

# Genetické testování rodičovství u zvířat

## Přednáška

**Modul no. 1: Precizní chov hospodářských zvířat**

Aleš Knoll, Petra Bartoňová

Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta



Co-funded by  
the European Union

# Základní pojmy

parentita: rodičovství

paternita: otcovství

identifikace jedince: určení, že vzorek DNA patří konkrétnímu jedinci (molekulární daktyloskopie)

genetický typ: soubor genotypů (alel) charakteristický a nezaměnitelný pro každého jedince, též *genetický profil*



Co-funded by  
the European Union

# Určování rodičovství a identifikace jedince u živočichů

- ověření původu a identifikace
- hospodářská zvířata - zákon 154/2000 Sb.
  - prase: určení genetického typu (identifikace) kanců ve šlechtitelských chovech
  - skot: genetický typ před výběrem pro plemenitbu (odchovny býků), ověření a osvědčení původu plemenných býků,
  - koně: ověření a osvědčení původu hříbat po inseminaci (vždy u angl.pln. a klusáka, i když není inseminace)
  - další druhy: pes, exotické ptactvo, chránění živočichové CITES (původ i identifikace)



Co-funded by  
the European Union

# Význam

**Význam** v genetice zvířat, forenzní genetice a medicíně

*Zvířata:*

časté chyby v záznamech

chybné údaje o příbuznosti pro odhad plemenné hodnoty

koupíte zvíře, které nepatří deklarovaným (kvalitním) rodičům

*Člověk:*

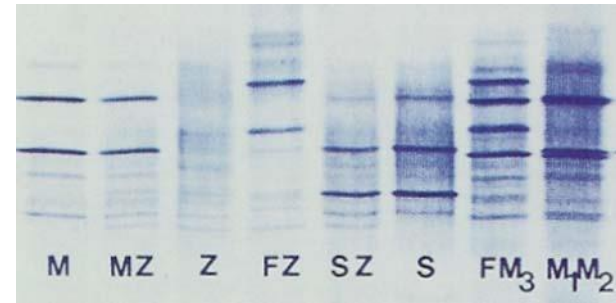
paternitní spory

identifikace pachatele, příp. oběti

transplantace a jiné léčebné postupy, kde rozhoduje příbuznost

# Vývoj a použití metod

Dříve: polymorfismu krevních skupin  
a bílkovin



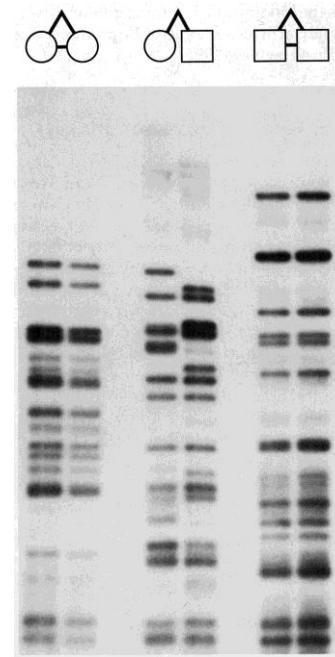
*protein IEF*

Nově: variabilita DNA (DNA fingerprinting)

- VNTR (variable number of tandem repeats, minisatelite)

Aktuálně:

- STR (short tandem repeats, mikrosatelite)
- SNP (nejnovější, stále častěji používané)



*VNTR*

Požadavky:

- vysoká spolehlivost zamítnutí a (nebo) potvrzení rodičovství
- relativně snadné a rychlé laboratorní testování
- vysoká reprodukovatelnost
- nejnižší cena

# Mikrosatelity

- krátké tandemové repetice složené z mono, di, tri nebo tetra nukleotidových motivů
- vysoce polymorfní  $\Rightarrow$  různé alely (5-20)  
např.  $(GC)_n$   $n = 5-25$  opakování
- délkový polymorfismus, tj. pokud se amplifikuje sekvence s MS pomocí PCR, zjistíme elektroforézou odlišnou velikost fragmentů (alel) danou rozdílným počtem repetic
- označení alely je tedy velikost v bp



