja-Pereira et al. 2009). Proto byla v této práci pro ověření vysokomolekularity DNA použita gelová elektroforéza.

Na obou elektroforeogramech vzorků exkrementů (obrázek 5 a 6) bylo možné pozorovat rozostřenou stopu za bandem DNA. Tato stopa naznačuje, že mohlo dojít k fragmentaci molekul DNA důsledkem dlouhodobého zmražení či chemické degradace (Mulcahy et al. 2016). Především však tato stopa poukazuje na to, že se ve vzorcích nachází molekuly RNA, které nebyly při procesu izolace DNA degradovány RNAsou. Zhnag et al. (2013), kteří ve své studii naměřili podobné hodnoty čistoty DNA, také pozorovali na elektroforeogramu výrazný „tailing phenomenon“. Autoři zmiňují, že tento jev může být způsoben také přítomností fragmentů bakteriální, parazitární a mikrobiální DNA ve vzorcích exkrementů.

Názory různých autorů na problematiku dlouhodobého skladování exkrementů a s tím související změnu kvality a kvantity izolované DNA se značně liší. Lucchini et al. (2002) a Lonsinger et al. (2015) na základě svých výzkumů zastávají názor, že při dlouhodobém uchovávání vzorků v mrazu nedochází k degradaci DNA. Autoři doporučují odebírat vzorky exkrementů v zimě a dodávají, že se ani u opakovaných cyklů tání a mražení neprokázal vliv na degradaci DNA.

Santini et al. (2007) navrhuje jako nejvhodnější metodu skladování vzorků konzervaci v 95% ethanolu při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Uvádějí, že míra úspěšnosti amplifikace PCR pro fragmenty o velikosti 1600 bp byla u zmražených vzorků výrazně vyšší než u vzorků uchovávaných v pokojové teplotě. Zároveň se míra úspěšnosti amplifikace postupem času zvyšovala. Po šesti měsících bylo ze zmražených vzorků 98 % úspěšných PCR reakcí, zatímco ze vzorků skladovaných při pokojové teplotě bylo úspěšných pouze 55 %.

Ačkoli může být zmražení exkrementů v terénu náročné, je třeba učinit tak co nejdříve po odběru vzorku. Ze studií vyplývá, že chladné a suché podmínky (Lucchini et al. 2002; Santini et al. 2007; Adams et al. 2011) a sběr co nejčerstvějších vzorků (Piggott 2004; Reddy et al. 2012) udržují nejvyšší možnou kvalitu a kvantitu DNA.

Zcela opačné výsledky však přinesla studie Zhu et al. (2017), která ukázala, že nízká teplota ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) byla nejméně vhodnou metodou pro skladování exkrementů. Při této metodě byl pozorován výrazně nižší úspěch amplifikace ve srovnání s metodou rychlého vysušení vzorků pomocí ethanolu nebo s metodou zasolení vzorků. Úspěšnost amplifikace se po pěti měsících zmražení vzorků snížila o 60 %.

Z výše zmíněných studií vyplývá, že pohled autorů na nejvhodnější způsob skladování exkrementů a na degradaci DNA ve vzorcích není jednotný. V této práci byly exkrementy bezprostředně po odběru uloženy do přenosného mrazícího boxu, ve kterém byly převezny do laboratoře a dále byly uchovány při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do doby izolace DNA. Při tomto způsobu skladování nebyl u vzorků, které byly označeny jako „čerstvé“, nalezen statisticky průkazný

rozdíl mezi prvním měřením ihned po izolaci DNA a druhým měřením po půl roce (tabulka 3). Je tedy možné říct, že dlouhodobým zmražením vyizolované DNA z čerstvých exkrementů se nemění její koncentrace.

Naopak u zmražených exkrementů, které byly skladovány půl roku při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a poté z nich byla izolována DNA, byl prokázán statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi dvěma měřeními. U těchto vzorků byl pozorován výrazný nárůst koncentrace DNA při druhém proměření vzorků po půl roce (tabulka 4). Jak již bylo zmíněno výše, tento jev mohl být zapříčiněn degradací DNA. Fragmentovaná DNA se pak mohla projevit vyššími hodnotami koncentrace při spektrofotometrickém měření. Materiál exkrementů je problematický v tom, že obsahuje větší množství kyselin, bakterií a enzymů. Zůstává otázkou, zda jsou filtry schopny všechny nečistoty zachytit nebo se část enzymů při eluci dostává do vzorku a způsobuje tak rychlejší degradaci DNA.

Aby bylo možné přesněji zjistit, proč dochází k navýšení koncentrace DNA, bylo by zapotřebí provést chemický rozbor roztoku DNA. Není v možnostech této práce určit, zda v roztoku DNA není obsažen nadbytek solí nebo kyselin, které prošly přes filtr. Pro stanovení přesné příčiny navyšování koncentrace DNA by bylo třeba provést podrobnější analýzy na principu fluorimetrie.

