



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a zemědělských biotechnologií

Diplomová práce

Detekce dědičného onemocnění anomálie oka (CEA)
u ovčáckých plemen

Autor práce: Bc. Hana Žáková

Vedoucí práce: Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D.

Konzultant práce: Ing. Eva Jozová, Ph.D.

České Budějovice
2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím zdrojů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 23. 4. 2021

.....

Podpis

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá detekcí onemocnění anomálie oka (CEA) u ovčáckých plemen. CEA je vrozené dědičné oční onemocnění, jehož hlavními projevy jsou hypoplazie cévnatky a rozštěp optického disku. Onemocnění nelze vyléčit a často se objevují přidružené komplikace jako odchlípení sítnice nebo nitrooční krvácení. Za rozvojem této anomálie stojí delece 7,8 kb oblasti v intronu 4 genu *NHEJ1*.

Cílem práce byla optimalizace metod PCR a real-time PCR pro detekci kauzální mutace CEA a následný screening vzorků DNA pocházejících od psů ovčáckých plemen. Vyšetřovaný soubor byl tvořen 138 vzorky DNA od jedinců plemen border kolie, krátkosrstá kolie, dlouhosrstá kolie, sheltie, australský ovčák a německý ovčák. Biologický materiál byl získán stěrem bukalní sliznice. Obě použité metody poskytly stejné výsledky genotypů vyšetřovaných jedinců. Screening vzorků potvrdil největší výskyt jedinců postižených CEA u plemen dlouhosrstá kolie (91 %) a sheltie (23 %). Nejmenší výskyt recesivních homozygotů (4 %) byl zjištěn u plemene border kolie. U ostatních plemen nebyl detekován žádný jedinec postižený CEA.

Klíčová slova: ovčácký pes, CEA, *NHEJ1*, PCR

Abstract

This thesis deals with the detection of Collie Eye Anomaly (CEA) in Shepherd breeds. CEA is a congenital hereditary eye disease whose main manifestations are choroidal hypoplasia and coloboma of the optic nerve. This disease is incurable and complications such as retinal detachment or intraocular bleeding are often associated with it. The development of this anomaly is caused by a deletion of the 7.8 kb region in intron 4 of the *NHEJ1* gene.

The aim of this thesis is to optimize PCR and real-time PCR methods for the detection of CEA causal mutation and subsequent screening of DNA samples from Shepherd breeds dogs. The investigated group consisted of 138 DNA samples collected from individuals of the Border Collie, Smooth Collie, Rough Collie, Sheltie, Australian Shepherd and German Shepherd breeds. Biological materials were obtained via buccal swab. Both examined methods yielded the same results with regards to the subjects' genotypes. The screening of samples confirmed the findings of previous research, that the highest incidence of CEA occurs in Rough Collie (91%) and Sheltie (23%) breeds, respectively. The lowest incidence of recessive homozygotes (4%) was found in the Border Collie breed. Among other breeds, no dogs affected by CEA were detected.

Keywords: Shepherd Dog, CEA, *NHEJ1*, PCR

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Dagmar Stehlíkové, Ph.D. za odborné rady, ochotu a především čas, který věnovala vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem chovatelům psů za poskytnutí vzorků pro praktickou část práce a v neposlední řadě své rodině za podporu po celou dobu studia.

Obsah

Úvod.....	7
1 Literární přehled.....	8
1.1 CEA.....	8
1.1.1 Historie onemocnění.....	9
1.1.2 Klinické příznaky.....	9
1.1.3 Oftalmologické vyšetření.....	14
1.2 Genetické metody detekce CEA.....	15
1.2.1 PCR.....	17
1.2.2 ELFO.....	19
1.2.3 Real-time PCR.....	20
2 Cíle práce a hypotézy.....	22
2.1 Cíle práce.....	22
2.2 Hypotézy.....	22
3 Materiál a metody.....	23
3.1 Odběr vzorků.....	23
3.2 Izolace DNA.....	23
3.3 Měření koncentrace DNA.....	25
3.4 PCR.....	25
3.5 ELFO.....	28
3.6 Real-time PCR.....	28
4 Výsledky.....	31
4.1 PCR.....	31
4.2 Real-time PCR.....	39
5 Diskuse.....	43
Závěr.....	48
Seznam použité literatury.....	49
Seznam obrázků.....	55
Seznam tabulek.....	56
Seznam zkratk.....	57
Přílohy.....	58

Úvod

Psi mohou být postiženi různými vrozenými abnormalitami oka, které jsou buď dědičné nebo získané. Vrozené dědičné defekty zahrnují velké množství očních patologií a jejich výskyt závisí na genetické výbavě potomků zděděné od rodičů. Tyto poruchy jsou přítomny již od narození, ale příznaky se mohou projevit v pozdějším věku jedince.

Jednotlivé dědičné poruchy často postihují konkrétní plemena psů, a právě tak je tomu u onemocnění anomálie oka u kolíí (CEA). Anomálie postihuje ovčácká plemena psů, zejména krátkosrsté kolie, dlouhosrsté kolie, border kolie, sheltie a australské ovčáky, nicméně výskyt u dalších plemen je již také potvrzený.

CEA je vrozené dědičné oční onemocnění. Hlavními projevy jsou choroidální hypoplazie (hypoplazie cévnatky) a kolobom (rozštěp) optického disku. Tyto projevy se mohou vyskytovat současně a často je doprovází další defekty, kterými jsou odchlípení sítnice nebo nitrooční krvácení. U jedinců postižených CEA je přítomna mutace genu, která má vliv na správný vývoj oka, konkrétně cév vyživujících sítnici. Kauzální mutací pro CEA je delece v intronu 4 genu *NHEJ1*.

Díky identifikaci mutací, které jsou příčinou dědičných onemocnění, roste počet dostupných genetických testů. Testování CEA je důležité u jedinců predisponovaných plemen, aby se zabránilo šíření onemocnění do dalších generací. Oftalmologické vyšetření odhalí pouze jedince postižené CEA, přenašeči zůstávají skryti, proto nejspolehlivější metodou pro diagnostiku jsou DNA testy.

Tato diplomová práce je zaměřena na detekci mutace genu *NHEJ1* pomocí molekulárně genetické metody PCR a její modifikace real-time PCR.

1 Literární přehled

1.1 CEA

Anomálie oka u kolií (Collie Eye Anomaly, CEA) je vrozená dědičná porucha u psů, která způsobuje abnormální vývoj cévnatky oka (Yakely a kol., 1968). CEA je velmi heterogenní onemocnění s variabilitou v klinických projevech a jejich závažnostech. Dvěma hlavními oftalmoskopickými změnami jsou choroidální hypoplazie a kolobom optického disku nebo přilehlých oblastí. Tato porucha může být dále komplikována odchlípením sítnice a nitroočním krvácením. Postižení je ve většině případů nesymetrické, zasahuje obě oči, avšak s různou závažností projevu na každém oku. Míra poškození zraku koresponduje se závažností onemocnění, kdy může dojít až ke ztrátě zraku (Abarca, 2019). CEA není vázána na pohlaví a frekvence onemocnění nesouvisí s barvou srsti, typem srsti nebo přítomností genu pro merle zbarvení, který ovlivňuje pigment na pokožce a vytváří barevné skvrny na srsti (Gelatt, 2014).

Dědičné formy onemocnění očí jsou pravděpodobně nejlépe popsaná a charakterizovaná onemocnění u psů na klinické a molekulární úrovni (Mellersh, 2014). CEA byla intenzivně studována u dlouhosrstých a krátkosrstých kolií na konci 60. let 20. století, což vedlo k pečlivému popisu klinického fenotypu, dědičnosti a histopatogeneze onemocnění (Roberts, 1969). Wallin-Hakanson a kol. (2000a) ve své studii zpochybnili recesivní způsob dědičnosti a jejich výsledky vedly k závěru, že se jedná spíše o polygenní typ dědičnosti vzhledem k přítomnosti více defektů a změn u CEA syndromu. Choroidální hypoplazie, označovaná jako primární CEA fenotyp, představuje mírnější formu onemocnění a je považována za autozomálně recesivní znak. Extrémně vysoký výskyt CEA u určitých plemen spojený s variabilní expresí fenotypu a důkazy o neúplné penetranci v některých populacích však zakryl skutečný způsob dědičnosti onemocnění. Segregační studie v čistokrevných populacích ukázaly, že penetrance primárního CEA fenotypu u homozygotů je menší než 100 % (neúplná penetrance). Také byla pozorována částečná penetrance u některých heterozygotů. Z toho vyplývá, že část heterozygotů může exprimovat postižený fenotyp (Lowe a kol., 2003).

CEA je způsobena delecí v genu *NHEJ1* (Non-Homologous End-Joining factor 1). Deletovaná oblast genu pravděpodobně nese transkripční faktory, které jsou nezbytné pro embryonální vývoj postižené části oka. Dosud však neexistuje

žádná studie zaměřená na embryonální nebo postnatální expresi určitých proteinů, takže o skutečné příčině onemocnění lze jen spekulovat (Palanova, 2016).

Onemocnění bylo popsáno u psů ovčáckých plemen, nejčastěji u kolií (dlouhosrstá kolie, krátkosrstá kolie, border kolie). Dalšími plemeny, u kterých se může tato anomálie vyskytnout, jsou sheltie, australský ovčák, dlouhosrstý vipet, lancashirský patař, kanadský retrievr, německý ovčák, beagle, australská kelpie, hokkaido-ken a boykin španěl. CEA může zřejmě postihovat více plemen, ale onemocnění u dalších nebylo zatím prokázáno (Mizukami a kol., 2012; Kucharczyk a kol., 2019).

1.1.1 Historie onemocnění

Anomálii oka u kolií poprvé popsal v roce 1953 W. Magrane. Název vznikl podle plemene, které bývá touto poruchou nejčastěji postiženo (Magrane, 1953). V dalších letech bylo zjištěno, že onemocnění se objevuje i u jiných plemen a název může být zavádějící. Byla navržena alternativa „congenital posterior segment anomaly“, avšak název zůstal nezměněn a dodnes se používá termín CEA (Bedford, 1998).

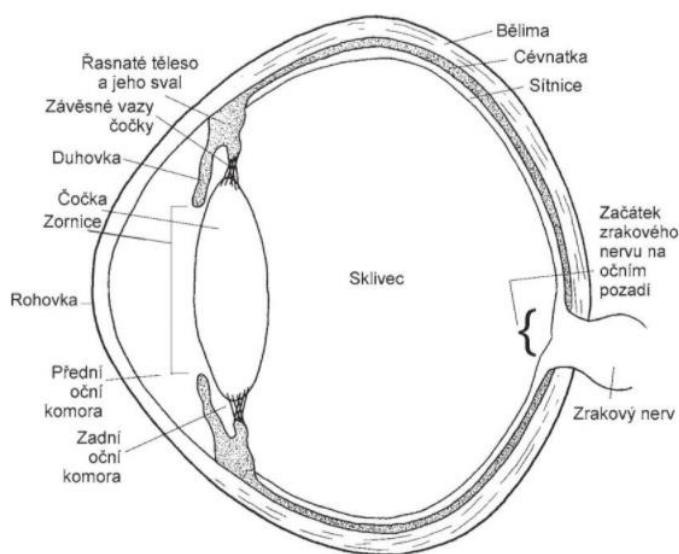
V roce 1969 bylo provedeno pokusné křížení zdravého psa a feny postižené CEA. Z 12 vrhů vzešlo 78 potomků, z nichž bylo 60 % postižených CEA. Tento pokus potvrdil genetické založení této anomálie a její přenos na potomstvo (Roberts, 1969).

Výskyt anomálie u kolií byl podle průzkumu ve Spojených státech kolem 80 % (Donovan a Wyman, 1965). Během několika let prevalence klesla na 59 % díky výběrovému chovu psů (Gelatt, 2014). Zaznamenán byl výskyt v Norsku 41 % (Bjerkas, 1991), v Rakousku 13 % (Holzhacker, 1988) a ve Švýcarsku 32 % (Kellner a Leon, 1985). Podle pozdějšího průzkumu Walser-Reinhardt a kol. (2009) byla incidence ve Švýcarsku 40 %.

1.1.2 Klinické příznaky

CEA jako vrozený oční syndrom zahrnuje poškození zevní vazivové a střední cévnaté vrstvy oční koule. Za patogenezi onemocnění je považována abnormální mezodermální diferenciace, jež vede k defektům bělimy, cévnatky, optického disku a sítnice. Hlavním znakem CEA je choroidální hypoplazie, která může, či nemusí být doprovázena zjevnými defekty sítnice, bělimy nebo kolobomy. Klinické nálezy u postižených jedinců mohou být velmi různorodé. V jednom vrhu se často vyskytují velké rozdíly v závažnosti postižení (Gelatt, 2014). Pro popis projevů CEA je

důležitá znalost anatomické stavby oka (obrázek 1.1), která je téměř stejná u všech savců.



Obrázek 1.1 Stavba oka (Reece, 2010)

Oční koule se skládá ze tří vrstev:

- tunica fibrosa – vazivový obal, který je tvořen rohovkou a bělimou;
- tunica vasculosa – cévní vrstva, která se skládá z cévnatky, řasnatého tělesa a duhovky;
- tunica nervosa – vnitřní vrstva, kterou tvoří sítnice.

Rohovka je průhledná přední část očního bulbu a skrze ni vstupuje světlo do nitra oční koule. Stroma rohovky tvoří pravidelně uspořádaná vlákna kolagenu. Rohovka je bohatě inervovaná a není zásobena krví (Reece, 2010).

Bělina je tvořena sítí kolagenových vláken, která podporují tvar oka. Mezi kolagenovými vlákny jsou rozptýlena elastická vlákna, jež pomáhají odolávat nitroočnímu tlaku. Bělina udržuje optimální nitrooční tlak vypouštěním komorové vody, která vyplňuje prostor mezi rohovkou a čočkou. Zvýšení nitroočního tlaku může způsobit glaukom.

Cévnatka je pigmentovaná a vysoce vaskularizovaná vrstva, která zajišťuje přísun živin do sítnice. Součástí cévnatky je oblast nazývaná tapetum lucidum. Nad touto oblastí je sítnice obvykle bez pigmentu. Díky tomu se může světlo odrážet zpět do sítnice, což zlepšuje noční vidění. Tapetum lucidum má u psa výrazně zelenou barvu (Liebich a König, 2004).

Duhovka vychází z řasnatého tělesa a zakrývá přední povrch čočky kromě oblasti, kde se nachází zornice. Funkce duhovky spočívá v kontrole množství světla vstupujícího do oka prostřednictvím zornice. Kolagenová vlákna jsou schopna se přizpůsobit rozšíření a zúžení zornic. Za šera se zornice rozšiřují, to umožňuje maximální stimulaci fotoreceptorů, zejména tyčinek (Gelatt, 2014).

Sítnice je vnitřní světločivná vrstva oka, která je rozdělena na fotosensitivní část (pars optica) a slepou část (pars caeca). Sítnici tvoří deset vrstev:

- pigmentový epitel,
- tyčinky a čípky (fotoreceptory),
- zevní limitující membrána,
- zevní jaderná membrána,
- zevní plexiformní vrstva,
- vnitřní jaderná vrstva
- vnitřní plexiformní vrstva,
- vrstva gangliových buněk,
- vrstva nervových vláken,
- vnitřní limitující membrána.