Co-funded by  
the European Union

# Mikrosatelite

(GC)<sub>n</sub>  
velikost PCR

↓ primer přímý

mikrosatelit

primer zpětný ↓

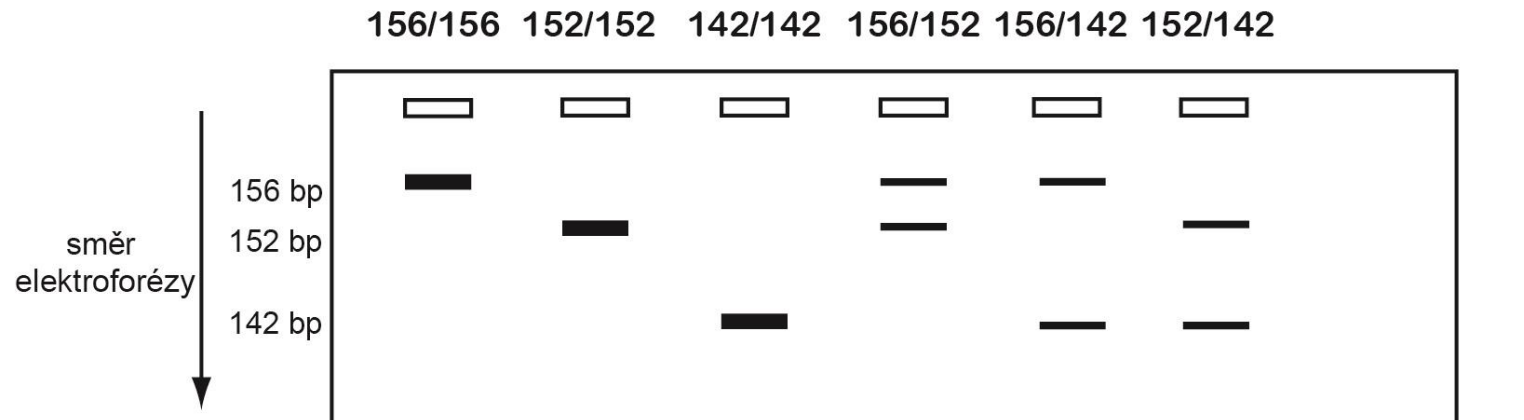
5' **CATTGAATCGGTATCAT**(N)<sub>60</sub>**AGCGCGCGCGCGCGCGCT**(N)<sub>40</sub>**ACGTTAATTCATTTCGTG** 3' n=8  
152 bp

5' **CATTGAATCGGTATCAT**(N)<sub>60</sub>**AGCGCGCT**(N)<sub>40</sub>**ACGTTAATTCATTTCGTG** 3' n=3  
142 bp

5' **CATTGAATCGGTATCAT**(N)<sub>60</sub>**AGCGCGCGCGCGCGCGCGCT**(N)<sub>40</sub>**ACGTTAATTCATTTCGTG** 3' n=10  
156 bp

Schéma PAGE

genotyp



Co-funded by  
the European Union

# Používané mikrosatelity

Příklady:

*Prase* (10x) – S0068, S0107, SW24, SW840, SW353, SW936, SW353, S0070, SW72, TNFB

*Skot* (11x) – TGLA53, TGLA122, TGLA126, TGLA227, ETH3, ETH10, ETH225, BM1824, BM2113, INRA23, SPS115

*Koně* (17x) – VHL20, AHT4, HTG4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS2, HMS3, ASB17, LEX3, HMS1, CA425

*Pes* (18x) – AHTk211, CXX279, INU055, REN169018, REN54P11, AHT137, AHTTh260, AHTk253, INRA21, REN169D01, AHT121, AHTTh171, FH2054, REN162C04, REN247M23, FH2848, INU005, INU30



Co-funded by  
the European Union

## Další panely

- *dravci* 5 MS
- *kozy* 14 MS
- *ovce* 13 MS
- *ostatní* - jeleni, kočky, bobři, nutrie, slepice, husy, lamy



