

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE



Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra genetiky a šlechtění

**Optimalizace izolace DNA z buněk bukální sliznice u psa
(*Canis lupus familiaris* L.)**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl
Autor práce: Alžběta Lacinová

2012

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Optimalizace izolace DNA z buněk bukální sliznice u psa (*Canis lupus familiaris* L.)“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne:

Alžběta Lacinová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi, za odborné vedení mé bakalářské práce a poskytnuté rady. Můj velký dík patří také Ing. Jakubu Vaškovi, Ph.D. a Ing. Daniele Čílové za pomoc, cenné rady a připomínky a také za jejich trpělivost, hlavně při provádění laboratorních výzkumů. Dále děkuji své kolegyni Janě Ždímalové za její spolupráci a pomoc při praktické části bakalářské práce.

Řešení bakalářské práce bylo podpořeno grantovým projektem FRVŠ MŠMT „2730 Aa - Modernizace laboratoře genetických analýz technikami založenými na principu kapilární elektroforézy“ a výzkumným záměrem „MSM6046070901 - Setrvalé zemědělství, kvalita zemědělské produkce, krajinné a přírodní zdroje“.

SOUHRN

Studium molekulární genetiky psů je v současnosti na vysoké úrovni a zájem o ni ze strany genetických laboratoří i samotných chovatelů stále stoupá. Pes jako modelový organismus je pro genetické studie vhodný zejména díky své obrovské fenotypové rozmanitosti a rovněž se studium psího genomu využívá i pro potřeby humánní medicíny, protože pes trpí obdobnými dědičnými chorobami jako lidé. Ke kvalitní genetické analýze patří nejen správně provedený odběr biologického materiálu testovaného jedince, ale i transport vzorků do laboratoře a jejich způsob skladování, které mohou výsledky analýzy významně ovlivnit.

Ve své práci jsem se zaměřila na problematiku optimalizace těchto prvotních kroků, které vedou k získání kvalitní nekontaminované genomické DNA. V teoretické části uvádím literární přehled aktuálních výzkumů psího genomu a problematiku odběru buněk bukálních sliznic u psů i u lidí. V praktické části popisují vlastní výzkum optimalizace procesu izolace DNA.

Tato práce je zaměřena na vyhodnocení možných vlivů na kvalitu a kvantitu izolované DNA. Na výtěžnost DNA má statisticky významný vliv ($\alpha = 0,05$) hodnocené plemeno psa. Prokázalo se, že u velkých a obřích plemen se odebere větší množství buněk bukálních sliznic než například u toy plemen, a tím i množství získané DNA se výrazně vyšší.

Byl rovněž proveden experiment, kdy se zkoumal vliv opakovaného odběru buněk bukální sliznice na množství DNA, a prokázalo se, že množství DNA se sice po opakovaných odběrech snižuje, ale stále je možné vyizolovat dostatek kvalitní DNA i po 14. odběru jednoho jedince během jednoho dne.

Vliv kontaminace cytologických kartáčků zbytky potravy nebyl prokázán jako statisticky významný ($\alpha = 0,05$), přesto bych ale chovatelům psů, případným zájemcům o genetické analýzy, doporučila vzorky buněk bukálních sliznic odebírat z relativně čisté psí tlamy, protože tyto výsledky se vztahují pouze na tři konkrétní mikrosatelitní markery (FH2004, FH3210 a FH3241), nejsou tedy celkově zobecněny.

Rovněž byl testován vliv způsobu a doby skladování na parametry kvality a kvantity DNA. Bylo prokázáno, že skladování nevysušených cytologických kartáčků, obsahujících buňky bukální sliznice, má za následek degradaci DNA a zvýšený růst bakterií a mikroorganismů ve vzorku.

Klíčová slova: *Canis lupus familiaris* L., pes domácí, bukální sliznice, izolace DNA, kvalita a kvantita DNA, kontaminace, PCR

SUMMARY

Molecular genetic studies are currently at the high level and genetic laboratories and also dog owners and breeders are more and more interested in these analyses. Domestic dog is often used as a model organism for genetic studies (veterinary even in human medicine) especially because of its phenotype diversity and sharing some of inherited diseases with humans. It is very important to have good quality samples of biological material without contamination because they will be used for genetic analysis. To minimize contamination and degradation of DNA it is crucial to do good sampling, transport samples to the laboratory and keep them in suitable conditions.

In this work, I concentrate on these first steps of the optimization process of DNA isolation. The first part of this bachelor thesis contains literary summary of recent researches studying canine genome and it also contains the description of different methods and techniques of collecting buccal cells from dogs and humans. In the second part, I introduce my own research.

The research considers possible influences on quality and quantity of isolated DNA. Samples were taken noninvasively from buccal swabs by the use of cytobrushes. It shows that the influence of dog's breed is statistically significant ($\alpha = 0,05$). Giant breeds have larger buccal mucosa than toy breeds so the total amount of DNA is bigger as well.

The thesis is focused on the effect of repeated sampling as well. The model study includes sampling from the same dog individual fourteen times a day. The total amount of isolated DNA is lower; however, it still can be used for genetic analysis.

The effect of contamination of different kinds of organic components of dogs' food is not statistically significant ($\alpha = 0,05$); however, I would still recommend to dog owners who send samples to the laboratory that they should be aware of contamination when collecting samples. My study has only limited validity because it only refers to three microsatellite markers (FH2004, FH3210 and FH3241).

This work also includes a model study of whether there is a statistically significant influence of temperature and preservation time on the quality a quantity of isolated DNA. I demonstrate that moist cytobrushes are not good for follow-up DNA isolation because of potential bacteria growth and defragmentation of DNA.

Key words: *Canis lupus familiaris* L., domestic dog, buccal cells, DNA isolation, quality and quantity of DNA, contamination, PCR

Obsah

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | ÚVOD | 1 |
| 2. | VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE | 2 |
| 2.1 | Vědecké hypotézy | 2 |
| 2.2 | Cíle práce | 3 |
| 3. | LITERÁRNÍ REŠERŠE | 5 |
| 3.1 | Domestikace, význam psa a jeho taxonomické zařazení | 5 |
| 3.2 | Charakteristika a rozdělení plemen psů | 7 |
| 3.2.1 | Rozdělení plemen podle FCI | 8 |
| 3.2.2. | Zařazení plemen do velikostních kategorií..... | 8 |
| 3.2.3. | Charakteristika jednotlivých plemen testovaných v bakalářské práci..... | 9 |
| 3.3 | Genom psa..... | 10 |
| 3.4 | Veterinární molekulární laboratoře a jejich nabídky analýz | 12 |
| 3.4.1 | Laboratoře v České republice | 12 |
| 3.4.2 | Laboratoře v zahraničí | 13 |
| 3.5 | Metody izolace DNA | 15 |
| 3.5.1 | Fenol – chloroformová extrakce..... | 15 |
| 3.5.2 | Metody založené na navázání DNA na silikátovou kolonku | 16 |
| 3.6 | Buňky bukálních sliznic jako biologický materiál určený k extrakci DNA | 16 |
| 3.6.1 | Metody odběru bukálních sliznic | 16 |
| 3.6.2 | Posuzování kvality a kvantity izolované DNA pomocí UV-spektrofotometrické metody | 20 |
| 3.7 | Analýzy polymorfismů DNA | 21 |
| 3.7.1 | Polymerázová řetězová reakce (PCR) | 22 |
| 3.7.2 | Mikrosatelitní markery | 22 |
| 3.7.3 | Detekce polymorfismů nukleových kyselin | 23 |
| 4. | MATERIÁL A METODY | 25 |
| 4.1 | Plemena použitá pro pokusy v bakalářské práci | 25 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.2 | Provedení stěrů bukálních buněk | 25 |
| 4.3 | Izolace genomické DNA psa z odebraných buněk bukálních sliznic | 27 |
| 4.4 | Posouzení kvality a kvantity izolované DNA z buněk bukálních sliznic | 28 |
| 4.4.1 | Posouzení vysokolomekularity extrahované DNA..... | 28 |
| 4.4.2 | Stanovení výtěžnosti genomické DNA psů izolované z jednoho cytologického kartáčku | 29 |
| 4.4.3 | Vyhodnocení čistoty DNA psů izolované z bukálních buněk..... | 31 |
| 4.5 | Hodnocené mikrosatelitní lokusy na autozomech psů | 31 |
| 4.5.1 | Hodnocené mikrosatelitní lokusy | 31 |
| 4.5.2 | Komponenty reakčních směsí pro amplifikaci jednotlivých mikrosatelitních lokusů | 32 |
| 4.5.3 | Teplotní a časové podmínky amplifikace jednotlivých mikrosatelitních lokusů | 34 |
| 4.5.4 | Příprava amplifikovaných vzorků na separaci v kapilární elektroforéze | 35 |
| 4.5.5 | Kapilární elektroforéza amplifikovaných mikrosatelitních lokusů | 36 |
| 4.6 | Vliv plemene na množství a kvalitu izolované DNA z buněk bukálních sliznic | 37 |
| 4.6.1 | Hodnocená plemena a struktura experimentu | 37 |
| 4.6.2 | Izolace DNA z buněk bukálních sliznic různých plemen psů..... | 38 |
| 4.6.3 | Statistické vyhodnocení vlivu plemene a pohlaví zvířete na výtěžnost DNA a na parametry její čistoty..... | 38 |
| 4.7 | Vliv opakovaného odběru buněk bukální sliznice jednoho psa na výtěžnost a kvalitu izolované DNA..... | 38 |
| 4.7.1 | Hodnocené plemeno a přehled časových intervalů odběru buněk | 38 |
| 4.7.2 | Izolace DNA z opakovaně odebíraných vzorků bukálních buněk jednoho psa .. | 39 |
| 4.7.3 | Statistické vyhodnocení závislosti výtěžnosti a kvality DNA na pořadí opakovaného odběru buněk bukálních sliznic..... | 39 |
| 4.8 | Vliv doby a teploty skladování cytologických kartáčků s odebranými buňkami na kvalitu a kvantitu izolované DNA | 39 |
| 4.8.1 | Volba modelového plemene, sušení vzorku a rozdílné doby skladování biologického materiálu | 39 |
| 4.8.2 | Izolace DNA z různým způsobem skladovaných cytologických kartáčků s odebranými bukálními buňkami | 40 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.8.3 | Statistické vyhodnocení vlivu různého způsobu skladování biologického materiálu na výtěžnost a kvalitu izolované DNA..... | 40 |
| 4.9 | Simulace kontaminace cytologických kartáčků různými organickými látkami..... | 41 |
| 4.9.1 | Výběr modelového plemene a organických kontaminujících látek..... | 41 |
| 4.9.2 | Izolace DNA z bukálních buněk psa záměrně kontaminovaných různými organickými látkami..... | 42 |
| 4.9.3 | Statistické vyhodnocení vlivu kontaminujících organických látek na kvalitu a kvantitu izolované DNA z bukálních buněk..... | 42 |
| 4.9.4 | Ověření vlivu kontaminujících organických látek na vhodnost DNA pro molekulární analýzy pracující na principu PCR..... | 43 |
| 5. | VÝSLEDKY | 44 |
| 5.1 | Vliv velikosti plemene na provádění odběru buněk bukálních sliznic..... | 44 |
| 5.2 | Vyhodnocení vlivu opakovaného odběru buněk bukálních sliznic na kvantitu a kvalitu izolované DNA..... | 48 |
| 5.3 | Výsledky vyhodnocení vlivu různého způsobu skladování cytologických kartáčků s odebranými buňkami | 51 |
| 5.4 | Výsledky hodnocení vlivu organických kontaminujících látek na kvantitu a kvalitu izolované DNA..... | 55 |
| 6. | DISKUZE..... | 66 |
| 6.1 | Vliv plemenné příslušnosti na parametry kvantity a kvality izolované DNA..... | 66 |
| 6.2 | Vliv opakovaného odběru buněk bukálních sliznic cytologickým kartáčkem na množství a kvalitu extrahované DNA | 68 |
| 6.3 | Vliv podmínek a doby skladování cytologických kartáčků s odebranými buňkami na množství a kvalitu extrahované DNA..... | 69 |
| 6.4 | Vliv přítomnosti kontaminujících organických látek na parametry extrahované DNA a na specifickou detekci alel mikrosatelitních lokusů | 71 |
| 7. | ZÁVĚR | 74 |
| 8. | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 77 |

| | | |
|-----|-------------------------------|----|
| 9. | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK..... | 85 |
| 10. | PŘÍLOHY | 86 |

Seznam příloh

Příloha 1: Fotodokumentace některých psů použitých pro experimenty

Příloha 2: Pufry a roztoky použité při gelové elektroforéze

1. ÚVOD

Pes domácí je jedním z nejčastěji chovaných domácích zvířat po celém světě. Není to už jen pomocník při lovu, ochránce a hlídač, ale také nenahraditelný společník lidí, jejich přítel a člen rodiny.

Po mnohaletém soužití s lidmi se pes adaptoval na jejich způsob života a to nejen v pozitivním smyslu, ale přejal bohužel i některé civilizační a dědičné choroby, které jsou jim nyní společné. Proto se genetické laboratoře často zabývají výzkumem psího genomu a detekcí jednotlivých genů, které jsou odpovědné za určité projevy sledovaného znaku.

Proto, že psi hrají tak důležitou roli jako společníci lidí a jejich domácí mazlíčci, je dnes vyšlechtěno přes 400 různých plemen, které se od sebe liší nejen chováním a povahovými vlastnostmi, ale i vzhledem, například velikostí, silou kostry, barvou a typem srsti. Tyto fenotypové projevy jsou důležitým plemenným znakem, který je potřeba udržovat. Je tedy nutné znát jeho genetickou podstatu.

DNA se pro tyto výzkumné účely může izolovat z krve, chlupových cibulek nebo z buněk bukální sliznice. Metodu izolace z bukálních sliznic jsem zvolila i pro svoji bakalářskou práci. Popisuji zde průběh celého experimentu, od volby vhodných plemen, přes metodu odběru vzorků a izolaci DNA, až po vyhodnocení kvality a kvantity DNA z čistých i kontaminovaných vzorků. Při odběru buněk bukálních sliznic se totiž často stává, že DNA je kontaminovaná zbytky potravy, proto jsem se snažila zjistit, zda má tato kontaminace a způsob skladování vzorků nějaký vliv na následné analýzy izolované DNA.

2. VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

2.1 Vědecké hypotézy

Na začátku řešení bakalářské práce jsem si vytyčila následující vědecké hypotézy, které vycházejí ze studia vědecké literatury zaměřené na molekulární na analýzy psiho genomu:

1. Buňky bukálních sliznic jsou jaderné somatické buňky a obsahují tudíž molekuly DNA. Sterilní cytologický kartáček umožňuje tyto buňky odebrat a zachytit na svém povrchu.
2. Všechny molekulární analýzy psiho genomu vyžadují v počátečních etapách získání biologického materiálu, ze kterého je možné extrahovat DNA. Z praktického hlediska jsou mnohem výhodnější neinvazivní metody odběru vzorků, které nemusí provádět veterinární lékař a které zvířeti nezpůsobují bolest ani velké stresové zatížení.
3. Plemenná příslušnost může ovlivnit množství buněk zachycených na cytologickém kartáčku. Lze tedy předpokládat, že z většího množství zachycených buněk je následně vyizolováno i větší množství DNA. Vliv plemenné příslušnosti nemusí vycházet pouze ze snazšího odběru bukálních buněk u psů s větší tlamou a větší plochou pysků, ale může být zapříčiněn i povahovými vlastnostmi psů a jejich schopnostmi akceptovat důkladný odběr bukálních buněk cytologickým kartáčkem.
4. Při opakovaném odběru buněk bukálních sliznic cytologickým kartáčkem u jednoho a téhož psa lze předpokládat, že se stoupajícím počtem odběrů může docházet ke snižování počtu buněk zachycených na kartáčku. Lze proto i předpokládat, že výtěžnost DNA při opakovaných odběrech může klesat.
5. Enzymy nukleázy mohou výrazně poškozovat a degradovat molekuly DNA na principu štěpení fosfodiesterových vazeb, které spojují jednotlivé nukleotidy. Účinek nukleáz je z hlediska následných molekulárních analýz zcela nežádoucí, ale během odběru, transportu a skladování biologických vzorků je možné vytvořit takové podmínky, které budou aktivitu nukleáz eliminovat. Současně lze simulovat takovou situaci, která bude odpovídat transportu nevhodně připravených vzorků, kdy naopak nukleázy mohou být vysoce aktivní.
6. Nukleázy způsobují fragmentaci vysokomolekulární DNA a jejich účinek je možný vyhodnotit na základě testovací elektroforézy extrahované DNA.

7. Existují UV-spektrofotometrické metody, které je možné úspěšně aplikovat při odhadu koncentrace extrahované DNA a při posouzení kontaminací izolované DNA různými organickými látkami i anorganickými solemi.
8. Při odběru bukálních sliznic z tlamy psa nelze nikdy vyloučit přítomnost kontaminujících látek, které mohou teoreticky obsahovat molekuly cizorodé DNA. Tuto situaci lze experimentálně simulovat přidávkem typických komponentů psí potravy k vzorkům bukálních sliznic. Lze předpokládat, že organické kontaminanty mohou způsobovat kontaminace nejen na úrovni DNA, ale i na úrovni proteinů.
9. Kontaminaci cizorodou DNA lze detekovat na základě PCR amplifikačního testu, ale pouze za podmínek, kdy použitá dvojice primerů bude vykazovat komplementaritu nejen k analyzované DNA psa, ale i ke kontaminující DNA. O většině mikrosatelitních markerů lze předpokládat, že jsou vysoce specifické a při amplifikaci se jejich primery nebudou schopny navazovat na cizorodou templátovou DNA jiného původu než psího.

2.2 Cíle práce

Během řešení bakalářské práce jsem si stanovila cíle, pomocí kterých se pokusím přijmout nebo vyvrátit výše popsané hypotézy. K základním cílům práce patří:

1. Zpracovat literární rešerši zaměřenou na aktuální výsledky molekulárního výzkumu psů a na problematiku extrakce DNA z buněk bukálních sliznic.
2. Vybrat vhodnou skupinu plemen, lišící se svou velikostí a u testovaných jedinců se naučit reprodukovatelně izolovat genomickou DNA s využitím komerčně vyráběného kitu.
3. Samostatně zvládnout techniky hodnocení kvality a kvantity DNA, které jsou založeny na UV-spektrofotometrických analýzách a gelové elektroforéze.
4. Statisticky vyhodnotit vliv plemene na výtěžnost DNA a na poměry absorbancí A260/A280 a A260/A230.
5. Připravit experiment, který bude zacílený na vliv opakovaného odběru buněk bukálních sliznic jednoho psa na parametry kvantity a kvality izolované DNA. Získaná data vyhodnotit na základě regresní a korelační analýzy.
6. Navrhnout experiment, který bude simulovat podmínky při transportu neodborně připravených vzorků cytologických kartáčků do genetické laboratoře. U tohoto

experimentu se zaměřit rovněž na statistické vyhodnocení vlivu podmínek a doby skladování na kvalitu a kvantitu izolované DNA.

7. Experimentálně ověřit, zda přítomnost kontaminujících organických látek v odebraném vzorku bukálních sliznic má vliv na množství a kvalitu extrahované DNA. Teoreticky možný inhibiční efekt kontaminujících látek na funkci termostabilní DNA polymerázy ověřit na základě PCR amplifikace tří autozomálních mikrosatelitních lokusů.

3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 Domestikace, význam psa a jeho taxonomické zařazení

Názory na původ a místo domestikace psa se rozcházejí, ale to, že psi hrají velmi důležitou roli v lidském životě je dnes už samozřejmostí snad pro každého.

Domestikace je proces, kterým se zvířata držená člověkem v zajetí postupem času adaptují, jak na něj, tak i na jeho způsob života. Domestikace s sebou nese ale mnohé fenotypové změny, takže se zvíře bude lišit od svých divokých předků (Price, 1984).

Francis Galton (1865) formuloval ve své studii šest základních podmínek, které musí zvířata splnit, aby bylo vůbec možné je domestikovat:

1. odolnost – zvíře musí být schopno přežít v novém prostředí a brzy se mu přizpůsobit
2. přichylnost k člověku – zvíře se musí podvolit lidské vůli a nechat se sebou manipulovat, i přesto, že člověk z něj chce mít užitek ve formě tvrdé práce a často ho v období, kdy ho nepotřebuje, zanedbává
3. touha po pohodlí – jakmile zvíře zjistí, že prostředí vytvořené člověkem je pro jeho přežití výhodnější než volná příroda, bude se v zajetí chovat klidněji a lépe si zvykne
4. užitečnost pro člověka – je to jedna z hlavních podmínek, bez které by člověk ani nepotřeboval zvíře ochočovat
5. snadné rozmnožování – také jedna z hlavních podmínek, která, pokud je splněna, urychluje proces domestikace. Zvířata se musí snadno rozmnožovat i v zajetí, kde jsou pro ně, oproti volnému životu, ztížené podmínky.
6. snadná ochočitelnost – zvíře se musí nechat člověkem snadno ovládat, a to i v případě velkého stáda

Pokud pes tehdy tyto podmínky splnil, mohl začít proces domestikace. Coppinger R. a Coppinger L. (2001) formulovali čtyři kroky možného způsobu domestikace psa:

- lidé vytvořili novou obydlenu niku
- někteří vlci se v ní více pohybovali kvůli lepšímu přístupu k potravě
- tito vlci byli více tolerantní vůči lidské přítomnosti
- někteří takoví vlci měli existenciální výhody oproti divokým vlkům

Poslední genetické studie dokazují, že jediným předkem psa domácího (*Canis lupus familiaris*) je pouze vlk (*Canis lupus*), ne šakal nebo kojot (Vilà et al., 1997). Lindblad-Toh et al. (2005) popsali kompletní sekvenci psiho genomu, kde mimo jiné zjistili, že pes a vlk šedý jsou nejbližší příbuzní, jejich genom se liší pouze v 0,04 % až 0,21 % genetické informace. Další tři druhy, které jsou se psem blíže příbuzní a v divočině se s ním mohou pářit, jsou kojot, šakal zlatý a vlk etiopský.

Stále ale není přesně určeno období, kdy byl pes domestikován. Provádí se analýzy mitochondriální DNA (mtDNA) (Vilà et al., 1997) a protože mitochondriální genom se dědí pouze po matce, analýzy tak umožňují odlišný pohled na evoluční historii psových. Vilà et al. (1997) analyzovali kontrolní sekvence mtDNA u 147 psů a 162 vlků z 27 míst světa. Ukázalo se, že tento druh vznikl nejspíš v období před 40 000 až 135 000 let. Psi tedy mohou být mnohem starší, než se předpokládalo podle archeologických nálezů, ale nebyly fenotypově odlišné od svých vlčích předků (Vilà et al., 1997).

Savolainen et al. (2002) provedli studii na mitochondriální DNA 654 psů z celého světa. Největší genetická variabilita byla prokázána u psů z východní Asie, z čehož dospěli k názoru, že pes domácí vznikl z vlka právě v této oblasti asi před 15 000 lety.

Archeologické nálezy také podporují tuto domněnku. Nejstarší nález psí kostry pochází z Bonn – Oberkasselu v Německu z období před 14 000 lety. Byla zde nalezena spodní čelist psa, která se jako jediná z celé psí kostry zachovala ve společném hrobě dvou lidí, padesátiletého muže a dvaceti až pětadvacetileté ženy (Nobis, 1979). Dalším významným archeologickým nálezem byla kostra štěněte pohřbená společně s mužem. Stáří těchto kostí bylo odhadnuto na 12 000 let (Davis et Valla, 1978). Lidé už v této době museli mít ke psům nějaký vztah, pokud byli ochotní pohřbit ho společně se svými blízkými do hrobu. Zpočátku ale pes znamenal pravděpodobně relativně snadný zdroj potravy. Vlci, kteří se přibližovali k lidským obydlím, kde taktéž hledali potravu, nebyli tak plaší a proto je lidé mohli snadněji ulovit. Morey (1990) se domnívá, že lidé i psi jsou sociální druhy, které loví víceméně stejnou kořist, proto se vlci mohli naučit přizpůsobit se na zbytcích kořisti po lidech. Lidé se také mohli naučit stejné taktice.

Také mohli začít využívat psy k lovu, jakmile kořist skolili, lidé je od ní odehnali, najedli se a zbytky přenechali psům. Obě strany měli z takového soužití benefit. Psi se rozlišovali na ty, kteří lovili podle pachové stopy, a ty, kteří vyhledali kořist pouze zrakem. Lidé oceňovali nejen jejich schopnost lovit, ale naučili se využívat i psí produkty, psí kůže a kosti jako nástroje nebo do nich vyřezávali ornamenty (Morey, 2010).

Jakmile se lidská společnost naučila psy akceptovat jako pomocníky a společníky, začala záměrná selekce a v dnešní době už známe více než 400 plemen psů. Většina z nich byla šlechtěna na rozdílný fenotyp a typické vlastnosti (van Asch et al., 2009). Dnes už mnoho lidí zapomíná na původní poslání daného plemene a z dříve ostrých loveckých psů se snaží dělat domácí mazlíčky. To se ovšem netýká pouze loveckých psů, na druhou stranu je ale role psa jako společníka v této době obrovská. Mnoho psů se uplatňuje i při léčení lidí a zlepšování jejich zdravotního i psychického stavu při nejrůznější canisrehabilitacích. Služební plemena se stále více využívají v armádě a u policie. I nabídka psích sportů je dnes opravdu bohatá, se psem můžeme chodit na agility, flyball, soutěžit v dog frisbee či v obedience. Sportovní kynologie také oslovuje mnohem víc lidí, je vidět, že zájem o psy a soužití s nimi stále roste a význam psa v lidské společnosti je nyní opravdu obrovský. Nesmíme ale zapomínat na to, že pes je stále šelma, která potřebuje spoustu pozornosti a zvláštní péče.

Pes domácí (*Canis lupus familiaris*) patří do podřádu psotvárné šelmy (*Carniformia*) a čeledi psovití (*Canidae*) (Císařovský, 2008), jak je uvedeno na obrázku 1.

Obrázek 1: Pozice psa domácího v živočišné říši – upraveno podle Císařovský, 2008

| | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|
| Říše: živočichové | | | | | | |
| Kmen: strunatci | | | | | | |
| Třída: savci | | | | | | |
| Řád: šelmy | | | | | | |
| Podřád: psotvární | | | | | | |
| Čeleď: psovití | | | | | | |
| Rod: Canis | | | | | | |
| Druh: vlk obecný (<i>Canis lupus</i>) | | | | | | |
| Poddruh: | | | | | | |
| pes domácí (<i>Canis lupus familiaris</i>)* | | | | | | |
| vlk indický (<i>Canis lupus pallipes</i>)* | | | | | | |
| vlk mongolský (<i>Canis lupus chanco</i>)* | | | | | | |

3.2 Charakteristika a rozdělení plemen psů

Ve své práci jsem izolovala DNA ze stěrů bukálních sliznic osmi plemen. Zde se zaměřím na jejich stručnou charakteristiku a rozdělení.

