

Izolace bovinní genomové DNA z neinvazivně získaných biologických vzorků

Certifikovaná metodika č. 181

Jindřich Čítek

Oto Hanuš

Libor Večerek

Eva Samková

Lenka Hanusová

Zuzana Křížová

Irena Jelínková

Robert Kala

2018

Tato publikace byla vytvořena za finanční podpory grantu Národní agentury pro zemědělský
výzkum QJ1510339.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Certifikovaná metodika QJ1510339 č. 181 - název: Izolace bovinní genomové DNA z neinvazivně získaných biologických vzorků

Certifikovaná uplatněná metodika a technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému QA/QC (quality assurance/quality control, zajištění a řízení kvality) ke stanovení genotypů pro geny ovlivňující kvalitu kravského mléka.

Cíl certifikované uplatněné metodiky:

Cílem certifikované metodiky QJ1510339 č. 181 je předat praktické zkušenosti pro nejširší zavedení molekulárně biologických metod použitelných při odběru a zpracování biologických vzorků, izolaci DNA a navazující genotypizaci genů, které mají potenciál ovlivňovat kvalitu mléka. Cílem autorů je poskytnout zejména přehled neinvazivního získání DNA pro následné analýzy, který bude zpřístupněn laboratorům, zabývajícím se molekulárně genetickými analýzami u skotu.

Náplň certifikované uplatněné metodiky:

Náplní certifikované metodiky QJ1510339 č. 181 je popis metod získání a zpracování biologických vzorků a izolace DNA. Důraz je přitom kladen na neinvazivnost, nízkou cenu a jednoduchost. Metodika obsahuje přehledně uspořádané popisy několika laboratorních metod, vhodných k zavedení i do laboratoří se základním vybavením.

Zdroj certifikované uplatněné metodiky:

Projekt MZe NAZV KUS QJ1510339.

Zpracovali dne: 10. 9. 2018; Jindřich Čítek¹, Oto Hanuš², Libor Večerek¹, Eva Samková³, Lenka Hanusová⁴, Zuzana Křížová¹, Irena Jelínková¹, Robert Kala³; ¹Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra genetiky a speciální produkce rostlinné; ²Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha; ³Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů; ⁴Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra zootechnických věd

Uplatnění bylo provedeno zavedením všech principů metodiky od 20. 12. 2018.

I. Cíl metodiky

Cílem certifikované metodiky je předat praktické zkušenosti pro zpracování biologických vzorků – izolaci DNA. Důraz je kladen na neinvazivnost odběru vzorků.

Metodika je dedikována projektu NAZV QJ1510339 a bude poskytnuta laboratořím, které se zabývají genetikou skotu.

II. Vlastní popis metodiky

Biologické vzorky zpracovatelné pro následné genetické analýzy jsou ty, v nichž zůstalo buněčné jádro obsahující chromozómy. Při izolaci DNA jde o její uvolnění z komplexu s chromozomálními proteiny, zbavení zbytků buněk a tkání, v případě krve plazmatických proteinů, u mléka všech mléčných proteinů, tuku a dalších složek mléka.

Dosud se velmi často jako zdroj DNA používá krev. U savců vč. skotu obsahuje jaderné leukocyty a další buňky uvolněné z endotelu cév. Její získání však vyžaduje invazivní odběr provedený zaškolenou kvalifikovanou osobou nebo veterinárním lékařem, což je spojeno s dalšími náklady. U skotu je krev odebírána většinou z podocasní žíly do zkumavek či jednorázových odběrových souprav s antikoagulačním roztokem, nejčastěji EDTA. Ihned po odběru se obsah zkumavky promíchá, aby se zamezilo vzniku sraženin. DNA je možné z krve izolovat ihned po odběru, kdy je kvalita i výtěžnost DNA nejvyšší. EDTA působí jako konzervant, takže při pokojové teplotě lze plnou krev uchovávat 24 hodin, v chladničce při 4 °C přibližně 1 týden. Zmražený vzorek lze uchovávat i několik let, nelze však vyloučit jeho postupnou degradaci nebo zhoršení kvality. Zmražením na velmi nízké teploty až -80 °C lze dosáhnout lepších výsledků, avšak laboratoř musí mít k dispozici drahý hlubokomrazicí box. Pro následnou izolaci DNA je nabízena řada komerčních kitů pro zpracování krve, nebo se používají rutinně zavedené postupy modifikované pro příslušnou laboratoř.