Co-funded by  
the European Union

# Postup analýzy

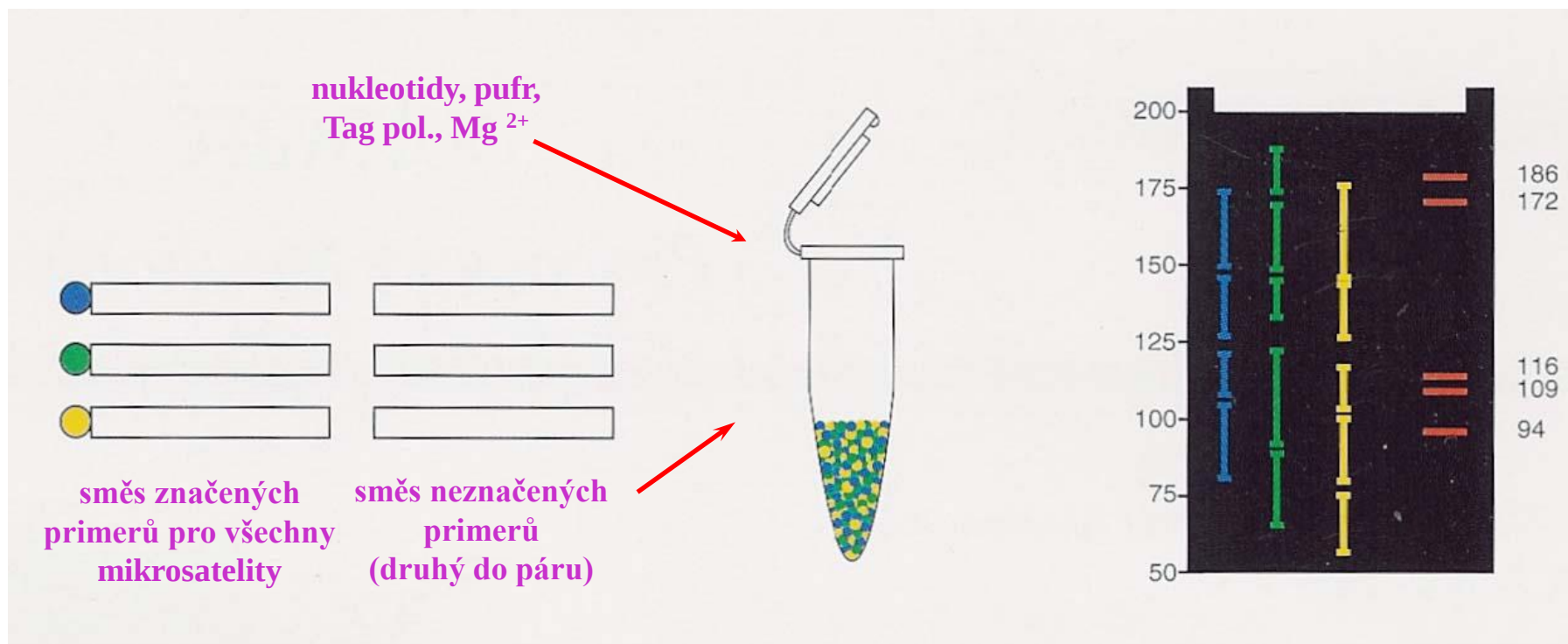
ISAGREED

1. Izolace genomové DNA testovaného jedince
2. Multiplexní PCR - amplifikace panelu mikrosatelitů
3. Fragmentační analýza pomocí fluorescenční kapilární elektroforézy
4. Určení velikosti píků
5. Určení alel jednotlivých mikrosatelitů: rozlišení dle barvy a známého rozsahu alel
6. Vyhodnocení – ověření rodičovství



Co-funded by  
the European Union

# Multiplexní PCR



Fluorescenční barvy (G5):