3.2.1 Rozdělení plemen podle FCI

V České republice se plemena psů zapisují pod Mezinárodní kynologickou organizaci FCI, která plemena dělí do deseti skupin (FCI, 2010):

- I. plemena ovčácká, pastevecká a honácká, kromě švýcarských salašnických psů
- II. pinčové, knírači, plemena molossoidní a švýcarští salašničí psi
- III. teriéři
- IV. jezevčíci
- V. špicové a primitivní plemena
- VI. honiči a barváři
- VII. ohaři
- VIII. slídiči, retrívři a psi vodní
- IX. společenská plemena
- X. chrti

3.2.2. Zařazení plemen do velikostních kategorií

Podle kohoutkové výšky v dospělosti se psi dělí do čtyř skupin. Malá plemena váží v dospělosti maximálně 10 kilogramů. Řadí se sem i toy plemena, která mají maximální váhu do 4 kilogramů (Royal Canin, 2010). Do malé velikostní kategorie patří některá plemena psů ze skupiny FCI číslo II, III, IV, IX. Z těchto malých plemen jsem do výzkumu použila stěry bukálních sliznic border teriéra a standardního jezevčíka dlouhosrstého. Z toy plemen byl vybrán jezevčík králičí dlouhosrstý. Další skupinou jsou plemena střední, kam spadají psi o váze mezi 11 a 25 kilogramy. FCI doposud uznalo 137 středních plemen (Royal Canin, 2010). Do mé bakalářské práce byla zahrnuta DNA border kolie a bearded kolie. Dále sem patří například kokršpaněl, sibiřský husky či plemena nízkonohých honičů.

Plemena psů vážící v dospělosti mezi 26 a 44 kilogramy řadíme do kategorie velkých plemen. Jsou to například němečtí i belgičtí ovčáci, retrívři (kromě Nova scotia duck tolling retrívra) nebo také ohaři a někteří chrti. U těchto plemen je potřeba dbát na správnou výživu nejen během života, ale hlavně ve štěněčím věku, aby se správně vyvinula kostra a klouby. Jsou to velká a mnohdy těžká plemena, která svoje klouby patřičně zatěžují, proto často trpí poruchami motoriky či artritidou. Z těchto velkých plemen jsem pro svou práci vybrala československého vlčáka a rhodeského ridgebacka.

Poslední skupinou jsou obří plemena o váze nad 45 kilogramů. Řadí se sem například molossoidní plemena. U těchto psů jsou klouby ještě více zatěžovány velkou konstitucí

a tělesnou vahou. Kostra se vyvíjí poměrně rychle, takže musíme hlídat poměr vápníku a fosforu hlavně v období růstu (Royal Canin, 2010). Z obřích plemen jsem do výzkumu zařadila bukální stěry z plemene bernský salašnický pes a bulmastif.

3.2.3. Charakteristika jednotlivých plemen testovaných v bakalářské práci

Jezevčíka králíčího (JK, JKD – dlouhosrstý) řadíme společně se všemi jezevčíky do FCI skupiny IV, standard číslo 148. Od trpasličího se liší obvodem hrudníku, ve stáří minimálně 15 měsíců má mít maximální obvod 30 centimetrů. Hlava se má při pohledu shora i ze strany stejnoměrně zužovat až k nosní houbě, morda dosahuje až k úrovni očí, pes ji může doširoka otevřít. Pysky musí být pevně přilehlé a dobře krýt spodní čelist (FCI, 2001). Má protáhlé tělo na krátkých končetinách, přesto by měl být hbitý a pohyblivý. Podle standardu FCI má být přátelský, ale ne bázlivý ani agresivní. Jezevčíci jsou ostražití a tvrdohlaví, schopni pracovat bez závislosti na vůdci, což je jednou z jejich předností při práci v podzemní noře.

Jezevčík standardní (JS, JSD – dlouhosrstý) má mít podle standardu FCI (2001) obvod hrudníku větší než 35 centimetrů, ale neměl by přesahovat horní hranici hmotnosti, což je 9 kilogramů.

Border teriér (BRT) patří do FCI skupiny III, najdeme ho pod standardem číslo 10. Je to středně velký pracovní pes, se silnou kostrou a kompaktní stavbou těla. Hlava by se měla podobat hlavě vydry, tlama je krátká, ale silná (FCI, 1998). Border teriér je velice temperamentní, aktivní a podle standardu má v chování projevovat určitou dávku hravosti.

Border kolie (BOC) patří mezi ovčácká plemena, je tedy v FCI skupině I, pod standardem číslo 297. Tělesná stavba těchto kolií musí ukazovat jejich výkonnost, vyváženost a ladný půvab. Široká a silná čenichová partie směrem k nosní houbě zužovat a pysky mají být přiléhavé ani plné ani oblé (FCI, 2009). Jsou to vytrvalí, inteligentní a práce chtějí psi (Verhoef-Verhallen, 2002).

Plemenný standard bearded kolie (BD) najdeme pod číslem 271, v FCI skupině I. Je to štíhlý, šlachovitý pes, který by neměl působit těžkým dojmem. Lebka je kvadratická, tlama prostorná a silná, její délka odpovídá vzdálenosti stopu od týlního hrbolu. Pysky musí být jednobarevné, bez teček a skvrn, a jejich pigmentace, stejně jako pigmentace očních víček, má odpovídat barvě nosní houby (FCI, 1989). Povahu bearded kolií standard popisuje jako aktivní, zvědavou, ale bez známek agresivity nebo nervozity.

Československý vlčák (ČSV) je řazen do FCI skupiny I se standardem číslo 332. Ačkoli byl vyšlechtěn na území bývalého Československa, dnes má nad tímto plemenem patronát Slovenská republika. Je to velký silný pes obdélníkového rámce. Tlma nesmí být široká, hřbet nosu by měl být rovný. Pysky musí těsně přiléhat a jejich okraje jsou černé (FCI, 1999). Pes je silně fixován na svého pána, nedůvěřivý k cizím lidem, ostražitý a nebojácný.

Ve skupině FCI číslo VI pod standardem číslo 146 nalezneme rhodeského ridgebacka (RR). Je to harmonicky stavěný, elegantní pes se silnou kostrou a dobrým osvalením. Zvláštností toho plemene je pruh srsti na hřbetě nazývaný ridge, rostoucí opačným směrem než ostatní srst po těle. Podle FCI standardu (1998) je tlma velká a prostorná, pysky mají přiléhat k čelistem a být pevně napjaté.

Bernský salašnický pes (BSP) spadá do FCI skupiny II, standard číslo 45. Stavba těla je harmonická, silná, pes je dobře osvalen a má silné končetiny. Původním posláním bylo hlídat statky ve švýcarském kantonu Bern, nahánět ovce a dobytek z pastvy a rozvážet na speciálně upravených vozících mléko do vesnic (Räber, 1997). Hlava bernských salašnických psů je silná a při pohledu zepředu a z profilu málo klenutá, tlma silná a středně dlouhá, černě pigmentované pysky musí pevně přiléhat k čelisti (FCI, 2003).

Bulmastif (BM) je velké molossoidní plemeno patřící do FCI skupiny II, standard má číslo 157. Jeho velké tělo je souměrné, je plný síly, ale nemá působit těžkopádně. Dále se ve standardu dočteme, že je velmi aktivní a vytrvalý. Lebka je velká a kvadratická, tlma má být naopak menší a krátká. Vzdálenost od špičky čenichu ke stopu má být zhruba jednu třetinu celkové délky hlavy. Pysky nesmí přesahovat spodní okraj dolní čelisti. U bulmastifů je dovolen lehký předkus a líce mají být lehce vyplněné (FCI, 2011).

3.3 Genom psa

V dnešní době je známo více než 400 plemen psů s naprosto různorodým fenotypem, proto je pes velmi zajímavý jako model pro genetické analýzy a studie.

Psí genom rozluštila v roce 2004 Kirsten Lindblad-Tohová a její tým z Broad Institute of Harvard and MIT (publikováno 2005). Pro jeho sekvenaci použili DNA z fený boxera a vypočetli celkovou velikost genomu na 2,41 miliardy párů bází. Jejich studie poskytla nejen koncept vysoce kvalitní sekvence psího genomu, ale také navrhla mapu jednonukleotidových polymorfismů (SNP – single nucleotide polymorphisms) napříč jednotlivými plemeny. Odhalili, že v celém psím genomu se objevuje rozsáhlý haplotyp, podle kterého jsou schopni určit povahu genetické rozmanitosti u psů. Dále také Lindblad-Toh et al. (2005) vytvořili

software pro formální hodnocení přesnosti kompletace DNA a následně tak ověřili, že více než 99 % z jejich návrhu sekvence psího genomu bylo sestaveno správně. Také ve své studii srovnávali lidský a psí genom a zjistili, že 5,3 % lidského genomu obsahuje funkční prvky, které se zachovaly i u psů kvůli mnohaleté negativní selekci. Jejich výsledky dále ukazují, že tyto prvky se běžně objevují v sadě v genomu savců, neboť je našly na stejných lokusech i u myši.

Ostrander a Wayne (2005) naproti tomu stanovili počet genů ve psím genomu na 19 000, což je o něco méně než v lidském genomu, který obsahuje podle National Human Genome Institut (2011) 20 500 genů.

Rozluštění psího genomu umožňuje studovat genetickou příbuznost jednotlivých plemen, příbuznost psa a vlka či dědičně přenosné choroby i dědičné vlastnosti psů. Zjištěná kompletní sekvence psího genomu dále napomohla k sestavení fylogenetického stromu téměř všech žijících druhů z čeledi *Canidae*, psovití. Také ale umožňuje srovnávat lidský genom s genomem ostatních savců, v závislosti na přesně zjištěné pozici psa ve fylogenetickém stromu savců (Lindblad-Toh et al., 2005).

Ostrander a Wayne (2005) se domnívají, že za poslední dvě století se psi stali tak významnou součástí lidského života a provádělo se tolik užitkových křížení, že to může být považováno za jeden z největších genetických pokusů, který kdy byl vytvořen. Za tuto dobu vzniklo přes 400 plemen psů, což se v rámci jednoho plemene nemohlo vyhnout příbuzenské plemenitbě, protože jak uvádí Dostál (2007), vlastnosti i vzhled nově vznikajícího plemene potřebujeme upevnit, aby se přenášely na potomstvo, čehož dosáhneme právě úzkou příbuzenskou plemenitbou.

Ta s sebou ale nese nebezpečí upevnění i nežádoucích znaků a vlastností, genetických chorob nevyjímaje. Jak uvádí Ostrander a Wayne (2005), u mnoha z dnešních plemen psů se vyskytují dědičná onemocnění, jako například rakovina, hluchota, slepota, nemoci srdce a poruchy jeho rytmu, epilepsie, choroby očí či autoimunitní onemocnění. Vzhledem k tomu, že v lidské populaci se tyto choroby taktéž vyskytují, zkoumání jejich genetické podstaty a možnosti léčení je snadněji proveditelné a v mnohých ohledech levnější na psech.

Fenotypová rozmanitost psích plemen poukazuje na jejich genetickou diverzitu, která byla ale během historie vzniku jednotlivých plemen dvakrát ohrožena tzv. efektem hrdla lahve. To znamená, že se prudce snížila velikost efektivní populace, a to jednou kvůli samotné domestikaci psa a podruhé tvorbou současných plemen. Pokles genetické rozmanitosti je patrný, jak uvádí Lindblad-Toh et al. (2005), z široké vazebné nerovnováhy

(LD – linkage disequilibrium), kterou popisuje Sutter et al. (2004) jako nenáhodné spojování alel ve dvou či více lokusech.

3.4 Veterinární molekulární laboratoře a jejich nabídky analýz

V dnešní době existuje v zahraničí i v České republice několik desítek specializovaných laboratoří a ústavů, které poskytují genetické a biologické analýzy nejen pro potřeby státního veterinárního dozoru a nejrůznějších výzkumů, ale i pro jednotlivé chovatele, kteří se na specializované laboratoře často obrací se žádostí o provedení genetických testů u jejich psa či feny, které chtějí zařadit do chovu. V následujících kapitolách se zaměřím na charakteristiku nejznámějších laboratoří v České republice i v zahraničí a nastíním nabídky jejich analýz.

3.4.1 Laboratoře v České republice

V Plzni existuje genetická laboratoř Genomia s.r.o., akreditovaná pod číslem 1549, která se zabývá molekulárně biologickou diagnostikou. Testuje a zkoumá dědičné choroby psů, koček i skotu, provádí testy barev a kvality srsti psů, koček a koní. Dále mapuje genetické profily jednotlivých psů a provádí výzkum parentity. Jejich nabídka obsahuje okolo 70 různých speciálních vyšetření pro psy. Laboratoř nabízí i archivaci DNA po dobu 10 let. Ceny se pohybují v rozmezí od 680 Kč za průkaz *Borrelie burgdorferi* až po 3 000 Kč za alergologické testy. V nich stanovují protilátky na inhalační alergeny (například javor, bříza, dub, pelyněk černobýl či alergie na blechy) a potravinové alergeny (například rýže, kukuřice, oves nebo různé druhy masa) (Genomia, 2012).

Laboratoř molekulární genetiky a cytogenetiky GENSERVICE s.r.o., akreditovaná pod číslem 1097, sídlí v Brně a nabízí analýzu DNA pro určení parentity, pro vytvoření individuálního DNA profilu a podle rozboru krve jsou schopni vybrat nejvhodnější jedince k plemenitbě. U ptáků provádí určování pohlaví, diagnostiku původců cirkovirové infekce a průkaz *Chlamydia psittaci*. Za 300 Kč nabízejí archivaci DNA a za 1 500 Kč zjišťují druhovou identifikaci na základě mitochondriální DNA (Svoboda, 2004).

Státní veterinární ústav Praha poskytuje chovatelům genetické analýzy v Laboratoři molekulárních metod. Testy na genetické choroby provádějí pouze u koček a psů. U psů navíc jenom test na přítomnost defektního genu MDR1, který způsobuje přecitlivělost vůči některým lékům. Toto onemocnění se vyskytuje především u ovčáckých plemen, protože jak

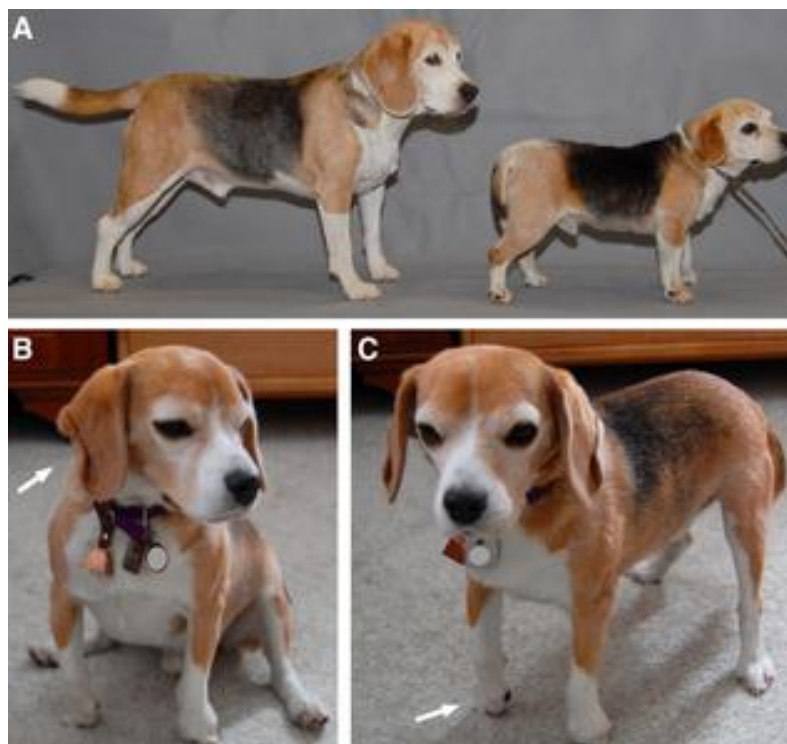
uvádí Ostrander a Wayne (2005) mutace genu MDR1 se vyskytuje u společného předka těchto plemen, což potvrdili analýzou haplotypů. Laboratoř molekulárních metod dále nabízí identifikaci druhově specifické DNA. Určování pohlaví nabízí pouze u skotu, ale jak uvádí na svých internetových stránkách, po domluvě jsou schopni provést i pro jiné druhy (Státní veterinární ústav Praha, 2010).

Na Vysočině byl v roce 2003 zřízen Státní veterinární ústav Jihlava jako akreditovaná zkušební laboratoř č. 1129. Zabývá se testováním zdraví zvířat, hygienou a bezpečností potravin i krmiv a ekologií. V oblasti zdraví a prevence chorob zvířat nabízí diagnostiky infekčních i neinfekčních chorob zvířat hospodářských i v zájmových chovech, provádí speciální vyšetření na přítomnost bakterií a parazitů v těle zvířat. Při kontrole zdravotního stavu používají biochemické, toxikologické a hematologické vyšetření. Na oddělení patologie provádí histologická a imonohistologická vyšetření. Jejich laboratoř molekulární biologie používá na stanovení bakteriálních a virových patogenů v organismu diagnostiku pomocí PCR a real – time PCR. Ceny laboratorního vyšetření u psů se pohybují od 100 Kč za průkaz mikrofilárií vlasovce psiho (*Dirofilaria immitis*) nebo 150 Kč za nálezi *Giardie intestinalis*, až po 2 000 Kč za průkaz protilátek u *Toxoplasma gondii* či *Leishmania infantum* (Státní veterinární ústav Jihlava, 2012).

3.4.2 Laboratoře v zahraničí

Veterinární genetická laboratoř UC Davis provádí výzkumy pod záštitou Kalifornské veterinární univerzity v USA. Nabízí testování parentity, genetické diagnostiky a výzkum dědičných chorob. Nově také provádí testy na podíl vlčí krve v křížencích mezi psy a vlky. U psů provádí již zmiňované testování rodičovství, testy na predispozice pro hyperurikosurie, která se projevuje zvýšeným vylučováním kyseliny močové močí. Také se zabývá testováním genů pro určování barvy srsti, u amerických bezsrstých teriérů testují geny pro přítomnost osrstění. U mopsů testuje náchylnost na encefalitidy a u všech ostatních plemen nabízí možnost zjištění karyotypu z krevního vzorku. U bíglů provádí testy na přítomnost mutované alely, která způsobuje Musladin-Lueke Syndrom (UC Davis, 2011). Jak uvádí Bader et al. (2010), Musladin-Lueke syndrom se projevuje fibrózou kůže, na ušních chrupavkách i na ocase se mohou projevit záhyby a boule. Na předních končetinách mají bíglové zkrácené prsty a mohou mít problémy i se srdečním rytmem, což může přerůst v záchvaty, které někdy končí smrtí. Tento syndrom je zobrazen na obrázku 2. V jeho části A je vidět srovnání zdravého a postiženého bígla. V části B a C je detail bígla trpícího MLS syndromem.

Obrázek 2: Musladin-Lueke syndrom u bígla – upraveno podle Badera, 2010



Ve státě Michigan v USA je veterinární genetická laboratoř VetGen, která své výzkumy zaměřuje na genom psů, koček a koní. U psů kříženců zkoumá jejich genetickou příbuznost s čistokrevnými plemeny, na svých internetových stránkách uvádí, že stačí zaslat stěr bukální sliznice psa a do tří týdnů v emailu zveřejní výsledky, jaká plemena se podílela na vzniku daného křížence. Nabízí otestování, zda je pes potomek první filiální generace dvou čistokrevných psů, tzv. Designer dog. Dále poskytuje testování parentity a testy na mnoho dědičných chorob. Také se zabývá dědičností barvy, struktury a délky srsti (vetGen, 2012).

Animal Genetics je genetická laboratoř ve státě Florida v USA. Zájemcům nabízí testování genetikých vloh pro barvu a typ srsti psa či testy na dědičné choroby. Vytváří také DNA profily jednotlivých psů a provádí testování parentity (Animal Genetics, 2012).

Genetická laboratoř, specializující se na testování psů a koní, Canine and Equine Genetics Laboratory na Univerzitě v Minnesotě nabízí testy na pět dědičných chorob u psů. U border kolií zde zkoumají poruchu zvanou kolaps border kolií (BCC), která se projevuje, jak uvádějí na svých internetových stránkách, po namáhavé fyzické práci zrychleným dýcháním, poruchou koordinace chůze, padáním na stranu a celkovým zmatením. Podobný kolaps může nastat i po fyzických aktivitách u jiných plemen, jako jsou někteří retrívři nebo welsh corgi. Genetické testy na přítomnost idiopatické epilepsie provádí tato laboratoř u australských ovčáků, bíglů, anglických špringršpanělů, velkých švýcarských salašnických

psů a maďarských ohařů. Dále provádí testy u leonbergerů na dědičnou chorobu zvanou polyneuropatie, což je porucha periferních nervů. V jejich nabídce je jako poslední uveden test na zjištění genetické predispozice výskytu močových kamenů ze šťavelanu vápenatého. Tato porucha je, jak uvádějí, velice častá u malých kníračů (Canine and Equine Genetics Laboratory, 2011).

3.5 Metody izolace DNA

Nukleové kyseliny se nacházejí především v buněčném jádře, proto pro jejich izolaci se nejdříve musí lyzovat buňky dané tkáně, ze kterých chceme nukleové kyseliny získat. Pro izolaci DNA z buněk bukalních sliznic je možné zvolit laboratorní postupy, které vycházejí z roztoků, které jsou přímo připraveny v laboratoři. Mezi nejčastěji používanou metodu izolace DNA z bukalních buněk zachycených na odběrovém kartáčku patří fenol – chloroformová extrakce (Bílek et al., 2007). V současné době však naprostá většina laboratoří provádějící větší počty analýz využívá komerčně vyráběných kitů, které jsou založeny na lýze buněk a na následném zachycení molekul DNA na silikátové kolonce.

3.5.1 Fenol – chloroformová extrakce

Tato metoda je velmi rozšířená a vhodná zejména pro vysokomolekulární genomové nukleové kyseliny (Bílek et al., 2007). Vybraná tkáň, ze které se bude izolovat nukleová kyselina, se nejprve lyzuje v pufru. Lýzi buněk usnadňuje přidání enzymu proteinázy K. Přidáním fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu se docílí denaturace bílkovin a jejich vysrážení. Po centrifugaci dojde k rozdělení fází na horní vodní a dolní chloroformovou, protože chloroform je organické rozpouštědlo, které se nemísí s vodným roztokem. Na rozhraní mezi fázemi se vysrážejí prstenec proteinů. Horní vodní fáze obsahuje nukleové kyseliny. Po přidání koncentrovaného etanolu a odstředění se nukleové kyseliny vysrážejí. Společně s nimi se vysráží ale i soli, které se ze vzorku odstraní 70 % etanolem a ve zkumavce zůstane pouze supernatant a čisté nukleové kyseliny (Raclavský, 2003).

Modifikaci fenol – chloroformové extrakce popisují například García-Closas et al. (2001) a Cao et al. (2003). Tito autoři uvádějí, že fenol – chloroformová extrakce poskytuje nejvyšší výtěžnost DNA, která je vhodná pro následné analýzy na principu PCR. Fenol – chloroformovou purifikaci použili při extrakci DNA u psů například Vilà et al. (2003) a Sundqvist et al. (2001).

3.5.2 Metody založené na navázání DNA na silikátovou kolonku

Další metoda izolace nukleových kyselin využívá vysokou afinitu DNA na silikátový povrch ve speciálně upravené chromatografické kolonce. DNA se po přidání chaotropních solí (iontové sloučeniny porušující vodíkové můstky vody) naváže na povrch silikagelu a kontaminující látky projdou přes kolonku. Čistá DNA tak zůstane na kolonce, odstranit ji můžeme smytím vodou nebo puftrem (Janochová, 2009).

Na tomto principu je založena naprostá většina komerčně vyráběných extrakčních kitů. Výhodou použití těchto technik je zaručení vysoké stability všech roztoků a laboratorního materiálu, který je při extrakci používán. Metoda využívající komerčně vyráběné kity je mnohonásobně rychlejší oproti standardním laboratorním postupům. Obvykle není zapotřebí provádět žádné složité optimalizace. Návody k použití kitů obvykle uvádějí detailní postup izolace z různého typu biologického materiálu, jako je například krev, chlupové cibulky nebo stěry bukálních sliznic. V oblasti molekulární genetiky psů například Chang et al. (2007) použili pro extrakci DNA z bukálních stěrů kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). Yokoyama et al. (2010) popisují extrakce psí DNA s využitím kitu Puregene Blood Kit (QIAGEN). Vilà et al. (2003) použila pro získání vysokomolekulární genomické DNA u psů a vlků kit Izoquick DNA Extraction Kit (Orca). Použití kitu QIAamp DNA Stool Mini Kit doporučují například Liberg et al. (2005).

3.6 Buňky bukálních sliznic jako biologický materiál určený k extrakci DNA

Izolace DNA z buněk bukálních sliznic má výhodou v tom, že metoda odebrání vzorků je neinvazivní, to znamená, že testovaného jedince nijak nepoškozujeme a nenarušujeme homeostázu jeho organismu (Beja-Pereira et al, 2009).

3.6.1 Metody odběru bukálních sliznic

Nejčastěji se pro odběr buněk bukálních sliznic používá cytologický kartáček, kterým se vytře prostor mezi dásní a tváří, respektive pyskem u zvířat. Další výhodou je, že stěr bukálních buněk v humánní medicíně mohou provádět sami testovaní jedinci, případně sami majitelé testovaných psů, nemusí být proveden lékařem, jako například vzorky DNA izolované z krve.

Odběry buněk bukálních sliznic v humánní genetice

Při výzkumech lidské DNA se často používá odběr pomocí výplachu ústní vodou (Marchand et al., 2001; Heath et al., 2001; García-Closas et al., 2001; Feigelson et al., 2001). Technika je snadná, odběr rychlý a do výzkumu je možné zahrnout velké množství testovaných jedinců.

Rozsáhlé studie, které zahrnují mnoho testovaných dobrovolníků nejsou ale vždy tak snadno proveditelné. Touto problematikou se zabývali Marchand et al. (2001). Výzkum prováděli na 239 obyvatelích Havajských ostrovů. Zaslali dobrovolníkům 10 ml ústní vody, kterou si měli vyplachovat ústní dutinu po dobu 60 sekund, poté vzorek vyplivnout a uzavřít do zkumavky a zaslat do laboratoře. V laboratoři byly vzorky zmrazeny na teplotou $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a ponechány tak zhruba rok, než všichni účastníci zaslali vzorky zpět.

Heath et al. (2001) ve své studii zjišťovali, která značka ústní vody bude nejvíce vyhovovat pro použití při odebírání DNA. Na vyhodnocení nejvhodnějšího typu ústní vody bylo použito pět faktorů: její slučitelnost s látkami na pročištění DNA, výtěžnost a kvalita DNA zkoumaná po proběhlé PCR, dále stálost roztoku s DNA ponechaného 7 dní při pokojové teplotě a posledním hodnoceným kritériem byla příchut' ústní vody. Skupině 20 testovaných lidí byly předloženy vzorky pěti typů ústní vody a dobrovolníci je měli ohodnotit na stupnici 1 – 5 (5 nejlepší chuť, 1 nejhorší). Po vyhodnocení všech parametrů vyšla jako nejlepší medium pro odběr bukálních buněk ústní voda značky Scope, zobrazená na obrázku 3.