Dalším zdrojem DNA je býčí sperma. Je k dispozici v inseminačních dávkách v plastových trubičkách, pro účely inseminace je přechováváno v tekutém dusíku při teplotě -196 °C. Pro izolaci DNA postačí je skladovat v běžném mrazáku při -18 °C, ev. v hlubokomrazicím boxu. Pro transport do laboratoře je možné použít obálku a dodávku poštou, protože není nutné zachovat oplozeníschopnost spermií a i po několikadenním transportu v letním období lze z inseminačních dávek DNA izolovat. K tomu se opět nejčastěji používají komerčně nabízené kity.

Méně často se DNA izoluje z dalších materiálů, odebíraných zejména *post mortem*. Lze uvést svalovou tkáň, kousky uší, jater a další. V těchto případech, kdy je nutné k oddělení vzorku použít nůž nebo skalpel, je nutné upozornit na nutnost dokonalé mechanické očisty nástroje mezi odběrem jednotlivých vzorků a zničení DNA na jeho povrchu v plameni (plynový kahan, v terénu lihový kahan apod.). Jinak může dojít ke kontaminaci odebíraného vzorku a výsledky následné analýzy, často poměrně nákladné, jsou nespolehlivé. Izolaci DNA lze provést z čerstvé tkáně, nebo ji uskladnit v mrazicím boxu. K vlastní izolaci DNA se používají tzv. tkáňové kity, speciálně připravené pro zpracování tkání.

V současné době je hojně používána technika bukálních nebo nasálních stěrů, tj. odběr epitelálních buněk z dutiny ústní nebo nosního otvoru. Tampon v ochranném pouzdru se zašle do laboratoře, která opět komerčním kitem izoluje DNA.

Pro izolaci z výše uvedených materiálů je nabízena řada komerčních kitů od různých firem. Postup je většinou poměrně jednoduchý, návod je součástí kitu. V této metodice se proto zaměříme zejména na neinvazivní metodu získání DNA z mléka.

Při odběru jakékoliv tkáně je nezbytné zabránit kontaminaci, tj. přenosu materiálu mezi vzorky, ale i jakýmkoliv jiným znečištěním. Každý vzorek (zkumavka) musí být při odběru řádně označen a zapsán do seznamu, který umožní následnou jednoznačnou identifikaci zvířete, od něhož pochází. Je rovněž nutné vést jednoduchou a přehlednou evidenci vzorků v laboratorních denících s uvedením identifikace zvířete, druhu tkáně, data odběru atd. Transport vzorků ze stáje, jatek apod. do laboratoře, ev. transport mezi laboratořemi musí být přizpůsoben druhu odebrané tkáně, délce transportu, ročnímu období. U inseminačních dávek je možná poštovní zásilka. U rychlé přepravy osobním automobilem, trvající 1-2 hod. není chlazení vzorků nezbytné. Při déletrvajícím transportu se doporučuje zkumavky se vzorky umístit do polystyrenové bedny se suchým ledem (CO₂) nebo namraženými vložkami.

K extrakci a purifikaci DNA je k dispozici více metod. Vždy musíme zvolit vhodnou metodu s ohledem na požadovanou čistotu a kvalitu DNA a její požadované množství. Důležité je rovněž to, z jakého materiálu chceme DNA získat. V laboratoři je nutné vždy metodu vyzkoušet a eventuálně upravit, zejména pokud chceme zpracovat větší počet vzorků. To platí jak pro metody tzv. manuální, kdy pracujeme s vlastními roztoky, tak pro používání komerčních kitů.

V této části přinášíme několik osvědčených metod pro izolaci DNA z kravského mléka. Tento zdroj DNA je u dojených krav snadno dostupný, neinvazivní, oddojení několika stříků může provést i jen krátce zaškolená osoba. Nutné je individuální ruční oddojení vzorku z jedné čtvrti, nesmí se odebírat mléko nadojené dojícím strojem, protože i zcela nepatrná

kontaminace mlékem jiné dojnice znemožní přesnou následnou genetickou analýzu. DNA je izolována z epiteliálních buněk mléčné žlázy, tj. somatických buněk, jejichž počet je z hygienického a technologického hlediska limitován. Množství získané DNA je závislé na počtu somatických buněk, její koncentrace v roztoku po izolaci proto dost kolísá. Další nevýhodou získávání DNA z mléka je, že je poněkud obtížnější její vyčištění. Koncentrace a čistota DNA je ovšem důležitá pro další laboratorní analýzy. Je proto důležité pracovat pečlivě. Uvedena je také metodika pro izolaci z býčího spermatu, resp. inseminačních dávek.