FAM - modrá

VIC - zelená

NED – žlutá

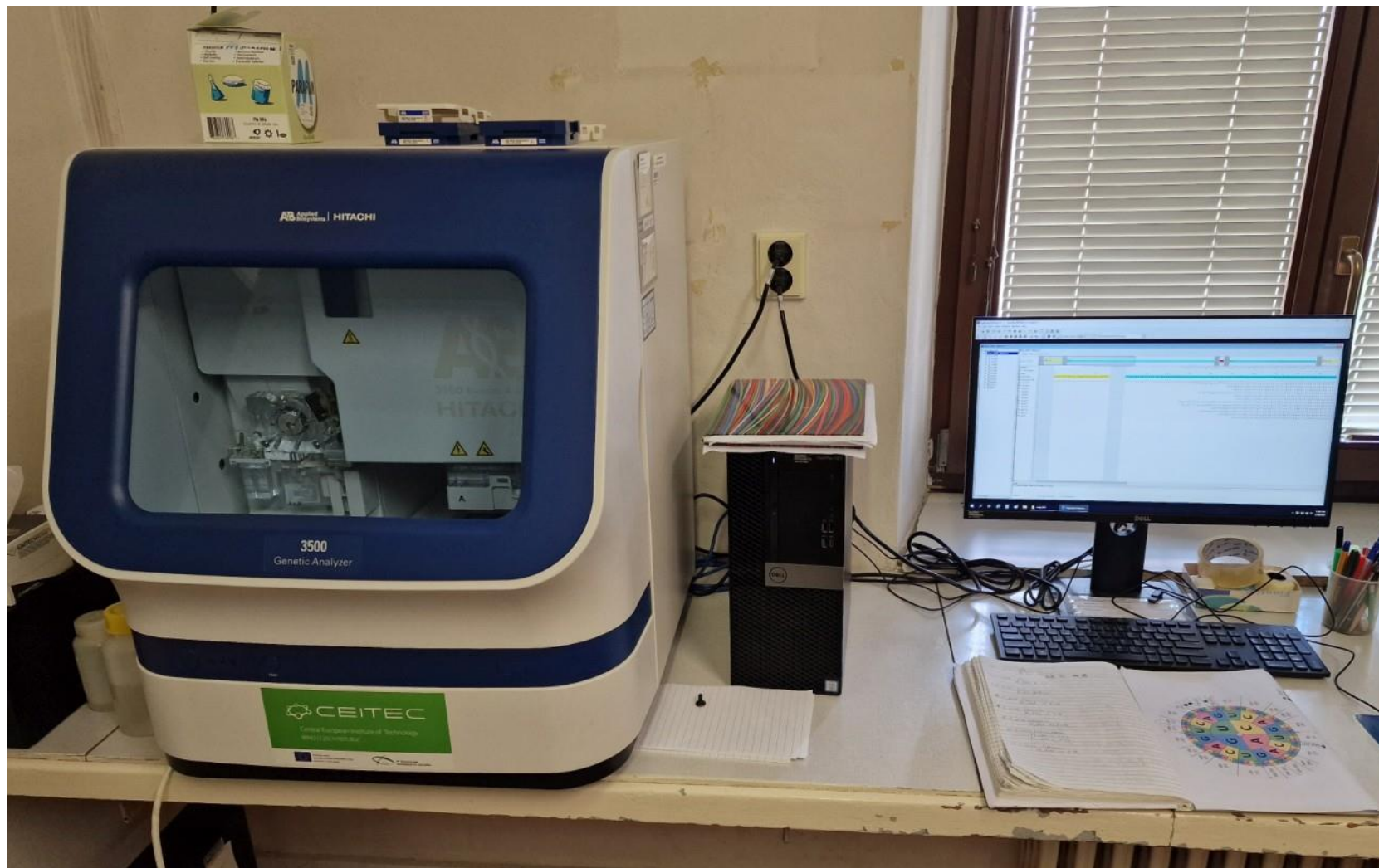
PET - červená

LIZ – oranžová (velikostní standard)

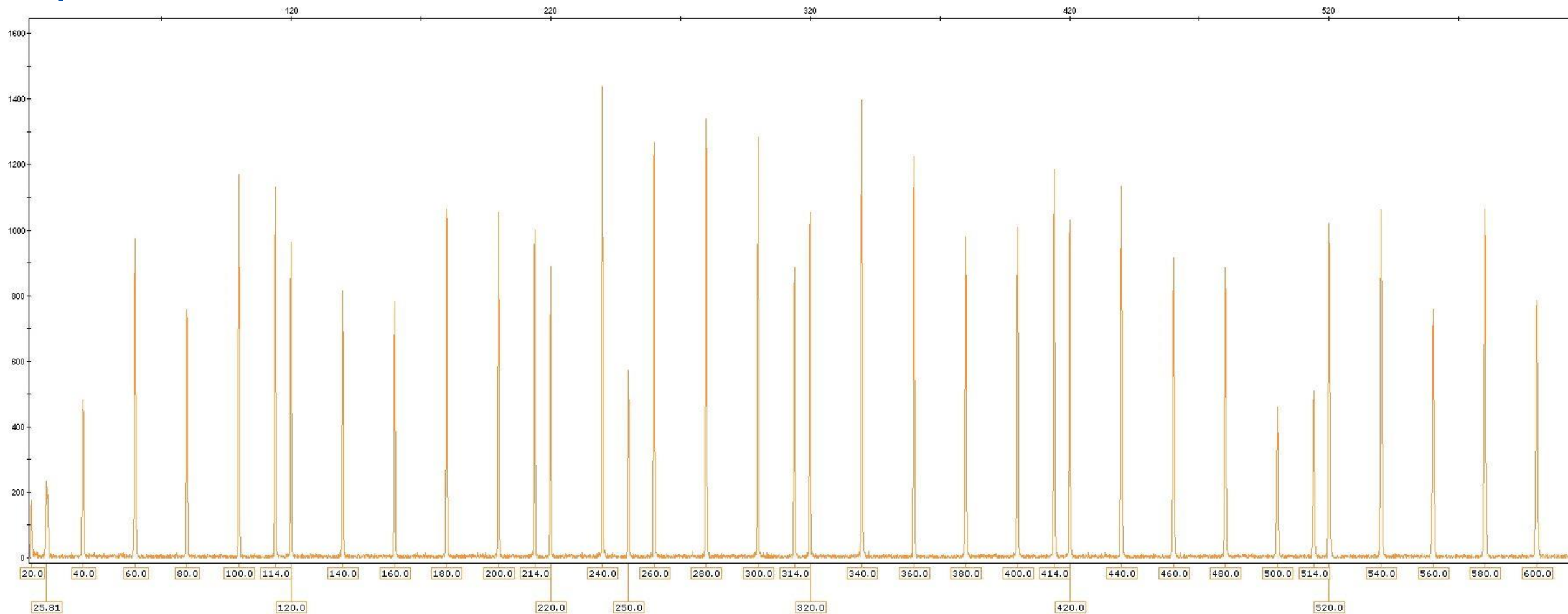
rozsahy velikostí alel různých mikrosatelitů v jedné barvě se nesmí překrývat