Obrázek 3: Ústní voda Scope – upraveno podle DuPont Packaging, 2010



Než se odběr pomocí ústní vody začal běžně používat v praxi, bylo provedeno několik srovnávacích studií na testování kvality a kvantity DNA odebrané z buněk bukální sliznice pomocí výplachu ústní vodou nebo stěrem cytologických kartáčků (García-Closas et al.,2001; King et al.,2002). García-Closas et al. (2001) došli k závěru, že jeden vzorek DNA odebraný pomocí výplachu obsahuje větší množství DNA a izolovaná DNA má i větší molekulovou hmotnost než ze vzorku pocházejícího ze dvou cytologických kartáčků.

King et al. (2002) taktéž porovnávali tyto dvě metody odběru buněk bukálních sliznic, navíc ještě zkoumali i finanční stránku obou těchto metod pro rozsáhlé studie. Jako výhody izolace vzorků DNA odebraných pomocí výplachu ústní vodou uvádějí vyšší průměrnou výtěžnost DNA a to, že i její fragmenty jsou delší než při izolaci buněk odebraných pomocí cytologických kartáčků. Naproti tomu je ale odběr ústní vodou finančně nákladnější, protože vzorky se před zmrazením musí odstředit a spotřebuje se tak více materiálu. Do svého výzkumu King et al. (2002) zahrnuli 24 dobrovolníků, pouze 22 z nich poslalo vzorky DNA zpět do laboratoře. Každý dobrovolník obdržel dva soubory cytologických kartáčků a jeden vzorek ústní vody s polypropylenovou zkumavkou. Zásilky jim byly odesílány vždy po 4 týdnech, aby se bukální sliznice mohla zregenerovat. Jedna skupina účastníků měla odebrat buňky bukální sliznice ráno před jídlem, druhá skupina kdykoli během dne. Před odebíráním si měli 10 sekund vyplachovat ústa vodou z vodovodu a poté odebrat buňky jedním kartáčkem z pravé tváře, druhým z levé tváře a třetí opět z pravé tváře. První zásilka cytologických kartáčků obsahovala instrukce, aby dobrovolníci při odebírání vzorků otáčeli cytologickým kartáčkem, zatímco s ním budou pohybovat po bukální sliznici nahoru a dolů. Ve druhé zásilce byl změněný postup – před odebíráním vzorků si měli dobrovolníci 30 sekund třít tvářemi o zuby a poté odebrat vzorky stejným způsobem, jako v prvním případě. Za další 4 týdny měli účastníci výzkumu odebírat vzorky pomocí výplachu ústní vodou, nejprve museli vypláchnout ústa vodou z vodovodu opět po dobu 10 sekund a následně si 15 sekund třít tváře proti zubům. Poté nabrat do úst 20 ml ústní vody Scope a 60 sekund si energicky kloktat a vyplachovat ústní dutinu. Vzorek následně vyplivnout do přiložené zkumavky a odeslat zpět do laboratoře. Po vyhodnocení výsledků King et al. (2002) publikovali, že nenašli rozdíly výtěžností DNA mezi vzorky z ranního odběru buněk nebo během dne. Rozdíl ve výtěžnosti nebyl ani mezi rozdílnými způsoby odebírání vzorků (otáčení kartáčku, tření tváře).

Odběr buněk bukálních sliznic pomocí ústní vody se jeví jako výhodný alespoň v humánní medicíně. Je ale potřeba dodržovat určitá pravidla při provádění odběru, protože

jak uvádí Feigelson et al. (2001), pokud si testovaný jedinec vyčistí zuby 1 hodinu před odběrem, sníží se množství DNA extrahované z bukálních buněk až o 40 %.

Harty et al. (2000) vynalezli další způsob odběru bukálních buněk, a to pomocí speciálně upravené karty. Ve své studii uvádějí, že výtěžnost DNA ze stěrů sliznic pomocí takové karty je srovnatelná se stěry pomocí kartáčků, navíc je tento způsob získávání vzorků výhodnější pro potřeby rozsáhlých dlouhodobých studií, kdy se vzorky s DNA musí dlouho skladovat a složitě převážet. Karty byly speciálně upraveny, aby zpomalovaly růst bakterií a potlačovaly aktivitu nukleáz. Tyto nukleázy, jak uvádí Alberts (1998), hydrolyzují fosfodiesterovou vazbu a tím nukleové kyseliny štěpí. Hartý et al. (2000) vzorky uchovávali pět dnů při pokojové teplotě a následně je rozdělili do čtyř skupin, z nichž byla DNA izolována buď okamžitě, nebo až po skladování při pokojové teplotě po dobu devíti měsíců, při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Čerstvé vzorky měly střední výtěžnost ($2,3\text{ }\mu\text{g}$ lidské DNA), skladované vzorky měly výtěžnost o něco menší, přesto se DNA ze všech vzorků úspěšně amplifikovala a redukci výtěžnosti při dlouhodobém skladování připisují fixaci DNA na odběrovou kartu, spíše než ztrátě genetického materiálu.

Odběry buněk bukálních sliznic psů

DNA z bukální sliznice psů je snadno a jednotně amplifikovatelná a mnoho let skladovatelná aniž by se poškodila. Odběr se provádí nejčastěji cytologickým kartáčkem. Vzorkem z jednoho takového kartáčku je možné provést až 200 PCR reakcí (Oberbauer et al., 2003).

Nový typ cytologického kartáčku Oragene ANIMAL testovali Yokoyama et al. (2010). Vzorky bukálních sliznic odebírali od čtyř bearded kolií a jedné border kolie. Majitelé psů, kteří se účastnili experimentu, uvedli, že samotný odběr byl velice jednoduchý a celý proces netrval více než 10 minut. Po odebrání byly vzorky ponechány při pokojové teplotě a odeslány do laboratoře. Tam byly cytologické kartáčky se stěrem sliznic vloženy do vodní lázně o teplotě $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ na dvě hodiny a poté byla provedena izolace.

Při provádění stěrů sliznic se vzorek může kontaminovat zbytky potravy v tlamě psa. Pro minimalizaci takovéto kontaminace uvádí Oberbauer et al. (2003), že před odběrem buněk sliznice by pes neměl minimálně 15 minut přijímat potravu ani vodu. Chang et al. (2007) se domnívají, že pro omezení kontaminace DNA by se stěry sliznic měly provádět minimálně 25 minut po krmení, a majitelům psů, kteří odběry prováděli, doporučovali, aby psovi před odběrem vypláchli tlamu vodou nebo aby se pes alespoň vody napil. Po odebrání

buněk ze sliznice měli nechat cytologický kartáček oschnout na vzduchu, aby se zamezilo růstu bakterií. Výťažnost DNA z takovýchto vzorků byla 1 – 2 μg DNA z jednoho kartáčku (Chang et al., 2007).

3.6.2 Posuzování kvality a kvantity izolované DNA pomocí UV-spektrofotometrické metody

Warburg a Christian (1942) uvádějí, že kvantifikace DNA pomocí spektrofotometrické metody je jedním z nejrychlejších a nejjednodušších způsobů odhadování koncentrace nukleových kyselin v izolovaných vzorcích. Warburg a Christian (1942) předpokládají, že všechny čtyři nukleotidy, které jsou součástí molekuly DNA, se vyznačují schopností maximálně zachycovat UV světlo o vlnové délce 260 nm. Autoři předpokládají, že extinkční koeficient nukleotidů molekul DNA rozpuštěných v proměřovaném roztoku je roven 20, pokud paprsek UV záření prochází spektrofotometrickou kyvetou o šířce 1 cm. Nutná podmínka pro proměňování absorbance vzorků DNA UV-spektrofotometrickou metodou je, že kyveta musí být vyrobena z čistého křišťálového skla. Warburg a Christian (1942) a Sambrook et al. (1989) uvádějí, že jestliže paprsek světla o vlnové délce 260 nm prochází vzorkem DNA o koncentraci $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, potom absorbance tohoto roztoku je rovna 1. Tato úměra platí tehdy, pokud je šířka kyvety rovna 1 cm.

UV-spektrofotometrické metody je možné použít nejen pro stanovení koncentrace nukleových kyselin, ale i pro posouzení možných kontaminací izolovaných molekul DNA různými organickými látkami i anorganickými solemi. Například Warburg a Christian (1942) popisují možnost, jak lze UV-spektrofotometricky vyjádřit proteinové znečištění izolované DNA. Jejich teorie vychází z předpokladu, že aminokyseliny, které mají charakter aromatických molekul, jsou schopny maximálně pohlcovat světlo o vlnové délce 280 nm. Pokud je tedy kontaminující protein složen z aminokyselin aromatického charakteru, potom takovýto polypeptidový řetězec maximálně absorbuje světlo o vlnové délce 280 nm. Kontaminujícími proteiny však nemusí mít řetězce bohaté na aminokyseliny aromatického charakteru. Typickým příkladem jsou histonové proteiny nebo protaminy. Přítomnost histonových proteinů je v extrahovaném roztoku DNA očekávatelná, protože histony patří mezi důležité jaderné proteiny. Pro vyjádření stupně kontaminace takovýmito typy proteinů je mnohem výhodnější využít UV-spektrofotometrické měření při vlnové délce 228 respektive 230 nm. Například Glasel (1995) zjistil, že histonové proteiny vykazují téměř nulovou absorbanci při vlnové délce 280 nm. Při vlnové délce 228 nm však docházelo k absorbanci

značně velkého množství záření. Toto záření bylo pohlcováno peptidickou vazbou. Proto řada autorů doporučuje současně extrahované vzorky DNA proměřovat rovněž při vlnové délce 228 respektive 230 nm.

V současné době se pro vyjádření čistoty DNA používá systém poměru absorbancí při dvou různých vlnových délkách. Tento systém charakterizují například Wilfinger et al. (1997). Tito autoři uvádějí, že za vysoce čistou DNA je možné považovat takovou, kde se její hodnota poměru A260/A280 ve vzorku pohybuje mezi 1,8 – 2,0. Současně vysoce čistou extrahovanou DNA charakterizuje poměr A260/A230, který se pohybuje v intervalu od 2,0 do 2,2.

Odchytky od těchto poměrů absorbancí obvykle signalizují různé typy kontaminací. Přehled různých typů kontaminací uvádí například Thermo Fisher Scientific (2011). Při extrakcích rostlinné DNA s využitím kitů je poměrně časté použití guanidinu, který bývá součástí lyzačních a promývacích roztoků. Možná kontaminace guanidinem je charakteristická pro snížené hodnoty poměru A260/A280. Častou organickou kontaminující látkou ve vzorcích DNA získané pomocí fenol – chloroformové metody jsou rezidua fenolu. Fenolová kontaminace se projevuje rovněž snížením poměru A260/A280. Někteří autoři používají pro zvýšení výtěžnosti DNA přídavek glykogenu do extrakční směsi. Glykogen výrazně napomáhá srážení izolované DNA. Jeho přítomnost ve finálních vzorcích DNA je podchytilelná na základě snížení poměru A260/A280.

Izolované molekuly DNA respektive jejich roztoky nemusí být kontaminovány pouze organickými sloučeninami. Při extrakci DNA může docházet rovněž k nežádoucímu zasolení vzorků. Řada technik, jako je například sekvenování, jsou citlivé právě na toto zasolení. Zdrojem zasolení nejčastěji bývají některé komponenty extrakčních pufrů (CTAB, PVPP). Zhou et al. (1996) uvádí, že tyto dva kontaminanty způsobují snížení hodnot poměru absorbancí A260/A280 i A260/A230.

3.7 Analýzy polymorfismů DNA

Analýza DNA umožňuje identifikovat genové lokusy a jednotlivé alely, které zajišťují konkrétní fenotypový projev znaku. Analýzou lze zjistit, zda je testovaný jedinec homozygot dominantní, recesivní nebo heterozygot. Další typy analýz jsou zaměřeny na studie polymorfismů nekódujících sekvencí, které jsou následně využity jako vazbové genetické markery nebo obecně pro studium polymorfismů daného biologického druhu.

3.7.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí metody PCR (polymerase chain reaction) lze rychle a účinně namnožit i velmi malý úsek DNA. Je často využívána v laboratořích při provádění genetických analýz a testování dědičných chorob u lidí i zvířat. Tato reakce však může být použita pouze u DNA, kde je předem známá počáteční a koncová sekvence nukleotidů studované oblasti, protože PCR je řízena krátkými uměle nasyntetizovanými oligonukleotidy (primery), které se na základě komplementarity bází párují s templátovou DNA na počátku a konci amplifikovaného fragmentu (Alberts et al., 1998).

Polymerázová řetězová reakce probíhá ve třech základních krocích, které se za sebou mnohokrát opakují – denaturace templátové DNA, nasedání primerů (annealing) a prodlužování (extenze) nových řetězců DNA.

Prvním krokem PCR je denaturace, při které se požadovaný roztok s DNA zahřeje na 94 °C po dobu asi jedné minuty (Vierstrate, 1999). Působení této teploty na DNA dokáže rozštěpit vodíkové můstky mezi jednotlivými bázemi, a tím vzniknou jednořetězcové molekuly DNA (Watson, 1988).

Druhým krokem PCR je annealing, kdy primery nasedají na řetězce DNA. Aby se primery byly schopné napojit na úseky DNA, je nutné roztok ochladit na 37 – 65 °C (podle typu PCR). Při standardní PCR se vzorky zchlazují, jak uvádí Innis et al. (1990), na 55 °C.

Posledním krokem je prodlužování. V něm musí dojít ke vzniku dvouřetězcové DNA, s jedním vláknem původním a druhým syntetizovaným. Účastní se při tom termostabilní DNA polymeráza, která pro zahájení syntézy nového řetězce DNA potřebuje teplotu 72 °C. Nejčastěji se používá *Taq* DNA polymeráza izolovaná z termofilní bakterie *Thermophyllus aquaticus* (Alberts et al., 1998).

3.7.2 Mikrosatelitní markery

Mikrosatelity jsou tandemově se opakující sekvence DNA o velikosti 1 – 6 párů bází (Ellegren, 2004). Mikrosatelity jsou ve velkém počtu rozprostřeny v celém genomu, především u eukaryotních organismů. Řada mikrosatelitních lokusů vykazuje vysokou frekvenci mutací, která je vysvětlována pomocí jevu zvaného replikační sklouznutí (Levinson and Gutman, 1987). Frekvence mutací kolísá v rozmezí 10^{-2} – 10^{-6} (Schug et al., 1997; Ellegren, 2000), což je několikanásobně vyšší hodnota oproti běžné mutační frekvenci při replikaci, jejíž hodnota je 10^{-9} (Leonard et al., 2003).

Z výše uvedeného vyplývají výhody markerů založených na mikrosatelitních lokusech. Výhodou mikrosatelitních markerů (SSR marker – simple sequence repeat) je jejich takřka neomezené množství v genomu, vysoký polymorfismus, specifčnost a reprodukovatelnost (Ellegren, 2004). Jako každé markery mají i ty mikrosatelitní některé nevýhody vyplývající z jejich biologické podstaty a z principu použité molekulárně genetické metody. Většina mikrosatelitních analýz využívá PCR, během které vznikají tzv. kómové produkty, a často dochází k přidávání netemplátového A (Johansson et al., 2003). Přesto klady SSR markerů převažují nad zápory, což dokládá jejich využití v různých oblastech genetického výzkumu.

Častou aplikací bývá například identifikace jedinců pro určení paternity (Bownig et al., 1997) a maternity (van Asch et al., 2009), mapování genomu (Sargan et al., 2007) či populační a fylogenetické studie (Irion et al., 2003; Parker et al., 2004; van Asch et al., 2010). Velká pozornost byla rovněž věnována studiu variability uvnitř a mezi různými plemeny. Zajc et al. (1996) porovnávali variabilitu tří plemen pomocí 19 mikrosatelitních markerů a došli k závěru, že u každého plemene došlo k výrazné redukci variability, a dále zjistili nízkou vnitrodruhovou variabilitu psů oproti jiným druhům zvířat.

Specifické PCR markery používali taktéž například Nowacka-Woszuk et al. (2007), kteří je popsali ve studii mutací genů *SRY* a *SOX9*.

Aplikovatelnost mikrosatelitních markerů nemusí být omezena pouze na studium variability v rámci druhu, ale lze je využít i na úrovni vyšších taxonů, jak dokládá studie Klukowské et al. (2003). Autoři tohoto výzkumu použili 9 mikrosatelitních markerů u tří druhů psovitých šelem – lišky polární (*Alopex lagopus*), psa domácího (*Canis lupus familiaris*) a lišky obecné plavé (*Vulpes vulpes fulva*) ke zjištění genetické vzdálenosti a tvorbě fylogenetických stromů.

3.7.3 Detekce polymorfismů nukleových kyselin

Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza patří mezi separační metody, které od sebe oddělují molekuly o rozdílné velikosti. Speciální gel (agarózový nebo polyakrylamidový) se nechá zatuhnout ve vaničce s hřebeny, které v něm vytvoří jamky, do nichž následně vpravujeme roztok DNA. Ten obsahuje kromě molekul DNA i speciální fluorescenční barvivo, díky kterému jsou fragmenty DNA po proběhlé elektroforéze vidět pod UV zářením. Gel se poté ponoří do vaničky s elektroforetickým pufrům a připojí se ke zdroji elektrického napětí. Gel funguje

jako molekulové síto, přes které díky elektrickému napětí prochází DNA. Její fragmenty mají negativní náboj, takže se pohybují od záporné elektrody ke kladné, a tak se v gelu rozdělí podle své velikosti. Při nanášení roztoku DNA do gelu je v rámci bezpečnosti vhodné pracovat v rukavicích, protože fluorescenční barvivo ethidium bromid je potenciální kancerogen (Raclavský, 2003).

Kapilární elektroforéza

Jedná se v principu o klasickou gelovou elektroforézu, pouze s několika modifikacemi. V molekulární genetice je kapilární elektroforéza využívána na fragmentační analýzu a sekvenování DNA. V obou případech dochází k separaci fluorescenčně značených fragmentů DNA v tenké kapiláře vyplněné speciálním polymerem (Applied Biosystems, 2010). Tímto způsobem je dosaženo vysoce účinné a rychlé separace fragmentů (Kašička, 1997). K detekci separovaných fragmentů se využívá kombinace laseru a CCD (charge-coupled device) kamery. Velkou výhodou je možnost automatizace celého procesu a tím pádem značná úspora času.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Plemena použitá pro pokusy v bakalářské práci

Bakalářská práce je zaměřena na studium různých vlivů na kvalitu a kvantitu DNA extrahované z bukálních stěrů u psů. Jedním z dílčích cílů je ověřit hypotézu, zda parametry izolované DNA mohou být ovlivněny rovněž plemennou příslušností. Z pohledu této hypotézy byla vybrána skupina plemen. Ta byla sestavena takovým způsobem, aby v sobě zahrnovala plemena různých velikostních skupin. Předpokládala jsem, že množství odebraných bukálních buněk může teoreticky souviset s velikostí tlamy psa, respektive se snadností důkladně odebrat vzorky. Předpokládala jsem, že odběr bukálních buněk u velkých a obřích plemen bude snadnější oproti malým a toy plemenům, která mnohdy vykazují mnohem nervóznější povahu, a rovněž velikost kartáčku a velikost jejich tlamy je v odlišném poměru oproti obřím a velkým plemenům.

Pro experimenty byli použiti vždy psi s průkazem původu. U každého plemene byli hodnoceni psi i feny, vždy se jednalo o zvířata ve výstavní kondici s perfektním stavem chrupu a dásní. Jako zástupci obřích plemen byla použita plemena bulmastif a bernský salašnický pes. Velká plemena reprezentoval československý vlčák a rhodeský ridgeback. Střední plemena byla zastoupena border kolií a bearded kolií. Zástupci malých plemen jsou border teriér a jezevčík dlouhosrstý standardní. Z toy plemen byl hodnocen jezevčík dlouhosrstý králičí.

4.2 Provedení stěrů bukálních buněk

Stěry buněk byly provedeny vždy jedním člověkem, který se snažil maximálně dodržet mechaniku pohybu kartáčku v prostoru mezi dásní a pyskem a současně vždy dodržoval dobu stěru 30 sekund. Zvířata určená pro odběr bukálních sliznic byla vždy ponechána jednu hodinu před odběrem bez krmení a napájení. Důvodem bylo omezení možné kontaminace vzorků zbytky potravy. Pro odběr bukálních buněk byl použit cytologický kartáček firmy Lotus Global Co., Ltd., London. Tento kartáček je výrobcem dodáván ve sterilní podobě. Použitý cytologický kartáček je znázorněn na obrázku 4.

Obrázek 4: Kartáček pro odběr cytologických stěrů s odebranými buňkami



Délka odběrové části kartáčku s jemnými štětinami byla 2 cm a jeho rukojeť 16,5 cm dlouhá. Velikostní parametry cytologického kartáčku umožňovaly jeho aplikaci jak u obřích, tak i u toy plemen. Na obrázku 5 je znázorněn postup při odběru buněk u plemene československý vlčák.

Obrázek 5: Odběr buněk bukálních sliznic pomocí cytologického kartáčku



Při odběru bylo postupováno asepticky, člověk se nikdy nedotýkal vlastní odběrové části kartáčku. Kartáček byl po otevření sterilního pouzdra vsunut rovnou do tlamy psa mezi dásně a pysk, kartáček se také nikdy nedotýkal chrupu psa s cílem minimalizovat kontaminaci potenciálně vznikající tlakem na povrchu psího chrupu. Odebrané kartáčky byly vloženy při standardním postupu do čisté papírové obálky, kde byly ponechány, aby důkladně vyschly.

V jednotlivých variantách experimentů byla rovněž hodnocena možnost skladování vlhkých kartáčků. Pro tyto účely byla asepticky odstřižena vlastní odběrová část, která byla následně vložena do sterilní polypropylenové zkumavky o objemu 1,5 ml. Kartáčky s odebranými buňkami byly skladovány různým způsobem podle variant experimentů. Tyto podmínky experimentů budou blíže popsány v dalších kapitolách práce.

4.3 Izolace genomické DNA psa z odebraných buněk bukálních sliznic

DNA byla izolována pomocí univerzálního kitu NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel). Pro zamezení případné kontaminace lidskou DNA byla izolace DNA prováděna vždy v jednorázových latexových rukavicích. S kartáčky bylo vždy manipulováno asepticky, laboratorní stůl byl vždy ošetřen 70 % etanolem při extrakci DNA. Při izolaci byl použit následující modifikovaný postup:

1. Pomocí sterilní pinzety byl z obálky, respektive zkumavky, vyjmut odběrový kartáček, pomocí sterilních laboratorních nůžek byla odstřižena odběrová část kartáčku, která byla asepticky přenesena do nové sterilní polypropylenové zkumavky o objemu 1,5 ml. Pinzety a nůžky byly vždy mezi jednotlivými odběry důkladně sterilizovány 70 % etanolem.
2. Do zkumavky s odebraným kartáčkem bylo přidáno 600 μ l pufru T1 a 25 μ l proteinázy K. Kartáčky byly s tímto roztokem důkladně promíchány po dobu dvakrát 5 sekund pomocí vortexu TK3S (TechnoKartell). Cílem tohoto postupu bylo důkladné smytí buněk, zachycených na štětinkách odběrového kartáčku. Zkumavky s roztokem i s kartáčky byly inkubovány ve vyhřívaném bloku Bio TDB-120 (Biosan) při teplotě 56 °C po dobu 10 minut.
3. Po proběhlé inkubaci bylo do zkumavky přidáno 600 μ l pufru B3. Zkumavky byly následně inkubovány ve vhodném vyhřívaném bloku při 70 °C po dobu 10 minut.
4. Následně byly zkumavky vyjmuty z bloku a ve stojánku ponechány vychladnout na laboratorní teplotu. Z každé zkumavky byl sterilní pinzetou vyjmut odběrový kartáček, na kterém po proběhlých procedurách již nebyly zachyceny žádné buňky.
5. Do zkumavek s roztokem lyzovaných buněk bylo přidáno 600 μ l 90 % etanolu s cílem vysrážet izolované molekuly DNA. Vysrážení DNA probíhalo při opakovaném pomalém převrácení zkumavek vedoucím k důkladnému promíchání roztoků.

6. Vysrážené molekuly DNA byly zachyceny na kolonku, kterou výrobce kitu označuje NucleoSpin® Tissue Column. Do této kolonky bylo přeneseno 450 µl roztoku lyzovaných buněk. Extrahované molekuly DNA byly zachyceny na filtr kolonky po odstředění při 11000 x g po dobu 1 minuty. Pro odstředění byla použita laboratorní stolní centrifuga Centrifuge 5415 D (Eppendorf). Odstředěná kapalina byla zachycena do sběrné zkumavky, ze které byla následně odlita. Stejný postup byl opakovaně proveden, dokud filtrem kolonky neprotekl veškerý objem lyzovaných buněk.
7. V dalším kroku izolace bylo provedeno první promytí filtrů kolonky. Pro tento účel byl do každé kolonky přidán objem 500 µl pufru BW. Kolonky vložené do sběrných nádob byly odstředěny 1 minutu při 11000 x g. Roztok zachycený ve sběrné zkumavce byl vylit.
8. Následně bylo provedeno druhé promytí kolonek pomocí 600 µl pufru B5 a centrifugace po dobu 1 minuty při 11000 x g. Kapalina zachycená ve sběrné zkumavce byla rovněž vylita.
9. Centrifugací kolonek po dobu 1 minuty při 11000 x g bylo provedeno odstranění veškerých zbytků promývacích roztoků. Výsledkem byly suché kolonky se zachycenými molekulami genomické DNA.
10. V posledním kroku izolace DNA byly tyto kolonky přeneseny do nových sterilních polypropylenových zkumavek o objemu 1,5 ml. Molekuly DNA zachycené na filtrech byly vymyty 100 µl pufru BE, který byl předem temperován na teplotu 70 °C. Kolonky s přidaným BE pufrům byly ponechány 1 minutu inkubovat v laboratorní teplotě a následně odstředěny 1 minutu při 11000 x g.

4.4 Posouzení kvality a kvantity izolované DNA z buněk bukálních sliznic

4.4.1 Posouzení vysokomolekularity extrahované DNA

Pro zjištění, zda při izolaci DNA nedošlo k nežádoucí fragmentaci genomické DNA bylo provedeno elektroforetické posouzení vysokomolekularity. Pro tento test byla provedena elektroforetická separace v cele SubCell (BioRad). Jako separační medium byl použit 1 % agarózový gel. Elektroforéza probíhala v 1 x TBE pufru při konstantním napětí 120 V po dobu 60 minut. Složení 1 x TBE pufru je popsáno v příloze práce. Pomocí elektroforézy bylo separováno vždy 10 µl izolované genomické DNA, která byla zahuštěna 2 µl nanášecího

vzorkového pufru NP. Složení tohoto pufru je rovněž popsáno v příloze bakalářské práce. Elektroforetická aparatura použitá pro tento typ analýz je uvedena na obrázku 6.