Tyčinky v sítnici zviřat zprostředkovávají černobílé vidění, jsou velmi citlivé na světlo a důležité pro noční vidění. Čípky představují fotoreceptory pro barevné vidění a uplatňují se při vidění ve dne. Část sítnice, která je pozorována při oftalmologickém vyšetření, se nazývá oční pozadí (Reece, 2010)

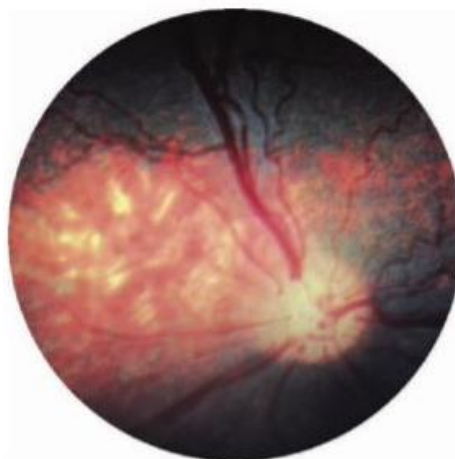
Optický (zrakový) nerv má u psa průměr přibližně 2 mm. Je tvořen axony bipolárních a multipolárních neuronů z gangliové vrstvy sítnice. Síť axonů se shromažďuje v oblasti zvané optický disk a prochází cévnatkou a bělimou do očnice. Poté pokračuje až do mozkové kůry, kde dochází ke konečnému zpracování vizuálních podnětů (Liebich a König, 2004; Samuelson, 2013)

Čtyři hlavní projevy zahrnuté do CEA syndromu jsou:

- choroidální hypoplazie,
- kolobom,
- odchlípení sítnice,
- nitrooční krvácení (Gelatt, 2014).

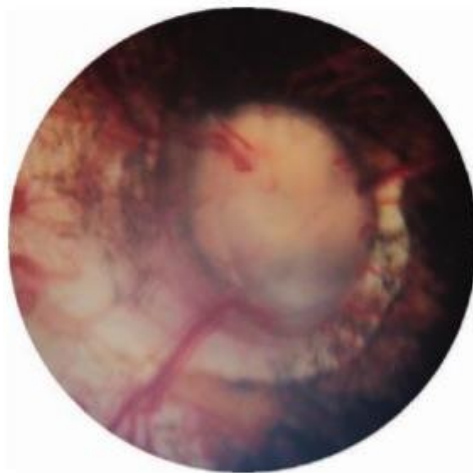
Cévnatka je vrstva oka uložená mezi sítnicí a bělimou. U CEA dochází v průběhu embryonálního vývoje k hypoplazii cévnatky, tzn. chybnému utváření. Vzniká tak

bledá, ztenčená oblast v blízkosti optického disku. Dochází k úbytku pigmentu v sítnici a cévnatce. Také může chybět část tapetum lucidum, což je reflexní vrstva cévnatky. Choroidální hypoplazie (obrázek 1.2) se vyznačuje sníženou hustotou a rozšířením cév v postižené oblasti cévnatky. U štěňat ve věku 4–5 týdnů lze pozorovat mírně stupně hypoplazie jako malé poruchy pigmentace v blízkosti optického disku (Abarca, 2019). Do 3 měsíců věku štěněte se změní barva vrstvy tapetum lucidum z modré na žlutozelenou a větší množství pigmentu překryje chorobné změny na cévnatce. Tento fenomén se nazývá „go normal“ a znemožní tak diagnostikovat CEA u starších štěňat (Walser-Reinhardt a kol., 2009). Diagnostika může být také obtížná u psů se zbarvením merle, kteří mají světlejší oční pozadí (Samuelson, 2013). Jedinci, u kterých se projevuje pouze choroidální hypoplazie, nemají žádné poruchy zraku, ale přesto by se neměli používat k chovu, aby se zamezilo přenosu mutované alely do dalších generací. Nicméně chovatelé často uchovňují i tyto psy (Wallin-Hakanson a kol., 2000b).



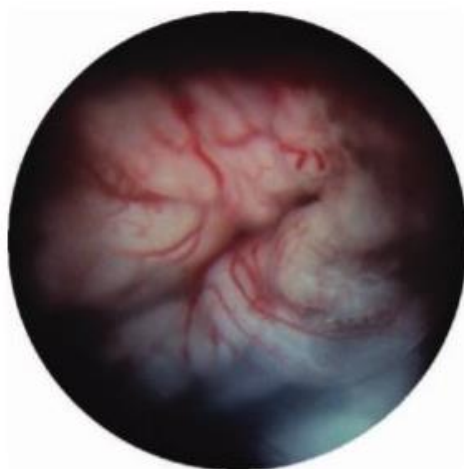
Obrázek 1.2 Choroidální hypoplazie (Dziezyc a Millichamp, 2004)

Kolobom (obrázek 1.3) je absence normální oční tkáně a vzniká jako výsledek nedokonalého uzávěru oční štěrbině během embryonálního vývoje. Může zasáhnout oční víčko, bělimu, sítnici, hlavu optického nervu nebo celou peripapilární oblast (Maggs a kol., 2013; Abarca, 2019). Na optickém disku jsou patrné papilární léze, které se jeví jako šedé nebo růžové prohlubně s různou velikostí. Velké kolobomy mohou vážně narušit oblast optického disku, který je často deformovaný a nakloněný. Psi s kolobomem hlavy optického nervu bývají nejvíce postiženi a hrozí u nich odchlípení sítnice a slepota. Většina postižených kolíí má také choroidální hypoplazii. U plemen sheltie a německý ovčák je možné pozorovat kolobomy bez choroidální hypoplazie (Samuelson, 2013; Brown a kol., 2018).



Obrázek 1.3 Kolobom hlavy optického nervu (Dziezyc a Millichamp, 2004)

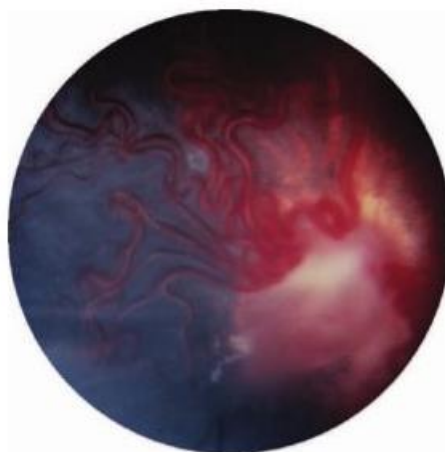
Odchlípení sítnice (obrázek 1.4) se vyskytuje u 5–10 % kolíí s CEA. Nejčastěji postihuje jedno oko, ale sporadicky se může projevit jako bilaterální (Gelatt, 2014). Odchlípení může být částečné, sousedící s kolobomem, většinou však jde o úplné odchlípení s retinální dialýzou (trhlina v sítnici). Nejčastěji je diagnostikováno u štěňat, ale může se rozvinout i u starších psů. Velké kolomoby optického disku jsou predispozicí k odchlípení sítnice. Tento projev je obvykle odhalen při prvním vyšetření v 6.–7. týdnu věku, nebo později jako následek komplikace CEA (během prvních 2–3 let života). Pokud pes netrpí odchlípením sítnice, je CEA ve většině případů asymptomatická. To je nepochybně důvod, proč se onemocnění stalo tak rozšířeným (Abarca, 2019). Léčba odchlípení sítnice dosáhla v posledních letech významného pokroku. Veterinární oftalmolog může provést laserovou operaci, kdy dojde k zacelení a připojení sítnice k ostatním vrstvám oka (Gelatt a Plummer, 2017).



Obrázek 1.4 Odchlípení sítnice (Dziezyc a Millichamp, 2004)

Hyféma neboli krvácení do přední oční komory lze pozorovat u malého procenta jedinců postižených CEA. Za predisponující faktory jsou považovány kolobomy a odchlípení sítnice. Během embryonálního vývoje oka je arteria hyaloidea hlavní tepnou, která zásobuje živinami čočku a sítnici. Pokud nedojde k regresi její distální části, vzniká persistující arteria hyaloidea. Tato struktura může prasknout a následně dochází ke krvácení do čočky, sklivce a přední oční komory. Hyféma může způsobit zvýšení nitroočního tlaku a rozvoj glaukomu (Telle a Betbeze, 2015).

Dalším znakem přítomným u CEA je téměř vždy zvýšená tortuozita (zakřivení) cév sítnice (obrázek 1.5). Tato cévní anomálie může být však nalezena také u kolíí prostých CEA a u psů jiných plemen, proto se obvykle nepovažuje za klinický symptom CEA. Přesto by se tomuto projevu měla věnovat zvýšená pozornost u plemen predisponovaných k CEA (Barrie a kol., 1981).



Obrázek 1.5 Zvýšená tortuozita cév sítnice (Dziezyk a Millichamp, 2004)

1.1.3 Oftalmologické vyšetření

Diagnostika CEA je založena na oftalmologickém vyšetření očního pozadí. U štěňat mladších než 2 týdny není možné vyšetřit oční pozadí, protože oční víčka jsou ještě zarostlá a rohovka není dostatečně čirá. V 7.–8. týdnu věku psa je dokončena diferenciacie sítnice, oční víčka jsou otevřená a je nejvhodnější doba k provedení oftalmologického vyšetření (Narfström a Petersen-Jones, 2013).

Ve veterinární oftalmologii se využívá přímá (obrázek 1.6) a nepřímá (obrázek 1.7) oftalmoskopie. Vyšetření se provádí v zatemněné místnosti s použitím mydriatik, které vyvolávají rozšíření zornice. Přímá oftalmoskopie poskytuje malé zorné pole s větším zvětšením, obraz je skutečný a nepřevrácený. Používá se zejména k vyšetření oblasti hlavy optického nervu. Toto vyšetření není dostatečné, a proto se používá také nepřímá oftalmoskopie, která využívá binokulární

oftalmoskop. Umožňuje podrobnější vyšetření očního pozadí za kratší dobu, lze hodnotit změny povrchu sítnice, odchlípení sítnice, kolobomy a edém papily zrakového nervu (Mould, 2002; Gelatt, 2014). Vyšetření provádí lékař oftalmolog, který má na hlavě nasazený oftalmoskop a před okem vyšetřovaného jedince drží čočku +14 až +30 dioptrií (Dietrich, 2019). Nepřímá metoda poskytuje skutečný, převrácený obraz s menším zvětšením, ale mnohem větším zorným polem (Mould, 2002). Oftalmologické vyšetření však odhalí pouze postižené jedince, nikoliv přenašeče (Parker a kol., 2007).



Obrázek 1.6 Přímá oftalmoskopie (Eyevetssouthsound.com, © 2015)



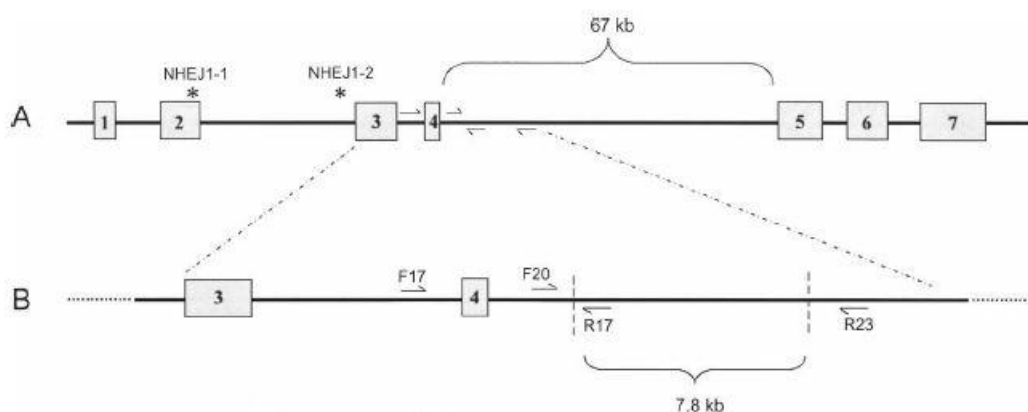
Obrázek 1.7 Nepřímá oftalmoskopie (Eyevetssouthsound.com, © 2015)

1.2 Genetické metody detekce CEA

Heterozygotní přenašeči zůstávají skryti, protože anomálie oka jsou děděny jako recesivní znaky. Právě proto jsou DNA testy nejvhodnější diagnostickou metodou pro dědičná onemocnění jako CEA (Parker a kol., 2007). DNA testy mohou být provedeny v jakémkoliv věku a prioritou pro jejich vyvinutí je identifikace kauzální mutace genu, která způsobuje dané onemocnění (Petersen-Jones, 2001). Lowe a kol. (2003) lokalizovali pomocí komparativního mapování genomu 3,9 cM oblast na

37. chromozomu spojenou s choroidální hypoplazií. Později byly techniky jemného mapování použity k identifikaci CEA lokusu v genu *NHEJ1* (Parker a kol., 2007). Gen *NHEJ1* má důležitou funkci v opravách zlomů dsDNA. Proces funguje na principu znovuspojení DNA řetězců a není závislý na dostupnosti homologního řetězce DNA (O’Driscoll, 2012).

Mutace asociovaná s CEA byla popsána jako homozygotní delece 7,8 kb v intronu 4 genu *NHEJ1*, což umožňuje detekci heterozygotů i homozygotů pomocí PCR metod. Parker a kol. (2007) použili dva páry primerů (obrázek 1.8), které umožňují identifikaci chromozomů s delecí a bez delecí.



Obrázek 1.8 A) Schéma genu *NHEJ1*: SNPs označené * a 67 kb intron 4. B) Bližší znázornění oblasti delece (7,8 kb) asociované s CEA, primery F17 a R17 pro amplifikaci divoké alely, F20 a R23 pro amplifikaci mutované alely (Parker a kol., 2007).

Oblast intronické delece zahrnuje několik konzervovaných sekvencí, zejména 124 bp úsek. Tento úsek je vysoce konzervovaný mezi savčími genomy a obsahuje vazebná místa pro mnoho regulačních proteinů. Absence těchto proteinů je pravděpodobně zodpovědná za rozvoj CEA (Palanova, 2016). V roce 2005 firma OptiGen, která se specializuje na testování dědičných forem onemocnění očí, představila komerční test pro detekci postiženého CEA genotypu (Bauer a kol., 2015).

V souvislosti s CEA jsou pozorovány tři genotypy:

- AA (dominantní homozygot) – zdravý jedinec, u kterého se nenachází poškozená forma genu;
- Aa (heterozygot) – přenašeč, který zdědil jednu poškozenou alelu;
- aa (recesivní homozygot) – postižený jedinec, který zdědil poškozenou alelu od obou rodičů.

Křížením dvou zdravých jedinců vznikne 100 % zdravých potomků, křížením zdravého jedince s přenašečem bude 50 % potomků zdravých a 50 % přenašečů, po

zkřížení dvou postižených jedinců bude 100 % potomků postiženo CEA a zkřížením dvou přenašečů vznikne 25 % potomků zdravých, 50 % přenašečů a 25 % potomků postižených CEA (Schneiderová, 2019).

Vyhodnocení výsledků DNA testů má několik variant zápisu. Laboratoř Genomia uvádí pro zdravého homozygota označení N/N (negativní/negativní), pro heterozygotního přenašeče N/P (negativní/pozitivní) a pro postiženého homozygota P/P (pozitivní/pozitivní) (Genomia.cz, © 2008–2021). Zahraniční laboratoř Laboklin používá označení N/N pro zdravého homozygota, N/CEA pro heterozygota a CEA/CEA pro postiženého homozygota (Laboklin.com, © 2007). Další používané označení je ++ pro zdravého homozygota, +/- pro heterozygota a -/- pro postiženého homozygota.