Výsledky této práce ukazují, že DNA v dostatečné kvalitě a množství není jednoduché z exkrementů získat. Pokud jsou odebírány čerstvé vzorky, které jsou bezprostředně po odběru zmrazeny, a následně je z nich v blízké době izolována DNA, je kvalita a kvantita DNA srovnatelná s hodnotami bukalních stěrů. U exkrementů však hrozí vyšší riziko kontaminace DNA, zároveň se u vzorků exkrementů při statistickém porovnání prokázalo, že dlouhodobé zmražení má vliv na koncentraci DNA. Z těchto důvodů je vhodné izolaci DNA z exkrementů využívat u divokých zvířat, u kterých není jiná možnost získání vzorků. Pokud však mají chovatelé možnost zvolit jiný materiál k odběru, nejsou exkrementy na základě výsledků této práce vhodným řešením.

## 6.4 ANOVA

Pro celkové statistické zhodnocení výsledků měření byla použita ANOVA hlavních efektů (tabulka 7). Závisle proměnnou byla koncentrace DNA a třídícími faktory kůň a typ vzorku. Při této analýze bylo zjištěno, že třídící faktor kůň nemá vliv na koncentraci DNA. Tato informace je užitečná např. pro populační analýzy, protože ukazuje, že nezáleží na tom, od jakého jedince DNA odebereme.



U třídícího faktoru typ vzorku bylo zjištěno, že alespoň jedna dvojice typů vzorků se statisticky významně liší na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Z tohoto důvodu bylo pro faktor typ vzorku provedeno podrobnější hodnocení Tukeyho HSD testem (tabulka 8). Z podrobnějšího hodnocení vyplynulo, že se průměrná koncentrace DNA u exkrementů čerstvých, exkrementů mražených a stěrů bukální sliznice statisticky průkazně neliší. Průměrná koncentrace DNA u typu vzorku žíně se statisticky významně liší od všech ostatních typů vzorků.

Výsledky této práce jasně ukazují žíně jako nejvhodnější materiál pro izolaci DNA od huculských koní. Žíně jako vhodný materiál pro izolaci DNA stanovili i Alhaddad et al. (2019) ve své studii na velbloudech (*Camelus dromedarius* Linnaeus, 1758). Výhodou tohoto materiálu je jednoduchý odběr, skladování i převoz vzorků. Průměrná hodnota koncentrace DNA získaná z žíní byla signifikantně větší než hodnoty získané z ostatních typů vzorků. Zároveň se všechny hodnoty poměru absorbancí A260/280 u žíní pohybovaly v rozmezí 1,8–2, což podle Wilfinger et al. (1997) značí čistou DNA. Na elektroforeogramu byla patrná výrazná signalizace bandu DNA. Nespornou výhodou je také fakt, že si DNA izolovaná z žíní při zmražení po dobu 6 měsíců zachovává stále stejnou koncentraci a je tedy možné ji dlouhodobě skladovat.

## 7. Závěr

- V literární rešerši byly shromážděny teoretické informace o plemeni huculský kůň a o současném stavu jeho populace na území České republiky. Dále byly v dostupné literatuře zmapovány postupy izolace genomické DNA a metody její analýzy. V neposlední řadě byly popsány různé typy biologických materiálů vhodné pro izolaci DNA od koní.
- Dílčím cílem práce bylo v experimentální části izolovat DNA ze třech typů biologických materiálů od vybraných 20 genotypů huculských koní. Ze všech vzorků byla úspěšně izolována DNA. Pro vzorky žíní a stěrů bukální sliznice byl využit komerčně dostupný kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel, Německo) a pro exkrementy kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit® (Qiagen, Nizozemsko). Koncentrace a čistota DNA byly spektrofotometricky změřeny bezprostředně po izolaci DNA a následně po 6 měsících. Vysokomolekularita DNA byla ověřena pomocí agarózové gelové elektroforézy.
- Na základě získaných výsledků bylo provedeno statistické vyhodnocení. Pomocí t-testu bylo zjištěno, zda se u jednotlivých typů materiálů mění koncentrace DNA při jejím uchovávání půl roku při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Výsledky prokázaly, že u zmražených exkrementů dochází ke změně koncentrace DNA. Byla tak vyvrácena hypotéza, že při dlouhodobém uchovávání vzorků DNA při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nedochází k jejich degradaci a k fragmentaci DNA. Naopak u ostatních typů vzorků nebyla změna koncentrace DNA statisticky prokázána.
- Dále bylo experimentálně zjišťováno, zda se mění množství DNA izolované z dlouhodobě zmražených exkrementů v porovnání s čerstvými exkrementy. Pomocí párového t-testu byly statisticky porovnány hodnoty koncentrace DNA u obou typů vzorků a byl nalezen statisticky velmi významný rozdíl ( $p \ll 0,05$ ). Tím byla potvrzena hypotéza, že se dlouhodobým uchováváním vzorků exkrementů při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  mění koncentrace izolované DNA.
- Pomocí analýzy rozptylu bylo statisticky posouzeno, zda množství vyizolované DNA pomocí komerčních kitů závisí na jednotlivém zvířeti a na typu odebraného materiálu. Statistické vyhodnocení ukázalo, že množství získané DNA není závislé na konkrétním jedinci. Naopak typ odebraného materiálu má vliv na koncentraci DNA, proto bylo