Obrázek 6: Elektroforetická aparatura SubCell (BioRad)



4.4.2 Stanovení výtěžnosti genomické DNA psů izolované z jednoho cytologického kartáčku

Pro stanovení koncentrace izolované DNA ve vzorcích jednotlivých variant experimentů byla použita UV-spektrofotometrická metoda. Fyzikální předpoklad tohoto způsobu stanovení vychází ze vztahu, že absorbance roztoku dsDNA o koncentraci $0,1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ při vlnové délce 260 nm je rovna 0,02. Jinými slovy po vynásobení absorbance měřeného vzorku při vlnové délce 260 nm číslem 50 získáme koncentraci dsDNA uvedenou v $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Pro UV-spektrofotometrické hodnocení byl použit automatický přístroj NanoPhotometer (Implen). Tento přístroj pracuje na principu mikroobjemového UV-spektrofotometru, který proměřuje každý vzorek při následujících vlnových délkách: 230 nm, 260 nm a 280 nm. Vlastní měření probíhalo vždy s 5 μl vzorku. Při měření byl dodržen následující postup:

1. Před vlastním měřením byla provedena kalibrace přístroje. Vzhledem k tomu, že izolovaná DNA byla rozpuštěna v pufru, který výrobce kitu označuje jako BE, byl tento pufr použit pro kalibraci jako tzv. slepý vzorek. To znamená, že hodnota

absorbancí při výše uvedených vlnových délkách tohoto slepého vzorku byla vždy rovna nule.

2. Každý měřený vzorek byl před vlastním měřením důkladně promíchán pipetou. Tento krok byl nezbytný pro to, že makromolekuly DNA při skladování vzorků mohou teoreticky vykazovat odlišnou koncentraci u dna než u hladiny zkumavky. Promíchání roztoku bylo provedeno vždy shodným způsobem – opakovaným pomalým nasáváním roztoku do pipety.
3. Na plošku přístroje s měřícím otvorem bylo pipetou přeneseno 5 μl promíchaného roztoku. Proměřovaná kapka extrahované DNA byla zakryta speciálním uzávěrem, který měl pro použité měření následující parametry: faktor 10, LP = 1 mm. Na obrázcích 7 a 8 je znázorněna kapka nanesená na měřící část přístroje a detailní pohled na výstupní obrazovku přístroje.
4. Pro hodnocení parametrů DNA byl použit automatický program určený pro měření DNA molekul. Měřené parametry (absorbance při jednotlivých vlnových délkách a automaticky stanovená koncentrace DNA) byly uloženy v paměti počítače.
5. Před měřením nového vzorku byla měřící ploška přístroje i použitý uzávěr důkladně otřeny tamponem z navlhčené a suché buničiny.
6. Výtěžnost izolované DNA uváděná v této práci v ng DNA, získané z jednoho cytologického kartáčku, byla stanovena podle následujícího postupu. V kapitole 4.3 je uvedeno, že veškerá izolovaná DNA byla rozpuštěna v objemu 100 μl . Po vynásobení koncentrace měřeného vzorku ($\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) číslem 100 bylo získáno celkové množství DNA v ng odpovídající jednomu stěru.

Obrázek 7: Detailní pohled na kapku roztoku DNA nanesenou na měřící část UV-spektrofotometru NanoPhotometer (Implen)



Obrázek 8: Výstupní obrazovka přístroje NanoPhotometer (Implen)



4.4.3 Vyhodnocení čistoty DNA psů izolované z bukálních buněk

Možná kontaminace organickými látkami byla posuzována rovněž na základě UV-spektrofotometrické metody. Tento postup je založen na předpokladu, že poměr absorbancí A260/A280 se u vzorků považovaných za čisté pohybuje v intervalu od 1,8 do 2. Poměr absorbancí A260/A230 se u čistých vzorků nachází v rozmezí 2,0 až 2,2. Tyto parametry byly stanoveny rovněž pomocí přístroje NanoPhotometer (Implen), který současně s měřením koncentrací vzorků ukládá do paměti počítače rovněž i výše zmíněné poměry absorbancí.

4.5 Hodnocené mikrosatelitní lokusy na autozomech psů

Vzhledem k tomu, že v experimentech, které budou popsány v dalších kapitolách této práce byl zkoumán vliv různých kontaminací DNA, bylo nutné zvolit vhodné molekulární markery, které budou sloužit k posouzení vlivu kvality izolované DNA na specifičnost PCR.

4.5.1 Hodnocené mikrosatelitní lokusy

Při řešení bakalářské práce jsem se zaměřila na hodnocení tří mikrosatelitních lokusů, které doporučují van Asch et al. (2009) pro identifikaci jednotlivců v populacích psích plemen a pro vyhodnocení sporných případů určování paternity. Van Asch et al. (2009) ve své

publikaci navrhli systém multiplex-SSR markerů. To znamená, že v jedné PCR reakci probíhala souběžně amplifikace alel většího počtu lokusů. Cílem bakalářské práce bylo posouzení vlivu kvality DNA na amplifikaci jednotlivých mikrosatelitních lokusů. Z těchto důvodů nebyla prováděna multiplex-SSR analýza, ale každý mikrosatelitní lokus byl amplifikován separátně.

Pro experimenty byly použity mikrosatelitní lokusy FH2004, FH3210 a FH3241. Lokus FH2004 objevil Francisco et al. (1996) a lokalizoval jej na 11. páru chromozomu psů (CFA11). Zbývající dva lokusy FH3210 a FH3241 popsali Guyon et al. (2003). Lokus FH3210 se nachází na 2. páru chromozomu (CFA2) a lokus FH3241 na 8. páru chromozomu (CFS8). Vzhledem k tomu, že detekce jednotlivých alel výše zmíněných mikrosatelitních lokusů byla provedena pomocí kapilární elektroforézy, bylo nutné provést fluorescenční označení F primerů jednotlivých primerových párů. V tabulce 1 jsou popsány sekvence použitých primerů a způsob fluorescenčního značení.

Tabulka 1: Charakteristika primerových párů použitých pro amplifikaci mikrosatelitních lokusů

| Primery | Fluorescenční značení | Sekvence |
|-----------------|-----------------------|------------------------|
| FH2004-F | 6-FAM | GGGGCTTTGTACTGTGACCTAC |
| FH2004-R | | ACAGACTGAGAATGCTGGGTT |
| FH3210-F | VIC | CAAGGACCACGATGAAATGACT |
| FH3210-R | | GCTGGATTCAGGAGCTGTTCA |
| FH3241-F | PET | TCCTTGTTTCCTTCCTCTGG |
| FH3241-R | | TTGGGCAAAATCAAAACTCC |

4.5.2 Komponenty reakčních směsí pro amplifikaci jednotlivých mikrosatelitních lokusů

Pro provedení této části bakalářské práce byly použity optimalizované metodické postupy školící katedry, které jsou využívány při stanovení paternity psů. Optimalizované složení reakčních komponent je uvedeno v tabulkách 2, 3 a 4.

Tabulka 2: Komponenty amplifikační směsi pro amplifikaci lokusu FH2004

| Komponenty | Koncentrace |
|---------------------------------|---------------------------------|
| DNA | 20 ng.12,5 μl^{-1} |
| Tris-HCl | 10 mM |
| MgCl ₂ | 1,5 mM |
| KCl | 50 mM |
| FH2004-F | 0,12 μM |
| FH2004-R | 0,12 μM |
| dNTP | 200 μM |
| BSA | 5 ng.12,5 μl^{-1} |
| Enhancer - TMA oxalát (Top Bio) | 2 mM |
| <i>Taq</i> polymeráza (Roche) | 0,5 U . 12,5 μl^{-1} |
| Objem | 12,5 μl |
| pH | 8,3 |

Tabulka 3: Komponenty amplifikační směsi pro amplifikaci lokusu FH3210

| Komponenty | Koncentrace |
|---------------------------------|---------------------------------|
| DNA | 20 ng.12,5 μl^{-1} |
| Tris-HCl | 10 mM |
| MgCl ₂ | 1,5 mM |
| KCl | 50 mM |
| FH3210-F | 0,12 μM |
| FH3210-R | 0,12 μM |
| dNTP | 200 μM |
| BSA | 5 ng.12,5 μl^{-1} |
| Enhancer - TMA oxalát (Top Bio) | 2 mM |
| <i>Taq</i> polymeráza (Roche) | 0,5 U . 12,5 μl^{-1} |
| Objem | 12,5 μl |
| pH | 8,3 |

Tabulka 4: Komponenty amplifikační směsi pro amplifikaci lokusu FH3241

| Komponenty | Koncentrace |
|---------------------------------|---------------------------------|
| DNA | 20 ng.12,5 μl^{-1} |
| Tris-HCl | 10 mM |
| MgCl ₂ | 1,5 mM |
| KCl | 50 mM |
| FH3241-F | 0,24 μM |
| FH3241-R | 0,24 μM |
| dNTP | 200 μM |
| BSA | 5 ng.12,5 μl^{-1} |
| Enhancer - TMA oxalát (Top Bio) | 2 mM |
| Taq polymeráza (Roche) | 0,5 U . 12,5 μl^{-1} |
| Objem | 12,5 μl |
| pH | 8,3 |

4.5.3 Teplotní a časové podmínky amplifikace jednotlivých mikrosatelitních lokusů

Rovněž pro amplifikaci vybraných markerů byly použity postupy, které byly na pracovišti školící katedry předem důkladně optimalizovány. Všechny mikrosatelitní lokusy byly amplifikovány při použití shodného teplotního a časového profilu. Tento profil je popsán v tabulce 5.

Tabulka 5: Teplotní a časový profil amplifikace vybraných SSR lokusů

| | | | |
|-------------------------------------|------|-------------|----------|
| Počáteční denaturace, predenaturace | 95°C | 900 sekund | 1 cyklus |
| Denaturace | 94°C | 30 sekund | 30 cyklů |
| Annealing | 60°C | 60 sekund | |
| Prodlužování | 72°C | 30 sekund | |
| Závěrečné prodlužování | 72°C | 3600 sekund | 1 cyklus |

Pro amplifikaci byl použit termocykler C1000TM Thermal Cycler (BioRad). Na obrázku 9 je znázorněno jádro tohoto termocykleru s vloženými zkumavkami.

Obrázek 9: Termocykler C1000™ Thermal Cycler (BioRad)



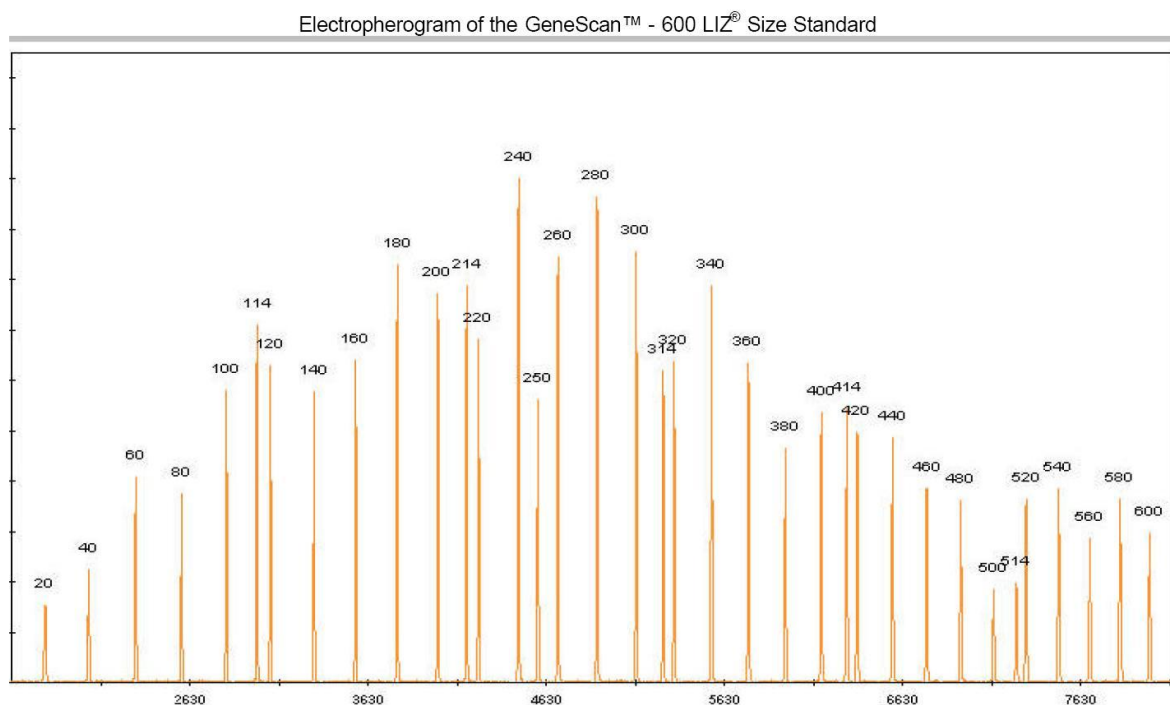
4.5.4 Příprava amplifikovaných vzorků na separaci v kapilární elektroforéze

Velice častým jevem při amplifikaci mikrosatelitních markerů je, že i ze shodného množství templátové DNA amplifikují různé mikrosatelitní markery variabilní množství produktů. Tato skutečnost se může projevovat při fragmentační analýze tím, že relativní svítivost – výška píků je u některých lokusů extrémně velká a u jiných lokusů naopak mnohdy neměřitelná. Z těchto důvodů je nutné vždy optimalizovat vhodné ředění vzorků. Při řešení bakalářské práce bylo optimalizováno ředění pomocí ddH₂O, které je uvedeno v tabulce 6.

Vzhledem k tomu, že kapilární elektroforéza fragmentuje ssDNA fragmenty, bylo nutné provést rovněž denaturaci amplifikovaných dsDNA produktů. Pro denaturaci byl použit vysoce čistý Hi-Di formamid (Applied Biosystems).

Během kapilární elektroforézy je rovněž automaticky odečtena velikost jednotlivých alel mikrosatelitních lokusů. Odečtení velikostí je založeno na principu komparace mobility amplifikovaných alel a mobilit jednotlivých fragmentů fluorescenčně značeného velikostního standardu. Jako velikostní standard byl použit GeneScan™-600 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems). Fragmenty hmotnostního standardu jsou uvedeny na následujícím obrázku.

Obrázek 10: Velikostní standard GeneScan™-600 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems)



Tabulka 6: Ředění PCR produktů a jejich příprava pro kapilární elektroforézu

| SSR lokus | Ředění PCR | | Vzorek pro fragmentační analýzu | | |
|---------------|------------------|-----------------------|---------------------------------|--------------|---------------------|
| | PCR produkt (μl) | H ₂ O (μl) | Ředěný PCR produkt (μl) | LIZ 600 (μl) | Hi-Di formamid (μl) |
| FH2004 | 1 | 19 | 1 | 0,2 | 12 |
| FH3210 | 1 | 19 | 1 | 0,2 | 12 |
| FH3241 | 1 | 9 | 1 | 0,2 | 12 |

Vzorky určené k denaturaci byly inkubovány v PCR stripech v termocykleru C1000™ Thermal Cycler (BioRad) při teplotě 95 °C po dobu 10 minut. Jednotlivé stripy byly přelepeny speciální folií. Během této doby došlo k denaturaci dvouřetězcových fragmentů DNA. Jednořetězcová DNA byla následně ochlazena na teplotu 4 °C a jednotlivé stripy byly přeneseny do podavače genetického analyzátoru.

4.5.5 Kapilární elektroforéza amplifikovaných mikrosatelitních lokusů

Denaturované produkty amplifikace, které obsahovaly alely mikrosatelitních lokusů a hmotnostní standard, byly fragmentovány pomocí přístroje ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Pro separaci byl použit polymer POP4, který je doporučován pro fragmentační analýzu mikrosatelitních lokusů. Fragmentační analýza probíhala v kapiláře

dlouhé 47 cm se čtecí délkou 36 cm. Konkrétní podmínky kapilární elektroforézy jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7: Nastavení genetického analyzátoru pro detekci alel hodnocených mikrosatelitních lokusů

| Parametry separace | Hodnoty přístroje |
|---------------------------|----------------------|
| Délka kapiláry (cm) | 36 |
| Modul | GS STR POP4 (1ml) G5 |
| Polymer | POP4 |
| Virtuální filtr | G5 |
| Doba nástřiku (s) | 5 |
| napětí při nástřiku (kV) | 15 |
| teplota při separaci (°C) | 60 |
| Napětí při separaci (kV) | 15 |
| Doba separace (minuty) | 25 |

CCD kamera genetického analyzátoru snímá intenzitu fluorescenčního signálu označených fragmentů DNA procházejících proměřovaným okénkem kapiláry. Výstupem tohoto snímání jsou tzv. chromatogramy, ve kterých je automaticky odečtena velikost alel. Výška píků (relativní svítivost fragmentů) koreluje s množstvím amplifikovaných alel. Odečtení velikostí alel bylo provedeno pomocí programu GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems).

4.6 Vliv plemene na množství a kvalitu izolované DNA z buněk bukálních sliznic

4.6.1 Hodnocená plemena a struktura experimentu

Pro experiment byla vybrána již výše zmíněná plemena odpovídající různým velikostním kategoriím. Struktura experimentu je patrná z tabulky 20, která je uvedena ve výsledkové části bakalářské práce. Z této tabulky vyplývá, že u každého plemene bylo provedeno hodnocení dvou jedinců opačného pohlaví. U každého jedince byl proveden odběr

buněk bukálních sliznic vždy z pravé a levé tváře. To znamená, že u každého hodnoceného zvířete byly nezávisle izolovány dva vzorky.

4.6.2 Izolace DNA z buněk bukálních sliznic různých plemen psů

Izolace byla provedena podle postupu, který je detailně popsán v kapitole 4.3. Kvalita izolované DNA z různých psích plemen byla posouzena pomocí postupů uvedených v kapitole 4.4. Odběry sliznic byly provedeny u všech zvířat vždy v ranních hodinách. Cytologické kartáčky byly ponechány asepticky důkladně vyschnout a krátkodobě 1 – 2 dny uskladněny v papírových obálkách při – 20 °C v mrazicím boxu (Liebher).

4.6.3 Statistické vyhodnocení vlivu plemene a pohlaví zvířete na výtěžnost DNA a na parametry její čistoty

Ze schématu pokusu vyplývá, že data uvedená ve výsledkové tabulce 9 bylo možné roztrždit z hlediska následujících třídících faktorů: plemeno, pohlaví a izolovaný vzorek z pravé či levé tváře. Získaná data byla statisticky vyhodnocena pomocí vícenásobné analýzy rozptylu s podrobnějším vyhodnocením metodou podle Tukeyho. Pro statistickou analýzu byl použit program STATISTICA Cz 9.1 (StatSoft, Inc.). Výše popsané schéma pokusu bylo aplikováno na hodnocení výtěžnosti DNA z jednoho cytologického kartáčku, poměru absorbancí A260/A280 a poměru absorbancí A260/A230.

4.7 Vliv opakovaného odběru buněk bukální sliznice jednoho psa na výtěžnost a kvalitu izolované DNA

4.7.1 Hodnocené plemeno a přehled časových intervalů odběru buněk

Cílem tohoto experimentu bylo ověřit, jaký vliv má opakovaný odběr buněk bukálních sliznic v relativně krátkých intervalech (30 minut) na kvalitu a kvantitu extrahované DNA. Experimenty byly provedeny u plemene rhodeský ridgeback. Byl použit jeden pes – samec tohoto plemene. Časové schéma odběru bukálních buněk je patrné z výsledkové tabulky 14. Z této tabulky vyplývá, že v průběhu jednoho dne v časovém rozmezí od 8:00 do 14:30 hodin bylo provedeno 14 odběrů vzorků vždy z pravé i levé tváře. Během této doby hodnocený pes nebyl krměn, měl však volný přístup k napájení. Odebrané cytologické kartáčky byly

ponechány, aby důkladně vyschly a po uložení v papírové obálce byly do následujícího dne skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazicím boxu (Liebher).

4.7.2 Izolace DNA z opakovaně odebíraných vzorků bukálních buněk jednoho psa

Izolace DNA byla provedena standardním postupem popsáným v kapitole 4.3 následující den po odběru bukálních sliznic. Pro hodnocení množství izolované DNA a parametrů A260/A280 a A260/A230 byl použit metodický postup uvedený v kapitole 4.4. Cílem tohoto experimentu bylo rovněž ověřit spolehlivost – reprodukovatelnost opakovaných měření jednoho vzorku. Z těchto důvodů byla koncentrace a poměry absorbancí měřeny u každého vzorku ve třech opakováních.

4.7.3 Statistické vyhodnocení závislosti výtěžnosti a kvality DNA na pořadí opakovaného odběru buněk bukálních sliznic

Získaná data (výtěžnost DNA A260/A280 a A260/A230) byla vyhodnocena pomocí regresní analýzy. Touto analýzou bylo zjišťováno, jak výše uvedené parametry závisejí na počtu opakování odběrů. Byl hodnocen lineární, exponenciální, logaritmický, polynomický a mocninný typ regrese. Výběr regresní funkce, která nejvíce odpovídá struktuře rozložení dat, byl následně proveden podle hodnoty koeficientu determinace. Statistická analýza byla provedena pomocí programu Excel 2007 (Microsoft Office).

4.8 Vliv doby a teploty skladování cytologických kartáčků s odebranými buňkami na kvalitu a kvantitu izolované DNA

4.8.1 Volba modelového plemene, sušení vzorku a rozdílné doby skladování biologického materiálu

Experimenty prováděné v této části bakalářské práce měly za cíl simulovat vliv stupně vysušení odebraných bukálních stěrů a dobu nutnou k zaslání vzorků do genetické laboratoře na kvalitu a kvantitu izolované DNA. Pro tuto část experimentu bakalářské práce bylo zvoleno plemeno československý vlčák. Hodnoceni byli dva jedinci – sourozenci pes a fena, které vlastní stejná chovatelka. Během tří dnů byly u každého hodnoceného zvířete získány standardně odebrané cytologické kartáčky, které byly následně určeny pro jednotlivé

varianty experimentu. Tyto varianty jsou patrné z tabulky 15, která je uvedena ve výsledkové části bakalářské práce. Z této tabulky vyplývá, že u každého zvířete byla jedna polovina vzorků vysušena standardním způsobem a kartáčky byly do termínu izolace krátkodobě uchovávány v papírových obálkách. Druhá polovina vzorků od každého jedince byla po odebrání ve vlhké podobě okamžitě uzavřena do sterilní polypropylenové zkumavky o objemu 1,5 ml. Izolace DNA tudíž u této části probíhala z nevysušených vzorků. Dalšími variantami tohoto pokusu byly různé doby skladování (5 hodin, 3 dny, 7 dnů a 14 dnů). Po tyto doby byly papírové obálky a polypropylenové zkumavky uchovávány v laboratorním termostatu Shaking Incubator MB-205 (N-Biotek), při konstantní teplotě +25 °C. U každé z výše uvedených variant a subvariant byly hodnoceny tři nezávisle odebrané individuální vzorky.

4.8.2 Izolace DNA z různým způsobem skladovaných cytologických kartáčků s odebranými buňkami

Již z kapitoly 4.8.1 vyplývá, že polovina vzorků byla extrahována z vysušených kartáčků a druhá polovina z vlhkých kartáčků. Pro izolaci DNA i pro hodnocení výtěžnosti a parametrů čistoty byl použit standardní metodický postup uvedený v kapitolách 4.3 a 4.4.

4.8.3 Statistické vyhodnocení vlivu různého způsobu skladování biologického materiálu na výtěžnost a kvalitu izolované DNA

Z tabulky 15 uvedené ve výsledcích bakalářské práce vyplývá, že tento pokus byl navržen tak, aby získaná data bylo možné vyhodnotit pomocí analýzy rozptylu vícenásobných třídění. Třídícími faktory této analýzy byl způsob vysušení vzorku (suché nebo vlhké), pohlaví zvířete (pes nebo fena), doba skladování (5 hodin, 3 dny, 7 dnů nebo 14 dnů) a individuálně izolovaný vzorek (vzorek 1, 2 nebo 3). Podrobné vyhodnocení statisticky průkazných diferencí bylo provedeno metodou podle Tukeyho. Pro provedení analýzy rozptylu byl použit program STATISTICA Cz 9.1 (StatSoft, Inc.). Výše uvedené schéma pokusu bylo aplikováno při hodnocení výtěžnosti DNA z jednoho stěru, poměru A260/A280 a poměru A260/A230.

4.9 Simulace kontaminace cytologických kartáčků různými organickými látkami

4.9.1 Výběr modelového plemene a organických kontaminujících látek

Cílem těchto pokusů bylo zjistit, zda různé organické látky, simulující zbytky potravy nebo zbytky organických látek, mají vliv na kvalitu a kvantitu DNA a na její vhodnost pro molekulární analýzy založené na principu PCR. Experimenty byly provedeny u čtyř jedinců plemene československý vlčák. Jednalo se o dva psy a dvě feny, které vlastní stejná majitelka. Bukální buňky byly odebrány standardním způsobem, následně byly vysušeny a jeden den byly uchovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazicím boxu (Liebher). V následující tabulce je uveden přehled a bližší charakteristika jednotlivých kontaminujících látek. Každá kontaminující látka byla v množství uvedeném v tabulce 8 přidána k jednotlivým kartáčkům, které byly umístěny v izolační polypropylenové zkumavce. To znamená, že současně s izolovanou genomickou DNA psa probíhala extrakce DNA i z přídatku kontaminujících biologických látek.

Tabulka 8: Podrobný přehled kontaminujících látek – 1. část

| Číslo | Kontaminant | Charakteristika | Množství | Složení |
|-------|--------------------------------|---|----------|---|
| 1 | Mrkev (<i>Daucus carota</i>) | syrový kořen | 20 mg | voda, bílkoviny, cukry, vláknina, mastné kyseliny, draslík, sodík, vápník, vitamín C, β -karoten |
| 2 | Rýže (<i>Oryza sativa</i>) | vařené obilky | 20 mg | sacharidy, bílkoviny, voda, fosfor, draslík, mastné kyseliny |
| 3 | Granule | Hill's Canine Adult Large Breed Chicken | 5 mg | kukuřice, drůbeží masová moučka (min. 20 % kuřecího masa), mouka ze sojových bobů, živočišné tuky, kukuřičný lepek, bílkovinný hydrolyzát, lněné semínko, rostlinný olej, chlorid sodný, uhličitan vápenatý, vitamíny A, D3, železo, jód, měď, mangan, zinek, selen |
| 4 | Suchar | Pedigree Biscrok | 5 mg | obiloviny, maso a výrobky živočišného původu (min. 4 % kuřecího masa, min. 4 % hovězího masa, min. 4 % morkové kosti), minerální látky, oleje a tuky, vedlejší produkty rostlinného původu, vitamíny A, D, E, kyselina ortofosforečná, sorban draselný, disiřičitan sodný, kyselina citrónová |

Tabulka 8: Podrobný přehled kontaminujících látek – 2. část

| Číslo | Kontaminant | Charakteristika | Množství | Složení |
|-------|---|--------------------------|----------|---|
| 5 | Jílek vytrvalý (<i>Lolium perene</i>) | čerstvá listová čepel | 5 mg | celulóza, hemicelulóza, voda, chlorofyl, sacharidy, anorganické sloučeniny |
| 6 | Holub domácí (<i>Columba livia</i>), polský rys | prapor letky | 5 mg | beta keratin, síra, voda, tuky, proteiny |
| 7 | Lípa srdčitá (<i>Tilia cordata</i>) | kůra kmene | 5 mg | celulóza, hemicelulóza, lignin |
| 8 | Oves setý (<i>Avena sativa</i>) | ovesné vločky | 10 mg | bílkoviny, nenasycené mastné kyseliny, slizové látky, vitamíny B1, B6, E, železo, vápník, fosfor, lecitin |

4.9.2 Izolace DNA z bukálních buněk psa záměrně kontaminovaných různými organickými látkami

Postup při izolaci DNA i při posuzování její kvantity a kvality se nelišil od standardního metodického postupu, který je uvedený v kapitolách 4.3 a 4.4.