1.2.1 PCR

V oblasti molekulárně biologických technik bylo učiněno mnoho klíčových objevů, nicméně největší přínos pro rozvoj molekulární biologie měla právě polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR). Jedním z důvodů je jednoduchost reakce a relativně snadné praktické provedení. PCR patří mezi první metody použité k analýze DNA (Walker a Rapley, 2009). Metoda probíhá jako in vitro amplifikace genomové DNA bez klonování ve vektorech (Šmarda a kol., 2005). Byla zavedena v roce 1983 Kary Mullisem (Mullis, 1990). PCR je schopna pracovat s nepatrným množstvím DNA a amplifikovat ho na takové množství, které je možné analyzovat (Clark a kol., 2019). Principem metody je replikace nukleových kyselin, jež je jedním ze základních procesů v živých organismech. Podstatou PCR je zmnožení určitého úseku DNA, který je vymezen dvěma primery vázajícími se na protilehlé řetězce DNA. Syntéza nových vláken DNA probíhá cyklicky a zajišťuje ji enzym DNA polymeráza ve směru 5'→3' (Šmarda a kol., 2005). Každá nově syntetizovaná DNA se stane templátem pro další DNA, tak vzniká řetězová reakce a DNA kopie se tvoří exponenciálně. Reakce probíhá v termocykleru, který dokáže rychle a přesně měnit teplotu podle nastaveného programu (Clark a kol., 2019).

PCR vyžaduje přítomnost určitých složek v reakční směsi:

- a. templátová DNA,
- b. oligonukleotidové primery (forward a reverse),
- c. volné deoxynukleotidy,
- d. termostabilní DNA polymeráza (*Taq* polymeráza),

e. Mg^{2+} ionty a reakční pufr (Weier a Gray, 1988).

Pro úspěšné provedení PCR je zásadním krokem navržení vhodných primerů, které by měly splňovat tyto podmínky:

1. délka 15–30 bází,
2. optimální obsah GC párů 40–60 %,
3. podobná teplota tání obou primerů (rozdíl maximálně 5 °C),
4. absence komplementárních sekvencí v primerech – nesmí na sebe vzájemně nasedat a tvořit dimery,
5. absence vnitřních sekundárních struktur – nesmí docházet k self-annealingu a vzniku vlásenek (Lorenz, 2012).

Před provedením PCR je nejprve nutné izolovat DNA, která obsahuje požadovanou cílovou sekvenci. Na začátku reakce dojde k počáteční denaturaci, poté probíhají ve 25–40 cyklech 3 hlavní kroky s přesně definovanými časovými a teplotními podmínkami. Prvním krokem je denaturace templátové DNA, zahřátí na teplotu přibližně 94 °C, kdy se dvouvláknová DNA rozplete. V tuto chvíli je fragment, který má být amplifikován, dostupný pro primery. Ty se mohou navázat na templát a vymezí tak určitou sekvenci (Walker a Rapley, 2009; Joshi a Deshpande, 2011). Tento druhý krok se nazývá annealing – nasedání primerů. Teplota annealingu by měla být o několik stupňů nižší než teplota tání primerů, obvykle 40–60 °C, doba závisí na délce primerů (Clark a kol., 2019). Třetím krokem je elongace, kdy probíhá syntéza DNA pomocí termostabilní DNA polymerázy při 72 °C, čas je ovlivněn výslednou velikostí amplikonů. Na závěr reakce (po posledním cyklu) jsou vzorky inkubovány při 72 °C 5–15 minut kvůli dosyntetizování nedokončených PCR produktů. Tato fáze se nazývá finální elongace. Poté je reakční směs zchlazena na 4 °C a následuje vizualizace amplikonů (Joshi a Deshpande, 2011; Lorenz, 2012).

PCR má v dnešní době díky svým benefitům velmi široké využití. Našla uplatnění ve všech oblastech molekulární biologie a biotechnologie, jako například při vzniku transgenních rostlin a živočichů, v lékařské diagnostice, genové terapii, forenzní vědě nebo environmentální analýze. Také byla modifikována pro stanovení množství mRNA nalezené v různých tkáních a organismech, což umožňuje nahlédnout do buněčného prostředí a studovat expresi různých genů (Clark a kol., 2019). Používá se například pro zmnožení úseku DNA (genu), kde jako templát může sloužit DNA i RNA (cDNA). K detekci specifické mutace, patogenu, virové infekce v ranném stádiu, v prenatalní diagnostice a k identifikaci osob v oboru

soudního lékařství (Alberts a kol., 2006). V neposlední řadě je možné PCR použít pro výrobu hybridizační sondy nebo pro detekci GMO (Zhou a kol., 2009).

Vzhledem k širokému uplatnění PCR má metoda mnoho modifikací, jejichž reakční podmínky jsou upraveny podle potřeby konkrétní metody. Často používanou variantou je multiplex PCR. Reakční směs obsahuje několik párů primerů, z nichž každý amplifikuje jinou cílovou sekvenci. Tato metoda umožňuje detekci několika genů nebo patogenů v jedné PCR reakci (Šmarda a kol., 2005). Nested PCR využívá dva páry primerů (vnější a vnitřní) pro jeden určitý lokus. Probíhají dvě po sobě jdoucí reakce, každá s jiným párem primerů. Metoda je vysoce citlivá a slouží ke zvýšení specifity PCR (Haff, 1994). Reverzně-transkriptázová PCR se používá pro analýzu RNA. Nejprve dochází k přepisu mRNA do cDNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy a následně probíhá amplifikace standardním postupem PCR (Simpson a kol., 1992).

I přes veškeré výhody, které PCR poskytuje, má také svá omezení. Díky vysoké citlivosti metody může jakákoliv kontaminace vzorku, byť stopovým množstvím jiné DNA, vést k zavádějícím výsledkům. Pro navrhování primerů je důležitá předchozí znalost části sekvence DNA, z toho vyplývá, že lze metodu použít pouze k prokázání přítomnosti či nepřítomnosti známého genu nebo patogenu. Dalším omezením může být skutečnost, že primery mohou nespecificky hybridizovat se sekvencemi, které jsou podobné DNA templátu, ale ne zcela identické. Ojedinele mohou být do PCR sekvence DNA polymerázou inkorporovány nesprávné nukleotidy (Smith a Osborn, 2009; Garibyan a Avashia, 2013).

1.2.2 ELFO

Elektroforéza nukleových kyselin (ELFO) je nejčastěji používaná technika k separaci, identifikaci a purifikaci molekul DNA. Jde o elektromigrační metodu, která k separaci využívá pohyb nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. DNA má díky přítomnosti fosfátových skupin záporný náboj, tudíž se pohybuje v elektrickém poli ke kladně nabitě elektrodě (Fukal a kol., 2006; Beránek, 2016).

Nejjednodušší a nejrozšířenější metodou je horizontální elektroforéza na agarózovém gelu s použitím interkalačního barviva (ethidium bromid). Barvivo interkaluje mezi vlákna dsDNA a pod UV světlem zviditelňuje fragmenty DNA, které jsou patrné jako proužky, jejichž intenzita se řídí koncentrací DNA. Dalším interkalačním činidlem, které lze použít, je fluorescenční barvivo SYBR Green.

Agarózové gely se používají k separaci molekul větších než 100 bp (do cca 50 kb). Polyakrylamidové gely jsou vhodné pro separaci kratších DNA molekul o velikosti 10–1000 bp. Velikost fragmentu DNA lze zjistit jednoduše použitím velikostního markeru, který je napipetován na gel vedle vzorku (Šmarda a kol., 2005; Walker a Rapley, 2009).

1.2.3 Real-time PCR

Real-time PCR je technika, která umožňuje detekci i kvantifikaci amplifikované DNA v reálném čase, zatímco se DNA syntetizuje. Amplifikace DNA je monitorována v každém cyklu pomocí speciálního termocykleru, který zaznamenává fluorescenci. Fluorescenční signál lze vytvořit několika způsoby.

První metoda zahrnuje přidání interkalačního fluorescenčního barviva (SYBR Green), které se váže na dsDNA a emituje světlo (Valasek a Repa, 2005). Intenzita fluorescence závisí na množství DNA vytvořeném v každém cyklu. SYBR Green monitoruje celkové množství dsDNA, ale nedokáže rozlišit různé sekvence. Pokud dojde například k tvorbě dimerů, fluorofor bude emitovat světlo, což povede k nesprávným výsledkům (Clark a kol., 2019). Použití interkalačního barviva SYBR Green je jednou z nejjednodušších a cenově nejdostupnějších metod díky tomu, že nejsou třeba specifické fluorescenčně značené sondy (Tan a kol., 2009).

Druhou metodou je použití fluorescenčně značených sond (TaqMan). Sonda je oligonukleotidová sekvence, která je komplementární k cílové DNA. Na 5' konci má fluorescenční značku (fluorofor) a na 3' konci zhášec. Sonda se váže na vnitřní část amplifikované sekvence mezi forward a reverse primer. Pokud vznikne homoduplex, je sonda rozložena aktivitou DNA polymerázy a dojde k emisi fluorescence (Clark a kol., 2019). Výhodou TaqMan analýzy je možnost použití v multiplexu a vysoká specifita reakce. Fluorescenční barvivo konjugované s oligonukleotidovou sondou zaručuje specifitu emitované fluorescence (Soltany-Rezaee-Rad a kol., 2015). Nevýhodou je nutnost syntézy specifických sond pro různé sekvence (Valasek a Repa, 2005). Další možností je použití dvojice sond, které využívají proces zvaný Försterův rezonanční přenos energie (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET). Pokud jsou fluorofor a zhášec v těsné blízkosti, zhášec absorbuje emitované světlo pomocí FRET. Pokud je zhášec daleko od fluoroforu, není schopen absorbovat energii a termocykler může zaznamenat intenzitu fluorescence (Clark a kol., 2019). FRET sondy jsou atraktivní technologií v buněčném výzkumu

díky schopnosti monitorování biochemických reakcí a sledování buněčných procesů *in vivo*. Umožňují současnou detekci více produktů a jsou vhodné pro použití v klinické diagnostice (Didenko, 2001). Nevýhodou je nutnost identifikace dvou oblastí pro hybridizaci dvou sond, mezi kterými je mezera 2–5 nukleotidů. S tím se pojí také náročnější návrh těchto sond (Jothikumar a kol., 2009).

Ve srovnání s konvenční PCR spojenou s gelovou elektroforézou poskytuje real-time PCR vyšší rychlost, citlivost a specifitu. Díky těmto benefitům je nyní jednou z nejdůležitějších technik pro detekci a monitoring genetických mutací (Tan a kol., 2009). Dalším příkladem použití je studium genové exprese, detekce patogenů, genotypizační analýza bodových mutací, které způsobují například fenyلكetonurii, srpkovitou anémií nebo trombofilní stavy a v neposlední řadě detekce biologicky důležitých polymorfismů souvisejících s metabolismem léčiv (Beránek, 2016).

2 Cíle práce a hypotézy

2.1 Cíle práce

1. Optimalizace metod PCR a real-time PCR pro detekci mutace genu *NHEJ1*.
2. Screening mutace genu *NHEJ1* metodami PCR a real-time PCR u vzorků DNA pocházejících od psů ovčáckých plemen.
3. Zpracování literárního přehledu dosavadních poznatků o geneticky podmíněném onemocnění CEA a vyšetřovacích metodách.

2.2 Hypotézy

1. Metoda real-time PCR je nejvhodnější metodou pro detekci mutace genu *NHEJ1*.
2. Je optimalizováno více primerů cílených do stejného genu se stejnou účinností.
3. Prevalence výskytu onemocnění je nejvyšší u plemen dlouhosrstá kolie a sheltie.

3 Materiál a metody

Pro praktickou část diplomové práce byla použita DNA od 138 psů ovčáckých plemen – border kolie, krátkosrstá kolie, dlouhosrstá kolie, sheltie, australský ovčák a německý ovčák. Část vzorků byla odebrána v období od 4. 6. 2020 do 6. 12. 2020 a část vzorků byla poskytnuta Ing. Dagmar Stehlíkovou, Ph.D., jejich odběr byl proveden v roce 2019. Kromě 5 jedinců jsou všichni s průkazem původu. Z celkového počtu 138 jedinců je 53 psů a 85 fen ve věku od 2 měsíců do 14 let. Zastoupení jednotlivých plemen je znázorněno v tabulce 3.1.

Tabulka 3.1 Zastoupení jednotlivých plemen (zdroj: autor)

Plemeno	Pes	Fena	Celkem
Border kolie	7	19	26
Krátkosrstá kolie	5	6	11
Dlouhosrstá kolie	11	12	23
Sheltie	3	10	13
Australský ovčák	1	8	9
Německý ovčák	26	30	56
Celkem	53	85	138

3.1 Odběr vzorků

Odběr vzorků byl prováděn stěrem bukální sliznice psů pomocí odběrových tamponů FLOQSwabs™ (Copan). Odběr prováděla autorka práce nebo chovatelé, kterým byly zaslány odběrové tampony, instrukce k odběru (příloha 1) a informační dotazník (příloha 2).

3.2 Izolace DNA

Izolace DNA z odebraných bukálních stěrů byla prováděna pomocí komerčního kitu Presto™ Buccal Swab gDNA Extraction Kit od firmy Geneaid. Tento kit využívá proteinázu K a chaotropní sůl k lýze buněk a degradaci proteinu. DNA se poté může vázat na povrch kolonky. Součástí kitu je carrier RNA pro efektivnější vázání DNA na membránu kolonky. Pomocí promývacích pufrů jsou odstraněny nečistoty a přečištěná DNA je eluována elučním pufrem (Geneaid.com, 2017).

Postup izolace DNA

Příprava vzorku

- Do 1,5 ml mikrozkuhavky bylo napipetováno 500 μ l S1 bufferu a 20 μ l proteinázy K.

-
- Poté byl do mikroskopické vložky vložen odběrový tampon a krouživými pohyby došlo k uvolnění stěru do roztoku.
 - Následovala inkubace 10 minut při 60 °C.
 - Konec odběrového tamponu byl přenesen do filtrační kolonky, která byla centrifugována 2 minuty při 14000 × g pro získání zbylého vzorku z tamponu.
 - Eluát byl přepipetován k inkubovanému vzorku.

Lyze buněk

- Do mikroskopické vložky se vzorkem bylo napipetováno 500 µl S2 bufferu a 1 µl carrier RNA, směs byla vortexována.
- Poté proběhla inkubace 10 minut při 60 °C, po 5 minutách byla směs vortexována.

Navázání DNA

- Do mikroskopické vložky bylo přidáno 500 µl ethanolu a vzorek byl vortexován.
- Do nové GD kolonky bylo napipetováno 750 µl vzorku, proběhla centrifugace 1 minutu při 14000 × g a eluát byl odstraněn.
- Poté byl do kolonky napipetován zbytek vzorku, který byl centrifugován 1 minutu při 14000 × g.
- GD kolonka byla umístěna do nové sběrné mikroskopické vložky.

Promytí DNA

- Do GD kolonky bylo napipetováno 400 µl W1 bufferu a po centrifugaci 30 sekund při 14000 × g byl odstraněn eluát.
- Následně bylo přidáno 600 µl wash bufferu, opět proběhla centrifugace a eluát byl odstraněn.
- Kolonka byla centrifugována 3 minuty na maximum.

Eluce DNA

- GD kolonka s navázanou DNA byla vložena do nové 1,5 ml označené mikroskopické vložky.
- Nakonec bylo připipetováno 70 µl elution bufferu, vzorek byl inkubován 3 minuty při laboratorní teplotě a poté centrifugován 1 minutu na maximum.
- Vyizolovaná DNA byla uchována při -20 °C.