provedeno podrobnější hodnocení Tukeyho HSD testem. Bylo zjištěno, že množství DNA získané z žíní je výrazně vyšší než množství DNA získané z ostatních typů vzorků.

- Na základě poznatků z této práce lze konstatovat, že pro získání DNA od koní je možné využít všechny popsané typy biologického materiálu. Shrnutím výsledků statistického vyhodnocení bych jednoznačně doporučila k izolaci DNA žíně s chlupovými cibulkami, jelikož přinesly prokazatelně nejlepší výsledky koncentrace i čistoty DNA. Vzhledem k minimálnímu obsahu vody v žíních lze vzorky bez problémů přepravovat a skladovat při pokojové teplotě. Zároveň spatřuji výhodu v jednoduchosti odběru materiálu a také v možnosti DNA dlouhodobě skladovat při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bez změny její koncentrace.

## 8. Seznam použité literatury

- Adams J, Goldberg C, Bosworth W, Rachlow J, Waits L. 2011. Rapid species identification of pygmy rabbits (*Brachylagus idahoensis*) from faecal pellet DNA. *Molecular Ecology Resources* **11**:808-812.
- Alhaddad H, Maraqa T, Alabdulghafour S, Alaskar H, Alaqeely R, Almathen F, Alhajeri BH, Palsson A. 2019. Quality and quantity of dromedary camel DNA sampled from whole-blood, saliva, and tail-hair. *PLOS ONE* **14** (e0211743) DOI: 10.1371/journal.pone.0211743.
- Archie E, Moss C, Alberts S. 2003. Characterization of tetranucleotide microsatellite loci in the African Savannah Elephant (*Loxodonta africana africana*). *Molecular Ecology Notes* **3**:244-246.
- Asawakarn S, Teeranuwat I, Watcharaprapong N, Siriwatchaiporn N, Somsai P, Kuldee M, Suriyaphol G, Dhitavat S. 2018. Comparison of dried blood spot, buccal swab, cloacal swab and feces as DNA sources to identify avian sexes by PCR. *Thai Journal of Veterinary Medicine* **48**:325-330.
- Asociace chovatelů huculského koně. 2009. Šlechtitelský program huculského koně. Pardubice. Available from <http://www.hucul-achhk.cz/pdf/program.pdf> (accessed October 2019).
- Bahl MI, Bergström A, Licht TR. 2012. Freezing fecal samples prior to DNA extraction affects the Firmicutes to Bacteroidetes ratio determined by downstream quantitative PCR analysis. *FEMS Microbiology Letters* **329**:193-197.
- Beja-Pereira A, Oliveira R, Alves P, Schwartz M, Luikart G. 2009. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources* **9**:1279-1301.
- Bio-Rad Laboratories. 2000. Chelex®100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin: Instruction Manual. 2000. Hercules. Available from <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT200.pdf> (accessed November 2019).
- Bonelli F, Rota A, Aurich C, Ille N, Camillo F, Panzani D, Sgorbini M. 2019. Determination of Salivary Cortisol in Donkey Stallions. *Journal of Equine Veterinary Science* **77**:68-71.
- Bowling AT, Ruvinsky A. 2000. The genetics of the horse. CABI Pub., New York, N.Y.
- Brinkman T, Schwartz M, Person D, Pilgrim K, Hundertmark K. 2010. Effects of time and rainfall on PCR success using DNA extracted from deer fecal pellets. *Conservation Genetics* **11**:1547-1552.
- Brooks R, Williamson J, Hensley A, Butler E, Touchton G, Smith E. 2003. Buccal cells as a source of DNA for comparative animal genomic analysis. *Biotechnology Letters* **25**:451-454.
- Brown TA. 2016. Gene cloning and DNA analysis: an introduction. Seventh edition. Wiley Blackwell, Chichester.

Čapková Frydrychová R, Sýkorová M, Šíchová J, Brož V. 2013. EKOTECH: KURZ ZÁKLADNÍCH METOD MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE. Available from <https://docplayer.cz/10436559-Kurz-zakladnich-metod-molekularni-biologie.html> (accessed October 2019).