4.9.3 Statistické vyhodnocení vlivu kontaminujících organických látek na kvalitu a kvantitu izolované DNA z bukálních buněk

Ze struktury získaných dat uvedených v tabulce 20 je patrné, že experiment byl koncipován tak, aby získané výsledky bylo možné vyhodnotit pomocí vícenásobné analýzy rozptylu. Třídícími faktory této analýzy byly kontaminující látky (krmné granule, syrová mrkev, vařená rýže, psí suchar, ovesné vločky, peří holuba domácího, čepel jílků vytrvalého, kůra lípy srdčité), pohlaví psa (pes a fena), konkrétní jedinec zastupující samčí a samičí pohlaví (jedinec 1 a jedinec 2) a individuálně izolovaný vzorek (vzorek 1 a vzorek 2). Podrobnější vyhodnocení analýzy rozptylu bylo provedeno metodou podle Tukeyho. Analýza rozptylu zpracovaná na základě programu STATISTICA Cz 9.1 (StatSoft, Inc.) byla aplikována na parametry množství izolované DNA z jednoho stěru, poměry absorbancí A260/A280 a A260/A230.

4.9.4 Ověření vlivu kontaminujících organických látek na vhodnost DNA pro molekulární analýzy pracující na principu PCR

Genomická DNA izolovaná z jednotlivých variant experimentu plynoucích z kapitoly 4.9.3 byla použita jako templátová DNA pro amplifikaci tří mikrosatelitních lokusů. Molekulární analýza byla provedena podle metodického postupu popsaného v kapitole 4.5.

5. VÝSLEDKY

5.1 Vliv velikosti plemene na provádění odběru buněk bukálních sliznic

Do experimentu byli úmyslně zařazeni zástupci obřích, velkých, středních, malých a toy plemen. Ve všech případech se jednalo o psy plně socializované, kteří byli navyklí z výstavních akcí na kontrolu chrupu prováděnou cizí osobou. Odběr vzorků u naprosté většiny plemen nečinil žádný problém. Všechna zvířata akceptovala vsunutí kartáčku do tlamy a neprojevovala známky agresivity ani strachu. Jedinou výjimku tvořili zástupci toy plemene – králíčí jezevčáci. U nich byl odběr vzorků poměrně problematický, oba jedinci se snažili zakusovat do kartáčku a odběr bez asistence chovatele nebyl možný.

V tabulce 9 je znázorněno schéma experimentu a jsou zde uvedeny charakteristiky izolované DNA.

Tabulka 9: Charakteristika DNA izolované z bukálních buněk různých plemen – 1. část (zkratky plemen psů jsou vysvětleny v kapitole 3.2.3)

| Plemeno | Pohlaví | Množství DNA z 1 stěru [ng] | | A260/A280 | | A260/A230 | |
|---------|---------|-----------------------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|
| | | pravá tvář | levá tvář | pravá tvář | levá tvář | pravá tvář | levá tvář |
| BM | pes | 8250 | 8450 | 1,975 | 1,952 | 2,178 | 2,115 |
| BM | fena | 8650 | 8950 | 1,912 | 1,936 | 2,165 | 2,135 |
| BSP | pes | 8200 | 8650 | 1,936 | 1,911 | 2,198 | 2,174 |
| BSP | fena | 8900 | 8450 | 1,945 | 1,962 | 2,145 | 2,166 |
| ČSV | pes | 8600 | 8150 | 1,921 | 1,977 | 2,111 | 2,153 |
| ČSV | fena | 8450 | 8350 | 1,933 | 1,905 | 2,169 | 2,132 |
| RR | pes | 8750 | 8800 | 1,975 | 1,941 | 2,133 | 2,148 |
| RR | fena | 8900 | 8650 | 1,925 | 1,912 | 2,16 | 2,189 |
| BD | pes | 6500 | 6950 | 1,931 | 1,952 | 2,114 | 2,154 |
| BD | fena | 6850 | 6300 | 1,955 | 1,91 | 2,174 | 2,115 |
| BOC | pes | 5350 | 5250 | 1,951 | 1,989 | 2,154 | 2,126 |
| BOC | fena | 5600 | 5300 | 1,921 | 1,965 | 2,136 | 2,166 |
| BRT | pes | 5900 | 5450 | 1,909 | 1,958 | 2,173 | 2,175 |
| BRT | fena | 5400 | 5550 | 1,956 | 1,963 | 2,166 | 2,119 |

Tabulka 9: Charakteristika DNA izolované z bukalních buněk různých plemen – 2. část
(zkratky plemen psů jsou vysvětleny v kapitole 3.2.3)

| Plemeno | Pohlaví | Množství DNA z 1 stěru [ng] | | A260/A280 | | A260/A230 | |
|------------|---------|-----------------------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|
| | | pravá tvář | levá tvář | pravá tvář | levá tvář | pravá tvář | levá tvář |
| JSD | pes | 5750 | 5250 | 1,936 | 1,927 | 2,142 | 2,135 |
| JSD | fena | 5150 | 5650 | 1,947 | 1,961 | 2,121 | 2,142 |
| JKD | pes | 1450 | 1350 | 1,942 | 1,933 | 2,181 | 2,136 |
| JKD | fena | 1300 | 1450 | 1,971 | 1,953 | 2,149 | 2,171 |

Vysokomolekularita izolované DNA byla testována pomocí elektroforetické separace. Na následujícím obrázku je uveden elektroforeogram DNA izolované z bukalních sliznic různých plemen. U každého vzorku bylo separováno 100 ng genomické DNA.

Obrázek 11: Elektroforetický test vysokomolekularity DNA izolované z bukalních buněk různých psích plemen



Údaje uvedené v tabulce 9 byly vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu vícenásobného třídění, kde třídícími kategoriemi bylo plemeno a pohlaví. Cílem analýzy bylo prokázat, zda tyto dva faktory mají statisticky významný vliv na množství DNA izolované z jednoho

kartáčku a poměry absorbancí A260/A280 a A260/A230 na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. V následující tabulce jsou uvedeny výsledky analýzy rozptylu pro výtěžnost DNA z jednoho kartáčku. Z této tabulky vyplývá, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ bylo zjištěno, že mezi plemeny lze nalézt alespoň jednu dvojici plemen, jejichž průměrné množství DNA izolované z jednoho kartáčku se bude statisticky významně lišit. Naopak u třídícího kritéria pohlaví nebyly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ zjištěny statisticky významné rozdíly.

Tabulka 10: Statistické hodnocení vlivu plemene a pohlaví na množství DNA izolované z jednoho cytologického kartáčku – výsledky analýzy rozptylu

| Složky variability | Stupně volnosti | Hodnota F-testu | Pravděpodobnost p |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Absolutní člen | 1 | 27869,76* | 0,000000 |
| Plemeno | 8 | 423,80* | 0,000000 |
| Pohlaví | 1 | 0,31 | 0,584050 |
| Chyba | 26 | | |

Vzhledem, k tomu, že analýza rozptylu prokázala statisticky významný vliv plemene na výtěžnost DNA, bylo přistoupeno k podrobnějšímu vyhodnocení analýzy rozptylu metodou podle Tukeyho. Výsledky podrobnějšího vyhodnocení uvádí následující tabulka.

Tabulka 11: Podrobnější vyhodnocení analýzy rozptylu výtěžností DNA způsobené plemeny metodou podle Tukeyho (zkratky plemen jsou vysvětleny v kapitole 3.2.3)

| Plemeno | Průměrná výtěžnost DNA z 1 cytologického kartáčku [ng] | | | | | | | | |
|------------|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | BM | BSP | ČSV | RR | BD | BOC | BRT | JSD | JKD |
| | 8575,0 | 8550,0 | 8382,5 | 8775,0 | 6650,0 | 5375,0 | 5575,0 | 5450,0 | 1387,5 |
| BM | | 1,000000 | 0,957897 | 0,947923 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 |
| BSP | 1,000000 | | 0,981431 | 0,903693 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 |
| ČSV | 0,957897 | 0,981431 | | 0,341776 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 |
| RR | 0,947923 | 0,903693 | 0,341776 | | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 |
| BD | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | | 0,000149 | 0,000163 | 0,000150 | 0,000149 |
| BOC | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | | 0,947923 | 0,999936 | 0,000149 |
| BRT | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000163 | 0,947923 | | 0,997295 | 0,000149 |
| JSD | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000150 | 0,999936 | 0,997295 | | 0,000149 |
| JKD | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | 0,000149 | |

V tabulce 11 jsou dvojice plemen, které se z hlediska průměrné výtěžnosti DNA z jednoho kartáčku lišily statisticky významně na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, zvýrazněny

červenou barvou. V této tabulce jsou také uvedeny hodnoty pravděpodobností, se kterými se porovnávané průměry shodují. Z této tabulky je možné vyvodit rovněž následující závěry. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi průměrnými výtěžnostmi DNA u následujících dvojic plemen:

- bulmastif a bernský salašnický pes
- bulmastif a československý vlčák
- bulmastif a rhodeský ridgeback
- bernský salašnický pes a československý vlčák
- bernský salašnický pes a rhodeský ridgeback
- československý vlčák a rhodeský ridgeback
- border kolie a border teriér
- border kolie a jezevčík standardní dlouhosrstý
- border teriér a jezevčík standardní dlouhosrstý

Z těchto dvojic plemen vyplývá obecné shrnutí, že ve výtěžnosti DNA se na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nelišila obří a velká plemena. Současně nebyly prokázány rozdíly rovněž mezi většinou středně velkých plemen. Největší rozdíly byly zjištěny naopak mezi obřími respektive velkými plemeny a plemeny malými a toy.

Stejná struktura experimentu včetně analýzy rozptylu byla aplikována rovněž na hodnocení dvou parametrů čistoty A260/A280 a A260/A230. Výsledky analýzy rozptylu pro tyto dva parametry jsou uvedeny v tabulkách 12 a 13, ze kterých vyplývá, že u obou parametrů nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, které by byly vysvětlovány třídícím faktorem plemeno a pohlaví.

Tabulka 12: Statistické hodnocení vlivu plemene a pohlaví na poměr absorbancí A260/A280 u DNA izolované z jednoho cytologického kartáčku – výsledky analýzy rozptylu

| Složky variability | Stupně volnosti | Hodnota F-testu | Pravděpodobnost p |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Absolutní člen | 1 | 228891,9 | 0,000000 |
| Plemeno | 8 | 0,3 | 0,943285 |
| Pohlaví | 1 | 0,3 | 0,570542 |
| Chyba | 26 | | |

Tabulka 13: Statistické hodnocení vlivu plemene a pohlaví na poměr absorbancí A260/A230 u DNA izolované z jednoho cytologického kartáčku – výsledky analýzy rozptylu

| Složky variability | Stupně volnosti | Hodnota F-testu | Pravděpodobnost p |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Absolutní člen | 1 | 293775,5 | 0,000000 |
| Plemeno | 8 | 1,0 | 0,493569 |
| Pohlaví | 1 | 0,0 | 0,889725 |
| Chyba | 26 | | |

Vzhledem k tomu, že analýzou rozptylu nebyl prokázán statisticky významný vliv na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ pro faktor plemeno a pohlaví, nebylo provedeno následné podrobné vyhodnocení.

5.2 Vyhodnocení vlivu opakovaného odběru buněk bukálních sliznic na kvantitu a kvalitu izolované DNA

Cílem tohoto modelového experimentu bylo zjistit, zda opakovaný odběr buněk bukálních sliznic může vést ve finále k snížení množství extrahované DNA. Pokus byl navržen proto, že řada chovatelů, kteří odebírají sami odebírají vzorky určené ke genetickým analýzám, mnohdy pokládají dotazy, jestli například při neúmyslné kontaminaci jednoho cytologického kartáčku mohou vzápětí provést další odběr u téhož jedince. Experiment byl realizován u jednoho psa u plemene rhodeský ridgeback, u kterého bylo prováděno 14 opakovaných odběrů v časových intervalech, které jsou uvedeny v tabulce 14.

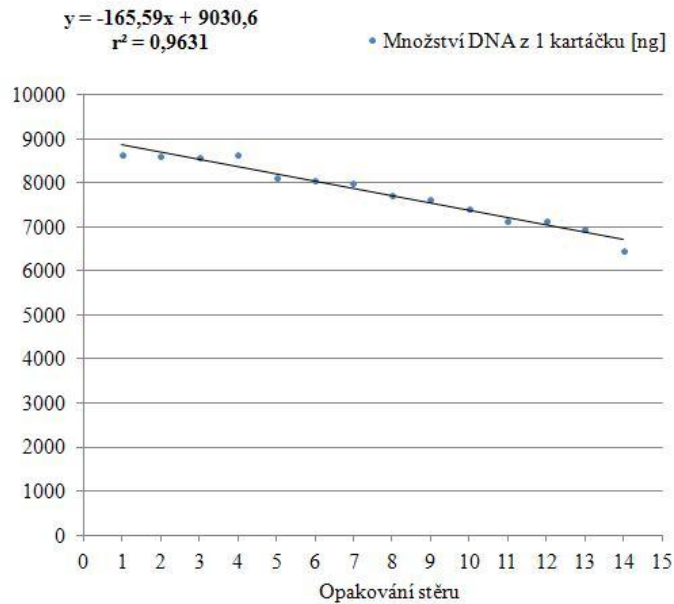
Experiment byl navržen tak, aby získaná data bylo možné vyhodnotit na základě regresní a korelační analýzy. Pro získání většího počtu dat byly prováděny odběry bukálních sliznic vždy z obou tváří pokusného psa. Tyto tváře jsou spíše formálně v tabulce označeny jako pravá a levá. Nepředpokládala jsem, že faktor tváře je významným faktorem, který ovlivní výtěžnost izolované DNA. Proto získaná data nebyla statisticky zpracována analýzou rozptylu.

Tabulka 14: Charakteristika DNA izolované z opakovaných odběrů buněk bukálních sliznic jednoho psa

| Číslo stěru | Doba stěru | Tvář | Množství DNA z 1 kartáčku [ng] | | | A260/A280 | | | A260/A230 | | |
|----------------|---------------|-------|-----------------------------------|------|------|-----------|-------|-------|-----------|-------|-------|
| | | | M1 | M2 | M3 | M1 | M2 | M3 | M1 | M2 | M3 |
| 1 | 8:00 | pravá | 8700 | 8700 | 8700 | 1,989 | 1,989 | 1,989 | 2,117 | 2,117 | 2,117 |
| | | levá | 8600 | 8600 | 8550 | 1,991 | 1,991 | 1,991 | 2,119 | 2,119 | 2,118 |
| 2 | 8:30 | pravá | 8650 | 8650 | 8650 | 1,997 | 1,995 | 1,995 | 2,121 | 2,121 | 2,121 |
| | | levá | 8550 | 8600 | 8600 | 1,913 | 1,913 | 1,913 | 2,135 | 2,135 | 2,135 |
| 3 | 9:00 | pravá | 8600 | 8550 | 8550 | 1,974 | 1,974 | 1,974 | 2,141 | 2,141 | 2,141 |
| | | levá | 8600 | 8600 | 8600 | 1,945 | 1,945 | 1,945 | 2,111 | 2,111 | 2,111 |
| 4 | 9:30 | pravá | 8650 | 8650 | 8650 | 1,988 | 1,988 | 1,988 | 2,123 | 2,123 | 2,123 |
| | | levá | 8600 | 8600 | 8600 | 1,99 | 1,99 | 1,992 | 2,159 | 2,159 | 2,159 |
| 5 | 10:00 | pravá | 8150 | 8150 | 8150 | 1,963 | 1,963 | 1,963 | 2,181 | 2,181 | 2,181 |
| | | levá | 8050 | 8050 | 8050 | 1,987 | 1,987 | 1,987 | 2,145 | 2,145 | 2,145 |
| 6 | 10:30 | pravá | 8000 | 8000 | 8000 | 1,945 | 1,945 | 1,945 | 2,153 | 2,152 | 2,153 |
| | | levá | 8100 | 8100 | 8150 | 1,965 | 1,966 | 1,966 | 2,178 | 2,178 | 2,178 |
| 7 | 11:00 | pravá | 8050 | 8050 | 8050 | 1,983 | 1,983 | 1,983 | 2,118 | 2,118 | 2,118 |
| | | levá | 7950 | 7950 | 7950 | 1,911 | 1,911 | 1,911 | 2,151 | 2,151 | 2,151 |
| 8 | 11:30 | pravá | 7800 | 7800 | 7800 | 1,965 | 1,965 | 1,965 | 2,111 | 2,111 | 2,112 |
| | | levá | 7650 | 7650 | 7650 | 1,989 | 1,989 | 1,989 | 2,121 | 2,121 | 2,121 |
| 9 | 12:00 | pravá | 7550 | 7550 | 7550 | 1,971 | 1,971 | 1,971 | 2,133 | 2,133 | 2,133 |
| | | levá | 7700 | 7700 | 7700 | 1,901 | 1,901 | 1,901 | 2,151 | 2,151 | 2,151 |
| 10 | 12:30 | pravá | 7500 | 7450 | 7450 | 1,965 | 1,965 | 1,965 | 2,149 | 2,149 | 2,149 |
| | | levá | 7350 | 7350 | 7350 | 1,955 | 1,957 | 1,955 | 2,162 | 2,162 | 2,162 |
| 11 | 13:00 | pravá | 7100 | 7100 | 7100 | 1,968 | 1,967 | 1,968 | 2,114 | 2,115 | 2,115 |
| | | levá | 7150 | 7150 | 7150 | 1,993 | 1,993 | 1,994 | 2,138 | 2,138 | 2,138 |
| 12 | 13:30 | pravá | 7200 | 7200 | 7150 | 1,925 | 1,925 | 1,925 | 2,141 | 2,141 | 2,141 |
| | | levá | 7050 | 7050 | 7050 | 1,914 | 1,914 | 1,914 | 2,162 | 2,162 | 2,162 |
| 13 | 14:00 | pravá | 6900 | 6900 | 6900 | 1,961 | 1,961 | 1,961 | 2,159 | 2,159 | 2,158 |
| | | levá | 7000 | 7000 | 7000 | 1,97 | 1,97 | 1,941 | 2,118 | 2,118 | 2,118 |
| 14 | 14:30 | pravá | 6500 | 6500 | 6500 | 1,988 | 1,988 | 1,988 | 2,154 | 2,154 | 2,154 |
| | | levá | 6450 | 6450 | 6400 | 1,975 | 1,975 | 1,975 | 2,147 | 2,147 | 2,147 |

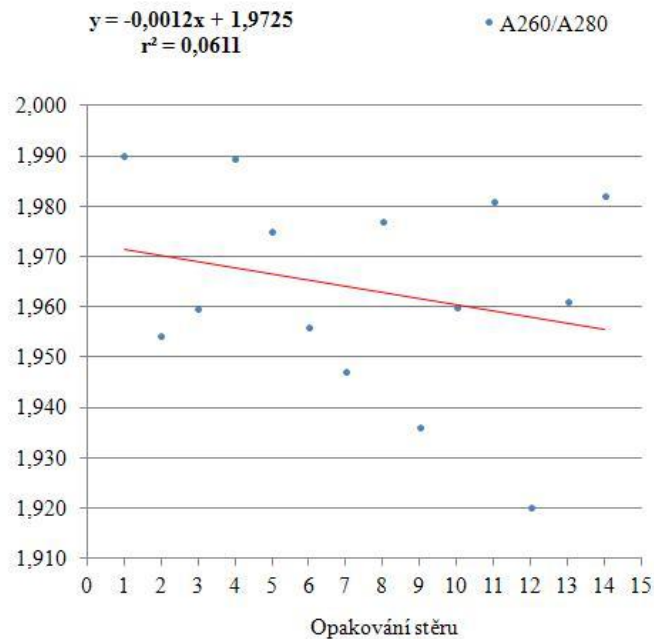
Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí programu Excel (Microsoft office). Postup při vyhodnocení byl takový, že na data uvedená v tabulce 14 byly aplikovány různé regresní modely, jejichž cílem bylo zjistit, jak těsně závisí množství DNA izolované z jednoho kartáčku, A260/A280 a A260/A230 na počtu opakovaných odběrů. Na základě koeficientu determinace bylo zjištěno, že u výtěžnosti DNA této závislosti nejlépe odpovídá lineární regresní model, jehož výsledek je prezentován na grafu 1. Z tohoto grafu vyplývá, že vysoká hodnota koeficientu determinace ($r^2 = 0,9631$) svědčí o velmi těsné závislosti.

Graf 1: Lineární závislost množství izolované DNA z jednoho kartáčku na opakování stěru

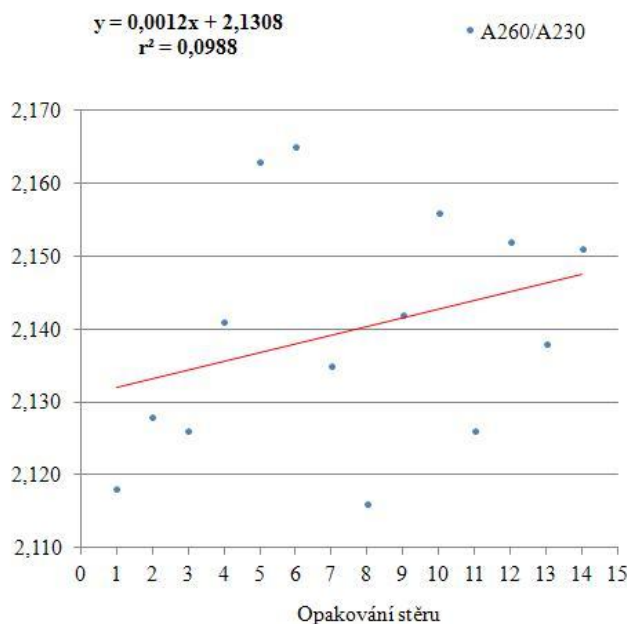


Shodným způsobem byly vyhodnoceny rovněž parametry A260/A280 a A260/A230. Z grafu 2 a 3 vyplývá, že hodnoty koeficientů determinace byly u obou závislostí velice nízké, a proto lze vyslovit závěr, že neexistuje závislost mezi hodnotami těchto parametrů a počtem opakovaných stěrů.

Graf 2: Lineární závislost hodnot A260/A280 na opakování stěru



Graf 3: Lineární závislost hodnot A260/A230 na opakování stěru



Korelační analýzou se potvrdil předpoklad, že výtěžnost DNA je závislá na opakování odběru buněk bukálních sliznic a naopak parametry čistoty A260/A280 a A260/A230 na opakování závislé nejsou. Opakovaný odběr sice způsobil snížení množství izolované DNA, ale i toto množství je naprosto dostatečné pro provádění velkého množství molekulárních analýz založených na principu PCR.

5.3 Výsledky vyhodnocení vlivu různého způsobu skladování cytologických kartáčků s odebranými buňkami

Experiment byl navržen proto, že na školícím pracovišti byly v minulosti odebírané vzorky (kartáčky) skladovány uzavřené ve sterilních polypropylenových zkumavkách. Tato původní strategie uchovávání vzorků byla navržena s cílem maximální eliminace kontaminací cytologických kartáčků. Uvedený postup uchovávání vzorků byl navržen zejména proto, že řada chovatelů zasílá vzorky do laboratoře poštou a teoreticky mohlo hrozit riziko protržení papírové obálky se samotným kartáčkem. Mnoho chovatelů však nedbalo doporučení laboratoře, aby byl kartáček před uzavřením zkumavky ponechán řádně vyschnout. V řadě případů potom do laboratoře dorazily vzorky, obsahující nevysušené kartáčky, které byly po několika dnech dopravovány poštou. Vlhké prostředí kartáčků tak vytvořilo ideální podmínky pro rozvoj mikroorganismů, které jsou samozřejmě odebírány současně s bukálními buňkami.

Obvyklý výsledek takto doručených vzorků představoval DNA, která byla pro následné analýzy nepoužitelná.

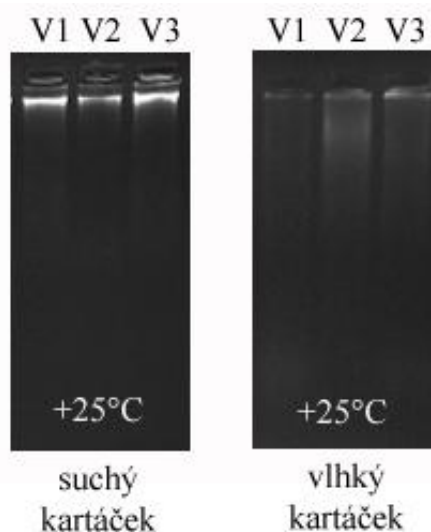
Pro modelový experiment byl použit pes a fena plemene československý vlčák a schéma pokusu s naměřenými výsledky je prezentováno v tabulce 15. Termínem suchý kartáček je míněn kartáček, který byl ponechán po odběru při laboratorní teplotě důkladně vyschnout a teprve v suchém stavu byl umístěn do polypropylenové zkumavky. Varianta vlhký kartáček představovala kartáček s odebranými buňkami, který byl okamžitě po odběru uzavřen do zkumavky. Stabilitu podmínek, které měly simulovat zasilání vzorků poštou v letním období, zajišťoval biologický termostat s nastavenou konstantní teplotou + 25 °C.