3.3 Měření koncentrace DNA

Po izolaci bylo u vzorků provedeno spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA pomocí přístroje BioSpec-nano (Shimadzu). Tento přístroj umožňuje kvantifikaci a kontrolu čistoty nukleových kyselin. Na měrnou plochu je nejprve napipetován 1 μl blanku (eluční pufr) a poté 1 μl vzorku. Měření probíhá při vlnových délkách 230 nm, 260 nm a 280 nm. Hodnotí se poměry absorbancí OD260/280 a OD260/230 (Shimadzu.com, 2017).

3.4 PCR

V této diplomové práci byly k detekci mutace genu *NHEJ1* použity dvě metody, PCR a její modifikace real-time PCR.

PCR byla provedena se dvěma druhy primerů s odlišnými reakčními protokoly. Reakce se lišily pouze v použitých primerech, objemy komponent zůstaly stejné. V obou případech byl použit GoTaq® Green Master Mix (Promega). Primery byly syntetizovány firmou Macrogen a před použitím naředěny na koncentraci 10 pmol/ μl .

První primery byly převzaty z článku Beckers a kol. (2016). V reakci byl použit jeden forward a dva reverse primery uvedené v tabulce 3.2. R_wt primer v kombinaci s F primerem slouží k amplifikaci divoké alely a R_mut primer s F primerem k amplifikaci mutované alely. Reakční směs měla výsledný objem 25 μl a složení je znázorněno v tabulce 3.3.

Tabulka 3.2 Sekvence primerů podle Beckers a kol. (2016)

Primer	Sekvence 5'→3' (nt)
F	TTTGGTTGCCCGATCGATCA (20)
R_wt	CCCCTGTTTGCCGTTTAATAGATGT (25)
R_mut	CCAATCATCCAGCCCAGCAT (20)

Tabulka 3.3 Složení reakční směsi pro PCR (zdroj: autor)

Složka	Objem [μl]
GoTaq® Green Master Mix (Promega)	12
Forward primer	1
Reverse primer	1
PCR H ₂ O	9
DNA templát (20–60 ng/ μl)	2
Celkem	25

Příprava vzorku

- Do dvou 1,5 ml mikrozkušavek byly připraveny reakční směsi podle tabulky 3.3 pro příslušný počet vzorků + negativní kontrola + jeden navíc (rezerva pro chybu při pipetování).
- V první mikrozkušavce reakční směs obsahovala primery F a R_{wt}, ve druhé F a R_{mut}.
- Reakční směs byla rozpipetována do PCR zkumavek po 23 μ l.
- K reakční směsi byly přidány 2 μ l DNA templátu, do negativní kontroly 2 μ l PCR H₂O.

Před zahájením testování všech vzorků bylo nejprve nutné provést optimalizaci reakčního protokolu. K tomu byl použit teplotní gradient pro nasedání primerů v termocykleru Eppendorf Mastercycler PRO (Eppendorf). Schéma reakčního protokolu je znázorněno v tabulce 3.4. V reakčním protokolu byl teplotní gradient nastaven na 59–65 °C, annealing probíhal při teplotách: 59; 59,1; 59,4; 60; 60,6; 61,4; 62,2; 63; 63,7; 64,2; 64,7; 64,9 [°C].

Tabulka 3.4 Reakční protokol s teplotním gradientem (zdroj: autor)

Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94 °C	1 min	1
Denaturace	94 °C	15 s	40
Annealing	59–65 °C	15 s	
Elongace	72 °C	30 s	
Terminální extenze	72 °C	7 min	1
Chlazení	4 °C	∞	1

Pro vizualizaci fragmentů byla provedena elektroforéza na 2% agarózovém gelu (viz kapitola 3.5). Na základě provedeného teplotního gradientu byla pro nasedání primerů zvolena teplota 59 °C. Po optimalizaci metody bylo provedeno testování všech vzorků DNA. Schéma použitého reakčního protokolu je popsáno v tabulce 3.5, složení reakční směsi (tabulka 3.3) zůstalo stejné jako při reakci s teplotním gradientem. Produkty PCR byly zobrazeny pomocí gelové elektroforézy (viz kapitola 3.5).

Tabulka 3.5 Reakční protokol – optimalizovaná PCR (zdroj: autor)

Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94 °C	1 min	1
Denaturace	94 °C	15 s	40
Annealing	59 °C	15 s	
Elongace	72 °C	30 s	
Terminální extenze	72 °C	7 min	1
Chlazení	4 °C	∞	1

Dále byly použity dva páry primerů (tabulka 3.6) podle Parker a kol. (2007). Jeden pár (F20 a R23) pro detekci mutované alely a druhý (F17 a R17) pro detekci divoké alely. Složení reakční směsi je znázorněno v tabulce 3.3.

Tabulka 3.6 Sekvence primerů podle Parker a kol. (2007)

Primer	Sekvence 5'→3' (nt)
F17	TCTCACAGGCAGAAAGCTCA (20)
R17	CCATTCATTCCTTTGCCAGT (20)
F20	TGGGCTGGTGAACATTTGTA (20)
R23	CCTTTTGTGTTGCCCTCAGA (20)

Příprava vzorku

- Do dvou 1,5 ml mikrozkušavek byly připraveny reakční směsi podle tabulky 3.3 pro příslušný počet vzorků + negativní kontrola + jeden navíc (rezerva pro chybu při pipetování).
- V první mikrozkušavce reakční směs obsahovala primery F17 a R17, ve druhé F20 a R23.
- Reakční směs byla rozpipetována do PCR zkušavek po 23 µl.
- K reakční směsi byly přidány 2 µl DNA templátu, do negativní kontroly 2 µl PCR H₂O.
- PCR zkušavky se vzorky byly vloženy do termocykleru (Eppendorf Mastercycler PRO) s nastaveným programem dle tabulky 3.7.

Tabulka 3.7 Reakční protokol pro druhou PCR (zdroj: autor)

Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94 °C	5 min	1
Denaturace	94 °C	30 s	40
Annealing	60 °C	30 s	
Elongace	72 °C	1 min	
Terminální extenze	72 °C	7 min	1
Chlazení	4 °C	∞	1

Výsledné amplikony byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy na 2% agarózovém gelu (viz kapitola 3.5)

3.5 ELFO

K vyhodnocení PCR se používá elektroforetická separace fragmentů DNA.

Příprava 2% gelu

- Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 2,2 g agarózy a přidáno 120 ml 1x TBE pufru.
- Směs byla důkladně rozpuštěna v mikrovlnné troubě.
- Roztok byl zchlazen pod tekoucí vodou.
- Do roztoku byl napipetován ethidium bromid v objemu 4 μ l.
- Roztok byl nalit do připravené formy na gel.

Elektroforéza postup

- Po ztuhnutí byl gel vložen do elektroforetické vany.
- Do první jamky bylo napipetováno 11 μ l 100 bp DNA ladderu (New England Biolabs)
- Do následujících jamek bylo nanášeno 11 μ l vzorku.
- Elektroforéza byla nastavena nejprve na 50 V na cca 5 minut.
- Poté bylo nastaveno 90 V na 1 hodinu pro potřebnou separaci amplikonů dle jejich velikosti.
- Vizualizace byla provedena pomocí transluminátoru s UV světlem InGenius 3 (Syngene) a programu GeneSys (Syngene).

3.6 Real-time PCR

Metoda real-time PCR byla provedena s použitím interkalačního barviva SYBR Green v QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR Systému (ThermoFisher). Primery a metodika byly převzaty z článku Chang a kol. (2010) s provedením několika úprav. Pro real-time PCR byly použity tři primery (tabulka 3.8), jeden forward (F) a dva reverse (RW a RM) primery o finální koncentraci 200 nM. Složení reakční směsi je znázorněno v tabulce 3.9, výsledný objem byl 10 μ l. V reakci byl použit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Tabulka 3.8 Sekvence primerů pro real-time PCR (Chang a kol., 2010)

Primer	Sekvence 5'→3' (nt)
F	AGGGTTACCATTTGGGAACTGTCTT (25)
RW	AGCTTCTGACAGGCCACAATTATCTA (26)
RM	ACCAATCATCCAGCCCAGCATTAA (25)

Tabulka 3.9 Složení reakční směsi pro real-time PCR (zdroj: autor)

Složka	Objem [μl]
Power SYBR Green PCR Master Mix (2x)	4,5
Forward primer	0,2
Reverse primer	0,2
PCR H ₂ O	4,1
DNA templát	1
Celkem	10

Příprava vzorku

- Do dvou 1,5 ml černých mikrozkuvek byla připravena reakční směs podle tabulky 3.9 pro příslušný počet vzorků + negativní kontrola + jeden navíc (rezerva pro chybu při pipetování). Analýza byla provedena v duplikátech.
- V první mikrozkuvce reakční směs obsahovala primery F a RW pro amplifikaci divoké alely, ve druhé F a RM pro amplifikaci mutované alely.
- Reakční směs byla rozpipetována do PCR stripů po 9 μl. Pro každý vzorek byly dvě zkumavky s primery F a RW a dvě zkumavky s primery F a RM.
- K reakční směsi byl přidán 1 μl DNA templátu, do negativní kontroly 1 μl PCR H₂O.
- PCR stripy se vzorky byly vloženy do termocykleru QuantStudio™ 6 Flex (Thermofisher) s nastaveným amplifikačním programem dle tabulky 3.10.

Tabulka 3.10 Reakční protokol pro real-time PCR (zdroj: autor)

Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů	Změna teploty
Počáteční denaturace	50 °C	2 min	1	1,6 °C/s
	95 °C	10 min		1,6 °C/s
PCR amplifikace	95 °C	15 s	45	1,6 °C/s
	60 °C	1 min		1,6 °C/s
Křivka tání	95 °C	15 s	kontinuálně	1,6 °C/s
	60 °C	1 min		1,6 °C/s
	95 °C	15 s		1,6 °C/s

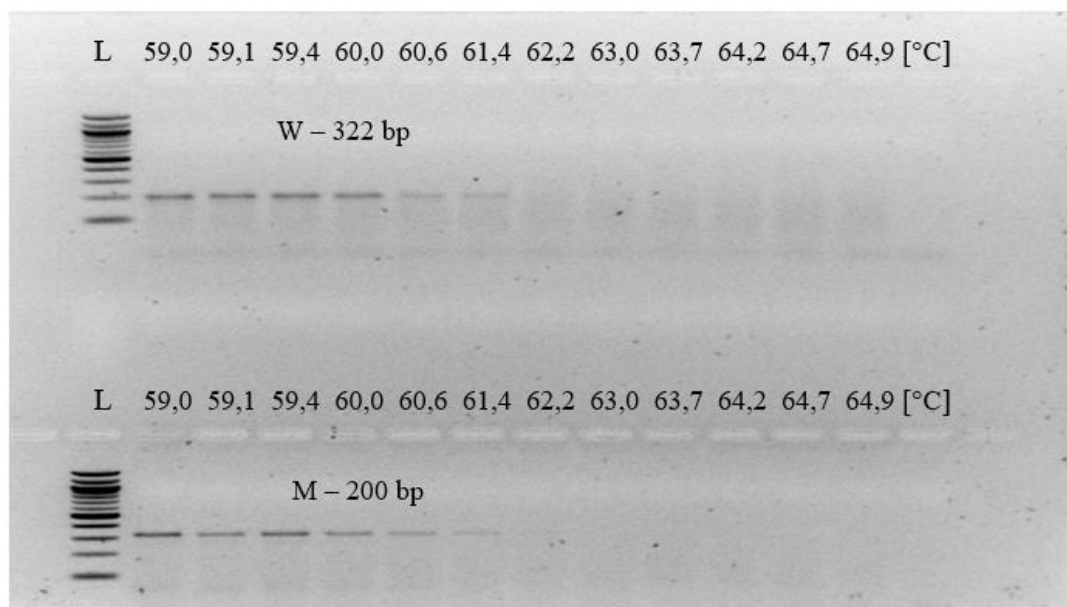
Vyhodnocení real-time PCR probíhalo pomocí softwaru QuantStudio™, který v každém cyklu zaznamenává fluorescenci. Po PCR amplifikaci proběhla analýza křivky tání, která slouží k odlišení specifických a nespecifických PCR produktů. Pomocí křivky tání byla určena teplota tání PCR produktů divoké a mutované alely.

4 Výsledky

Celkem 138 psů ovčáckých plemen bylo vyšetřeno na CEA. Z důvodu častého výskytu u kolíí je testování této anomálie důležité a poměrně běžné. U některých psů byl díky tomu uveden výsledek vyšetření z akreditované laboratoře.

4.1 PCR

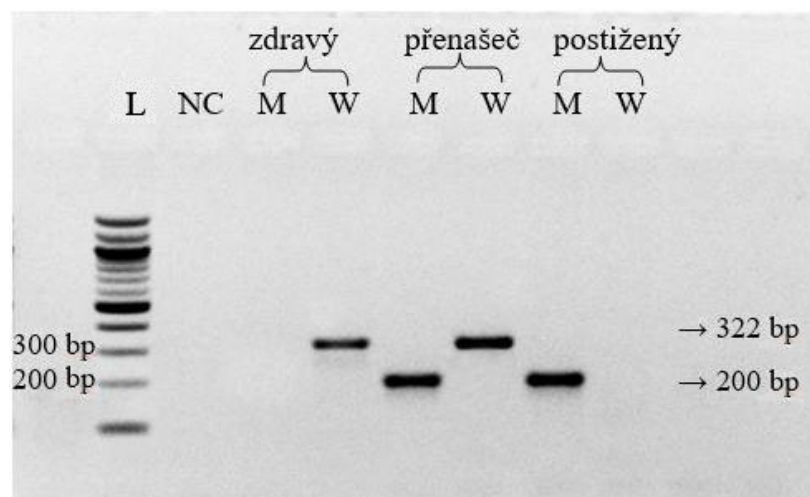
Pro optimalizaci PCR byly použity vzorky DNA se známým genotypem. Po provedení PCR s teplotním gradientem (obrázek 4.9) byla zvolena optimální teplota pro nasedání primerů 59 °C, při níž byly PCR produkty obou alel nejlépe amplifikovány. Na gelu (obrázek 4.9) jsou viditelné produkty o velikosti 322 bp (divoká alela, W) a 200 bp (mutovaná alela, M). Velikost amplifikovaných produktů je porovnávána s velikostním standardem (L).



Obrázek 4.9 Optimalizace metody PCR na základě teplotního gradientu. L – 100 bp DNA ladder (New England Biolabs), M – mutovaná alela, W – divoká alela (zdroj: autor)

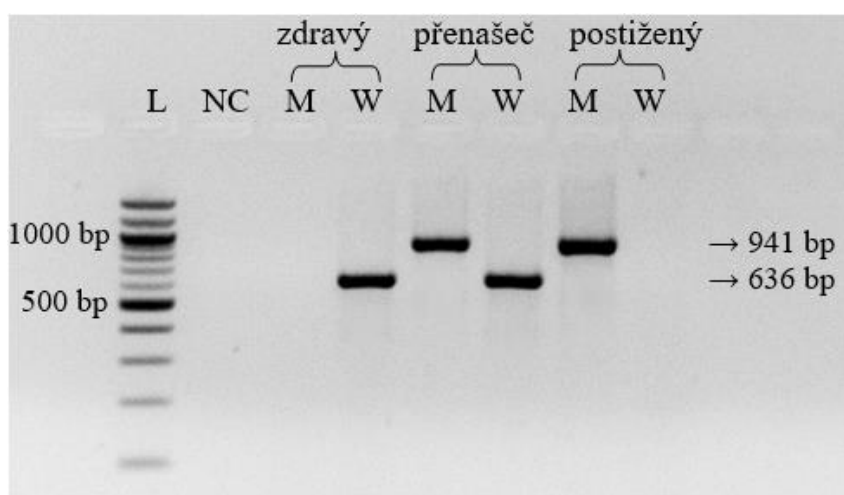
Po optimalizaci metody byly tyto primery použity k vyšetření všech 138 vzorků DNA. U 2 vzorků (č. 10 a 12) nedošlo k amplifikaci PCR produktů ani při opakované analýze z důvodu nízké koncentrace a znečištění DNA.