Deagle BE, Eveson JP, Jarman SN. 2006. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples – a case study on DNA in faeces. *Frontiers in Zoology* **3**:1-11.

Ensembl release 99. 2020. Horse assembly and gene annotation. European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute, Hinxton. Available from [http://www.ensembl.org/Equus\\_caballus/Info/Annotation](http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Annotation) (accessed February 2020).

Escobar T, Döwich G, Cantele L, Góss G, Porciúncula M, Leite C, Zuravski L, Duarte C, Lubeck I. 2020. Applications of polymerase chain reaction for the detection of equine *Leishmania* sp. infection. *Semina: Ciências Agrárias* **41**:199-212.

Felkel S et al. 2019. The horse Y chromosome as an informative marker for tracing sire lines. *Scientific Reports* **9**.

Flegr J. 2009. *Evoluční biologie 2., opr. a rozš. vyd.*. Academia, Praha.

Frantzen M, Silk J, Ferguson J, Wayne R, Kohn M. 2002. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology* **7**:1423-1428.

Garbieri T, Brozoski D, Dionísio T, Santos C, Neves L. 2017. Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3, 6 or 12 months using five different protocols. *Journal of Applied Oral Science* **25**:147-158.

Genomia. *Stručné instrukce k odběru koňských žíní*. 2008. Plzeň. Available from <https://www.genomia.cz/cz/pokyny/#zine> (accessed March 2020).

Goossens B, Waits LP, Taberlet P. 1998. Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. *Molecular Ecology* **7**:1237-1241.

Griffiths L, Chacon-Cortes D. 2014. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine* **2**:1-9.

Hart M, Meyer A, Johnson P, Ericsson A, Hofreiter M. 2015. Comparative Evaluation of DNA Extraction Methods from Feces of Multiple Host Species for Downstream Next-Generation Sequencing. *PLOS ONE* (e0143334) DOI: 10.1371/journal.pone.0143334.

Hartwell L, Goldberg M, Fisher J, Hood L. 2018. *Genetics: From Genes to Genomes*. Sixth edition. McGraw-Hill Education, New York.

Holl H, Vanhnasy J, Everts R, Hoefs-martin K, Cook D, Brooks S, Carpenter M, Bustamante C, Lafayette C. 2017. Single nucleotide polymorphisms for DNA typing in the domestic horse. *Animal Genetics* **48**:669-676.

- Hsing I, Xu Y, Zhao W. 2007. Micro- and Nano- Magnetic Particles for Applications in Biosensing. *Electroanalysis* **19**:755-768.
- Huang Q, Fu W. 2005. Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* **43**:841-842.
- Hučko V. 1996. Chov huculského koňa na Slovensku. Available from <http://www.hucul.net/knihy/HuckoHUCUL.htm> (accessed October 2019).
- Húska D, Baloun J, Trnková L, Adam V, Kizek R. 2008. Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA. *CHEMagazín* **XVIII**:14-15.
- Iannuzzi L, Meo GPD, Perucatti A, Incarnato D, Peretti V, Ciotola F, Barbieri V. 2014. An improved characterization of horse (*Equus caballus*, 2 n = 64) chromosomes by using replicating G and R banding patterns. *Caryologia* **56**:205-211.
- Innis M, Gelfand D, Sninski J, White T. 1990. PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California.
- Jacobsen S, Top Adler D, Bundgaard L, Sørensen M, Andersen P, Bendixen E. 2014. The use of liquid chromatography tandem mass spectrometry to detect proteins in saliva from horses with and without systemic inflammation. *The Veterinary Journal* **202**:483-488.
- Janabi A, Kerkhof L, McGuinness L, Biddle A, McKeever K. 2016. Comparison of a modified phenol/chloroform and commercial-kit methods for extracting DNA from horse fecal material. *Journal of Microbiological Methods* **129**:14-19.
- Jelínek J. 2016. Metodika uchování genetického zdroje zvířat: Huculský kůň. Available from <http://genetickezdroje.cz/wp-content/uploads/2019/11/Methodika-uchov%C3%A1n%C3%AD-GZ-Hucul.pdf> (accessed October 2019).
- Jeppson J, Laurell C, Franzén B. 1979. Agarose gel electrophoresis. *Clinical Chemistry* **25**:629-638.
- Kahl G. 2015. The dictionary of Genomics, Transcriptomics and Proteomics. Fifth edition. Wiley-VCH, Germany.
- Kalbfleisch T.S at al. 2018. EquCab3, an Updated Reference Genome for the Domestic Horse. DOI: 10.1101/306928.
- Karger B, Guttman A. 2009. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* **30**:196-202.
- Kebede F, Rosenbom S, Khalatbari L, Moehlman PD, Beja-Pereira A, Bekele A. 2014. Genetic diversity of the Ethiopian Grevy's zebra (*Equus grevyi*) populations that includes a unique population of the Alledghi Plain. *Mitochondrial DNA* **27**:397-400.
- Kidd JM et al. 2014. Exome capture from saliva produces high quality genomic and metagenomic data. *BMC Genomics* **15**:1-35.