Tabulka 15: Charakteristika DNA izolované z cytologických kartáčků skladovaných různým způsobem

| Stav kartáčku | Pohlaví | Doba | Množství DNA z 1 kartáčku [ng] | | | A260/A280 | | | A260/A230 | | |
|---------------|---------|---------|--------------------------------|------|------|-----------|-------|-------|-----------|-------|-------|
| | | | V1 | V2 | V3 | V1 | V2 | V3 | V1 | V2 | V3 |
| suchý | pes | 5 hodin | 8650 | 8400 | 8550 | 1,908 | 1,935 | 1,954 | 2,185 | 2,191 | 2,001 |
| suchý | pes | 3 dny | 8400 | 8150 | 8350 | 1,911 | 1,941 | 1,961 | 2,132 | 2,141 | 2,113 |
| suchý | pes | 7 dnů | 7300 | 7250 | 7150 | 1,923 | 1,932 | 1,901 | 2,089 | 2,015 | 2,157 |
| suchý | pes | 14 dnů | 6450 | 6650 | 6700 | 1,906 | 1,906 | 1,905 | 2,191 | 2,112 | 2,181 |
| suchý | fena | 5 hodin | 8900 | 8650 | 8450 | 1,932 | 1,954 | 1,921 | 2,147 | 2,115 | 2,143 |
| suchý | fena | 3 dny | 8300 | 8200 | 8130 | 1,941 | 1,908 | 1,903 | 2,165 | 2,136 | 2,118 |
| suchý | fena | 7 dnů | 7150 | 7000 | 7350 | 1,901 | 1,915 | 1,952 | 2,111 | 2,148 | 2,109 |
| suchý | fena | 14 dnů | 6550 | 6700 | 6250 | 1,906 | 1,941 | 1,957 | 2,187 | 2,192 | 2,115 |
| vlhký | pes | 5 hodin | 8950 | 8500 | 8750 | 1,954 | 1,936 | 1,962 | 2,191 | 2,145 | 2,168 |
| vlhký | pes | 3 dny | 4500 | 4650 | 4350 | 1,911 | 1,932 | 1,913 | 2,098 | 2,108 | 2,159 |
| vlhký | pes | 7 dnů | 1250 | 1150 | 1300 | 1,941 | 1,907 | 1,917 | 2,114 | 2,009 | 2,157 |
| vlhký | pes | 14 dnů | 350 | 450 | 500 | 1,935 | 1,965 | 1,925 | 2,105 | 2,156 | 2,181 |
| vlhký | fena | 5 hodin | 8500 | 8750 | 8350 | 1,961 | 1,921 | 1,935 | 2,178 | 2,178 | 2,144 |
| vlhký | fena | 3 dny | 4150 | 4050 | 4250 | 1,901 | 1,954 | 1,941 | 2,165 | 2,166 | 2,163 |
| vlhký | fena | 7 dnů | 1450 | 1360 | 1150 | 1,907 | 1,937 | 1,908 | 2,145 | 2,154 | 2,147 |
| vlhký | fena | 14 dnů | 300 | 350 | 400 | 1,923 | 1,903 | 1,924 | 2,117 | 2,108 | 2,159 |

Vysokomolekulárta DNA, která byla izolovaná ze všech variant uvedených v tabulce 15, byla hodnocena rovněž testovací gelovou elektroforézou. Na následujícím obrázku je uveden vzorový elektroforeogram, ze kterého jasně vyplývá, že pokles izolované DNA ze skladovaných vlhkých kartáčků je spojen s výraznou degradací (fragmentací) původní izolované vysokomolekulární DNA.

Obrázek 12: Rozdíly ve vysokomolekularitě DNA izolované ze suchých a vlhkých cytologických kartáčků skladovaných po dobu 14 dnů v teplotě +25 C



Naměřené hodnoty uvedené v tabulce 15 byly následně vyhodnoceny analýzou rozptylu vícenásobného třídění, kde třídícími faktory byla vysušenost vzorků, doba skladování a pohlaví hodnoceného jedince. Analýza rozptylu potvrdila, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statisticky významné rozdíly ve výtěžnosti DNA, které byly způsobeny třídícími faktory vysušenost vzorku a doba skladování. Jinými slovy je možné konstatovat, že u těchto dvou třídících faktorů je možno nalézt alespoň jednu konkrétní dvojici variant experimentu, jejíž průměrná výtěžnost DNA se bude statisticky významně lišit na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky analýz rozptylu jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 16: Statistické hodnocení vlivu vysušení vzorku, doby skladování a pohlaví zvířete na množství DNA izolované z jednoho kartáčku – výsledky analýzy rozptylu

| Složky variability | Stupně volnosti | Hodnota F-testu | Pravděpodobnost p |
|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Absolutní člen | 1 | 860,9716 | 0,000000 |
| Vysušenost vzorku | 1 | 107,4401 | 0,000000 |
| Pohlaví | 1 | 0,0472 | 0,829012 |
| Doba skladování | 3 | 35,8033 | 0,000000 |
| Chyba | 42 | | |

Z tabulky 16 vyplývá, že podrobnější vyhodnocení má smysl provést pro třídící kritérium vysušenost vzorku a doba skladování. Vzhledem k tomu, že u třídícího kritéria

vysušenost vzorku byly v experimentu zahrnuty pouze dvě alternativy (suché a vlhké kartáčky), nemá smysl podrobnější vyhodnocení provádět a je možné tvrdit, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ existují statisticky významné rozdíly mezi průměrnými výtěžnostmi DNA izolované ze suchých a vlhkých kartáčků.

Podrobnější vyhodnocení pomocí metody dle Tukeyho bylo tudíž provedeno pouze pro třídící faktor doba skladování. Výsledky hodnocení jsou uvedeny v tabulce 17, kde jsou červenou barvou zvýrazněny dvojice porovnávaných dob skladování, které se vzájemně liší na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Získané výsledky lze shrnout tak, že byla nalezena jediná dvojice dob skladování (7 dnů a 14 dnů), která se vzájemně nelišila na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ z hlediska výtěžnosti DNA. V této tabulce jsou uvedeny hodnoty pravděpodobností, se kterými se porovnávané průměry shodují.

Tabulka 17: Podrobnější vyhodnocení analýzy rozptylu výtěžností DNA způsobené různou dobou skladování cytologických kartáčků

| Doba | Průměrná výtěžnost DNA z 1 cytologického kartáčku [ng] | | | |
|----------------|--|----------|----------|----------|
| | 5 hodin | 3 dny | 7 dnů | 14 dnů |
| | 8616,7 | 6290,0 | 4238,3 | 3470,8 |
| 5 hodin | | 0,000749 | 0,000171 | 0,000171 |
| 3 dny | 0,000749 | | 0,002899 | 0,000199 |
| 7 dnů | 0,000171 | 0,002899 | | 0,501465 |
| 14 dnů | 0,000171 | 0,000199 | 0,501465 | |

Ve výsledkové tabulce 15 jsou rovněž uvedena data parametrů A260/A280 a A260/A230. Hodnoty těchto poměrů byly rovněž vyhodnoceny analýzou rozptylu, ve kterých byly zvoleny shodné třídící faktory: vysušenost vzorku, doba skladování a pohlaví jedince. Z analýzy rozptylu vyplývá, že u žádného z třídících faktorů u poměru A260/A280 i A260/A230 nebyla získána ani jedna dvojice porovnávaných průměrů, o které je možno tvrdit, že se vzájemně na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ odlišují. Výsledky analýzy rozptylu pro A260/A280 a A260/A230 jsou součástí tabulek 18 a 19. Vzhledem k tomu, že analýza rozptylu neprokázala statisticky významný vliv žádného z třídících faktorů na hodnocené vlastnosti DNA, nebylo provedeno ani následné podrobné vyhodnocení.

Tabulka18: Statistické hodnocení vlivu vysušení vzorku, doby skladování a pohlaví zvířete na poměr A260/A280 – výsledky analýzy rozptylu

| Složky variability | Stupně volnosti | Hodnota F-testu | Pravděpodobnost p |
|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Absolutní člen | 1 | 466278,2 | 0,000000 |
| Vysušenost vzorku | 1 | 0,5 | 0,469070 |
| Pohlaví | 1 | 0,1 | 0,797438 |
| Doba skladování | 3 | 2,2 | 0,107565 |
| Chyba | 42 | | |

Tabulka19: Statistické hodnocení vlivu vysušení vzorku, doby skladování a pohlaví zvířete na poměr A260/A230 – výsledky analýzy rozptylu

| Složky variability | Stupně volnosti | Hodnota F-testu | Pravděpodobnost p |
|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Absolutní člen | 1 | 120078,0 | 0,000000 |
| Vysušenost vzorku | 1 | 0,6 | 0,459618 |
| Pohlaví | 1 | 1,9 | 0,172458 |
| Doba skladování | 3 | 2,0 | 0,133444 |
| Chyba | 42 | | |

5.4 Výsledky hodnocení vlivu organických kontaminujících látek na kvantitu a kvalitu izolované DNA

V literární rešerši jsem se zmiňovala, že všichni autoři, kteří se zabývali izolací DNA z buněk bukalních sliznic, požadovali, aby jedinec určený k odběru biologického materiálu určitou dobu před odběrem nekonzumoval žádnou potravu. V případě, že analýzy byly prováděny u člověka, je řadou autorů rovněž doporučováno důkladné vypláchnutí ústní dutiny speciálně vyráběnými ústními vodami. Cílem všech těchto opatření je minimalizovat kontaminaci cytologických kartáčků různými organickými látkami, které mohou obsahovat molekuly DNA jiného organismu než je organismu cílový.

Cílem experimentu bylo simulovat různé organické znečištění kartáčků, které může potenciálně nastat při genetických analýzách psů. Odběry u velkého množství psů lze provádět například na výstavách, bonitacích a svodech. Při těchto akcích je velice obtížné přimět majitele psů, aby například pamlskem nemotivovali jednotlivá zvířata. Kontaminace zbytky potravy pak může být teoreticky zachycena i na odběrových kartáčcích. Schéma pokusu a jeho výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 20: Charakteristika DNA izolované z cytologických kartáčků kontaminovaných různými organickými látkami – 1. část

| Kontaminant | Jedinec | Množství DNA z 1 kartáčku [ng] | | | A260/A280 | | | A260/A230 | | |
|---|---------|--------------------------------|-------|-------|-----------|-------|-------|-----------|-------|-------|
| | | M1 | M2 | M3 | M1 | M2 | M3 | M1 | M2 | M3 |
| Kořen syrové mrkve | pes A | 9350 | 9350 | 9350 | 1,826 | 1,826 | 1,826 | 2,171 | 2,171 | 2,171 |
| | pes B | 9000 | 9000 | 9000 | 1,891 | 1,891 | 1,891 | 2,189 | 2,189 | 2,189 |
| | fena A | 9100 | 9100 | 9100 | 1,872 | 1,872 | 1,872 | 2,107 | 2,107 | 2,107 |
| | fena B | 8950 | 8950 | 8950 | 1,813 | 1,814 | 1,813 | 2,145 | 2,145 | 2,145 |
| Vařená rýže | pes A | 8650 | 8650 | 8700 | 1,861 | 1,861 | 1,861 | 2,132 | 2,132 | 2,132 |
| | pes B | 8350 | 8350 | 8350 | 1,853 | 1,853 | 1,853 | 2,156 | 2,156 | 2,156 |
| | fena A | 8500 | 8500 | 8500 | 1,812 | 1,812 | 1,812 | 2,161 | 2,161 | 2,162 |
| | fena B | 8200 | 8200 | 8200 | 1,861 | 1,861 | 1,861 | 2,145 | 2,145 | 2,145 |
| Granule Hill's Canine Adult Large Breed Chicken | pes A | 12150 | 12150 | 12150 | 1,873 | 1,873 | 1,873 | 2,178 | 2,178 | 2,178 |
| | pes B | 12300 | 12300 | 12300 | 1,841 | 1,841 | 1,841 | 2,181 | 2,181 | 2,181 |
| | fena A | 12600 | 12600 | 12600 | 1,826 | 1,826 | 1,826 | 2,141 | 2,141 | 2,141 |
| | fena B | 12450 | 12500 | 12450 | 1,846 | 1,846 | 1,846 | 2,123 | 2,123 | 2,123 |
| Suchar Pedigree Biscrok | pes A | 10400 | 10400 | 10400 | 1,834 | 1,834 | 1,834 | 2,166 | 2,166 | 2,166 |
| | pes B | 10550 | 10550 | 10550 | 1,874 | 1,874 | 1,874 | 2,139 | 2,139 | 2,139 |
| | fena A | 10350 | 10350 | 10350 | 1,846 | 1,846 | 1,847 | 2,154 | 2,154 | 2,154 |
| | fena B | 10300 | 10300 | 10300 | 1,856 | 1,856 | 1,856 | 2,171 | 2,171 | 2,171 |
| Čepel jílku vytrvalého | pes A | 8650 | 8650 | 8650 | 1,891 | 1,891 | 1,891 | 2,144 | 2,145 | 2,145 |
| | pes B | 8500 | 8500 | 8550 | 1,811 | 1,811 | 1,811 | 2,133 | 2,133 | 2,133 |
| | fena A | 8450 | 8450 | 8450 | 1,824 | 1,824 | 1,824 | 2,151 | 2,151 | 2,151 |
| | fena B | 8750 | 8750 | 8750 | 1,835 | 1,835 | 1,835 | 2,181 | 2,181 | 2,181 |

Tabulka 20: Charakteristika DNA izolované z cytologických kartáčků kontaminovaných různými organickými látkami – 2. část

| Kontaminant | Jedinec | Množství DNA z 1 kartáčku [ng] | | | A260/A280 | | | A260/A230 | | |
|------------------------------|---------|--------------------------------|------|------|-----------|-------|-------|-----------|-------|-------|
| | | M1 | M2 | M3 | M1 | M2 | M3 | M1 | M2 | M3 |
| Prapor letky holuba domácího | pes A | 8950 | 8950 | 8950 | 1,846 | 1,846 | 1,846 | 2,191 | 2,191 | 2,191 |
| | pes B | 8350 | 8350 | 8350 | 1,844 | 1,844 | 1,844 | 2,141 | 2,141 | 2,141 |
| | fena A | 8650 | 8650 | 8650 | 1,875 | 1,875 | 1,875 | 2,123 | 2,124 | 2,123 |
| | fena B | 8200 | 8210 | 8200 | 1,811 | 1,811 | 1,811 | 2,147 | 2,147 | 2,147 |
| Kůra kmene lípy srdčité | pes A | 8450 | 8450 | 8450 | 1,832 | 1,832 | 1,832 | 2,159 | 2,159 | 2,159 |
| | pes B | 8750 | 8750 | 8750 | 1,841 | 1,842 | 1,842 | 2,118 | 2,118 | 2,118 |
| | fena A | 8600 | 8600 | 8600 | 1,876 | 1,876 | 1,876 | 2,173 | 2,173 | 2,173 |
| | fena B | 8200 | 8200 | 8200 | 1,851 | 1,851 | 1,851 | 2,149 | 2,149 | 2,149 |
| Ovesné vločky | pes A | 9200 | 9200 | 9200 | 1,844 | 1,844 | 1,844 | 2,163 | 2,163 | 2,163 |
| | pes B | 9450 | 9450 | 9450 | 1,849 | 1,849 | 1,849 | 2,162 | 2,162 | 2,162 |
| | fena A | 9650 | 9650 | 9650 | 1,833 | 1,833 | 1,833 | 2,155 | 2,155 | 2,155 |
| | fena B | 9150 | 9150 | 9150 | 1,821 | 1,821 | 1,821 | 2,135 | 2,135 | 2,135 |
| Kontrola bez kontaminantu | pes A | 8600 | 8600 | 8600 | 1,854 | 1,854 | 1,854 | 2,154 | 2,154 | 2,154 |
| | pes B | 8450 | 8450 | 8450 | 1,867 | 1,867 | 1,868 | 2,178 | 2,178 | 2,179 |
| | fena A | 8550 | 8550 | 8600 | 1,864 | 1,864 | 1,864 | 2,145 | 2,145 | 2,145 |
| | fena B | 8350 | 8350 | 8350 | 1,836 | 1,836 | 1,836 | 2,138 | 2,138 | 2,138 |

Pro simulaci kontaminace bylo zvoleno plemeno československý vlčák, které bylo prezentováno dvěma psy a dvěma fenami. Všechna zvířata vlastnila jedna chovatelka, která skutečně zajistila, že hodnocená zvířata nepřijímala minimálně 1 hodinu před odběrem žádnou potravu. Z tabulky 20 vyplývá, že experiment byl navržen tak, aby se získaná data dala vyhodnotit analýzou rozptylu. Třídícími faktory byla kontaminující organická látka a hodnocený jedinec.

Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ bylo zjištěno, že o výtěžnosti DNA z jednoho kartáčku byl průměr statisticky významně ovlivněn, jak třídícím faktorem kontaminace, tak i třídícím faktorem jedinec. Výsledky analýzy rozptylu jsou dokumentovány v tabulce 21.

Tabulka 21: Statistické hodnocení vlivu kontaminace a hodnoceného jedince na množství DNA izolované z jednoho kartáčku – výsledky analýzy rozptylu

| Složky variability | Stupně volnosti | Hodnota F-testu | Pravděpodobnost p |
|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Absolutní člen | 1 | 348761,7 | 0,000000 |
| Kontaminant | 8 | 775,4 | 0,000000 |
| Jedinec | 3 | 9,7 | 0,000012 |
| Chyba | 96 | | |

Podrobnější vyhodnocení metodou podle Tukeyho bylo provedeno nejprve pro třídící faktor kontaminující organická látka. Výsledky tohoto hodnocení znázorňuje tabulka 22.

Tabulka 22: Podrobnější vyhodnocení analýzy rozptylu výtěžností DNA způsobené různými organickými kontaminanty

| Kont. | Průměrná výtěžnost DNA z 1 cytologického kartáčku [ng] | | | | | | | | |
|----------|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | Mrkev | Rýže | Granule | Suchar | Jílek | Letka | Kůra | Vločky | Kontrola |
| | 9100,0 | 8429,2 | 12379,0 | 10400,0 | 8587,5 | 8538,3 | 8500,0 | 9362,5 | 8491,7 |
| Mrkev | | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 | 0,005010 | 0,000133 |
| Rýže | 0,000133 | | 0,000133 | 0,000133 | 0,313959 | 0,784764 | 0,978601 | 0,000133 | 0,990411 |
| Granule | 0,000133 | 0,000133 | | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 |
| Suchar | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 | | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 |
| Jílek | 0,000133 | 0,313959 | 0,000133 | 0,000133 | | 0,998181 | 0,926597 | 0,000133 | 0,882277 |
| Letka | 0,000133 | 0,784764 | 0,000133 | 0,000133 | 0,998181 | | 0,999719 | 0,000133 | 0,998762 |
| Kůra | 0,000133 | 0,978601 | 0,000133 | 0,000133 | 0,926597 | 0,999719 | | 0,000133 | 1,000000 |
| Vločky | 0,005010 | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 | 0,000133 | | 0,000133 |
| Kontrola | 0,000133 | 0,990411 | 0,000133 | 0,000133 | 0,882277 | 0,998762 | 1,000000 | 0,000133 | |

V tabulce 22 jsou uvedeny pravděpodobnosti, se kterými se porovnávají průměry shodují. Červenou barvou jsou v této tabulce zobrazeny takové dvojice kontaminujících organických látek, kde jsou statisticky významné rozdíly mezi průměrnými výtěžnostmi na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Jinými slovy z této tabulky lze vyvodit závěr, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly ve výtěžnosti DNA mezi následujícími dvojicemi kontaminantů:

- rýže a jílek
- rýže a letka holuba
- rýže a kůra kmene lípy
- rýže a nekontaminovaná kontrola
- jílek a letka holuba
- jílek a kůra kmene lípy
- jílek a nekontaminovaná kontrola
- letka holuba a kůra kmene lípy
- letka holuba a nekontaminovaná kontrola
- kůra kmene lípy a nekontaminovaná kontrola.

Podrobnější vyhodnocení metodou podle Tukeyho bylo provedeno rovněž pro třídící faktor hodnocený jedinec. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 23, která rovněž obsahuje hodnoty pravděpodobností, se kterými se shodovaly průměrné výtěžnosti DNA hodnocených psů.

Tabulka 23: Podrobnější vyhodnocení analýzy rozptylu výtěžností DNA způsobené různými hodnocenými jedinci

| Jedinec | Průměrná výtěžnost DNA z 1 cytologického kartáčku [ng] | | | |
|---------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Pes A | Pes B | Fena C | Fena D |
| | 9379,6 | 9300,0 | 9385,2 | 9174,4 |
| Pes A | | 0,286495 | 0,999380 | 0,000205 |
| Pes B | 0,286495 | | 0,230603 | 0,029718 |
| Fena C | 0,999380 | 0,230603 | | 0,000179 |
| Fena D | 0,000205 | 0,029718 | 0,000179 | |

Z této tabulky vyplývá, že fena D se z hlediska výtěžnosti DNA lišila od všech ostatních zvířat (pes A, pes B a fena C) na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Hodnoty A260/A280 a A260/A230 uvedené ve výsledkové tabulce byly hodnoceny rovněž pomocí analýzy rozptylu za použití shodných třídících kritérií – kontaminant

a hodnocený jedinec. U obou poměrů absorbancí bylo prokázáno, že přítomnost kontaminující látky statisticky průkazně neovlivnila hodnoty těchto poměrů na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Naopak statisticky významné rozdíly u poměru absorbancí A260/A280 i A260/A230 byly zjištěny u třídícího faktoru jedinec. Výsledky analýzy rozptylu dokumentují následující tabulky.

Tabulka 24: Statistické hodnocení vlivu kontaminace a hodnoceného jedince na poměr absorbancí A260/A280 – výsledky analýzy rozptylu

| Složky variability | Stupně volnosti | Hodnota F-testu | Pravděpodobnost p |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Absolutní člen | 1 | 826335,2 | 0,000000 |
| Kontaminant | 8 | 1,0 | 0,476946 |
| Jedinec | 3 | 3,1 | 0,030143 |
| Chyba | 96 | | |

Tabulka 25: Statistické hodnocení vlivu kontaminace a hodnoceného jedince na poměr absorbancí A260/A230 – výsledky analýzy rozptylu

| Složky variability | Stupně volnosti | Hodnota F-testu | Pravděpodobnost p |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Absolutní člen | 1 | 1264607 | 0,000000 |
| Kontaminant | 8 | 0 | 0,980721 |
| Jedinec | 3 | 4 | 0,013696 |
| Chyba | 96 | | |

Pro oba hodnocené poměry absorbancí bylo následně provedeno podrobnější vyhodnocení metodou podle Tukeyho. V tabulkách 26 a 27 jsou uvedeny hodnoty pravděpodobností, se kterými se hodnoty poměrů absorbancí jednotlivých jedinců shodovaly.

Tabulka 26: Podrobnější vyhodnocení analýzy rozptylu poměru A260/A280 způsobené různými hodnocenými jedinci

| Jedinec | Průměrná výtěžnost DNA z 1 cytologického kartáčku [ng] | | | |
|---------------|--|----------|----------|----------|
| | Pes A | Pes B | Fena C | Fena D |
| | 1,8512 | 1,8524 | 1,8476 | 1,8367 |
| Pes A | | 0,996650 | 0,921692 | 0,062265 |
| Pes B | 0,996650 | | 0,833217 | 0,036427 |
| Fena C | 0,921692 | 0,833217 | | 0,237225 |
| Fena D | 0,062265 | 0,036427 | 0,237225 | |

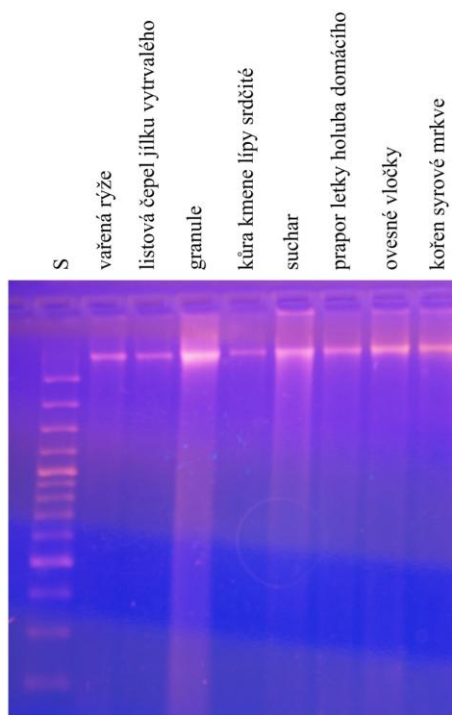
Tabulka 27: Podrobnější vyhodnocení analýzy rozptylu poměru A260/A230 způsobené různými hodnocenými jedinci

| Jedinec | Průměrná výtěžnost DNA z 1 cytologického kartáčku [ng] | | | |
|---------------|--|----------|----------|----------|
| | Pes A | Pes B | Fena C | Fena D |
| | 2,1621 | 2,1553 | 2,1456 | 2,1482 |
| Pes A | | 0,591449 | 0,016097 | 0,057601 |
| Pes B | 0,591449 | | 0,290076 | 0,565503 |
| Fena C | 0,016097 | 0,290076 | | 0,963675 |
| Fena D | 0,057601 | 0,565503 | 0,963675 | |

Podrobnější vyhodnocení analýzy rozptylu prokázalo, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, že se lišila průměrná hodnota poměru A260/A280 mezi psem B a fenou D. U poměru A260/A230 byly statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ zjištěny mezi psem A a fenou C.

Přítomnost kontaminujících organických látek ve zkumavce s cytologickým kartáčkem dle mého názoru způsobovala, že společně s DNA hodnoceného zvířete byla extrahována i DNA z kontaminující biologické látky. Na obrázku 13 je znázorněn elektroforeogram při testování vysokomolekularity DNA.

Obrázek 13: Elektroforeogram izolované DNA ze vzorků s různými organickými kontaminacemi



S - O⁺GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas)

Do jamek agarózového gelu, který je prezentován na obrázku 13, byla nanesena přímo izolovaná DNA bez ředění na konstantní koncentraci. Z tohoto obrázku je patrné, že svítivost jednotlivých fragmentů je variabilní a při pouhém porovnání intenzity svítivosti izolované genomické DNA s hodnotami výtěžnosti DNA uvedenými v tabulce 20 je patrné, že tyto dva znaky vzájemně korelují. Nejvyšší svítivost je patrná u DNA, kde kontaminujícími látkami byly granule a suchary. Rovněž tyto dva vzorky vykazovaly nejvyšší výtěžnost DNA. Na vzorcích kontaminovaných granulami a suchary je rovněž patrné, že kromě vysokomolekulární DNA tyto vzorky obsahují i určitý podíl degradované DNA. Vzhledem k tomu, že obě dvě kontaminující látky obsahují podíl živočišných bílkovin, lze předpokládat, že degradovaná DNA má původ právě v těchto kontaminujících látkách.

V případě, že by použitý izolační kit nedokázal důkladně vyčistit extrahovanou DNA od složek kontaminujících látek, mohlo by teoreticky docházet k inhibici PCR, kde by tato DNA měla fungovat jako templát. Přítomnost cizí kontaminující DNA by teoreticky mohla způsobovat i výskyt nespecifických produktů amplifikace. K této situaci by mohlo dojít pouze tehdy, kdy by dvojice primerů vykazovaly homologii i k jiné templátové DNA než k DNA psa. Pro tento experiment byla použita DNA kontaminovaná výše uvedenými látkami jako templát pro amplifikaci tří autozomálních mikrosatelitních lokusů. Velikosti alel těchto mikrosatelitních lokusů při použití zcela nekontaminované DNA jsou uvedeny v následující tabulce.