Na obrázku 4.10 jsou zobrazeny 3 možné genotypy onemocnění CEA. Zdravý jedinec je dominantní homozygot, amplifikovala se pouze divoká alela. Přenašeč je heterozygotní jedinec, tudíž došlo k amplifikaci obou alel, divoké i mutované a postižený jedince je recesivní homozygot, u kterého se amplifikovala jen mutovaná alela.



Obrázek 4.10 Výsledek PCR s použitím primerů dle Beckers a kol. (2016), zobrazení genotypů zdravého jedince, přenašeče a postiženého jedince. L – 100 bp ladder (New England Biolabs), NC – negativní kontrola, M – mutovaná alela (200 bp), W – divoká alela (322 bp) (zdroj: autor)

Dále byly testovány 2 páry primerů podle Parker a kol. (2007). Pomocí prvního páru primerů (F17 a R17) došlo k amplifikaci divoké alely (636 bp) a druhý pár primerů (F20 a R23) amplifikoval mutovanou alelu (941 bp). Na obrázku 4.11 jsou zobrazeny výsledky PCR analýzy 3 možných genotypů CEA. Stejně jako u předchozích primerů byla u zdravého jedince amplifikována pouze divoká alela, u přenašeče divoká i mutovaná alela a u postiženého jedince jen mutovaná alela.



Obrázek 4.11 Výsledek PCR s použitím primerů podle Parker a kol. (2007), zobrazení genotypů zdravého jedince, přenašeče a postiženého jedince. L – 100 bp ladder (New England Biolabs), NC – negativní kontrola, M – mutovaná alela (941 bp), W – divoká alela (636 bp) (zdroj: autor)

V tabulce 4.11 jsou uvedeni všichni testovaní jedinci, jejich plemena, výsledky PCR analýzy a známé genotypy uvedené chovateli. Výsledky PCR byly u všech vzorků stejné při použití obou primerů. Zdraví jedinci jsou označeni +/+, přenašeči onemocnění +/- a postižení jedinci -/-. U 23 vzorků (č. 1–23) byl znám výsledek

vyšetření díky předchozímu testování jedinců. Výsledek PCR analýzy u všech vzorků kromě 2 souhlasil s výsledkem z akreditované laboratoře, který uvedli chovatelé. U vzorků č. 19 a 20 bylo uvedeno, že se jedná o zdravé jedince, ale podle výsledku provedené PCR analýzy jsou jedinci heterozygotní přenašeči CEA.

Tabulka 4.11 Výsledky PCR analýzy (zdroj: autor)

Vzorek č.	Plemeno	Výsledek PCR	Známary genotyp
1	Sheltie	-/-	-/-
2	Sheltie	-/-	-/-
3	Sheltie	+/+	+/+
4	Sheltie	+/+	+/+
5	Sheltie	-/-	-/-
6	Sheltie	+/+	+/+
7	Sheltie	+/+	+/+
8	Sheltie	+/-	+/-
9	Sheltie	+/-	+/-
10	Sheltie		+/-
11	Sheltie	+/+	+/+
12	Sheltie		+/-
13	Border kolie	+/+	+/+
14	Border kolie	+/+	+/+
15	Border kolie	+/+	+/+
16	Border kolie	+/+	+/+
17	Border kolie	+/+	+/+
18	Border kolie	+/+	+/+
19	Border kolie	+/-	+/+
20	Border kolie	+/-	+/+
21	Border kolie	-/-	-/-
22	Border kolie	+/-	+/-
23	Border kolie	+/+	+/+
24	Sheltie	+/+	-
25	Border kolie	+/+	-
26	Border kolie	+/+	-
27	Border kolie	+/+	-
28	Border kolie	+/+	-
29	Border kolie	+/+	-
30	Border kolie	+/+	-
31	Border kolie	+/+	-
32	Border kolie	+/+	-
33	Německý ovčák	+/+	-
34	Border kolie	+/+	-
35	Německý ovčák	+/+	-

36	Border kolie	+/+	-
37	Německý ovčák	+/+	-
38	Německý ovčák	+/+	-
39	Německý ovčák	+/+	-
40	Německý ovčák	+/+	-
41	Německý ovčák	+/+	-
42	Německý ovčák	+/+	-
43	Německý ovčák	+/+	-
44	Německý ovčák	+/+	-
45	Německý ovčák	+/+	-
46	Německý ovčák	+/+	-
47	Německý ovčák	+/+	-
48	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
49	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
50	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
51	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
52	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
53	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
54	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
55	Border kolie	+/+	-
56	Border kolie	+/+	-
57	Německý ovčák	+/+	-
58	Německý ovčák	+/+	-
59	Německý ovčák	+/+	-
60	Německý ovčák	+/+	-
61	Německý ovčák	+/+	-
62	Německý ovčák	+/+	-
63	Německý ovčák	+/+	-
64	Německý ovčák	+/+	-
65	Německý ovčák	+/+	-
66	Německý ovčák	+/+	-
67	Německý ovčák	+/+	-
68	Německý ovčák	+/+	-
69	Německý ovčák	+/+	-
70	Německý ovčák	+/+	-
71	Německý ovčák	+/+	-
72	Německý ovčák	+/+	-
73	Německý ovčák	+/+	-
74	Německý ovčák	+/+	-
75	Německý ovčák	+/+	-
76	Německý ovčák	+/+	-
77	Německý ovčák	+/+	-
78	Německý ovčák	+/+	-

79	Německý ovčák	+/+	-
80	Německý ovčák	+/+	-
81	Německý ovčák	+/+	-
82	Německý ovčák	+/+	-
83	Německý ovčák	+/+	-
84	Německý ovčák	+/+	-
85	Německý ovčák	+/+	-
86	Německý ovčák	+/+	-
87	Německý ovčák	+/+	-
88	Německý ovčák	+/+	-
89	Německý ovčák	+/+	-
90	Německý ovčák	+/+	-
91	Německý ovčák	+/+	-
92	Německý ovčák	+/+	-
93	Australský ovčák	+/+	-
94	Australský ovčák	+/+	-
95	Australský ovčák	+/+	-
96	Australský ovčák	+/+	-
97	Australský ovčák	+/+	-
98	Australský ovčák	+/+	-
99	Německý ovčák	+/+	-
100	Německý ovčák	+/+	-
101	Německý ovčák	+/+	-
102	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
103	Krátkosrstá kolie	+/+	-
104	Krátkosrstá kolie	+/+	-
105	Krátkosrstá kolie	+/+	-
106	Krátkosrstá kolie	+/+	-
107	Border kolie	+/+	-
108	Německý ovčák	+/+	-
109	Krátkosrstá kolie	+/+	-
110	Krátkosrstá kolie	+/-	-
111	Krátkosrstá kolie	+/+	-
112	Krátkosrstá kolie	+/+	-
113	Krátkosrstá kolie	+/+	-
114	Australský ovčák	+/+	-
115	Australský ovčák	+/+	-
116	Australský ovčák	+/+	-
117	Border kolie	+/+	-
118	Border kolie	+/+	-
119	Německý ovčák	+/+	-
120	Německý ovčák	+/+	-
121	Krátkosrstá kolie	+/+	-

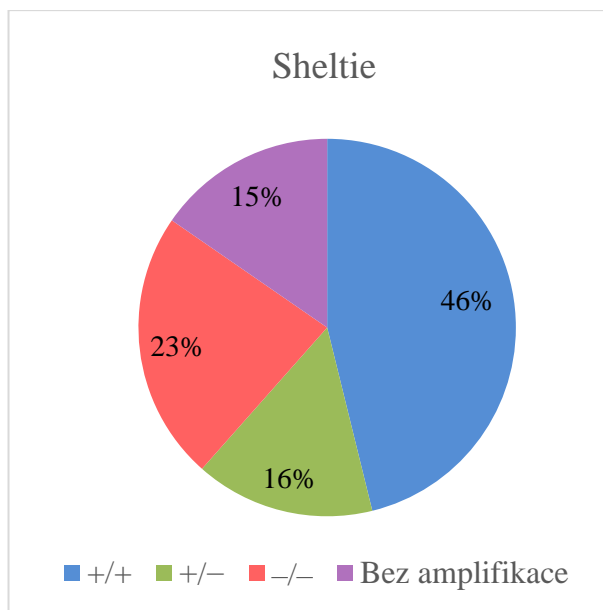
122	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
123	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
124	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
125	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
126	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
127	Dlouhosrstá kolie	+/-	-
128	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
129	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
130	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
131	Krátkosrstá kolie	+/+	-
132	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
133	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
134	Dlouhosrstá kolie	+/-	-
135	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
136	Německý ovčák	+/+	-
137	Dlouhosrstá kolie	-/-	-
138	Dlouhosrstá kolie	-/-	-

V tabulce 4.12 jsou uvedeny počty jedinců konkrétních plemen s určitým genotypem získaným metodou PCR. Z celkového počtu 138 vzorků DNA pocházejících od psů ovčáckých plemen bylo 103 jedinců zdravých, 8 přenašečů a 25 jedinců postižených onemocněním CEA.

Tabulka 4.12 Výsledné genotypy u jednotlivých plemen (zdroj: autor)

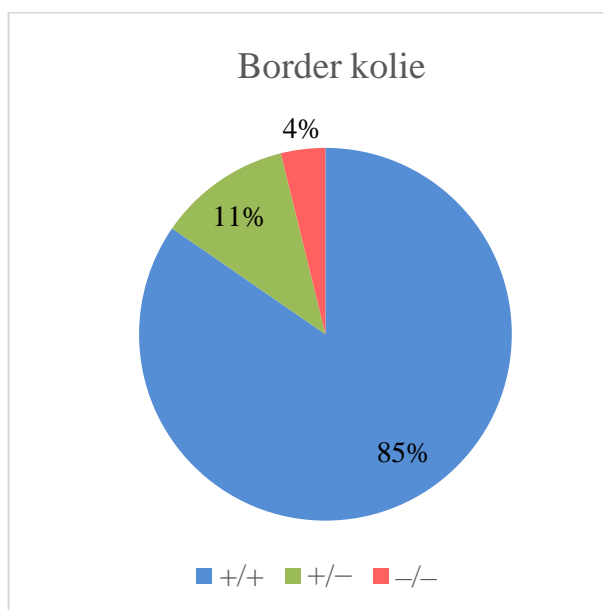
Plemeno	+/+	+/-	-/-	Bez amplifikace	Celkem
Sheltie	6	2	3	2	13
Border kolie	22	3	1	–	26
Dlouhosrstá kolie	–	2	21	–	23
Krátkosrstá kolie	10	1	–	–	11
Australský ovčák	9	–	–	–	9
Německý ovčák	56	–	–	–	56
Celkem	103	8	25	2	138

Data z tabulky 4.12 byla přenesena do grafů (obrázek 4.12–4.17). Bylo testováno 13 vzorků DNA od sheltií, z nichž byla CEA prokázána u 3 jedinců (23 %), 2 jedinci (16 %) byly heterozygotní přenašeči a zdravých jedinců bylo 6 (46 %). U 2 vzorků nedošlo k amplifikaci PCR produktu.



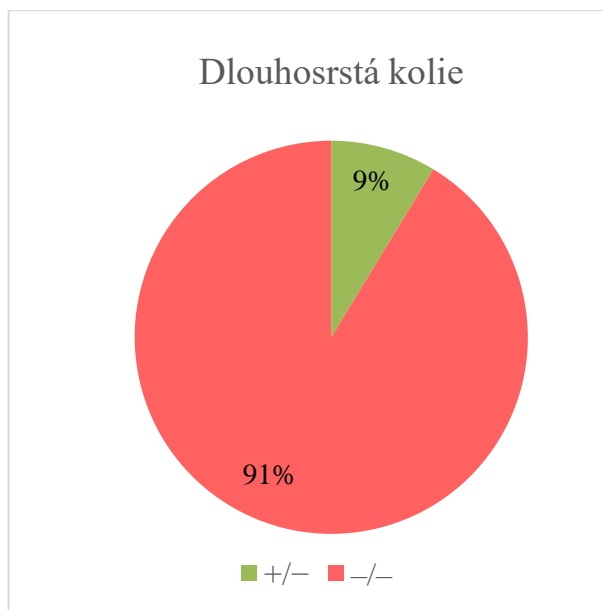
Obrázek 4.12 Výsledky plemene sheltie (zdroj: autor)

Vyšetřovaný soubor plemene border kolie tvořilo 26 vzorků. Z celkového počtu bylo 22 zdravých jedinců (85 %), 3 přenašeči (11 %) a 1 postižený jedinec (4 %).



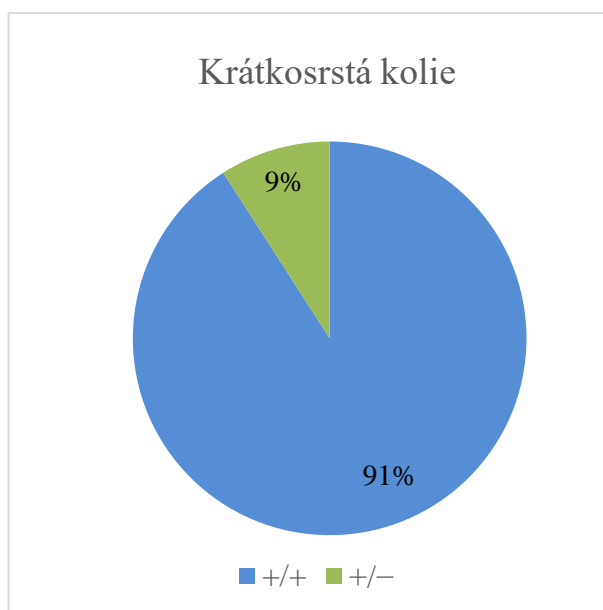
Obrázek 4.13 Výsledky plemene border kolie (zdroj: autor)

Vzorků od plemene dlouhosrstá kolie bylo testováno celkem 23. Zde bylo zaznamenáno nejvíce postižených jedinců, kterých bylo 21 (91 %) a 2 jedinci (9 %) byly přenašeči onemocnění. U tohoto plemene nebyli zaznamenáni žádní zdraví jedinci.



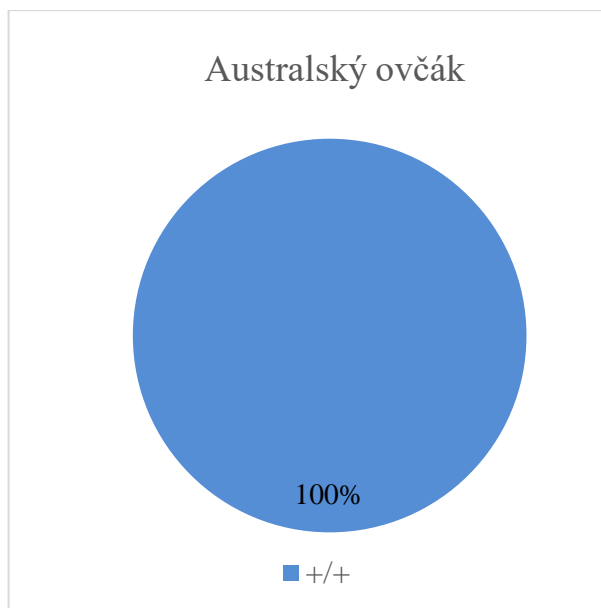
Obrázek 4.14 Výsledky plemene dlouhosrstá kolie (zdroj: autor)

Vyšetřovaný soubor plemene krátkosrstá kolie obsahoval 11 vzorků, z nichž 10 (91 %) bylo vyhodnoceno jako zdravý jedinec a 1 (9 %) jako heterozygotní přenašeč.