- King S, Schoenecker K, Fike J, Oyler-McCance S. 2018. Long-term persistence of horse fecal DNA in the environment makes equids particularly good candidates for noninvasive sampling. *Ecology and Evolution* **8**:4053-4064.
- Kohn M, York E, Kamradt D, Haught G, Sauvajot R, Wayne R. 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings. Biological Sciences* **266**:657-663.
- Kolodziej K, Nikolov I, Schulz H, Theissinger K, Schulz R. 2013. Evaluation of Fecal Storage and DNA Extraction Methods in Wild Boar (*Sus scrofa*). *Biochemical Genetics* **51**:406-412.
- Komosa M, Purzyc H. 2009. Konik and Hucul horses: A comparative study of exterior measurements. *Journal of Animal Science* **87**:2245-2254.
- Kusza S, Priskin K, Ivankovic A, Jedrzejewska B, Podgorski T, Jávora A, Mihók S. 2013. Genetic characterization and population bottleneck in the Hucul horse based on microsatellite and mitochondrial data. *Biological Journal of the Linnean Society* **109**:54-65.
- Lanci A, Roden S, Bowman A, Lacasella E, Frey A, Dutton P. 2012. Evaluating Buccal and Cloacal Swabs for Ease of Collection and Use in Genetic Analyses of Marine Turtles. *Chelonian Conservation* **11**:144-148.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* (e3923) DOI:10.3791/3923.
- Leiský O. 1999. Původ a typ huculského koně. TIS - HUCUL CLUB, Praha.
- Liu G, Zang S, Li L, Hu X, Zhao S, Li K, Hu D. 2014. Evaluation of fecal DNA preservation and extraction methods in Przewalski's horse. *Conservation Genetics Resources* **6**:511-513.
- Lobo D, Godinho R, Álvares F, López-bao J, Rodríguez A. 2015. A New Method for Noninvasive Genetic Sampling of Saliva in Ecological Research. *PLOS ONE* **10**:1-21.
- Lonsinger RC, Gese EM, Dempsey SJ, Kluever BM, Johnson TR, Waits LP. 2015. Balancing sample accumulation and DNA degradation rates to optimize noninvasive genetic sampling of sympatric carnivores. *Molecular Ecology Resources* **15**:831-842.
- Looi M, Zakaria H, Osman J, Jamal R. 2012. Quantity and quality assessment of DNA extracted from saliva and blood. *Clinical Laboratory* **58**:307-312.
- Lorenz TC. 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments* (e3998) DOI: 10.3791/3998.
- Love Stowell S, Bentley E, Gagne R, Gustafson K, Rutledge L, Ernest H. 2018. Optimal DNA extractions from blood on preservation paper limits conservation genomic but not conservation genetic applications. *Journal for Nature Conservation* **46**:89-96.

- Lucchini V, Fabbri E, Marucco F, Ricci S, Boitani L, Randi E. 2002. Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Molecular Ecology* **11**:857-868.
- Matlock B. 2015. Assessment of Nucleic Acid Purity. Thermo Fisher Scientific, Wilmington, MA, USA. Available from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf> (accessed January 2020).
- Melzak K, Sherwood C, Turner R, Haynes C. 1996. Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* **181**:635-644.
- Metzler-Zebeli BU, Lawlor PG, Magowan E, Zebeli Q. 2016. Effect of Freezing Conditions on Fecal Bacterial Composition in Pigs. *Animals (2076-2615)* **6**:18-26.
- Mulcahy DG, Macdonald KS, Brady SG, Meyer C, Barker KB, Coddington J. 2016. Greater than X kb: a quantitative assessment of preservation conditions on genomic DNA quality, and a proposed standard for genome-quality DNA. *PeerJ* **4**. Available from <https://peerj.com/articles/2528> (accessed April 2020).
- Murray JD. 2002. Horse genomics and reproduction. *Theriogenology* **58**:281-293.
- Nargessi RD. 2005 MAGNETIC ISOLATION AND PURIFICATION OF NUCLEIC ACIDS. United States Patent and Trademark Office, USA. US 6855499 B1.
- Nichols R, Königsson H, Danell K, Spong G. 2012. Browsed twig environmental DNA: diagnostic PCR to identify ungulate species. *Molecular Ecology Resources* **12**:983-989.
- Ovchinnikov I, Dahms T, Herauf B, Mccann B, Juras R, Castaneda C, Cothran E. 2018. Genetic diversity and origin of the feral horses in Theodore Roosevelt National Park. *PLOS ONE* **13**:1-18.
- Panasci M, Ballard W, Breck S, Rodriguez D, Densmore L, Wester D, Baker R. 2011. Evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success. *The Journal of Wildlife Management* **75**:1616-1624.
- Phillips K, McCallum N, Welch L. 2012. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). *Forensic Science International: Genetics* **6**:282-285.
- Picazo MG, García-Olmo DC. 2015. DNA from tissues of young mice is optimal for genotyping. *Electronic Journal of Biotechnology* **18**:83-87.
- Piggott M. 2004. Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA. *Wildlife Research* **31**:485-493.
- Polski J, Kimzey S, Percival R, Grosso L. 1998. Rapid and effective processing of blood specimens for diagnostic PCR using filter paper and Chelex-100. *Molecular Pathology* **51**:215-217.