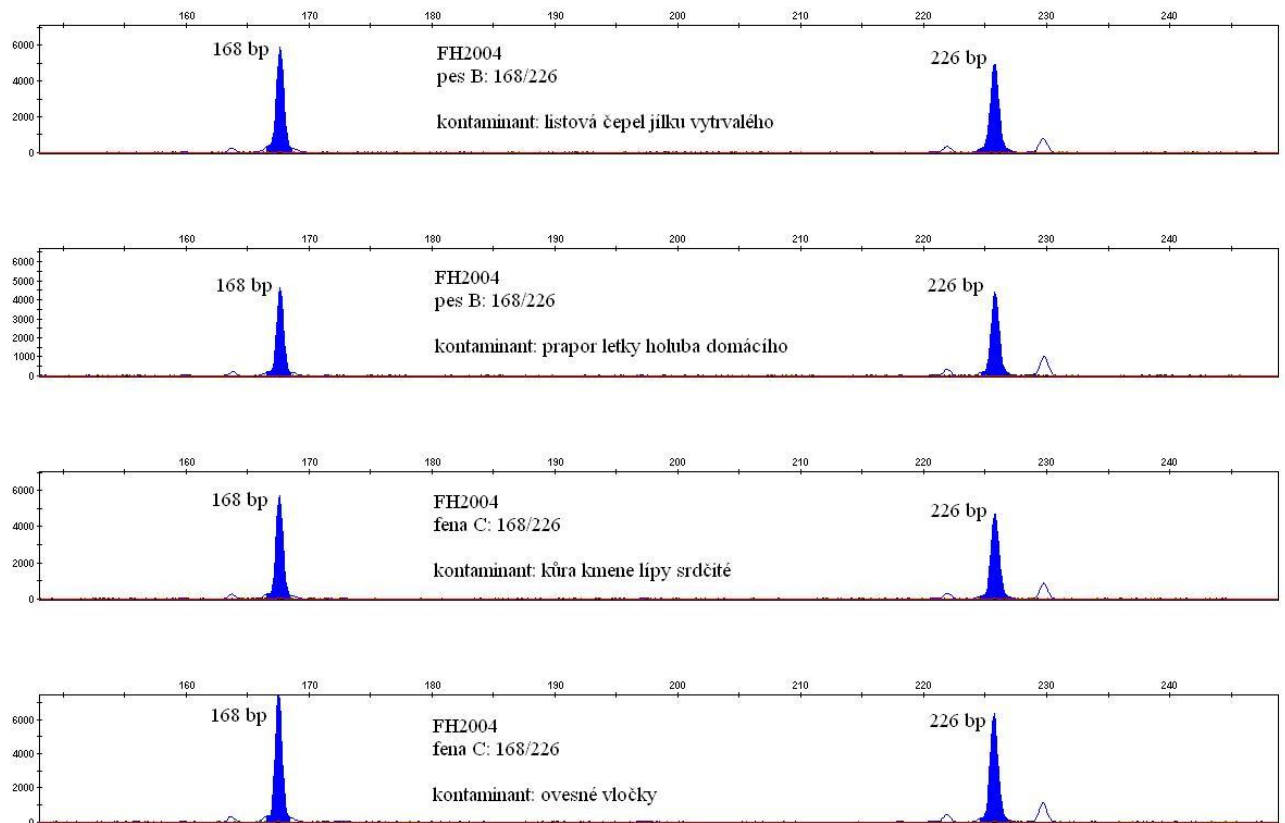
Tabulka 28: Velikosti alel hodnocených mikrosatelitních lokusů při použití nekontaminované DNA

| Jedinec | FH2004 | FH3210 | FH3241 |
|----------------|---------------|---------------|---------------|
| Pes A | 168/168 | 271/290 | 263/263 |
| Pes B | 168/226 | 298/302 | 259/263 |
| Fena C | 168/226 | 283/302 | 259/263 |
| Fena D | 226/226 | 283/298 | 263/263 |

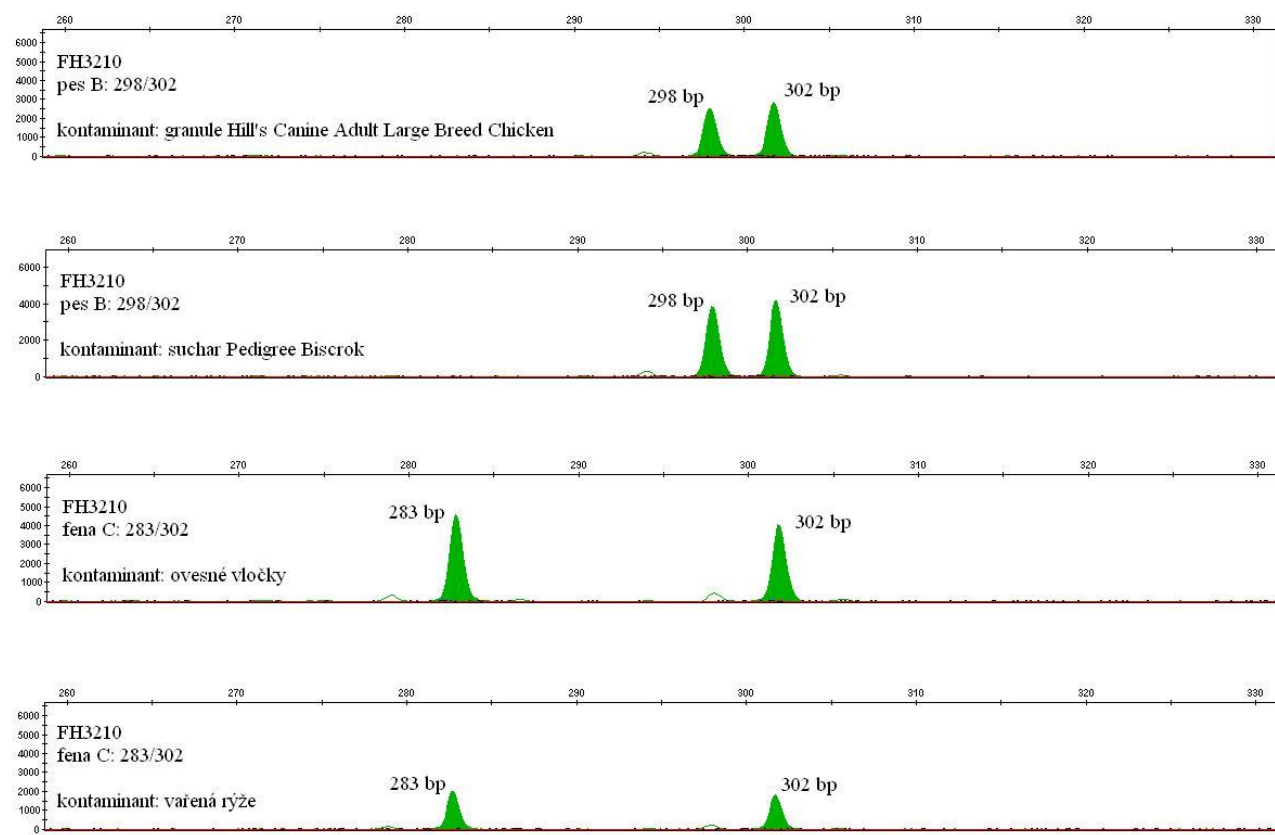
Pomocí fragmentační analýzy byly hodnoceny všechny genotypy a všechny varianty kontaminací. Výsledek analýzy potvrdil, že přítomnost ani jedné z kontaminujících látek neinhibovala amplifikaci a současně přítomnost cizorodé DNA nezpůsobila ani v jedné variantě pokusu přítomnost nespecifických fragmentů. To znamená, že ve všech variantách experimentu byly získány naprosto stejně velké alely všech mikrosatelitních lokusů, jako jsou

uvedeny v tabulce 28. Na následujících obrázcích jsou znázorněny vzorové chromatogramy, ze kterých je patrná specifická amplifikace.

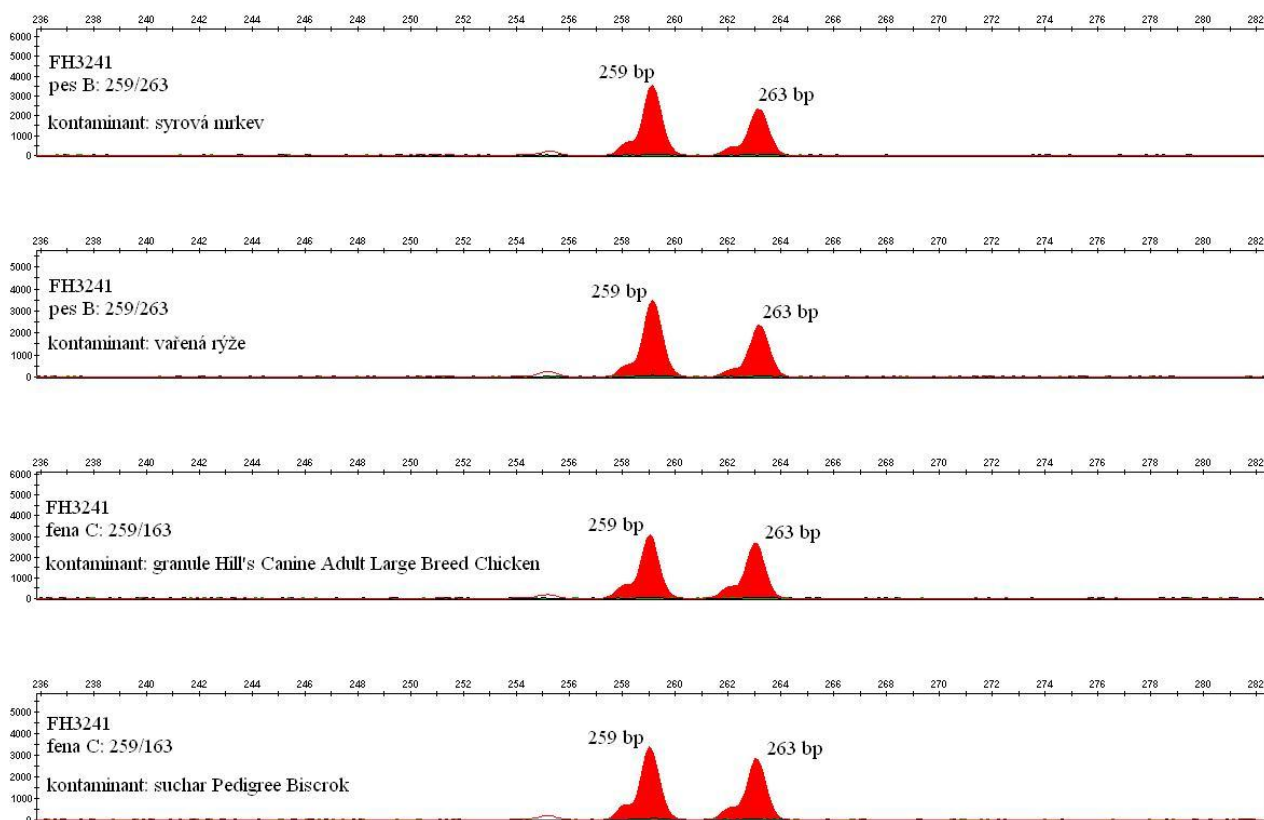
Obrázek 14: Vzorový chromatogram detekující alely mikrosatelitního lokusu FH2004 při kontaminaci templátové DNA různými organickými látkami



Obrázek 15: Vzorový chromatogram detekující alely mikrosatelitního lokusu FH3210 při kontaminaci templátové DNA různými organickými látkami



Obrázek 16: Vzorový chromatogram detekující alely mikrosatelitního lokusu FH3241 při kontaminaci templátové DNA různými organickými látkami



6. DISKUZE

Jako téma bakalářské práce jsem si zvolila studium metod izolace genomické DNA u psů z buněk bukálních sliznic. Tato neinvazivní metoda je obecně považována za vhodný způsob, který poskytuje dostatečné množství kvalitní DNA využitelné pro následné analýzy založené na principu PCR. Neinvazivnost této metody je hlavním z důvodem, proč chovatelé, kteří spolupracují z genetickými laboratoři nebo kteří sami požadují provedení genetické analýzy u svých psů, preferují právě odběr buněk bukálních sliznic. Cytologický kartáček, který je dodáván ve sterilním obalu je jistou zárukou, že nedojde ke kontaminaci tohoto nástroje ještě před vlastním odběrem. Vlastní odběr zvládá zkušený chovatel bez sebemenších problémů. K určitým problematickým situacím může dojít, pokud jsou odebrané vzorky skladovány nevhodným způsobem nebo nepřiměřeně dlouho uchovávány. Z praktických zkušeností je známé, že ke genetickým analýzám jsou neúmyslně zasílány vzorky, které jsou kontaminovány, popřípadě vzorky nevhodně skladované, obsahující již značně degradovanou DNA. Z těchto důvodů jsem se rozhodla v bakalářské práci na základě několika modelových experimentů prokázat, jaký dopad může mít neodborná manipulace s odebranými buňkami bukálních sliznic na kvalitu kvantitu DNA.

6.1 Vliv plemenné příslušnosti na parametry kvantity a kvality izolované DNA

V naprosté většině vědeckých prací je předpokládáno, že pro genetické analýzy je používána vždy vysokomekulární a nekontaminovaná DNA. Výjimky mohou nastat obvykle v případě extrakce DNA z netradičních materiálů, jako jsou například muzejní preparáty, zbytky uhynulých jedinců nebo výkaly (Kurose et al., 2005). Při volbě metody izolace jsem zvolila takový postup, který zajistí maximální stabilitu podmínek izolace a reprodukovatelnost výsledků. Proto jsem se rozhodla pro izolaci DNA použít komerčně vyráběný extrakční kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel). Jsem si vědoma toho, že cena vzorků izolovaných standardním laboratorním postupem, jako je například fenol – chloroformová extrakce (Bílek et al., 2007), je výrazně nižší. Fenol – chloroformovou extrakci doporučují použít pro získávání DNA u psů například García-Closas et al. (2001), Cao et al. (2003), Vilà et al. (2003) a Sundqvist et al. (2001). Tuto metodu obvykle využívají pracoviště, která se molekulárním analýzám zvířecího genomu věnovala ještě v době, kdy trh nebyl zásobován dostatečným množstvím kitů s přijatelnou cenou. Domnívám se, že pokud je

vysloveně laboratorní postup izolace DNA v dané laboratoři plně optimalizovaný a ověřený, je kvantita a kvalita izolované DNA rovněž naprosto vhodná pro genetické analýzy. Určitou nevýhodu těchto laboratorních postupů spatřuji i v práci s poměrně toxickými chemikáliemi jako je například fenol.

Izolaci genomické DNA pomocí komerčně dodávaných kitů považuji za progresivní postup, který kromě vynikající stability podmínek extrakce umožní rovněž izolovat vyšší množství vzorků v krátké časové periodě. Tuto výhodu považuji za důležitou zejména pokud genetické analýzy budou provádět velké diagnostické laboratoře, které jsou zaměřeny na hodnocení velkého množství vzorků. Kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel) pro izolaci psí DNA z bukálních sliznic nepoužil žádný z citovaných autorů. Protože výrobci různých kitů záměrně neuvádějí složení jednotlivých extrakčních a purifikačních roztoků, mohu pouze předpokládat, že například kit QIAamp DNA MiniKit (QIAGEN), který použil Chang et al. (2007), nebo kit Izoquick DNA Extraction Kit (Orca) použitý Vilà et al. (2003) pracují na obdobném principu.

Ve své bakalářské práci jsem se rozhodla ověřit, zdali výtěžnost DNA izolované z jednoho cytologického kartáčku bude ovlivněna plemenem psa. Pro tento účel jsem si záměrně zvolila kolekci osmi plemen, které odpovídají různým velikostním kategoriím. Tato plemena jsou blíže charakterizována v metodické části práce. Při navrhování tohoto experimentu jsem vyšla z hypotézy, že u psů velkých a obřích plemen je z důvodů velikosti tlamy a pysků mnohem snazší provádět odběr. Naopak u malých a toy plemen může vsunutí odběrové části kartáčku do tlamy způsobovat problémy. Tyto výsledky byly potvrzeny rovněž statisticky pomocí analýzy rozptylu, která jednoznačně prokázala, že existují statisticky významné rozdíly ve výtěžnosti DNA mezi obřimi, respektive velkými plemeny, a malými respektive toy plemeny. Přestože tyto rozdíly byly statisticky významné, mohu uvést, že množství DNA, které je získáno u malých plemen je naprosto dostatečné pro provádění molekulárních testů. Hlavní důvod v nižší výtěžnosti DNA u těchto malých plemen spatřuji nejenom v menší velikosti a ploše pysků, ale zejména v reakci samotného psa na přítomnost odběrového kartáčku v tlamě. Pro své experimenty jsem si záměrně zvolila plemeno jezevčík, které je využíváno jako norník a je od něj vyžadovaná určitá tvrdost a samostatnost při práci pod zemí. Je možné, že právě tyto povahové vlastnosti způsobily mnohdy až odmítavou reakci zvířat při odběru bukálních sliznic.

Na rozdíl od výtěžnosti DNA z výsledků práce vyplývá, že parametry čistoty vyjádřené poměry absorbancí A260/A280 a A260/A230 (Warburg a Christian, 1942; Glasel, 1995; Wilfinger et al., 1997) nebyly statisticky závislé na použitém plemeni. Tento výsledek

svědčí o tom, že plemenná příslušnost zřejmě ovlivnila množství somatických buněk, které zůstaly zachyceny na odběrovém kartáčku, ale neovlivnila již hodnotu výše zmiňovaných poměrů absorbancí. Z výsledků bakalářské práce vyplývá, že hodnoty poměrů A260/A280 a A260/A230 se pohybovaly vždy v intervalech, které Wilfinger et al. (1997) považuje za odpovídající vysoce čisté DNA. Tento výsledek byl očekávatelný, protože při extrakci nebyly použity žádné sloučeniny, které mohou potenciálně znečistit izolovanou DNA, a ovlivnit tak hodnoty poměru absorbancí. DNA může znečistit například fenol, glykogen, CTAB a PVPP, jejichž negativní vliv na kvalitu DNA popisují například Zhou et al. (1996) nebo Thermo Fisher Scientific (2011).

Získané výsledky a zkušenosti bych ráda diskutovala rovněž s některými možnostmi odběru bukálních buněk, které jsou využívány v humánní genetice. Zde kromě standardního odběru buněk bukálních sliznic na kartáček je využíváno rovněž důkladné kloktání speciální ústní vody, u které se předpokládá, že do ní dojde k uvolnění bukálních buněk. Domnívám se, že tato strategie je aplikovatelná pouze u člověka, nikoli však u zvířat. Dovedu si představit, že je možné speciální ústní vodou opatrně a šetrně vypláchnout i ústní dutinu psa s cílem maximálně se zbavit zbytků potravy ulpělé na sliznicích. Nedovedu si však představit, že by postup založený na kloktání a vyplivnutí vody do zkumavky, který popsal například King et al. (2002), byl použitelný v genetice psů.

6.2 Vliv opakovaného odběru buněk bukálních sliznic cytologickým kartáčkem na množství a kvalitu extrahované DNA

Problematikou, kterou jsem v tomto experimentu simulovala situaci, kdy například chovatel pokazí odběr sterilním kartáčkem a potřebuje odběr zopakovat, se nevěnoval žádný z citovaných autorů. Důvodem proč jsem tento experiment do své bakalářské práce zařadila, byly již zmiňované dotazy chovatelů, zdali mohou odběr cytologickým kartáčkem provést opakovaně. Obvyklým důvodem byla například taková situace, kdy při ukládání kartáčku se chovatel nebo pes opakovaně dotkl odběrové části kartáčku. Další situací bylo upuštění kartáčku na zem a jeho okamžitá kontaminace. Tento experiment respektive jeho výsledky jsem využila i při řešení bakalářské práce, kdy od jednoho zvířete bylo potřeba získat větší

počet odběrů, které byly následně použity na realizaci různých alternativ dalších experimentů bakalářské práce.

U plemene rhodeský ridgeback, které bylo pro tyto analýzy použito, byla prokázána těsná lineární závislost v množství izolované DNA na počtu opakování odběru buněk. Pokles výtěžnosti DNA z jednoho cytologického kartáčku však nebyl ani po 14. odběru nijak dramatický. Tento můj závěr dokládají následující údaje. Jestliže z prvního odběru buněk bukálních sliznic bylo získáno takové množství DNA, které je použitelné pro realizaci 430 PCR reakcí o objemu 12,5 μ l, potom ze 14. odběru bylo získáno množství DNA pro 320 PCR reakcí o stejném objemu. Snížení výtěžnosti DNA bylo očekávané. Předpokládala jsem, že při opakovaných odběrech bude postupně odstraněna část buněk bukálních sliznic.

Nepodařilo se mi nalézt, že by studii, zabývající se touto problematikou, prováděl někdo v oblasti molekulární genetiky psů. V humánní molekulární genetice však obdobné studie provedeny byly. Například King et al. (2002) se zaměřili na vliv strany lidské tváře, ze které byly cytologickým kartáčkem odebírány buňky. Tito autoři se rovněž věnovali problematice jednoho opakovaného odběru ze stejné tváře, který byl proveden v krátkém časovém intervalu po prvním odběru. Další experimenty, které provedli King et al. (2002), vedly ke sledování, zda výtěžnost izolované DNA je ovlivněna ranním odběrem nebo odběrem v průběhu dne. Přestože tito autoři použili jiný způsob statistického způsobu vyhodnocení dat, než které jsem použila já ve své práci, mohu konstatovat, že výsledky mého výzkumu odpovídají závěrům King et al. (2002). Tímto závěrem je konstatování, že opakované odběry bukálních sliznic výrazně neovlivňují množství extrahované DNA ani parametry A260/A280 a A260/A230.

6.3 Vliv podmínek a doby skladování cytologických kartáčků s odebranými buňkami na množství a kvalitu extrahované DNA

Již ve výsledkové části bakalářské práce jsem se zmínila o důvodu, proč jsem se zaměřila rovněž na simulaci různých podmínek, které mohou nastat při zasílání cytologických kartáčků nebo při jejich skladování. Důvodem této experimentální části bakalářské práce byly skutečné praktické zkušenosti školícího pracoviště s cytologickými kartáčky, které byly zaslány poštou zejména v letních měsících a u kterých nebylo možné extrahovat vysokomolekulární DNA.

Problematikou konzervace různých typů biologického materiálu určeného k izolaci DNA se zabývá řada autorů. Obecně lze konstatovat, že všeobecně platným doporučením je, že po odběru biologického materiálu je nutné vytvořit takové podmínky, které zabrání zejména enzymatické degradaci DNA. Touto problematikou se zabývají například Beja-Pereira et al. (2009). Tito autoři uvádějí, že k degradaci DNA dochází v důsledku vytvoření takových skladovacích podmínek, které jsou vhodné pro aktivitu enzymů nukleáz. Tito autoři doporučují provést různé zásahy vedoucí ke konzervaci odebraného materiálu. Uvádějí například okamžité zmrazení, vysušení v prostředí silikagelu nebo lyofilizaci. Při řešení bakalářské práce jsem se rozhodla zvolit vysušení vzorku při běžné laboratorní teplotě. Tímto způsobem jsem se snažila simulovat podmínky, která má k dispozici běžný chovatel, který se rozhodne zasílat vzorky ke genetickým analýzám. Beja-Pereira et al. (2009) rovněž doporučují konzervaci vzorků v etanolu. Tuto alternativu jsem záměrně nepoužila, a to z následujícího důvodu. Domnívám se, že odebrané buňky bukálních sliznic nejsou pevně přichyceny na cytologickém kartáčku a při ponoření kartáčku do roztoku etanolu by mohlo dojít k jejich odmytí.

V experimentu jsem použila dvě alternativy skladování vzorků – suchý a vlhký cytologický kartáček. Úplným vysušením kartáčku byly dle mého názoru vytvořeny takové podmínky, které výrazně inhibovaly aktivitu nukleáz zmiňovanou Beja-Pereira et al. (2009). Domnívám se rovněž, že vysušený cytologický kartáček nevytvořil podmínky pro rozvoj mikroorganismů. Tyto výsledky dokládají i hodnocení kvantity a kvality izolované DNA. Významným důkazem je dle mého názoru i hodnocení testovací elektroforézou, kdy po 14 dnech uchování suchých cytologických kartáčků při teplotě + 25 °C nebyly zjištěny žádné příznaky degradace vysokomolekulární struktury izolované DNA.

Varianta skladování vlhkých kartáčků již z hlediska vizuálního hodnocení po několika dnech uložení při teplotě + 25 °C přesně odpovídala stavu kartáčků, které v nevysušené podobě chovatelé odeslali k analýzám v letních měsících. Typickým příznakem byl značný zápach kartáčků. Mohu se domnívat, že všudypřítomná kontaminace mikroorganismy se v podmínkách skladování vlhkých kartáčků výrazně rozšířila a rovněž byly vytvořeny podmínky pro aktivitu nukleáz. Dle mého názoru je důkazem těchto závěrů výrazné snížení množství extrahované DNA, které bylo podloženo rovněž statistickou analýzou. Dalším důkazem naprosté nevhodnosti skladování vlhkých kartáčků je i téměř úplná degradace – fragmentace DNA, která je patrná z testovací elektroforézy. Ztráty DNA z delší dobu skladovaného biologického materiálu jsou očekávatelné. Molekula DNA představuje značně stabilní molekulu. Její stabilita však závisí na stavu buňky. U mrtvých buněk samozřejmě

dochází k její degradaci. Degradaci DNA u variabilního biologického materiálu odebraného šelmám popsali například Roon et al. (2003). Stejnou problematikou se zabývali například Gagneux et al. (1997), kteří doporučují i vysušený biologický materiál uchovávat ve zmražené podobě při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Osobně bych se přiklonila k této variantě skladování a při získání vysušených kartáčků doporučuji jejich uložení před extrakcí DNA v mrazicím boxu.

6.4 Vliv přítomnosti kontaminujících organických látek na parametry extrahované DNA a na specifičnost detekce alel mikrosatelitních lokusů

Poslední skupina experimentů zařazených do bakalářské práce měla za cíl simulovat situaci, kdy ústní dutina psa může být kontaminována zbytky potravy. Z těchto důvodů je doporučováno zajistit, aby pes po určitou dobu nemohl přijímat potravu. Z rozboru dostupné literatury je zřejmé, že se tyto údaje různí. Například Chang et al. (2007) uvádějí, že postačující doba bez příjmu potravy je 25 minut. Před vlastním odběrem tito autoři doporučují vypláchnout tlamu vodou nebo alespoň přimět psa k napití. V rozporu s těmito závěry je doporučení, které uvádějí Oberbauer et al. (2003). Tito autoři doporučují, aby pes minimálně 15 minut před odběrem nepřijímal ani vodu. Při řešení bakalářské práce jsem z etických důvodů ve všech variantách umožnila, aby psi vodu přijímali a před vlastním odběrem nebyli alespoň jednu hodinu krmeni. Pro simulaci kontaminace jsem použila 8 různých biologických kontaminantů, které se teoreticky mohou v tlamě psa nacházet. Jednalo se o součásti potravy (granule, suchary, ovesné vločky, mrkev, rýže), některých potravních doplňků (listy jílku), zbytky potenciální kořisti (peří holuba) a zbytky kůry lípy, které se do ústní dutiny mohou dostat například při aportování. Statistická analýza potvrdila, že přídavky kontaminujících organických látek průkazně ovlivnily množství extrahované DNA. Tento výsledek byl předem očekáván, zejména u kontaminací psími granulemi a suchary, které obsahují mimo jiné organické látky živočišného i rostlinného původu. Předpokládala jsem, že ve většině biologického materiálu, použitého pro simulaci kontaminací, bude přítomna i cizorodá DNA. Jedinou výjimkou materiálu, u kterého jsem předpokládala minimální množství DNA, byla praporová část letky holuba, která je tvořena keratinizovanými strukturami, a kůra lípy, tvořená odumřelými buňkami. Mohu konstatovat, že tento předpoklad byl potvrzen rovněž statisticky, protože tento materiál nezpůsobil u kontaminovaných vzorků vyšší výtěžnost DNA oproti nekontaminované kontrole. Zajímavým zjištěním bylo hodnocení čistoty DNA na

základě poměru absorbancí A260/A280 a A260/A230. Oba dva poměry lze použít pro hodnocení potenciální kontaminace vzorků proteiny (Warburg a Christian, 1942; Glasel, 1992). Z charakteristiky biologického materiálu použitého pro simulaci kontaminací je patrné, že zejména granule a suchary obsahovaly poměrně velké množství živočišných proteinů. Hodnoty poměru absorbancí A260/A280 a A260/A230 však ve všech variantách pokusů odpovídaly údajům, které podle práce Wilfinger et al. (1997) charakterizují vysoce čistou DNA. Analýzou rozptylu bylo rovněž potvrzeno, že tyto parametry nebyly ovlivněny přítomností kontaminantů a současně se nelišily ani od nekontaminované kontroly. Tento výsledek dle mého názoru svědčí o tom, že použitý kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel) je schopen výborně purifikovat i vzorky, které jsou záměrně kontaminovány.