A. Izolace DNA z mléka pomocí chelexu

Izolace

1. Termoblok nahřát na 56 °C, vodní lázeň na 98 °C.
2. Mléko promíchat vortexem, pipetovat 1 ml do mikrocentrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml (tzv. eppendorfky).
3. Mléko zahřát v termobloku, 56 °C, 10 minut.
4. Centrifugovat 5 minut/ 4.000 ot., 22 °C. Kroky 4 a 5 se provádí s cílem odstranit tuk z dalšího zpracování vzorku.
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek pipetovat spodní část (peleta ze somatických buněk), 50 µl.
6. K peletě v nové zkumavce přidat 100 µl 5% chelexu.
7. Vortexovat, krátce stočit na stolní centrifuze.
8. Přidat 1 µl roztoku proteinázy K (25 mg/ml). Pokud není výsledek izolace uspokojivý, zvýšit při příští izolaci dávka proteinázy K.
9. Vortexovat, krátce stočit na stolní centrifuze.
10. Vložit do termobloku na 45 minut, 56 °C.
11. Vortexovat, krátce stočit na stolní centrifuze.
12. Vložit do vodní lázně na 10 minut, 98 °C.
13. Vortexovat.
14. Centrifugovat 5 minut/14000ot., 22 °C.
15. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odsát supernatant s DNA a skladovat v lednici. Odsávat se musí pečlivě, pokud bychom odsáli i chelex, může dojít k inhibici následné PCR.

Přečištění izolované DNA

1. Smíchat 20 μ l roztoku izolované DNA + 21 μ l NaOAc 3M (octan sodný) + 50 μ l etanolu 96%.
2. Promíchat a nechat 15 minut stát při laboratorní teplotě.
3. Centrifugovat 30 minut/13000 ot., 22 °C.
4. Odstranit supernatant.
5. Přidat 250 μ l etanolu 80%, vortexovat.
6. Centrifugovat 15 minut/13000 ot., 22 °C.
7. Zopakovat krok 4 a 5.
8. Odstranit supernatant a dokonale vysušit mikrocentrifugační zkumavky v termobloku, 37 °C.
9. Do mikrocentrifugačních zkumavek k vysušené DNA přidat 30 μ l TE pufru, resuspendovat DNA opatrným promícháním na vortexu a stočit na stolní centrifuze.
10. Uchovávat v lednici při 4 °C.

Metoda modifikována dle Walsh et al. (1991).

B. Izolace DNA z mléka pomocí CTAB-PVP

Metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný, ale při snížené koncentraci solí vytváří sraženinu (Murray a Thompson 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Přidání PVP (polyvinylpyrrolidon) odstraňuje kontaminanty a umožňuje získání čisté a kvalitnější DNA.

1. Roztok 2x PVP-CTAB (cetyl trimetyl ammonium bromid-polyvinylpyrrolidon) a 1% roztok beta-merkptoetanolu předeřtát na 65 °C.
2. Do mikrocentrifugačních zkumavek pipetovat 500 μ l mléka promíchaného na vortexu.
3. V termobloku zahřívát 30 minut při 55 °C.
4. Centrifugovat 1 minutu/10000 ot.
5. Odsát opatrně peletu buněk ze dna zkumavky do nových zkumavek.
6. Do zkumavky přidat 500 μ l CTAB-PVP + 5 μ l beta-merkptoetanolu.
7. Inkubovat 45 minut/ 65 °C.
8. Centrifugovat 10 minut/12000 ot.