- Radvan J. 2000. Hucul a jeho zbarvení. *Ježdectví* **48**:16-17.
- Radvan J. 2001. Historie chovu huculského koně v českých zemích. *Ježdectví* **49**:52.
- Reddy PA, Bhavanishankar M, Bhagavatula J, Harika K, Mahla RS, Shivaji S. 2012. Improved Methods of Carnivore Faecal Sample Preservation, DNA Extraction and Quantification for Accurate Genotyping of Wild Tigers. *PLoS ONE* **7**:1-7.
- Renan S, Speyer E, Shahar N, Gueta T, Templeton A, Bar-David S. 2012. A factorial design experiment as a pilot study for noninvasive genetic sampling. *Molecular Ecology Resources* **12**:1040-1047.
- Roche Diagnostics. 2011. *Nucleic Acid Isolation and Purification*, 4th edition. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany. Available from <https://lifescience.roche.com/documents/Nucleic-Acid-Purification-and-Isolation-4th-edition.pdf> (accessed January 2020).
- Roon D, Waits L, Kendall K. 2003. A quantitative evaluation of two methods for preserving hair samples. *Molecular Ecology Notes* **3**:163-166.
- Ruml T, Rumlová M, Pačes V. 2002. *Genové inženýrství*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha.
- Sahib A, Mohammed B. 2017. A universal, rapid, and inexpensive method for genomic DNA isolation from the whole blood of mammals and birds. *Journal of Genetics* **96**:171-176.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santini A, Lucchini V, Fabbri E, Randi E. 2007. Ageing and environmental factors affect PCR success in wolf (*Canis lupus*) excremental DNA samples. *Molecular Ecology Notes* **7**:955-961.
- Santos E, Paula J, Motta P, Heinemann M, Leite R, Haddad J, Del Puerto H, Reis J. 2010. Methodology Comparison of three methods of DNA extraction from peripheral blood mononuclear cells and lung fragments of equines. *Genetics and Molecular Research* **9**:1591-1598.
- Sato T, Sato G, Shoji Y, Itou T, Sakai T. 2006. Extraction and detection of mRNA from horsehair. *Journal of Veterinary Medical Science* **68**:503-506.
- Senju N, Tozaki T, Kakoi H, Shinjo A, Matsuyama R, Almunia J, Takasu M. 2017. Genetic diversity of the Yonaguni horse based on polymorphisms in microsatellites and mitochondrial DNA. *Journal of Veterinary Medical Science* **79**:425-431.
- Seutin G, White B, Boag P. 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* **69**:82-90.
- Shaw K, Thain L, Docker P, Dyer C, Greenman J, Greenway G, Haswell S. 2009. The use of carrier RNA to enhance DNA extraction from microfluidic-based silica monoliths. *Analytica Chimica Acta* **652**:231-233.