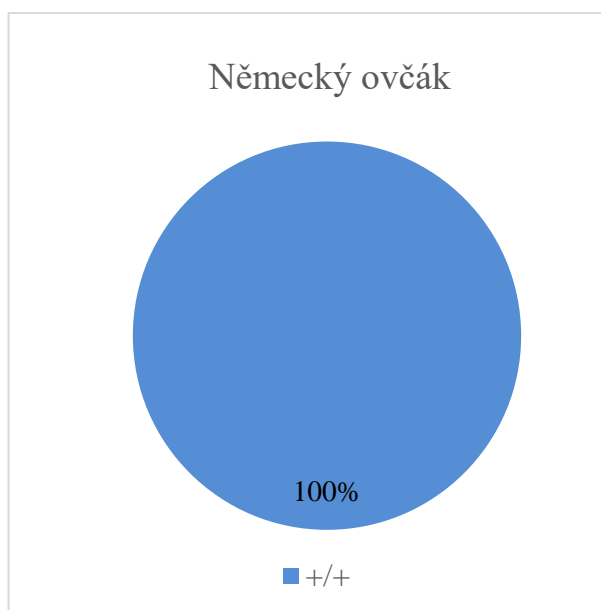
Obrázek 4.15 Výsledky plemene krátkosrstá kolie (zdroj: autor)

Nejméně jedinců bylo testováno u plemene australský ovčák, celkem 9 vzorků. Všichni testovaní jedinci byly vyhodnoceni jako zdraví.



Obrázek 4.16 Výsledky plemene australský ovčák (zdroj: autor)

Největší vyšetřovaný soubor představovalo plemeno německý ovčák. Bylo vyšetřeno celkem 56 vzorků DNA a všichni jedinci byly vyhodnoceni jako zdraví jedinci.

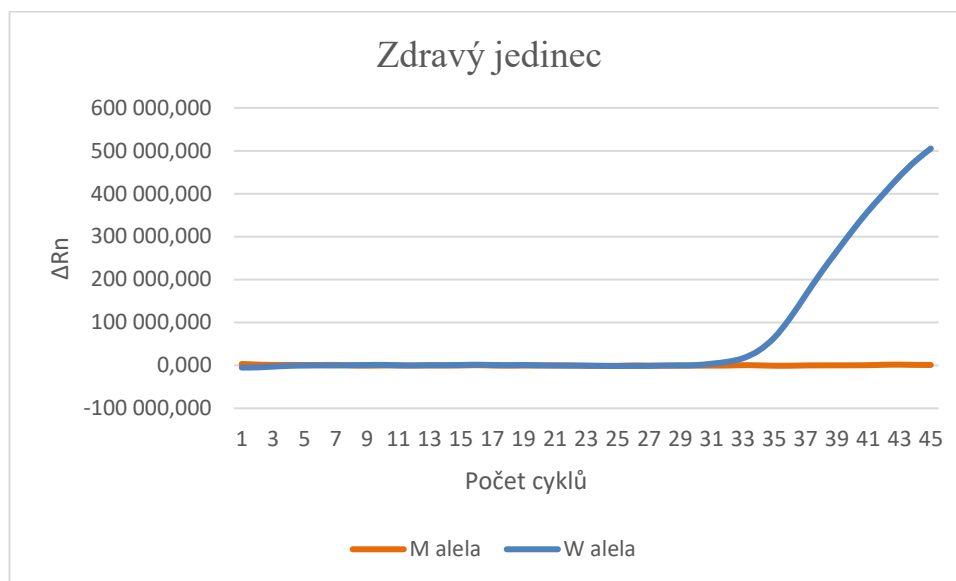


Obrázek 4.17 Výsledky plemene německý ovčák (zdroj: autor)

4.2 Real-time PCR

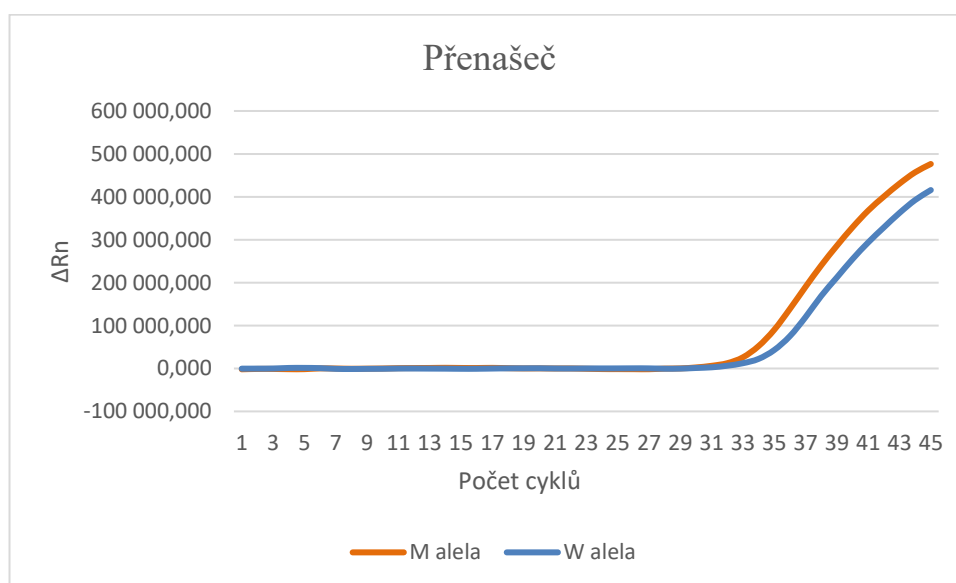
Pomocí real-time PCR s primery podle Chang a kol. (2010) bylo vyšetřeno 23 vzorků se známým genotypem. Na obrázcích 4.18, 4.19 a 4.20 jsou zobrazeny 3 genotypy onemocnění CEA, zdravý jedinec, přenašeč a postižený jedinec. Amplifikace PCR produktu je znázorněna jako intenzita fluorescence (ΔR_n) vzhledem k počtu cyklů. Na obrázku 4.18 je patrný nárůst fluorescence u divoké

alely začínající ve 31. cyklu. U mutované alely nedošlo k nárůstu fluorescence, jedná se tedy o zdravého jedince.



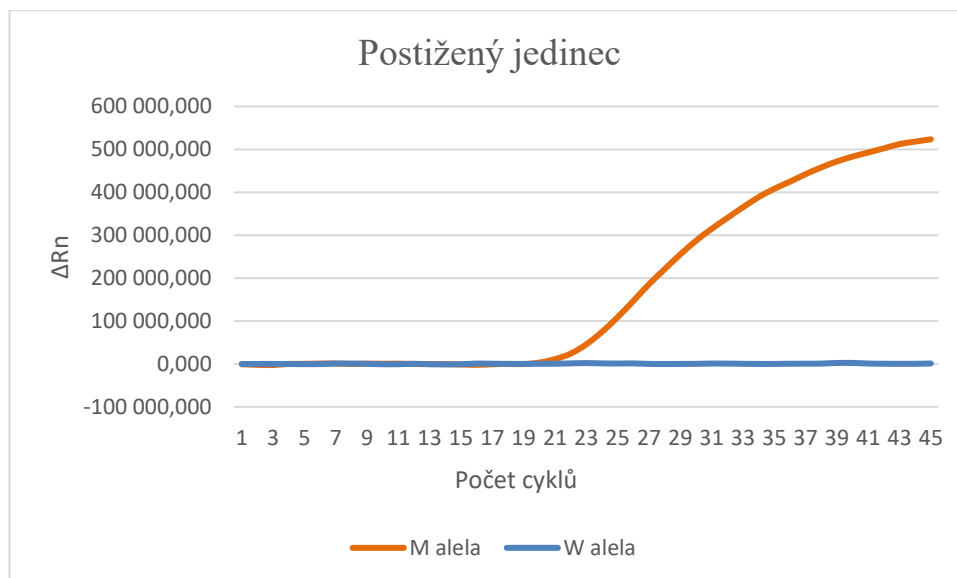
Obrázek 4.18 Výsledek real-time PCR zdravého jedince (zdroj: autor)

Na obrázku 4.19 je znázorněný nárůst fluorescence počínající ve 31. cyklu u obou alel, divoké i mutované. Jedná se tedy o přenašeče onemocnění.



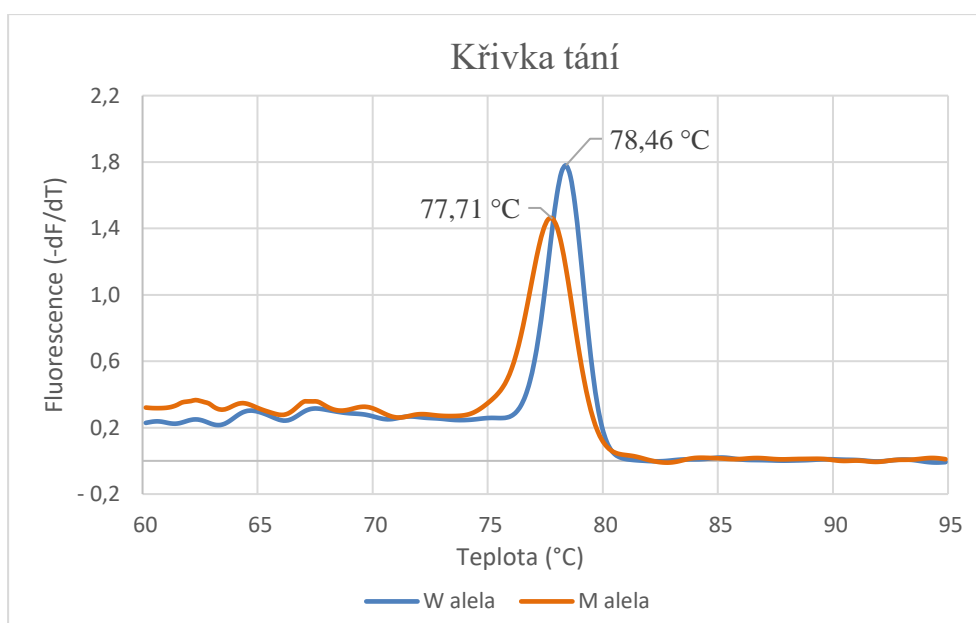
Obrázek 4.19 Výsledek real-time PCR přenašeče CEA (zdroj: autor)

Na obrázku 4.20 je viditelný nárůst fluorescence od 20. cyklu u mutované alely. U divoké alely nedošlo k amplifikaci, tudíž byl tento vzorek vyhodnocen jako postižený jedinec.



Obrázek 4.20 Výsledek real-time PCR postiženého jedince (zdroj: autor)

Analýza křivky tání (obrázek 4.21) zobrazuje teploty tání PCR produktů divoké a mutované alely u vzorku přenašeče onemocnění. Fluorescenční křivky byly získány zanesením záporné derivace fluorescence ($-dF/dT$) a teploty do grafu. U každé alely lze pozorovat pouze jedno zakřivení, tzn. že se neamplifikovaly žádné nespecifické produkty či dimery. Křivka tání je pro každou cílovou sekvenci specifická. Teplota tání mutované alely byla $77,71\text{ }^{\circ}\text{C}$ a divoké alely $78,46\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obrázek 4.21 Analýza křivky tání (zdroj: autor)

V tabulce 4.13 jsou uvedeny výsledky real-time PCR analýzy, plemena testovaných jedinců a jejich známé genotypy. Stejně jako v předchozí PCR analýze u vzorků č. 10 a 12 nedošlo k amplifikaci PCR produktů a u vzorků č. 19 a 20 se výsledek lišil

od výsledku uvedeného chovatelem. Metoda real-time PCR u těchto dvou vzorků potvrdila, že se jedná o přenašeče onemocnění.

Tabulka 4.13 Výsledky real-time PCR analýzy (zdroj: autor)

Vzorek č.	Plemeno	Výsledek real-time PCR	Známý genotyp
1	Sheltie	-/-	-/-
2	Sheltie	-/-	-/-
3	Sheltie	+/+	+/+
4	Sheltie	+/+	+/+
5	Sheltie	-/-	-/-
6	Sheltie	+/+	+/+
7	Sheltie	+/+	+/+
8	Sheltie	+/-	+/-
9	Sheltie	+/-	+/-
10	Sheltie		+/-
11	Sheltie	+/+	+/+
12	Sheltie		+/-
13	Border kolie	+/+	+/+
14	Border kolie	+/+	+/+
15	Border kolie	+/+	+/+
16	Border kolie	+/+	+/+
17	Border kolie	+/+	+/+
18	Border kolie	+/+	+/+
19	Border kolie	+/-	+/+
20	Border kolie	+/-	+/+
21	Border kolie	-/-	-/-
22	Border kolie	+/-	+/-
23	Border kolie	+/+	+/+

5 Diskuse

Odběr vzorků DNA jedinců ovčáckých plemen byl stěžejním krokem v experimentální části této diplomové práce. Vzorek DNA lze získat stěrem bukalní sliznice nebo z krve. Použití odběrových tamponů je pohodlnější pro majitele psů a také levnější, ale odběr musí být proveden pečlivě, aby poskytl dostatečné množství buněk pro izolaci DNA. Existuje zde také riziko kontaminace vzorku. Podle Petersen-Jones (2001) je nepravděpodobné, že by kontaminaci způsobila DNA jiného zvířete z důvodu mnohem většího množství DNA testovaného zvířete na odběrovém tamponu. Při odběru vzorku krve je sice velmi nízká pravděpodobnost kontaminace, ale z důvodu náročnosti a diskomfortu zvířat byla pro tuto práci zvolena neinvazivní metoda stěru bukalní sliznice odběrovým tamponem. Stejný postup použili ve svém výzkumu Parker a kol. (2007). Dostal a kol. (2010) zvolili jako materiál k analýze plnou krev konzervovanou roztokem K3EDTA, Beckers a kol. (2016) také použili krev vyšetřovaných jedinců, ale před analýzou provedli extrakci DNA z krve.

Izolace DNA z bukalních stěrů byla provedena kitem Presto™ Buccal Swab gDNA Extraction Kit (Geneaid). Tato metoda poskytla DNA v dostatečném množství i čistotě. Beckers a kol. (2016) prováděli extrakci DNA ze vzorků plné krve, které byly promyty pomocí Tris-HCl-EDTA a vznikl pelet bílých krvinek. Buňky byly resuspendovány v lyzačním pufru s přidavkem proteinázy K a DNA byla uvolněna inkubací při 56 °C. Chang a kol. (2010) použili pro izolaci komerční kit DNA Extractor SP Kit (Wako Pure Chemical Industries) a FTA (Flinders Technology Associates) karty, které použili ve svém výzkumu i Mizukami a kol. (2012). FTA karta obsahuje složky, které lyzují buňky a denaturují proteiny. Tato jednoduchá technologie snižuje náklady a čas potřebný pro zpracování vzorků DNA až do posledního kroku, kdy je DNA připravena k následnému zpracování.