# Fragmentační analýza

Fluorescenční kapilární elektroforéza na genetickém analyzátoru – rozdělení mikrosatelitů dle velikosti



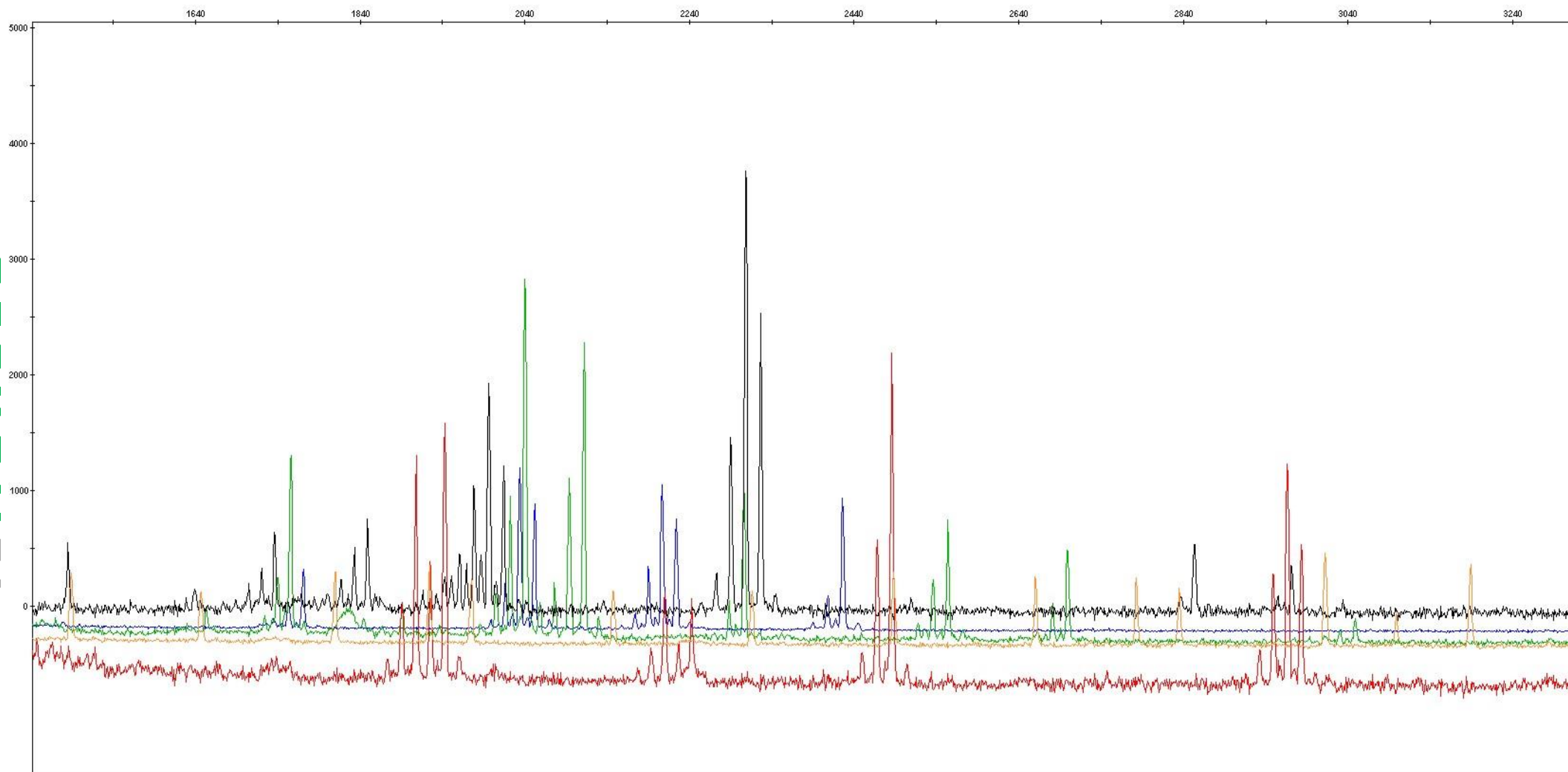
# Velikostní standard



Co-funded by  
the European Union

# Surová data – kapilární elektroforéza

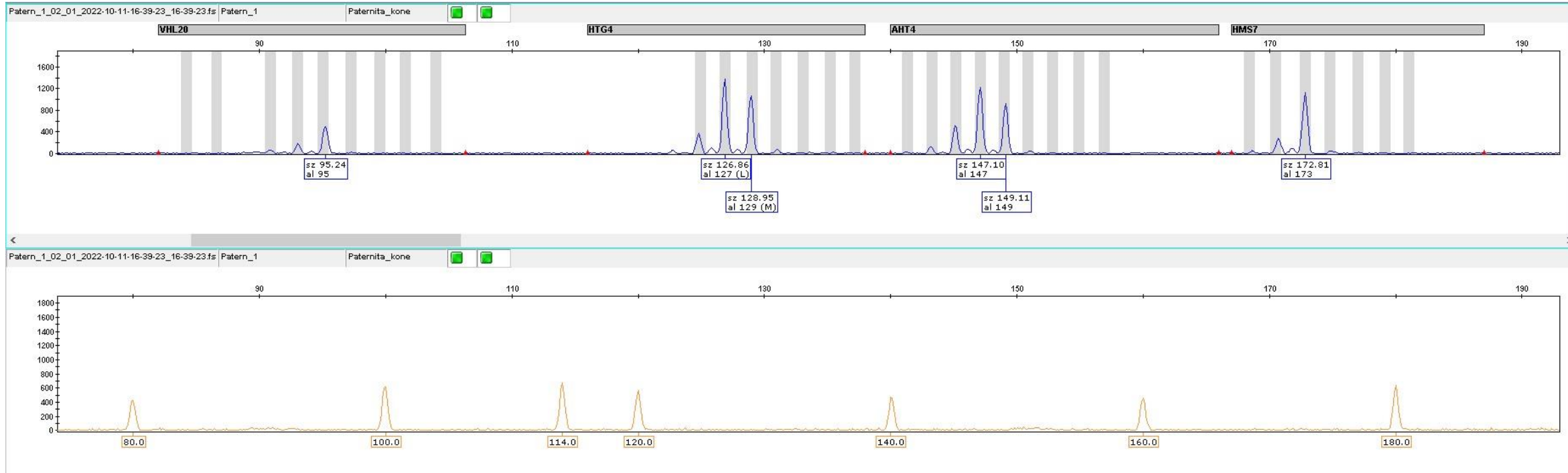
ISAGREED



Co-funded by  
the European Union

# Vyhodnocení - genotypy

Ukázka jedné z barev (6-FAM) a velikostního standardu (LIZ)





Siedlce University  
of Natural Sciences  
and Humanities

Mendel  
University  
in Brno



Czech University  
of Life Sciences Prague

## Partners:



# Děkuji za vaši pozornost!

*This presentation has been supported by the Erasmus+ KA2 Cooperation Partnerships grant no. 2021-1-SK01-KA220-HED-000032068 "Innovation of the structure and content of study programs in the field of animal genetic and food resources management with the use of digitalisation - Inovácia obsahu a štruktúry študijných programov v oblasti manažmentu živočíšnych genetických a potravinových zdrojov s využitím digitalizácie". The European Commission support for the production of this presentation does not constitute an endorsement of the contents which reflects the views only of the authors, and the Commission cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.*



Aleš Knoll



knoll@mendelu.cz



Co-funded by  
the European Union