- Schmidt A, Möstl E, Wehnert C, Aurich J, Müller J, Aurich C. 2010. Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport. *Hormones and Behavior* **57**:209-215.
- Sirdah M. 2014. Superparamagnetic-bead Based Method: An Effective DNA Extraction from Dried Blood Spots (DBS) for Diagnostic PCR. *Journal of Clinical* **8**:1-4.
- Snustad D, Simmons M, Relichová J. 2017. *Genetika*. Druhé, aktualizované vydání. Masarykova univerzita, Brno.
- Sundqvist A, Ellegren H, Vilà C. 2008. Wolf or dog? Genetic identification of predators from saliva collected around bite wounds on prey. *Conservation Genetics* **9**:1275-1279.
- Taberlet P, Luikart G. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**:41-55.
- Tan S, Yiap B. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2009**:1-10.
- Vostrá Vydrová H, Vostrý L, Hofmanová B, Veselá Z, Schmidová J, Majzlík I. 2015. Population studies of Czech Hucul horses. *Poljoprivreda/Agriculture* **21**:41-43.
- Wade C et al. 2009. Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse. *Science* **326**:865-867.
- Walsh P, Metzger D, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques* **10**:506-513.
- Wellbrock A, Bauch C, Rozman J, Witte K. 2012. Buccal swabs as a reliable source of DNA for sexing young and adult Common Swifts (*Apus apus*). *Journal of Ornithology* **153**:991-994.
- Wilfinger W, Mackey K, Chomczynski P. 1997. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques* **22**:474-481.
- Ząbek T, Radko A, Słota E. 2005. Implications for the use of horse hair roots as a DNA source for microsatellite typing. *Czech Journal of Animal Science* **50**:499-502.
- Zhang M et al. 2019. Fecal DNA isolation and degradation in clam *Cyclina sinensis*: noninvasive DNA isolation for conservation and genetic assessment. *BMC Biotechnology* **19**.
- Zhou J, Bruns M, Tiedje J. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and environmental microbiology* **62**:316-322.
- Zhou Z, Kadam U, Irudayaraj J. 2013. One-stop genomic DNA extraction by salicylic acid-coated magnetic nanoparticles. *Analytical Biochemistry* **442**:249-252.
- Zhu Y, Liu H-Y, Yang H-Q, Li Y-D, Zhang H-M. 2017. Factors affecting genotyping success in giant panda fecal samples. *PeerJ* (e3358) DOI 10.7717/peerj.3358.

Zpravodaj HUCUL. 2019. Asociace chovatelů huculských koní, Pardubice. Available from [https://www.cmsch.cz/getmedia/0c4201f1-96b1-4b13-b8ed783d61441015/hucul\\_2018.aspx?disposition=attachment](https://www.cmsch.cz/getmedia/0c4201f1-96b1-4b13-b8ed783d61441015/hucul_2018.aspx?disposition=attachment) (accessed March 2020).

Zumbo P. 2012. Phenol-chloroform Extraction. WEILL CORNELL MEDICAL COLLEGE, Laboratory of Christopher E. Mason, Ph.D.. Available from [https://www.academia.edu/9587465/WEILL\\_CORNELL\\_MEDICAL\\_COLLEGE\\_Phenol-chloroform\\_Extraction](https://www.academia.edu/9587465/WEILL_CORNELL_MEDICAL_COLLEGE_Phenol-chloroform_Extraction) (accessed December 2019).

## 9. Seznam zkratek

bp	base pairs, počet párů bází v molekule nukleové kyseliny
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FAO	Food and Agriculture Organization
Gpb	gigabase pair, miliarda párů bází
HIF	Hucul International Federation
LINEs	long interspersed nuclear elements, dlouhé rozptýlené jaderné elementy
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
SINEs	short interspersed nuclear elements, krátké rozptýlené jaderné elementy
SNPs	single nucleotide polymorphisms, jednonukleotidové polymorfismy
STRs	short tandem repeats, sekvence repetitivní DNA, mikrosatelit
Tris/EDTA	tris(hydroxymethyl)aminometan/kyselina ethylendiamintetraoctová

## 10. Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: klisna Nadia Goral 71/786 .....	11
Obrázek 2: Porovnání karyotypu klisny (♀) a hřebce (♂).....	13
Obrázek 3: Elektroforeogram – žíně.....	36
Obrázek 4: Elektroforeogram – stěry bukální sliznice .....	38
Obrázek 5: Elektroforeogram – exkrementy čerstvé .....	39
Obrázek 6: Elektroforeogram – exkrementy zmražené .....	40
Tabulka 1: Přehled výsledků t-testu – koncentrace DNA z žíní.....	37
Tabulka 2: Přehled výsledků t-testu – koncentrace DNA ze stěrů bukální sliznice .....	38
Tabulka 3: Přehled výsledků t-testu – koncentrace DNA z čerstvých exkrementů.....	39
Tabulka 4: Přehled výsledků t-testu – koncentrace DNA ze zmražených exkrementů.....	41
Tabulka 5: Přehled výsledků t-testu – porovnání čerstvých a zmražených exkrementů (1. měření).....	41
Tabulka 6: Přehled výsledků t-testu – porovnání čerstvých a zmražených exkrementů (2. měření).....	41
Tabulka 7: Přehled výsledků analýzy rozptylu.....	42
Tabulka 8: Tukeyův HSD test .....	42

# Přílohy

Příloha 1: Tabulka naměřených hodnot koncentrací DNA a poměru absorbancí A260/280 všech vzorků