9. Přidat 500 µl chloroformu s IAA (isoamyl alkohol) v poměru 24:1.
10. 10 minut opatrně promíchávat na míchadle při malých otáčkách.
11. Centrifugovat 5 minut/12000 ot.
12. Odsát supernatant do nových mikrocentrifugačních zkumavek.
13. Přidat 1/5 objemu CTAB-PVP (tj. v tomto případě 80 µl), promíchat (2-3x překlomit mikrocentrifugační zkumavku), přidat 500 µl chloroformu s IAA, 10 minut míchat na míchadle.
14. Centrifugovat 5 minut/14000 ot.
15. Odsát supernatant do nových mikrocentrifugačních zkumavek, přidat 250 µl ledového izopropanolu a 2-3 lehce promíchat (2-3x překlomit mikrocentrifugační zkumavku).
16. Uložit přes noc do mrazáku při -20 °C. V tomto kroku můžeme meziprodukt skladovat v mrazáku.
17. Centrifugovat 5 minut/14000 ot., 4 °C.
18. Supernatant opatrně odstranit.
19. Přidat 300 µl TE pufru, inkubovat 30–60 minut při 37 °C.
20. Přidat 600 µl ledového 96% etanolu, lehce promíchat (2-3x překlomit mikrocentrifugační zkumavku).
21. Uložit přes noc do mrazáku při -20 °C. V tomto kroku můžeme meziprodukt skladovat v mrazáku.
22. Centrifugovat 10 minut/14000 ot., 4 °C.
23. Odstranit supernatant, na dně by měla DNA vytvořit viditelnou peletu.
24. Přidat 1 ml ledového 70% etanolu, promíchat (2-3x překlomit mikrocentrifugační zkumavku).
25. Centrifugovat 2 minuty/14000 ot., 4 °C.
26. Odstranit supernatant, pro odstranění viditelných nečistit opakovat kroky 24, 25 a 26 ještě 2x.
27. Odstranit supernatant a nechat DNA vyschnout v termobloku (37 °C, otevřené zkumavky), nebo volně, zkumavky dnem vzhůru, maximálně 3 hodiny.
28. Přidat 100 µl 1x TE pufru a inkubovat 40 minut při 37 °C.

Roztok s DNA skladujeme v lednici 4 °C nebo v mrazáku při -20 °C.

Chemikálie:

- etanol (čistý, 96% nedenaturovaný)

- 2x PVP–CTAB extrakční pufr (2% CTAB, 100 mM Tris–HCl, pH=8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% 2-merkaptoetanol, 1% PVP–40000)
- 2-merkaptoetanol
- 5% CTAB
- chloroform–isoamylalkohol (24 : 1)
- 1x TE pufr sterilní
- isopropanol
- 70% ethanol

Metoda modifikována dle Doyle, Doyle (1990).

C. Izolace DNA z mléka pomocí CTAB-PVP, modifikovaná rychlá metoda

1. Do sterilních mikrocentrifugačních zkumavek pipetovat 500 μ l vortexovaného mléka.
2. Přidat extrakční pufr (500 μ l 2% CTAB-PVP + 5 μ l beta-merkaptoetanol) předeřátého na 65 °C a promíchat (2-3x překlopit mikrocentrifugační zkumavku).
3. Inkubovat 5 minut při 65 °C, během inkubace jednou lehce promíchat (2-3x překlopit mikrocentrifugační zkumavku).
4. Centrifugovat 5 minut/14000 ot., 22 °C
5. Odsát supernatant do nových eppendorfek.
6. Přidat 250 μ l isopropanolu a 2–3x lehce promíchat (2-3x překlopit).
7. Vložit na 2 minuty do mrazáku (-20 °C).
8. Centrifugovat 5 minut/14000 ot., 4 °C.
9. Odstranit supernatant, DNA by měla na dně vytvořit viditelnou peletu.
10. Přidat 1 ml ledového 70% etanolu.
11. Centrifugovat 5 minut/14000 ot., 4 °C.
12. Odstranit opatrně supernatant.
13. Mikrocentrifugační zkumavky nechat otevřené vyschnout, maximálně 3 hodiny.
14. Přidat 100 μ l sterilní vody, nechat resuspendovat při 37 °C, 45 minut.

Roztok s DNA skladujeme v lednici 4 °C nebo v mrazáku při -20 °C.

Metoda modifikována dle Williams et al. (1992).

D. Extrakce DNA z mléka s využitím automatické robotické stanice

Protože některé laboratoře jsou vybaveny roboty pro izolaci DNA, uvedeme v této certifikované metodice pro úplnost také metodický postup pro tento případ. Pořízení robotické stanice je ovšem investičně nákladné.

Před vlastní izolací DNA se mléko vortexuje, pipetuje se 500 μ l do mikrocentrifugační zkumavky a zahřeje na 56 °C po dobu 10 minut. Následně se centrifuguje při 4000 ot./min. po dobu 5 minut. Supernatant se opatrně odstraní, peleta somatických buněk se resuspenduje. Poté je vzorek připraven k izolaci DNA dle návodu výrobce příslušné robotické stanice. Doporučuje se použití kitu pro zpracování krve, pokud nejsou výsledky uspokojivé, můžeme ověřit izolaci s využitím kitu pro izolaci ze tkání.

Přesto, že výrobci automatických robotických stanic počítají s izolací z krve nebo tkání, při izolaci ze somatických buněk v mléce je výtěžnost a čistota DNA naprosto dostačující pro další analýzy.