Po izolaci DNA následovala optimalizace PCR protokolu pro detekci mutace genu *NHEJ1*. Specifické PCR primery jsou klíčové k amplifikaci pouze definované cílové sekvence ze vzorku DNA (Green a Sambrook, 2019). V této práci byly použity dvě sady primerů pro konvenční PCR a jedna sada pro real-time PCR. PCR primery podle Beckers a kol. (2016) měly nasedat při teplotě 64 °C. Po provedení PCR s teplotním gradientem bylo zjištěno, že tato teplota je příliš vysoká a nedochází k tvorbě amplikonů. Teplota nasedání primerů se může lišit z důvodu odlišných

laboratorních podmínek, ale vzhledem k tomu, že byla zjištěná teplota nasedání primerů o 5 °C nižší než teplota uvedená v článku, lze se domnívat, že 64 °C by mohla být spíše teplota tání primerů. U PCR primerů navržených Parker a kol. (2007) proběhla optimalizace bez problémů. Celý soubor vzorků DNA od jedinců ovčáckých plemen byl testován oběma primery a výsledky byly u všech vzorků stejné. Tímto lze potvrdit hypotézu, že je optimalizováno více primerů cílených do stejného genu se stejnou účinností.

Pro vyšetření mutace genu *NHEJ1* byla použita také metoda real-time PCR s primery převzatými z práce Chang a kol. (2010). Autoři v článku uvedli teplotu nasedání primerů 70 °C, ale při této teplotě byla amplifikace neúspěšná. Po upravení teploty na 60 °C se amplifikace již zdařila. Rozdílné teploty nasedání primerů by mohly být vysvětleny změnou laboratorních podmínek, například odlišné reagencie nebo jiný přístroj pro real-time PCR. Vzhledem k poměrně velkému rozdílu teplot lze však usoudit, že je tento údaj v článku uvedený chybně. Následovalo vyšetření všech vzorků se známým genotypem. U vzorků zdravého jedince a přenašeče lze pozorovat nárůst fluorescence od 31. cyklu, u vzorku postiženého jedince od 20. cyklu. Tento rozdíl je způsoben vyšší koncentrací DNA ve vzorku postiženého jedince. Byla provedena také analýza křivky tání PCR produktů, která potvrdila, že amplifikace proběhla správně, bez nespecifických produktů či dimerů. Podle zjištěných teplot tání produktů mutované alely (77,71 °C) a divoké alely (78,46 °C) lze potvrdit, že jsou teploty velmi blízko u sebe, což uvedli ve svém výzkumu i Chang a kol. (2010). Metodu SYBR Green real-time PCR použili ve své studii také Mizukami a kol. (2012), jejichž práce byla zaměřena na jedince japonského plemene hokkaido.

Po vyhodnocení výsledků analýz PCR a real-time PCR bylo zjištěno, že dva vzorky (č. 19 a 20) se svým výsledkem liší od výsledku z akreditované laboratoře uvedeného chovatelem. Tyto dva vzorky byly odebrány dvěma nepříbuzným jedincům od stejného chovatele. Chovatel uvedl, že se jedná o zdravé jedince, ale PCR analýza prokázala, že jde o přenašeče onemocnění. Lze formulovat několik důvodů, jak k této skutečnosti mohlo dojít. V první řadě se může jednat o chybu, kdy chovatel mylně uvedl výsledek u testovaného jedince. Dále se jako důvod nabízí kontaminace vzorků při odběru, ale s ohledem na tvrzení Petersen-Jones (2001) uvedené výše a pečlivý odběr se tato možnost zdá jako nepravděpodobná. Naskýtá se také možnost chyby při izolaci DNA nebo chybného provedení vyšetření

v akreditované laboratoři. Jedinec označený jako vzorek č. 20 má testované oba rodiče na CEA. Otec je zdravý jedinec a matka přenašeč tohoto onemocnění. Křížením zdravého jedince s přenašečem vznikne 50 % zdravých jedinců a 50 % přenašečů (Mellersh, 2018). Tento fakt napovídá tomu, že by mohl být tento jedinec skutečně přenašečem CEA.

Studie, kterou prováděli Chang a kol. (2010), prokázala, že SYBR Green real-time PCR je rychlá a poměrně levná genotypizační technika pro onemocnění CEA. Real-time PCR je méně náročná na čas a práci než end-point PCR, u které je nutné pro vyhodnocení provést gelovou elektroforézu. Usnadňuje provádění rozsáhlého screeningu u chovných populací plemen s predispozicí k CEA, čímž lze zabránit šíření této dědičné oční anomálie. Na základě těchto informací a po praktickém provedení obou metod a jejich porovnání lze potvrdit hypotézu, že metoda real-time PCR je nejvhodnější metodou pro detekci mutace genu *NHEJ1*.

Ve vyšetřovaném souboru vzorků plemene dlouhosrstá kolie bylo 91 % postižených jedinců, žádný jedinec nebyl vyhodnocen jako zdravý. Podle studie Bedford (1982b) bylo ve Velké Británii (UK) postiženo onemocněním CEA 64 % z 2000 jedinců plemene dlouhosrstá kolie, v Norsku 40,8 % ze 741 jedinců (Bjerkas, 1991), ve Finsku 30,95 % z 3577 jedinců (Leppänen a Saloniemi, 1998) a v České republice (ČR) 59,5 % z 37 jedinců, z nichž žádný nebyl zdravý (Dostal a kol., 2010). U plemene sheltie bylo zjištěno 23 % jedinců postižených CEA. Podle výzkumu Bedford (1982b) bylo v UK postiženo onemocněním CEA 72 % ze 400 jedinců plemene sheltie, v Nizozemsku 48,3 % ze 120 jedinců (Barnett a Stades, 1979) a v ČR 16,3 % ze 141 jedinců (Dostal a kol., 2010). Z toho lze vyvodit, že u plemene sheltie docházelo během let k poklesu výskytu onemocnění. Ve Finsku bylo 12,06 % z 315 jedinců plemene krátkosrstá kolie postižených CEA (Leppänen a Saloniemi, 1998), v ČR 11 % ze 45 jedinců (Dostal a kol., 2010). U tohoto plemene není ve srovnání s koly dlouhosrstou CEA velkým problémem. Munyard a kol. (2007) prováděli výzkum v Austrálii, z 223 jedinců plemene australský ovčák bylo 4,03 % jedinců postižených, v ČR bylo všech 33 testovaných jedinců zdravých (Dostal a kol., 2010) a stejně tomu bylo v Belgii, kde bylo testováno o jednoho psa méně (Beckers a kol., 2016). Bedford (1998a) také uvedl, že výskyt CEA u plemene border kolie je nízký a jsou diagnostikovány pouze sporadické případy, incidence podle jeho dřívějšího výzkumu byla 6 % (Bedford, 1982b). V pozdější studii, kterou prováděli ve Švýcarsku v letech 1999 až 2007 Walser-Reinhardt a kol. (2009) bylo

diagnostikováno 0,7 % jedinců postižených CEA z 1248 border kolií, dále podle Dostal a kol. (2010) bylo v ČR 2,5 % postižených border kolií z 80 testovaných jedinců a podle Beckers a kol. (2016) 1,1 % z 95 jedinců. V této práci byl diagnostikován 1 pes plemene border kolie postižený CEA (4 % z 26 jedinců). Nebyl detekován žádný postižený jedinec u plemen krátkosrstá kolie, australský ovčák a německý ovčák. Rampazzo a kol. (2005) ve své práci uvádějí výskyt projevů CEA (kolobom optického disku a těžká choroidální hypoplazie) u 5letého křížence plemen zlatý retrívr a německý ovčák. Nález u tohoto křížence byl však vyhodnocen jako náhodný kvůli dalším zdravotním problémům, kterými zvíře trpělo.

Procenta pozitivit se mohou lišit z důvodu rozdílné velikosti testované populace, autoři uvedených studií často vyšetřovali větší množství jedinců. Výzkumy byly také prováděny v různých státech a svou roli může sehrát i skutečnost, že většina uvedených studií byla provedena před značnou dobou. S tím se pojí také fakt, že v uvedených studiích, kromě studií Dostal a kol. (2010) a Beckers a kol. (2016), byly jedinci vyšetřováni oftalmologicky. Tento fakt by ale neměl být problémem, protože jsou porovnávána procenta postižených jedinců a po oftalmoskopickém vyšetření zůstanou skryti pouze přenašeči. Dále mohou být procenta ovlivněna výběrem testovaných jedinců. Záleží na tom, zda se jedná i o příbuzné jedince, nebo jsou tito jedinci vyřazeni a testují se pouze jedinci nepřibuzní. Beckers a kol. (2016) ze svého výzkumu vyřadili blízké příbuzné jedince, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků. Nicméně tento způsob není vždy možný z důvodu nedostatku informací o některých jedincích nebo nedostatečné velikosti populace.

Na základě procent pozitivních jedinců ze studií uvedených výše byla stanovena hypotéza o nejvyšší prevalenci výskytu onemocnění u plemen dlouhosrstá kolie a sheltie. Ačkoliv bylo v této práci vyšetřeno pouze 23 dlouhosrstých kolií a 13 sheltií, i přes to lze z výsledků práce potvrdit tuto hypotézu, jelikož byl u těchto dvou plemen největší výskyt jedinců postižených onemocněním CEA.

Vyšetření CEA u psů predisponovaných plemen je zásadním krokem, zvláště pokud se majitel rozhodne využít jedince k chovu. DNA test je jediný způsob, jak identifikovat přenašeče onemocnění, kteří zůstávají po oftalmologickém vyšetření skryti. Aby nedocházelo k neustálému šíření této vrozené dědičné anomálie, je vhodné nekřížit postižené jedince a přenašeče. Podle základních podmínek pro plánování vrhu musí být alespoň jeden z rodičů vrhu zdravý jedinec. Dostal a kol. (2010) uvedli, že chovatelé mohou zlepšit stav CEA u dlouhosrstých kolií, i když

může být v současné době velmi obtížné najít geneticky zdravého homozygotního jedince do chovu. Navrhl zkřížení přenašečů, kteří vyprodukují 25 % zdravých jedinců a dále křížit zdravé jedince s přenašeči CEA. Tím dojde ke snížení onemocnění v populaci a zvýší se počet zdravých zvířat, aniž by došlo ke ztrátě některých žádaných znaků u kolii.

Cílem do budoucna by mělo být snížení frekvence mutované alely, čemuž předchází právě screening chovných jedinců. Podle Ahonen a kol. (2018) by měli být heterozygotní přenašeči ponechání jako součást chovné populace, protože by mohlo dojít k častějšímu výskytu jiné recesivní alely, rozvoji dalších dědičných vad a zúžení rozsahu genetické diverzity daných plemen. Proto by mělo být snižování frekvence mutované alely prováděno opatrně.

Závěr

Tato diplomová práce se zabývá detekcí dědičného onemocnění anomálie oka u ovčáckých plemen. Jedním z cílů bylo zpracování literárního přehledu dosavadních poznatků o geneticky podmíněném onemocnění CEA a vyšetřovacích metodách. Dále byla provedena optimalizace metod PCR a real-time PCR pro detekci mutace genu *NHEJ1* a následný screening vzorků DNA pocházejících od psů ovčáckých plemen. Metody poskytly totožné výsledky u vyšetřovaných jedinců. Z dosavadních poznatků a po srovnání obou metod vyplývá, že metoda real-time PCR je vhodnější pro screening většího množství vzorků z důvodu menší časové a finanční náročnosti.

Očekávaná nejvyšší prevalence onemocnění u plemen dlouhosrstá kolie a sheltie byla potvrzena. Stav CEA u plemene dlouhosrstá kolie není příznivý a je skutečným problémem. Chovatelé by měli dbát na to, aby nedocházelo k produkci štěnat postižených tímto onemocněním, které nelze vyléčit. Genetické testy spolehlivě odhalí genotyp jedince, proto by měly být přednostně využívány ke screeningu CEA na rozdíl od oftalmoskopie, která neodhalí přenašeče.

Anomálie oka u kolií je podle odborné literatury problémem ve spoustě zemí, screening této mutace je proto velmi důležitý. Genetické vyšetření je žádoucí pro zařazení jedince do chovu a také představuje spolehlivý způsob, jak onemocnění a jeho následkům předcházet.

Seznam použité literatury

Abarca, E. (2019). Vitreous and ocular fundus. In: Martin, C. L., Pickett, J. P. a Spiess, B. M. (Eds.). *Ophthalmic disease in veterinary medicine*. Druhé vydání. CRC Press Taylor and Francis, Boca Raton, pp. 565–650. ISBN 978-1-4822-5864-6.

Ahonen, S. a kol. (2018). Nationwide genetic testing towards eliminating Lafora disease from Miniature Wirehaired Dachshunds in the United Kingdom. *Canine Genetics and Epidemiology*, 5(2):1–9.

Alberts, B. a kol. (2006). *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. První vydání. Espero, Ústí nad Labem. ISBN 80-902906-0-4.

Barnett, K. C. a Stades, F. C. (1979). Collie eye anomaly in the Shetland Sheepdog in The Netherlands. *Journal of Small Animal Practice*, 20(6):321–329.

Barrie, K. P. a kol. (1981). Diseases of the canine posterior segment. In: Gelatt K. N. (Ed.). *Textbook of Veterinary Ophthalmology*. První vydání. Lea a Febiger, Philadelphia. ISBN 978-0812106862.

Bauer, B. S. a kol. (2015). Diagnostic Ophthalmology. *The Canadian Veterinary Journal*, 56(9):989–990.

Beckers, E. a kol. (2016). Frequency estimation of disease-causing mutations in the Belgian population of some dog breeds. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 85(4):175–184.

Bedford, P. G. (1982a). Collie eye anomaly in the border collie. *The Veterinary Record*, 111(2):34–35.

Bedford, P. G. (1982b). Collie eye anomaly in the United Kingdom. *The Veterinary Record*, 111(12):263–270.

Bedford, P. G. (1998). Collie eye anomaly in the Lancashire heeler. *The Veterinary Record*, 143(13):354–356.

Beránek, M. (2016). *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. První vydání. Karolinum, Praha. ISBN 978-80-246-3246-9.

Bjerkas, E. (1991). Collie eye anomaly in the rough collie in Norway. *Journal of Small Animal Practice*, 32(2):89–92.

Brown, E. A. a kol. (2018). Genetic analysis of optic nerve head coloboma in the Nova Scotia Duck Tolling Retriever identifies discordance with the *NHEJ1* intronic deletion (collie eye anomaly mutation). *Veterinary Ophthalmology*, 21(2):144–150.

Clark, D. P. a kol. (2019). Polymerase chain reaction. In: *Molecular Biology*. Třetí vydání. Elsevier, United Kingdom, pp. 168–198. ISBN 978-0-12-813288-3.

Didenko, V. V. (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *BioTechniques*, 31(5):1106–1121.

Dietrich, U. (2019). Anamnesis and the ophthalmic examination. In: Martin, C. L., Pickett, J. P. a Spiess B. M. (Eds.). *Ophthalmic disease in veterinary medicine*. Druhé vydání. CRC Press Taylor and Francis, Boca Raton, pp. 1–37. ISBN 978-1-4822-5864-6.

Donovan, E. a Wyman, M. (1965). Ocular fundus anomaly in the Collie. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 147(1):1465–1469.

Dostal, J. a kol. (2010). Simplified PCR analysis of a mutation in the *NHEJ1* gene causing collie eye anomaly in some dog breeds. *Czech Journal of Animal Science*, 55(8):346–350.

Dziezyc, J. a Millichamp, N. J. (2004). *Color atlas of canine and feline ophthalmology*. První vydání. Elsevier, St. Louis. ISBN 978-0-7216-8239-6.

Fukal, L. (2006). *Bioanalytické metody pro fyziky*. První vydání. Vydavatelství VŠCHT, Praha. ISBN 80-7080-611-7.

Garibyan, L. a Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3):1–4.