č.	koncentrace [ng/μl] čerstvé exkrementy 1. měření	poměr absorbancí A260/280 čerstvé exkrementy 1. měření	koncentrace [ng/μl] čerstvé exkrementy 2. měření	poměr absorbancí A260/280 čerstvé exkrementy 2. měření	koncentrace [ng/μl] zmražené exkrementy 1. měření	poměr absorbancí A260/280 zmražené exkrementy 1. měření	koncentrace [ng/μl] zmražené exkrementy 2. měření	poměr absorbancí A260/280 zmražené exkrementy 2. měření	koncentrace [ng/μl] žíně 1. měření	poměr absorbancí A260/280 žíně 1. měření	koncentrace [ng/μl] žíně 2. měření	poměr absorbancí A260/280 žíně 2. měření	koncentrace [ng/μl] stěry bukalní sliznice 1. měření	poměr absorbancí A260/280 stěry bukalní sliznice 1. měření	koncentrace [ng/μl] stěry bukalní sliznice 2. měření	poměr absorbancí A260/280 stěry bukalní sliznice 2. měření
1	25,5	1,759	28	1,806	23,5	1,741	19,5	1,857	9,5	1,9	10	1,818	19,5	1,95	23,5	1,808
2	13,5	1,929	13,5	1,929	14	1,867	15,5	1,824	26,5	1,893	25,5	1,962	9,5	1,9	10	1,818
3	19,5	1,95	17,5	1,944	36	1,674	41,5	1,844	51,5	1,943	52,5	1,909	16	1,778	18	1,8
4	20,5	1,864	22	1,76	33,5	1,861	50	1,818	33,5	1,914	35	2	22	2,095	27	2
5	23,5	1,808	25,5	1,821	52	1,763	25	1,852	15,5	1,938	17	2	13,5	1,929	16	1,882
6	50	1,852	57,5	1,855	34	2	35,5	2,088	130	1,992	131	1,985	8,5	2,125	12	1,714
7	19	1,727	19,5	1,773	21,5	1,72	46	1,84	10,5	1,909	9,5	2,111	7	1,75	9	2
8	29	1,812	26	1,793	32	1,939	31,5	1,909	27	1,929	25,5	1,889	11,5	2,3	13,5	1,929
9	26	2,08	27,5	1,964	30	2,143	32	2	29	1,871	33	1,886	22	1,833	15,5	1,722
10	15,5	2,214	19,5	2,053	31	1,938	43,5	1,977	127	1,992	118	1,992	31,5	1,853	33	1,941
11	16,5	2,357	21	2	21,5	2,048	26	2,08	91,5	2,011	93,5	1,968	41	1,745	38	1,727
12	16	2,286	17	2,267	29,5	2,107	32,5	2,031	289	1,993	286	2,004	23	1,917	23	1,917
13	13,5	2,077	11	2	18	2	48	2	30,5	1,848	33	1,886	172	2,042	160	2,078
14	33,5	2,03	28,5	2,111	27,5	2,037	28	2,074	46	2	48	1,959	21,5	1,87	23,5	1,88
15	17	2,125	19	2,111	25	1,923	23	2	19,5	1,95	24	1,846	48,5	1,902	50,5	1,887
16	23,5	1,958	23	2,091	31	1,938	34	2,061	41	2,05	42	2	23	2	26,5	1,828
17	21,5	2,263	20	2	32,5	1,912	45,5	1,936	107	2,019	113	1,991	30,5	1,794	32,5	1,711
18	19	2,533	20	2,105	28,5	2,036	45,5	2,116	32	1,939	32	2,065	45,5	1,82	45,5	1,857
19	22,5	2,25	23	2,091	34	2,061	49,5	1,98	78	2	77	2	41,5	1,93	43,5	1,977
20	20,5	2,158	19	2	23	1,917	29,5	1,967	79	1,951	80	1,951	9	1,8	9	1,8

Příloha 2: Seznam huculských koní využitých pro experimenty v této práci

č. vzorku	jméno	místo ustájení
1	Anina	Toulcův dvůr
2	Bajka	Toulcův dvůr
3	Bosorka	Toulcův dvůr
4	Důvěra	Toulcův dvůr
5	Paoma	Toulcův dvůr
6	Pohoda	Toulcův dvůr
7	Sára	Toulcův dvůr
8	Tosca	Toulcův dvůr
9	Apolenka	Janova Hora
10	Ornela	Janova Hora
11	Irma	Janova Hora
12	Divizna	Janova Hora
13	Cikorka	Janova Hora
14	Lyríka	Janova Hora
15	Elsa	Janova Hora
16	Nora	Janova Hora
17	Barunka	Janova Hora
18	Šantalka	Janova Hora
19	Duběnka	Janova Hora
20	Jeřabina	Janova Hora

Příloha 3: Fotodokumentace některých koní použitých pro experimenty  
(kůň č. 4 – Důvěra, kůň č. 8 – Tosca)