E. Izolace DNA z inseminačních dávek

1. den

1. Odstříhnout konec pejetý, obsah opatrně vytlačit do mikrocentrifugační zkumavky, přidat 1 ml PBS pufru, opatrně promíchat, centrifugovat cca 5 min./14000 ot.
2. Supernatant odsát pipetou, nahradit čerstvým PBS pufrem, opatrně promíchat (vortex), centrifugovat, supernatant odsát pipetou, opakovat 4× do vyčištění.
3. K peletě spermií na dně mikrocentrifugační zkumavky přidat 200 μ l PBS, 800 μ l roztoku 3 a 16 μ l β -merkaptoetanolu, opatrně promíchat.
4. Inkubovat 30 min na vodní lázni při 50 °C.
5. Přidat 50 μ l proteinázy K (25 mg/ml), promíchat, inkubovat přes noc v termostatu při 37 °C.

2. den

1. Nejprve každý vzorek rozdělit do dvou označených mikrocentrifugačních zkumavek (1,5 ml), následná extrakce pak probíhá paralelně.
2. Extrakce chloroformem: naplnit mikrocentrifugační zkumavku, 6 min. důkladně protřepávat, centrifugovat, poté supernatant přepipetovat do čistých zkumavek a proces opakovat cca 2-3x, dokud není roztok vyčištěný.

3. Po závěrečném přepipetování vyčištěného roztoku do označené mikrocentrifugační zkumavky se sráží DNA přidávkem 0,5 ml vychlazeného 100% etanolem + CH₃COONa (9 dílů alkoholu, 1 díl octanu).

4. Centrifugovat, odstranit supernatant, peletu DNA na dně promýt 70% etanolem (cca 50-100 µl), odsát alkohol, nechat vyschnout, převrstvit TE pufrém (cca 200 µl, upravíme podle koncentrace DNA) a nechat resuspendovat při pokojové teplotě.

Příprava PBS pufru: do kádinky 1 litr navážíme: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,63 g Na₂HPO₄ * 12 H₂O, 0,24 g KH₂PO₄, následně doplníme destilovanou vodou a upravíme pH na 7,4 pomocí HCl, uchováváme v chladu.

Příprava roztoku 3: 0,6 g Tris, 2,9 g NaCl, 0,4 g NaOH, doplnit do 0,5 litru redestilovanou vodou.

Metodika modifikována dle Ashwell et al. (1996).

Z býčích inseminačních dávek lze získat velké množství DNA. Je však nutné pracovat velmi pečlivě, přesně podle návodu, jinak nebude izolace úspěšná.