Gelatt, K. N. (2014). *Essentials of veterinary ophthalmology*. Třetí vydání. John Wiley & Sons, Inc, Iowa. ISBN 978-1-118-77192-1.

Gelatt, K. N. a Plummer, C. E. (2017). *Color Atlas of Veterinary Ophthalmology*. Druhé vydání. John Wiley & Sons, Inc., Iowa. ISBN 978-1-119-23966-6.

Geneaid.com (2017). *Presto™ Buccal Swab gDNA Extraction Kit* [online] [cit. 4. 3. 2021]. Dostupné z: <https://www.geneaid.com/data/files/1605681962948428556.pdf>.

Genomia.cz (© 2008–2021). *Testování psů: CEA*. [online] [cit. 25. 2. 2021]. Dostupné z: <https://www.genomia.cz/cz/test/cea-collie-eye-anomaly/>.

Green, M. R. a Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 1(6):436–456.

Haff, L. A. (1994). Improved quantitative PCR using nested primers. *Genome Research*, 3(6):332–337.

Holz hacker, W. (1988). *Über die verbreitung der Collie- augen- anomalie (CEA) in Ostosterreich*. Doctor medicinae veterinariae thesis. University of Wien.

Chang, H.-S. a kol. (2010). A novel rapid genotyping technique for collie eye anomaly: SYBR Green-based real-time polymerase chain reaction method applicable to blood and saliva specimens on Flinders Technology Associates filter paper. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(5):708–715.

Joshi, M. a Deshpande, J. D. (2011). Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1):81–97.

Jothikumar, P. a kol. (2009). Design of FRET-TaqMan probes for multiplex real-time PCR using an internal positive control. *BioTechniques* 46(7):519–524.

Kellner, S. a Leon, A. (1985). Augenanomalie bei Collies in der Schweiz. *Kleintierpraxis*, 31(1):63–65.

Kucharczyk, N. a kol. (2019). Collie eye anomaly in Australian Kelpie dogs in Poland. *BMC Veterinary Research*, 15(392):1–4.

Laboklin.com (© 2007). *Collie eye anomaly (CEA) / Choroidal hypoplasia (CH)*. [online] [cit. 25. 2. 2021]. Dostupné z: <https://www.laboklin.co.uk/laboklin/showGeneticTest.jsp?testID=8304>.

Leppänen, M. a Saloniemi, H. (1998). Screening and controlling canine inherited ocular diseases in Finland: Epidemiological, economical and health promotional aspect. *Veterinary Ophthalmology*, 1(4):203–210.

Liebich, H.-G. a König, H. E. (2004). *Veterinary anatomy of domestic mammals: Textbook and colour atlas*. První vydání, Schattauer, Stuttgart. ISBN 3-7945-2101-3.

-
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 1(63):1–15.
- Lowe, J. K. a kol. (2003). Linkage mapping of the primary disease locus for collie eye anomaly. *Genomics*, 82(1):86–95.
- Maggs, D. J. a kol. (2013). *Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology*. Páté vydání, Elsevier, St. Louis. ISBN 978-1-4377-2367-0.
- Magrane, W. G. (1953). Congenital anomaly of the optic nerve in Collies. *North American Veterinarian*, 1(34):646–647.
- Mellersh, C. (2018). DNA testing for inherited eye diseases. In: Crispin S. a Mellersh C. (Eds.). *Hereditary eye disease in dogs*. British Veterinary Association, London, pp. 17–19.
- Mellersh, C. (2014). The genetics of eye disorders in the dog. *Canine Genetics and Epidemiology*, 1(3):1–14.
- Mizukami, K. a kol. (2012). Collie eye anomaly in Hokkaido dogs: Case study. *Veterinary Ophthalmology*, 15(2):128–132.
- Mould, J. R. B. (2002). Ophthalmic examination. In: Petersen-Jones S. a Crispin S. (Eds.). *BSAVA manual of small animal ophthalmology*. Druhé vydání. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, pp. 1–12. ISBN 978-0-905214-54-2.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4):56–65.
- Munyard, K. A. a kol. (2007). A retrospective evaluation of congenital ocular defects in Australian Shepherd dogs in Australia. *Veterinary Ophthalmology*, 10(1):19–22.
- Narfström, K. a Petersen-Jones, S. M. (2013). Diseases of the canine ocular fundus. In: Gelatt, K. N., Gilger, B. C. a Kern T. J. (Eds.). *Veterinary ophthalmology*. Páté vydání. John Wiley & Sons, Inc., Iowa, pp. 1303–1392. ISBN 978-0-470-96040-0.
- Eyevet-southsound.com (© 2015). *New exam patients*. [online] [cit. 28. 2. 2021]. Dostupné z: <https://www.eyevet-southsound.com/new-exam-patients>.
- O'Driscoll, M. (2012). Diseases associated with defective responses to DNA damage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12):1–25.
-

Palanova, A. (2016). Collie eye anomaly: A review. *Veterinární Medicína*, 60(7):345–350.

Parker, H. G. a kol. (2007). Breed relationships facilitate fine-mapping studies: A 7.8-kb deletion cosegregates with Collie eye anomaly across multiple dog breeds. *Genome Research*, 17(11):1562–1571.

Petersen-Jones, S. (2001). Current DNA-based tests for hereditary eye disease. *Veterinary Ophthalmology*, 4(4):233–236.

Rampazzo, A. a kol. (2005). Collie eye anomaly in a mixed-breed dog. *Veterinary Ophthalmology*, 8(5):357–360.

Reece, W. O. (2010). *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Druhé vydání. Grada, Praha. ISBN 978-80-247-3282-4.

Roberts, S. R. (1969). The collie eye anomaly. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 155(6):859–865.

Samuelson, D. A. (2013). Ophthalmic Anatomy. In: Gelatt, K. N., Gilger, B. C. a Kern T. J. (Eds.). *Veterinary ophthalmology*. Páté vydání. John Wiley & Sons, Inc., Iowa, pp. 39–170. ISBN 978-0-470-96040-0.

Shimadzu.com (2017). *BioSpec-nano – Spectrophotometer for Life Science*. [online] [cit. 4. 3. 2021]. Dostupné z: <https://www.shimadzu.com/an/products/molecular-spectroscopy/uv-vis/uv-vis-nir-spectroscopy/biospec-nano/index.html>.

Schneiderová, B. (2019). Anomálie oka kolií. [online] veterinariportal.cz [cit. 2. 03. 2021]. Dostupné z: <https://www.veterinariportal.cz/anomalie-oka-kolii/>.

Simpson, C. G. a kol. (1992). Rapid analysis of plant gene expression by a novel reverse transcriptase-PCR method. *The Plant Journal*, 2(5):835–836.

Smith, C. J. a Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1):6–20.

Soltany-Rezaee-Rad, M. a kol. (2015). Comparison of SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods for quantitative detection of residual CHO host-cell DNA in biopharmaceuticals. *Biologicals*, 43(2):130–135.

Šmarda, J. a kol. (2005). *Metody molekulární biologie*. První vydání. Masarykova univerzita, Brno. ISBN 978-80-210-3841-7.

Tan, S. W. a kol. (2009). Detection and differentiation of velogenic and lentogenic Newcastle disease viruses using SYBR Green I real-time PCR with nucleocapsid gene-specific primers. *Journal of Virological Methods*, 160(1):149–156.

Telle, M. R. a Betbeze, C. (2015). Hyphema: Considerations in the small animal patient. *Topics in Companion Animal Medicine*, 30(3):97–106.

Valasek, M. A. a Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29(3):151–159.

Walker, J. M. a Rapley, R. (2009). *Molecular biology and biotechnology*. Páté vydání. Royal Society of Chemistry, Cambridge. ISBN 978-0-85404-125-1.

Wallin-Hakanson, B. a kol. (2000a). Collie eye anomaly in the rough collie in Sweden: Genetic transmission and influence on offspring vitality. *Journal of Small Animal Practice*, 41(6):254–258.

Wallin-Hakanson, B. a kol. (2000b). Influence of selective breeding on the prevalence of chorioretinal dysplasia and coloboma in the rough collie in Sweden. *Journal of Small Animal Practice*, 41(2):56–59.

Walser-Reinhardt, L. a kol. (2009). Collie eye anomaly in Switzerland. *Schweizer Archiv Für Tierheilkunde*, 151(12):597–603.

Weier, H. U. a Gray, J. W. (1988). A Programmable System to Perform the Polymerase Chain Reaction. *DNA*, 7(6):441–447.

Yakely, W. L. a kol. (1968). Genetic transmission of an ocular fundus anomaly in collies. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 152(5):457–461.

Zhou, X. a kol. (2009). PCR-Free Detection of Genetically Modified Organisms Using Magnetic Capture Technology and Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy. *Plos One*, 4(11):1–8.

Seznam obrázků

Obrázek 1.1 Stavba oka (Reece, 2010).....	10
Obrázek 1.2 Choroidální hypoplazie (Dziezyc a Millichamp, 2004).....	12
Obrázek 1.3 Kolobom hlavy optického nervu (Dziezyc a Millichamp, 2004).....	13
Obrázek 1.4 Odchlípení sítnice (Dziezyc a Millichamp, 2004)	13
Obrázek 1.5 Zvýšená tortuozita cév sítnice (Dziezyc a Millichamp, 2004).....	14
Obrázek 1.6 Přímá oftalmoskopie (Eyevetssouthsound.com, © 2015)	15
Obrázek 1.7 Nepřímá oftalmoskopie (Eyevetssouthsound.com, © 2015).....	15
Obrázek 1.8 A) Schéma genu NHEJ1: SNPs označené * a 67 kb intron 4. B) Bližší znázornění oblasti delece (7,8 kb) asociované s CEA, primery F17 a R17 pro amplifikaci divoké alely, F20 a R23 pro amplifikaci mutované alely (Parker a kol., 2007).	16
Obrázek 4.9 Optimalizace metody PCR na základě teplotního gradientu. L – 100 bp DNA ladder (New England Biolabs), M – mutovaná alela, W – divoká alela (zdroj: autor)	31
Obrázek 4.10 Výsledek PCR s použitím primerů dle Beckers a kol. (2016), zobrazení genotypů zdravého jedince, přenašeče a postiženého jedince. L – 100 bp ladder (New England Biolabs), NC – negativní kontrola, M – mutovaná alela (200 bp), W – divoká alela (322 bp) (zdroj: autor)	32
Obrázek 4.11 Výsledek PCR s použitím primerů podle Parker a kol. (2007), zobrazení genotypů zdravého jedince, přenašeče a postiženého jedince. L – 100 bp ladder (New England Biolabs), NC – negativní kontrola, M – mutovaná alela (941 bp), W – divoká alela (636 bp) (zdroj: autor)	32
Obrázek 4.12 Výsledky plemene sheltie (zdroj: autor)	37
Obrázek 4.13 Výsledky plemene border kolie (zdroj: autor)	37
Obrázek 4.14 Výsledky plemene dlouhosrstá kolie (zdroj: autor)	38
Obrázek 4.15 Výsledky plemene krátkosrstá kolie (zdroj: autor)	38
Obrázek 4.16 Výsledky plemene australský ovčák (zdroj: autor)	39
Obrázek 4.17 Výsledky plemene německý ovčák (zdroj: autor).....	39
Obrázek 4.18 Výsledek real-time PCR zdravého jedince (zdroj: autor)	40
Obrázek 4.19 Výsledek real-time PCR přenašeče CEA (zdroj: autor).....	40
Obrázek 4.20 Výsledek real-time PCR postiženého jedince (zdroj: autor).....	41
Obrázek 4.21 Analýza křivky tání (zdroj: autor).....	41

Seznam tabulek

Tabulka 3.1 Zastoupení jednotlivých plemen (zdroj: autor)	23
Tabulka 3.2 Sekvence primerů podle Beckers a kol. (2016).....	25
Tabulka 3.3 Složení reakční směsi pro PCR (zdroj: autor)	25
Tabulka 3.4 Reakční protokol s teplotním gradientem (zdroj: autor)	26
Tabulka 3.5 Reakční protokol – optimalizovaná PCR (zdroj: autor)	27
Tabulka 3.6 Sekvence primerů podle Parker a kol. (2007)	27
Tabulka 3.7 Reakční protokol pro druhou PCR (zdroj: autor)	27
Tabulka 3.8 Sekvence primerů pro real-time PCR (Chang a kol., 2010).....	29
Tabulka 3.9 Složení reakční směsi pro real-time PCR (zdroj: autor).....	29
Tabulka 3.10 Reakční protokol pro real-time PCR (zdroj: autor).....	30
Tabulka 4.11 Výsledky PCR analýzy (zdroj: autor).....	33
Tabulka 4.12 Výsledné genotypy u jednotlivých plemen (zdroj: autor)	36
Tabulka 4.13 Výsledky real-time PCR analýzy (zdroj: autor)	42

Seznam zkratek

bp	pár bází
cDNA	komplementární DNA
CEA	Collie Eye Anomaly, anomálie oka u kolíí
ČR	Česká republika
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouřetězcová DNA
ELFO	elektroforéza
F	forward primer
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer, Försterův rezonanční přenos energie
FTA	Flinders Technology Associates
GMO	geneticky modifikovaný organismus
K3EDTA	tridraselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
kb	kilobáze
L	ladder, velikostní standard
M	mutovaná alela
mRNA	messenger RNA
NC	negativní kontrola
<i>NHEJ1</i>	Non-Homologous End-Joining Factor 1
nt	nukleotid
PCR	Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce
R	reverse primer
RM, R_mut	reverse primer pro mutovanou alelu
RNA	ribonukleová kyselina
RW, R_wt	reverse primer pro divokou alelu
UK	United Kingdom, Velká Británie
UV	ultrafialové
W	divoká alela

Přílohy

Příloha 1

Instrukce ke stěru sliznice

1. Zvíře by mělo mít čistou ústní dutinu. Je vhodné, aby alespoň 30 minut před stěrem nejedlo.
2. Během celého procesu odebrání vzorku dbejte na to, aby vatová část odběrového tamponu nepřišla do styku se žádným jiným materiálem než s buňkami bukalní (ústní) sliznice psa, kterého odebíráte.
3. Vyjměte odběrový tampon z ochranné zkumavky a provádějte stěr opakovaným otíráním vnitřní strany tváře a dásní alespoň 20 sekund. Otáčejte tamponem, aby byla využita celá jeho plocha. Druhou rukou můžete z vnější strany vytvářet mírný protitlak. Je vhodné odběr provést z více míst v mordě psa (možno nechat psa tampon lehce požvýkat).
4. Po odběru nechte tampon zaschnout – nechte ho zasunutý na několik centimetrů v ochranné zkumavce (cca 30 minut). Až vzorek zaschne, zavřete ochrannou zkumavku.
5. Celý postup zopakujte ještě jednou s druhým odběrovým tamponem.
6. Poté vyplňte přiložený dotazník (důležité je hlavně vyplnit číslo uvedené na odběrovém tamponu).
7. Pokud vzorek neodesíláte ihned, uložte na chladné místo (5–8 °C).

Příloha 2

Informační dotazník	
Číslo na odběrovém tamponu:	
Jméno majitele:	
Datum a čas stěru:	
Jméno psa:	
Plemeno:	
Věk:	
Pohlaví:	Pes / Fena
Import psa (odkud):	ANO / NE
Linie:	Výstavní / Pracovní
Pes testován na CEA:	ANO / NE Pozitivní / Negativní/ Přenašeč
Otec psa testován na CEA:	ANO / NE Pozitivní / Negativní / Přenašeč
Matka psa testována na CEA:	ANO / NE Pozitivní / Negativní / Přenašeč

(zdroj: autor)