Bylo rovněž zjištěno, že v hodnotách poměrů A260/A280 i A260/A230 byly statisticky průkazné rozdíly vždy mezi jedním psem a jednou fenou. Přes statistickou průkaznost těchto rozdílů se nedomnívám, že by analyzovaný jedinec byl důležitým faktorem ovlivňující kvalitu DNA. Za významný vliv jedince bych mohla považovat například takovou situaci, kdy by se tento jedinec od ostatních odlišoval například zánětlivým onemocněním ústní dutiny, poraněním bukálních sliznic nebo závažným poškozením chrupu. V těchto případech by se teoreticky dalo očekávat výraznější proteinová kontaminace odebíraných buněk. U zvířat, které jsem použila v bakalářské práci, se však takovéto zdravotní problémy nevyskytovaly. Proto se domnívám, že příčina nalezených statisticky významných diferencí, vyplývá z variability hodnot těchto parametrů, které jsou počítány na základě variabilně stanovených hodnot absorbancí. Tomuto mému názoru odpovídá i posouzení absolutních hodnot A260/A280 a A260/A230, které se vždy nacházely v intervalech typických podle Wilfinger et al. (1997) pro vysoce čistou DNA.

Pro ověření, jestli má přítomnost kontaminujících látek při izolaci vliv na průběh PCR reakce, byla zvolena metoda mikrosatelitních markerů. Pro experimenty jsem vybrala tři polymorfní mikrosatelitní lokusy, které jsou lokalizovány na autozomech. Zvolila jsem lokusy a k nim náležité primery, které publikovali van Asch et al. (2009). Na rozdíl od těchto autorů, kteří amplifikovali tyto markery v multiplex systému, jsem použila samostatnou amplifikaci jednotlivých markerů. Důvodem mého rozhodnutí bylo to, že pokud by kontaminace způsobila výskyt nespecifických amplifikací, bylo by mnohem jednodušší identifikovat jejich příčinu u samostatně amplifikovaných lokusů. Výsledky získané při experimentech bakalářské práce se plně shodují s vyslovenou hypotézou, že navržené dvojice primerů jsou homologní pouze k sekvencím psí DNA a že potenciálně kontaminující cizorodá DNA nefunguje jako templát pro nasedání použitých primerů. Z praktického hlediska to znamená,

že všechny varianty experimentu poskytovaly naprosto stejné alelické kombinace u hodnocených zvířat jako variant experimentu amplifikující nekontaminující DNA. Tyto výsledky dokazují to, že van Asch et al. (2009) skutečně navrhli vysoce specifické mikrosatelitní markery. Současně výsledky bakalářské práce dokumentují, že potenciální kontaminace zbytky potravy nemusí vždy negativně ovlivnit výsledky molekulárních analýz. Jsem si vědoma toho, že na základě provedených experimentů nelze tyto výsledky zcela zobecnit. Ale přesto se domnívám, že pokud jsou navrženy takové PCR markery, které jsou vysoce specifické pro psí genom, nemusí reálná kontaminace cytologického kartáčku zbytky potravy negativně ovlivnit výsledky analýzy. I přes zkušenosti, získané při realizaci těchto experimentů, bych ráda potenciálním žadatelům o provedení genetických analýz svých psů doporučila, aby se vždy maximálně snažili o omezení potenciální kontaminace a dodržovali rovněž zásady nekrmení psa před odběrem bukalních buněk, tak, jak je tato procedura doporučována například Chang et al. (2007).

7. ZÁVĚR

Na molekulární analýzy je nutné v roce 2012 pohlížet nejen jako na metody využívané v základním biologickém výzkumu, ale rovněž jako na velice účinný nástroj diagnostiky, který je využíván nejen veterinárními lékaři, ale i samotnými chovateli. Z literární rešerše vyplývá, že existuje široká síť genetických laboratoří, které provádějí nejrůznější typy genetických testů, založených na principech molekulární genetiky. Tyto testy jsou zaměřeny na stanovení paternity a maternity, identifikace major genů zodpovědných za některé kvalitativní znaky, jako je například zbarvení srsti, identifikaci mutací důležitých genů, které bývají spojovány se vznikem různých dědičných chorob. Vzhledem k progresivnímu rozvoji aplikovaných metod molekulární genetiky se domnívám, že spektrum prováděných molekulárních analýz se bude neustále rozšiřovat. Z těchto důvodů jsem si pro bakalářskou práci zvolila téma zaměřené na prvotní krok, který je nezbytný k následným genetickým analýzám. Tímto krokem mám na mysli získání kvalitní nekontaminované genomické DNA psů, která bude zárukou úspěšné aplikace různých typů genetických markerů.

Výsledky, které jsem během řešení práce získala, mohu shrnout do následujících bodů:

- Odběr buněk bukálních sliznic považuji za neinvazivní metodu získání biologického materiálu, který je bez problémů proveditelný chovatelem. Pomocí cytologického kartáčku bylo získáno dostatečné množství biologického materiálu, bez ohledu na velikost hodnoceného plemene. Při odběru buněk bukálních sliznic je nutné brát v potaz i povahu a socializaci psa, protože jeho chování během odběru může ovlivnit množství odebraných buněk a tím i výsledné množství DNA.
- Statisticky bylo prokázáno, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny významné rozdíly ve výtěžnosti DNA mezi hodnocenými plemeny. Statistická analýza však neprokázala, že hodnoty poměrů absorbancí A260/A280 a A260/A230 se statisticky významně liší mezi jednotlivými plemeny.
- Byla vyslovena hypotéza, že kromě velikosti tlamy může být důležitým faktorem, který vede k variabilitě výtěžností DNA, rovněž i povaha respektive schopnost hodnoceného jedince snášet důkladný stěr bukálních buněk.
- Na základě modelového experimentu zaměřeného na opakovaný odběr buněk bukálních sliznic z jednoho jedince byla prokázána velice těsná lineární závislost množství izolované DNA na vícenásobně opakovaném odběru buněk. Přesto mohu konstatovat, že i vícenásobně opakované odběry buněk zajistily dostatečné

množství genetického materiálu, ze kterého byla izolovaná DNA upotřebitelná pro velké množství PCR analýz.

- Experimentálně bylo prokázáno, že při transportu nebo skladování vlhkých kartáčků dochází k výrazné degradaci extrahované DNA. Tyto závěry byly potvrzeny nejen na základě statistického hodnocení zpracovaného na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, ale rovněž na základě elektroforetické analýzy. Elektroforetickým testem bylo potvrzeno, že při skladování vlhkých kartáčků dochází k fragmentaci DNA.
- Modelový experiment simulující kontaminaci cytologických kartáčků zbytky potravy, které se mohou nacházet v tlamě psa, prokázal, že použitý izolační kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel) dokázal důkladně purifikovat izolovanou DNA. Bylo prokázáno, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v poměrech absorbancí A260/A280 a A260/A230 mezi variantami kontaminujícími organických látek a kontrolní nekontaminovanou variantou.
- Statisticky bylo dále prokázáno, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ některé kontaminující látky statisticky významně zvýšily množství extrahované DNA oproti nekontaminované kontrole. Vyšší množství DNA oproti kontrole bylo zjištěno při kontaminaci cytologických kartáčků granulami Hill's Canine Adult Large Breed Chicken a suchary Pedigree Biscrok.
- Experimentálně bylo potvrzeno, že trojice primerů, použitých pro amplifikaci alel mikrosatelitních lokusů FH2004, FH3210 a FH3241, jsou vysoce specifické. To znamená, že ani u vzorků, u kterých byl předpokládán výskyt kontaminující DNA, pocházející z jednotlivých variant experimentu, nebyl ani v jednom případě zjištěn výskyt nespecifických amplifikací. Amplifikované alely všech výše uvedených lokusů vždy odpovídaly výsledkům získaných u nekontaminované kontroly.

V závěru práce bych měla pro chovatele nebo majitele psů, kteří uvažují o genetických analýzách, následující doporučení, týkající se odběru a dalšího zpracování biologického materiálu. Přestože v mé práci byly podány důkazy o tom, že i poměrně velká záměrná kontaminace vzorků neovlivnila výsledky genotypizace, rozhodně nemohu chovatelům doporučit, aby na tyto výsledky spoléhali, protože se týkaly pouze konkrétních mikrosatelitních markerů. Pro získání reprodukovatelných výsledků majitelům psů

jednoznačně doporučuji maximálně eliminovat kontaminace a současně vždy ke genetickým analýzám zasílat důkladně vysušené cytologické kartáčky.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. Základy buněčné biologie. Espero Publishing. Ústí nad Labem. 740 s. ISBN 8090290620.
- Applied Biosystems. ABI PRISM®310 Genetic Analyzer. User's Manual [manuál]. 2010. Tento laboratorní manuál je také v online verzi na internetu. Dostupný z <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041812.pdf>.
- Bader, H. L., Ruhe, A. L., Wang, L. W., Wong, A. K., Walsh, K. F., Packer, R. A., Mitelman, J., Robertson, K. R., O'Brien, D. P., Broman, K. W., Diane Shelton, G., Apte, S. S., Neff, M. W. 2010. An ADAMTSL2 Founder Mutation Causes Musladin-Lueke Syndrome, a Heritable Disorder of Beagle Dogs, Featuring Stiff Skin and Joint Contractures. *PLoS ONE*. 5 (9). e12817. 1-8.
- Beja-Pereira, A., Oliveira, R., Alves, P. C., Schwartz, M. K., Luikart, G. 2009. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources*. 9 (5). 1279-1301.
- Bowling, A. T., Eggleston-Stott, M. L., Byrns, G., Clark, R. S., Dileanis, S., Wictum, E. 1997. Validation of microsatellite markers for routine parentage testing. *Animal Genetics*. 28 (4). 247-252.
- Cao, W., Hashibe, M., Rao, J.-Y., Morgenstern, H., Zhang, Z.-F. 2003. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detection and Prevention*. 27 (5). 397-404.
- Chang, M. L., Terrill, R. L., Bautista, M. M., Carlson, E. J., Dyer, D. J., Overall, K. L., Hamilton, S. P. 2007. Large-Scale SNP Genotyping with Canine Buccal Swab DNA. *Journal of Heredity*. 98 (5). 428-437.
- Coppinger, R., Coppinger L. 2001. *Dogs: A Startling New Understanding of Canine Origin, Behaviour & Evolution*. Scribner. New York. p. 352. ISBN: 0684855305.
- Davis, S. J. M., Valla, F. R. 1978. Evidence for domestication of the dog 12,000 years ago in the Natufian of Israel. *Nature*. 276 (5688). 608-610.

- Dostál, J. 2007. Genetika a šlechtění plemen psů. Dona. České Budějovice. 261 s. ISBN: 9788073221041.
- Ellegren, H. 2000. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nature Genetics*. 24 (4). 400-402.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*. 5 (6). 435-445.
- Feigelson, H. S., Rodriguez, C., Robertson, A. S., Jacobs, E. J., Calle, E. E., Reid, Y. A., Thun, M. J. 2001. Determinants of DNA Yield and Quality from Buccal Cell Samples Collected with Mouthwash. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 10 (9). 1005-1008.
- Gagneux, P., Boesch, C., Woodruff, D. S. 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology*. 6 (9). 861-868.
- García-Closas, M., Egan, K. M., Abruzzo, J., Newcomb, P. A., Titus-Ernstoff, L., Franklin, T., Bender, P. K., Beck, J. C., Le Marchand, L., Lum, A., Alavanja, M., Hayes, R. B., Rutter, J., Buetow, K., Brinton, L. A., Rothman, N. 2001. Collection of Genomic DNA from Adults in Epidemiological Studies by Buccal Cytobrush and Mouthwash. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 10 (6). 687-696.
- Galton, F. 1865. The First Steps towards the Domestications of Animals. *Transactions of the Ethnological Society of London*. (3). 10-14.
- Glasel, J. A. 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*. 18 (1). 62-63.
- Harty, L. C., García-Closas, M., Rothman, N., Reid, Y. A., Tucker, M. A., Hartge, P. 2000. Collection of Buccal Cell DNA Using Treated Cards. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 9 (5). 501-506.
- Heat, E. M., Morken, N. W., Campbell, K. A., Tkach, D., Boyd, E. A., Strom, D. A. 2001. Use of Buccal Cells Collected in Mouthwash as a Source of DNA for Clinical Testing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 125 (1). 127-133.

- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. 1990. PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press. 482 p. ISBN: 0123721806.
- Irion, D. N., Schaffer, A. L., Famula, T. R., Eggleston, M. L., Hughes, S. S., Pedersen, N. C. 2003. Analysis of Genetic Variation in 28 Dog Breed Populations With 100 Microsatellite Markers. *Journal of Heredity*. 94 (1). 81-87.
- Janochová, J. 2009. Izolace DNA: výtěžnost a kvalita. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Přírodovědecká fakulta. Brno. 45 s.
- Johansson, Å., Karlsson, P., Gyllensten, U. 2003. A novel method for automatic genotyping of microsatellite markers based on parametric pattern recognition. *Human Genetics*. 113 (4). 316-324.
- Kašička, V. 1997. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy*. 91 (5). 320-329.
- King, I. B., Satia-Abouta, J., Thornquist, M. D., Bigler, J., Patterson, R. E., Kristal, A. R., Shattuck, A. L., Potter, J. D., White, E. 2002. Buccal Cell DNA Yield, Quality, and Collection Costs: Comparison of Methods for Large-scale Studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 11 (10). 1130-1133.
- Klukowska, J., Strabel, T., Mackowski, M., Switonski, M. 2003. Microsatellite polymorphism and genetic distances between the dog, red fox and arctic fox. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 120 (2). 88-94.
- Kurose, N., Masuda, R., Tatara, M. 2005. Fecal DNA analysis for identifying species and sex of sympatric carnivores: A noninvasive method for conservation on the Tsushima islands, Japan. *Journal of Heredity*. 96 (6). 688-697.
- Leonard, J. M., Bollmann, S. R., Hays, J. B. 2003. Reduction of Stability of Arabidopsis Genomic and Transgenic DNA-Repeat Sequences (Microsatellites) by Inactivation of AtMSH2 Mismatch-Repair Function. *Plant Physiology*. 133 (1). 328-38.
- Levinson, G., Gutman, G. A. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA-sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 4 (3). 203-221.

- Liberg, O., Andrén, H., Pedersen, H.-Ch., Sand, H., Sejberg, D., Wabakken, P., Åkesson, M., Bensch, S. 2005. Severe inbreeding depression in a wild wolf (*Canis lupus*) population. *Biology Letters*. 1(1). 17-20.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J. L., Kulbokas, E. J., Zody, M. C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R. K., Ostrander, E. A., Ponting, C. P., Galibert, F., Smith, D. R., deJong, P. J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, Ch.-W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M. J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, Ch., Kim, L., Koepfli, K.-P., Parker, H. G., Pollinger, J. P., Searle, S. M. J., Sutter, N. B., Thomas, R., Webber, C., Lander, E. S. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 438 (8). 803-819.
- Marchand, L. L., Lum-Jones, A., Saltzman, B., Visaya, V., Nomura, A. M. Y., Kolonel, L. N., 2001. Feasibility of Collecting Buccal Cell DNA by Mail in a Cohort Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 10 (6). 701-703.
- Morey, F. D. 1990. *Dogs, Domestication and the Development of a Social Bond*. Cambridge university press. New York. p. 356. ISBN: 9780521757430.
- Nobis, G. 1979. Der älteste Haushunde lebte vor 14000 Jahren. *Umschau*. 79 (19). 610.
- Nowacka-Woszuk, J., Nizanski, W., Klimowicz, M., Switonski, M. 2007. Normal male chromosome complement and a lack of the SRY and SOX9 gene mutations in a male pseudohermaphrodite dog. *Animal Reproduction Science*. 98 (3). 371-376.
- Oberbauer, A. M., Grossman, D. I., Eggleston, M. L., Irion, D. N., Schlaffer, A. L., Pedersen, N. C., Belanger, J. M. Alternatives to Blood as a Source of DNA for Large-scale Scanning Studies of Canine Genome Linkages. *Veterinary Research Communications*. 27 (1). 27-38.
- Ostrander, E. A., Wayne, R. K. 2005. The canine genome. *Genome Research*. 15 (12). 1706-1716.

- Parker, H. G., Kim, L. V., Sutter, N. B., Carlson, S., Lorentzen, T. D., Malek, T. B., Johnson, G. S., DeFrance, H. B., Ostrander, E. A., Kruglyak, L. 2004. Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science*. 304 (5674). 1160-1164.
- Price, E. O. 1984. Behavioral aspects of animal domestication. *The Quarterly Review of Biology*. 59 (1). 1-32.
- Räber, H. 1997. Bernský salašnický pes. Dona. České Budějovice. 166 s. ISBN: 8085463946.
- Roon, D. A., Waits, L. P., Kendall, K. C. 2003. A quantitative evaluation of two methods for preserving hair samples. *Molecular Ecology Notes*. 3 (1). 163-166.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E. F. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. p. 2344. ISBN 0879695773.
- Sargan, D. R., Aguirre-Hernandez, J., Galibert, F., Ostrander, E. A. 2007. An extended microsatellite set for linkage mapping in the domestic dog. *Journal of Heredity*. 98 (3). 221-231.
- Savolainen, P., Zhang, Y. P., Luo, J., Lundeberg, J., Leitner, T. 2002. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*. 298 (5598). 1610-1613.
- Schug, M. D., Mackay, T. F., Aquadro, C. F. 1997. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics*. 15 (1). 99-102.
- Sundqvist, A. K., Ellergen, H., Olivier, M., Vilà, C. 2001. Y chromosomes haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 10 (8). 1959-1966.
- Sutter, N. B., Eberle, M. A., Parker, H. G., Pullar, B. J., Kirkness, E. F., Kruglyak, L., Ostrander, E. A. 2004. Extensive and breed-specific linkage disequilibrium in *Canis familiaris*. *Genome Research*. 14 (12). 2388-2396.
- van Asch, B., Alves, C., Gusmao, L., Pereira, V., Pereira, F., Amorim, A. 2009. A new autosomal STR nineplex for canine identification and parentage testing. *Electrophoresis*. 30 (2). 417-423.

- van Asch, B., Pinheiro, R., Pereira, R., Alves, C., Pereira, V., Pereira, F., Gusmao, L., Amorim, A. 2010. A framework for the development of STR genotyping in domestic animal species: Characterization and population study of 12 canine X-chromosome loci. *Electrophoresis*. 31 (2). 303-308.
- Verhoef-Verhallen, E. 2002. *Border kolie*. Rebo production CZ. Čestlice. 127 s. ISBN: 8072342142.
- Vilà, C., Savolainen, P., Maldonado, J. E., Amorim, I. R., Rice, J. E., Honeycutt, R. L., Crandall, K. A., Lundeberg and J., Wayne, R. K. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*. 276 (5319). 1687-1689.
- Vilà, C., Walker, C., Sundqvist, A.-K., Flagstad, Andersone, Z., Casulli, A., Kojola, I., Valdmann, H., Halverson, J., Ellegren, H. 2003. Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf–dog hybrids. *Heredity*. 90 (1). 17-24.
- Warburg, O., Christian W. 1942. Isolation and crystallization of enolase. *Biochemische zeitschrift*. 310. 384-421.
- Watson, J. D., Tooze, J., Kurtz, D. T. 1988. *Rekombinantní DNA*. Academia. Praha. 293 s.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., Chomczynski, P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectro-photometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*. 22 (3). 474-481.
- Yokoyama, J. S., Erdman, C. A., Hamilton, S. P. 2010. Array-Based Whole-Genome Survey of Dog Saliva DNA Yields High Quality SNP Data. *Plos ONE*. 5 (5). e10809. 1-7.
- Zajc, I., Mellersh, C. S., Sampson, J. 1997. Variability of canine microsatellites within and between different dog breeds. *Mammalian Genome*. 8(3). 182-185.
- Zhou, J. Z., Bruns, M. A., Tiedje, J. M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (2). 316-322.

Použité internetové zdroje:

Animal Genetics Incorporated. Canine Services [online]. 2012 [cit. 2012-03-21]. Dostupné z <<http://www.horsetesting.com/Canine/Canine.asp>>.

- Bílek, K., Svobodová, K., Knoll, A. Seminář izolačních technologií pro studenty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně [online]. 2007 [cit. 2012-03-28]. Dostupné z <http://user.mendelu.cz/urban/frvs-doc/FRVS_2385_2007-prednaska.pdf>.
- DuPont Packaging. Past Award Winners [online]. 2010 [cit. 2012-03-31]. Dostupné z <http://www2.dupont.com/Packaging_Resins/en_US/awards/past_winners/22nd_dupont_packaging_award_winners.html>.
- FCI. Standards and Nomenclature. Fédération Cynologique Internationale [online]. 2010 [cit. 2012-03-02]. Dostupné z <<http://www.fci.be/nomenclature.aspx>>.
- Genomia s.r.o. Vyšetření pro kategorii: Psi [online]. 2012 [cit. 2012-03-19]. Dostupné z <<http://www.genomia.cz/cz/veterinari/psi/>>.
- National Human Genome Research Institute. An Overview of the Human Genome Project [online]. 2011 [cit. 2012-03-15]. Dostupné z <<http://www.genome.gov/12011238>>.
- Raclavský, V. Metody molekulární genetiky [online]. 2003 [cit. 2012-03-29]. Dostupné z <<http://biologie.upol.cz/metody/>>.
- Royal Canine. Dospělý pes [online]. 2010 [cit. 09-3-2012]. Dostupné z <<http://www.royalcanin.cz/psi/dospely-pes.html>>.
- Státní veterinární ústav Jihlava. Kontrola zdraví zvířat [online]. 2012 [cit. 2012-03-19]. Dostupné z <<http://www.svujihlava.cz/214-kontrola-zdravi-zvirat.html>>.
- Státní veterinární ústav Praha. Laboratoř molekulárních metod [online]. 2010 [cit. 2012-03-19]. Dostupné z <<http://www.lmmpraha.wz.cz/>>.
- Svoboda, P. Genservice, s.r.o. [online]. 2004 [cit. 2012-03-19]. Dostupné z <<http://www.almara.cz/genservice/>>.
- Thermo Fisher Scientific. Assessment of Nucleic Acid Purity [online]. 2011 [cit. 2012-04-01]. Dostupné z <<http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>>.
- UC Davis Veterinary Medicine. Veterinary Genetisc Laboratory [online]. 2011 [cit. 2012-03-20]. Dostupné z <<http://www.vgl.ucdavis.edu/services/dog.php>>.

Veterinary and Biomedical Sciences. Canine and Equine Genetics Laboratory [online]. 2011 [cit. 2012-03-21]. Dostupné z <<http://www.cvm.umn.edu/vbs/faculty/Mickelson/lab/home.html>>.

VetGen. Veterinary Genetic Services. Canine [online]. 2012 [cit. 2012-03-20]. Dostupné z <<http://www.vetgen.com/canine.html>>.

Vierstraete, A. 2001. PCR to amplify the requested gene [online]. University of Ghent. 1999 [cit. 2012-03-17]. Dostupné z <<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>>.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|--------------------|--|
| BD | bearded kolie |
| BM | bulmastif |
| BOC | border kolie |
| bp | base pairs, počet párů bází v molekule nukleové kyseliny |
| BRT | border teriér |
| BSP | bernský salašnický pes |
| CCD | charge-coupled device, zařízení s vázanými náboji, speciálně upravená kamera |
| ČSV | československý vlčák |
| CTAB | cetyltrimethylammonium bromid |
| ddH ₂ O | double distilled water, dvakrát deionizovaná voda |
| DNA | deoxyribonukleotidová kyselina |
| dsDNA | double-stranded DNA, dvouřetězcová DNA |
| FCI | Fédération Cynologique Internationale, Mezinárodní kynologická federace |
| JKD | jezevčík králičí dlouhosrstý |
| JSD | jezevčík standardní dlouhosrstý |
| LD | linkage disequilibrium, vazebná nerovnováha |
| mtDNA | mitochondriální DNA |
| PCR | polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce |
| PVPP | polyvinylpolypyrrolidon |
| RR | rhodeský ridgeback |
| SNP | single nucleotide polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus |
| ssDNA | single-stranded DNA, jednořetězcová DNA |
| SSR | simple sequence repeat, opakující se sekvence DNA, mikrosatelit |

10. PŘÍLOHY

Příloha 1: Fotodokumentace některých psů použitých pro experimenty (československý vlčák a rhodeský ridgeback)



Příloha 2: Pufry a roztoky použité při gelové elektroforéze

- nanášecí pufr NP (Sambrook et al., 1989)
 - 0,25 % bromfenolové modři – sodná sůl (Serva, SRN)
 - 0,25 % xylencyanolové modři FF (Sigma, USA)
 - 15,0 % ficolu (Sigma, USA)
 - vše se rozpustí ve sterilní ddH₂O
 - uchovává se při 4°C
- 10xTBE pufr (Sambrook et al., 1989)
 - 450 mM Tris-kyselina boritá (Sigma, USA), pH 8,0
 - 10 mM EDTA (Sigma, USA)
 - uchovává se při 4°C
- 1xTBE pufr (SAMBROOK et al., 1989)
 - naředí se 10xTBE pufr 1x deionizovanou H₂O
 - uchovává se při 4°C
- Zásobní roztok ethidium bromidu (SAMBROOK et al., 1989)
 - 10 mg ethidium bromidu (Sigma, USA)
 - 1 ml sterilní ddH₂O
 - při přípravě a manipulaci se musí pracovat v ochranných rukavicích
 - uchovává se ve tmě při teplotě 4°C
- Elektrodový pufr
 - 1500 ml 1xTBE
 - 75 µl zásobního roztoku ethidium bromidu
 - při přípravě a manipulaci se musí pracovat v ochranných rukavicích
 - pufr je určen pro okamžité použití