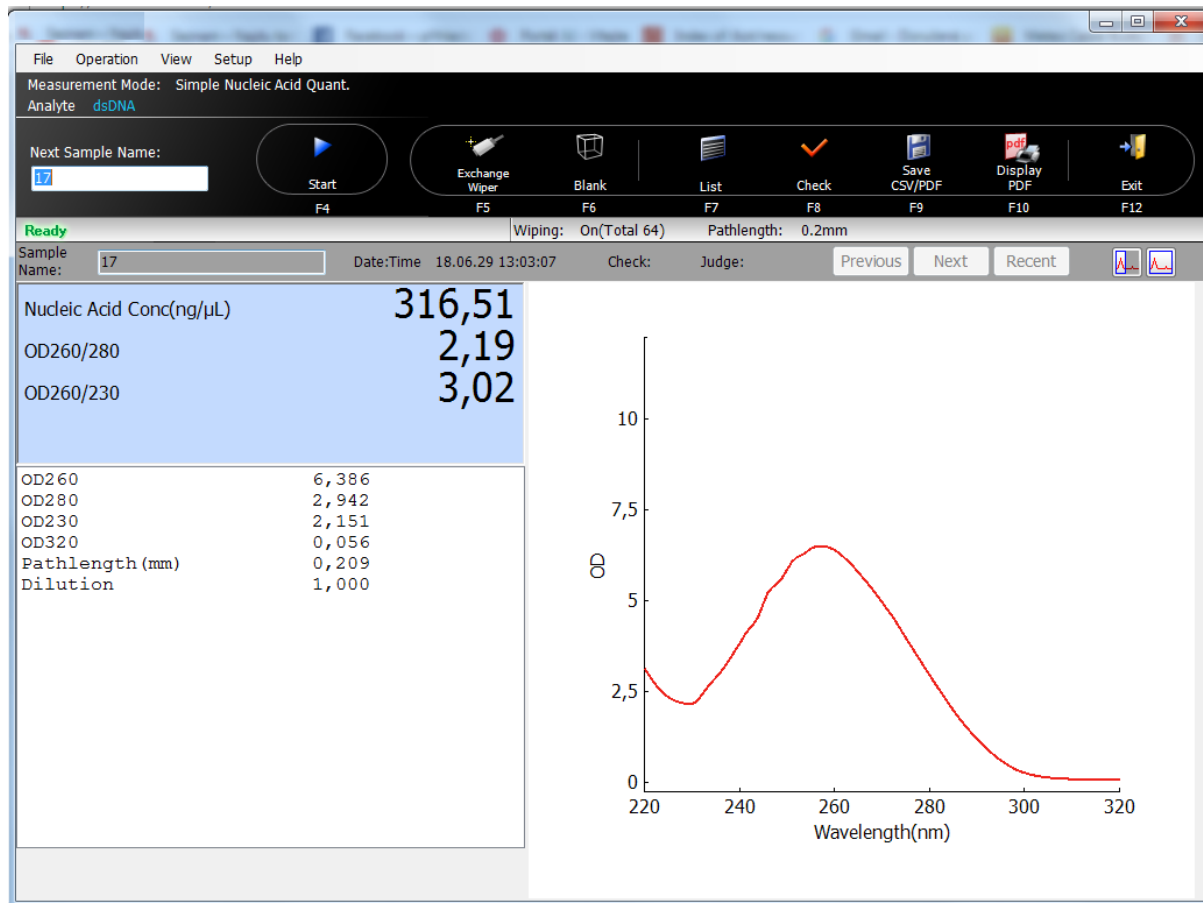
F. Měření čistoty a koncentrace DNA

Po ukončení izolace se doporučuje stanovit kvalitu a koncentraci získané DNA. Tento krok není nezbytný. Výsledek izolace lze stanovit spektrofotometricky. Metoda je založena na měření rozdílu mezi intenzitou světla, které vstupuje a vystupuje z měřeného materiálu. Nukleové kyseliny mají absorpční maximum při vlnové délce 260 nm (A₂₆₀). Kontaminující proteiny, které se během izolace nepodařilo odstranit, mají absorpční maximum při 280 nm (A₂₈₀).

Spektrofotometr změří absorbanci DNA při A₂₆₀, absorbanci bílkovin při A₂₈₀. Poměr A₂₆₀/A₂₈₀ (tzv. ratio) informuje o kontaminaci DNA proteiny. Ideální hodnota je 1,8 tj. čistá DNA, v rozpětí 1,7–1,9 má DNA s velmi dobrou čistotou. Nižší hodnoty ukazují na znečištění proteiny, hodnoty vyšší na to, že DNA je rozbitá na kratší fragmenty. Pro různé molekulárně genetické analýzy potřebujeme různě čistou DNA. Pro analýzu na čípech pro stanovení genomové plemenné hodnoty potřebujeme DNA velmi kvalitní, čistou a koncentrovanou. Na obr. 1 je výstup z přístroje BioSpecNano měřícího koncentraci a čistotu DNA, na obr. 2 je výstup číselných hodnot.

Koncentraci DNA lze vypočítat takto:

$$c_{\text{DNA}} (\mu\text{g/ml}) = 62.9 \cdot A_{260} - 36.0 \cdot A_{280}$$



Obr. 1 Měření kvality izolované DNA.

Measurement Mode: Simple Nucleic Acid Quant.

Date: 2016.02.18

Analyte: dsDNA

Page: 1/3

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
1	49	16.02.18 11:18:19			488,71	2,23	2,37	9,804	4,411	4,160	0,029	0,209	1,000
2	50	16.02.18 11:18:42			416,20	2,22	2,32	8,400	3,834	3,657	0,076	0,209	1,000
3	51	16.02.18 11:19:10			398,08	2,22	2,31	8,117	3,749	3,595	0,156	0,209	1,000

Obr. 2 Číselný výstup z přístroje pro měření DNA.

Dále může být provedena kontrola délky fragmentů získané DNA. Jednoduše lze provést elektroforézou na řídkém agarózovém gelu o koncentraci 0,8–1%, obarveném ethidium bromidem, který se během migrace DNA gelem váže na dvoušroubovici. Následně je DNA vizualizována na UV transiluminátoru UV světlem o vlnové délce 302-312 nm. Tato kontrola se běžně neprovádí. Pokud však nemáme k dispozici spektrofotometr nebo speciální přístroj pro měření kvality DNA, je tento postup vhodnou, jednoduchou a nenáročnou alternativou.

G. Uchování DNA a ředění na pracovní koncentraci

DNA lze uchovávat dlouhodobě zamraženou v etanolu nebo ve vodě, Tris-EDTA (TE) apod., nebo v lyofilizovaném stavu. Zmražení v hlubokomrazícím boxu na teplotu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ prodlužuje životnost při zachování kvality DNA. Opakované rozmrazování však velice negativně ovlivňuje její kvalitu, je proto vhodné vzorek rozdělit do více alikvotů, zejména u vzorků s ojedinělou DNA. Rozpuštění v pufru TE (1M Tris, 0,5M EDTA, voda) zvyšuje délku skladovatelnosti DNA, ale na druhé straně může inhibovat některé procesy, např. při metodě PCR (polymerázová řetězová reakce).

Pro ředění DNA na požadovanou koncentraci použijeme směšovací rovnici:

požadovaný objem naředěné DNA x požadovaná koncentrace = množství odebrané koncentrované DNA x její koncentrace

Například chceme si připravit 500 μl DNA o koncentraci 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, máme k dispozici DNA po izolaci o koncentraci 326 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Kolik budeme odebírat koncentrované DNA, kolik přidáme vody?

$$500\ \mu\text{l} \times 50\ \text{ng}/\mu\text{l} = X\ \mu\text{l} \times 326\ \text{ng}/\mu\text{l}$$

$$X = (500 \times 50) / 326$$

$$X = 76,7\ \mu\text{l}$$

To znamená, že z koncentrovaného roztoku DNA odebereme 76,7 μl a přidáme 423,3 μl vody (500-76,7).

III. Vyjádření k novosti postupů

Metodika přináší několik laboratorních metodik pro neinvazivní získávání bovinní DNA. Zejména nové je zařazení metodik pro izolaci z mléka, které je levným a snadno dostupným zdrojem. Důraz je kladen na jednoduchost postupu, postačí běžné laboratorní vybavení, není nutné pořizovat drahé přístroje (automaty na izolaci). Uvedené laboratorní metody tak umožňují ekonomickou analýzu i menšího počtu vzorků.

IV. Popis uplatnění metodiky

Certifikovaná metodika je především cílena na laboratoře, které provádí genetické analýzy u skotu jako servis pro chovatele, šlechtitele a šlechtitelské firmy. Využít ji však mohou i další např. výzkumné organizace, potenciálně také zpracovatelé mléka. Výhodou je zejména neinvazivnost, jednoduchost a finanční nenáročnost. Jednoduchá izolace umožní následné genetické analýzy např. polymorfních lokusů nebo lokusů řídících dědičné choroby apod.

V. Ekonomické aspekty

1) Vyčíslení nákladů na zavedení postupů uvedených v metodice

Náklady na pořízení potřebných přístrojů závisí na aktuálním vybavení laboratoře, která bude metodiku zavádět. Pro popsání laboratorní metody je zapotřebí termoblok, termostat (inkubátor), pipety, centrifuga nejlépe chlazená, vortex, třepačka, lednice, mrazák. Tyto přístroje jsou v běžné laboratoři k dispozici. Pokud chceme provádět kontrolu kvality DNA, potřebujeme spektrofotometr nebo speciální přístroj pro stanovení kvality. Pokud chceme stanovit kvalitu na elektroforéze, potřebujeme UV transiluminátor, elektroforézy.

2) Vyčíslení ekonomického přínosu

Uvedené laboratorní metodiky jsou obecně použitelné ve všech laboratořích s běžným vybavením, samozřejmě také v laboratořích, v nichž se již izolace DNA jinými metodami provádí, které se zabývají dalšími genetickými analýzami, nebo DNA předávají k další analýze. Důležitá je úspora nákladů použitím neinvazivních a hospodárných metod. Běžná cena komerční laboratoře za izolaci DNA jednoho zvířete je 200-300 Kč. Provedení izolace ve vlastní laboratoři kalkulujeme za cenu ca 50 Kč za vzorek. Při izolaci 100 vzorků za rok

jde o úsporu 15-25 tis. Kč. K této kalkulaci přistupují přínosy za navazující analýzy, které je rovněž možní provést ve vlastní laboratoři, např. polymorfni geny pro mléčné proteiny, pro dědičné choroby apod. Uvedené kalkulace jsou proto rámcové a nevystihují plně ekonomický potenciál zde uvedených laboratorních metodik.

Při současné a rovněž budoucí nadvýrobě všech živočišných produktů je jedinou možností pro udržení a zlepšení ekonomické efektivity chovu skotu zvýšená kvalita produkovaných surovin. Bez molekulárně genetických analýz je toto zlepšení nemožné, předkládaná metodika umožňuje provedení prvního kroku, izolace DNA.

VI. Seznam použité literatury

- Ashwell M. S., Rexroad Jr. C. E., Miller R. H. and Van Raden P. M. (1996): Mapping economic trait loci for somatic - cell score in holstein cattle using microsatellite markers and selective genotyping. *Animal Genetics*, 27, 235-242.
- Doyle J. J., Doyle J. L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Walsh P. S., Metzger D. A., Higuchi R. (1991): Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10, 506-13.
- Williams J. G. K., Hanafey M. K., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1992): Genetics analysis using RAPD markers. *Method Enzymol.* 260, 335-348.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Čítek J., Hanusová L., Brzáková M., Večerek L., Panicke L., Lískovcová L. (2018): Associations between Gene Polymorphisms, Breeding Values, and Glucose Tolerance Test Parameters in German Holstein Sires. *Czech Journal of Animal Science*, 63, 167-173.
- Čítek J., Řehout V., Hradecká E., Večerek L., Panicke L. (2007): The Breeding values of German Holstein Sires and the *DGATI* Polymorphism. *Archiv für Tierzucht*, 50, 136-146.
- Čítek J., Řehout V., Hájková J., Pávková J. (2006): Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic. *Vet Med – Czech*, 51, 6, 333-339.

- Čítek, J., Panicke, L., Řehout, V., Bláhová, B., Pávková, J. (2004): The *DGATI* polymorphism and breeding value of Holstein sires. *Animal Science Papers and Reports*, 22, 19-24.
- Čítek, J., Panicke, L., Řehout, V., Pávková, J. (2004): Plemenné hodnoty holštýnských býků v závislosti na polymorfismu *DGATI*. *Collection of Scientific Papers Faculty of Agriculture in Ceske Budejovice Series for Animal Sciences*, 21, 41-44.
- Večerek L. (2015): Analýza vybraných dědičných poruch zdraví skotu. Disertační práce, Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice, 150 s.

Vlastní práce, použité při tvorbě této certifikované metodiky, byly předtím již samostatně odborně oponovány, jak plyne ze seznamu výše.

Dedikace QJ1510339

Projekty a podpory rozvoje instituce (podíly): MZe NAZV KUS QJ1510339 (100%).

Oponenti CM: Ing. Irena Vrtková, Ph.D. (v oboru genetika), Mendelova univerzita v Brně, vědecká pracovnice v oboru molekulární genetika.

Oponenti státní správa: Ing. Zdeňka Majzlíková, Česká plemenářská inspekce.

Autorský kolektiv (podíly): Jindřich Čítek (25%), Oto Hanuš (15%) Libor Večerek (10%), Eva Samková (15%), Lenka Hanusová (10%), Zuzana Křížová (10%), Irena Jelínková (10%), Robert Kala (5%).

Přílohy, dokumenty a doklady:

technická řešení a postupy této certifikované metodiky byly zejména podpořeny výsledky vlastního výzkumu, vývoje a empirických poznatků, které byly publikovány.

Certifikovaná metodika pro praxi byla podporována řešením projektů MZe NAZV KUS QJ1510339.

Abstrakt

Molekulární genetiky je běžnou součástí šlechtitelské praxe. Prvním krokem v každé genetické analýze prováděné na genové úrovni je izolace genomové DNA. Těchto izolací je prováděno poměrně velké množství, jejich cena je proto velmi důležitá. Certifikovaná metodika přináší popis několika neinvazivních metod získání genomové DNA z kravského mléka a býčího spermatu.

Klíčová slova: DNA, izolace, neinvazivní, mléko, sperma

Abstract

Molecular genetics is commonly used in the breeding. The 1st step is, of course, the isolation of genomic DNA. This is an operation made frequently, so the costs are important. The methodics describes few non-invasive methods for isolation of DNA from cow's milk or bull's sperm.

Keywords: DNA, isolation, non-invasive, milk, sperm

Technické parametry (RIV):

Pravidelná systematická podpora kvality specificky efektivní selekce suroviny pro výrobu mléčných výrobků s vyšším nárokem na tepelné ošetření a s vyšší přidanou hodnotou a tím podpora technologické jistoty zpracovatele. Smlouva byla uzavřena se Svazem výrobců mléka, a.s. Za společnost Ing. Radek Musil, kontakt: Jílová 1550/1, 787 01 Šumperk, tel: 00420 583 214 718; 00420 603 891 289; e-mail: ekonom@dubicka.cz.