

Téma 4: Genetické testování rodičovství u zvířat

Laboratorní příklady

Dobrý den. V této přednášce se budeme zabývat genetickým testováním rodičovství u zvířat, konkrétně laboratorními postupy této analýzy. Přednáška je součástí modulu 4, Precizní chov hospodářských zvířat. Vytvoření této prezentace bylo podpořeno grantem ERASMUS + KA2 v rámci projektu ISAGREED, Inovace obsahu a struktury studijních programů v oblasti managementu živočišných genetických a potravinových zdrojů s využitím digitalizace.

Jaké jsou jednotlivé kroky samotné analýzy? Nejprve je potřeba izolovat DNA z biologického materiálu a ověřit její kvalitu. Dále pomocí multiplex PCR amplifikovat fragmenty a fragmentační analýzou získané amplikony separovat. Speciální počítačový program poté výsledky fragmentační analýzy automaticky porovná s kalibrační křivkou standardu a určí alely jednotlivých mikrosatelitů. Po získání genetického profilu jedince poté následuje ověření rodičovství. A teď si popíšeme jednotlivé kroky konkrétněji:

Prvním a nezbytným krokem většiny molekulárně genetických metod je izolace DNA. DNA lze izolovat téměř z každého biologického materiálu, např. z krve, svaloviny, stěrů bukalní sliznice, mléka, peří, vlasových nebo chlupových cibulek, spermatu atd. Kvalita a množství izolované DNA velmi ovlivňuje průběh následných reakcí. Existuje několik izolačních metod. Metoda je zvolena podle materiálu, ze kterého se DNA izoluje a dále podle množství a kvality biologického materiálu. V současné době patří mezi nejpoužívanější metody izolace DNA tzv. kolonková metoda, která se řadí do skupiny metod využívajících pro izolaci DNA pevné částice.

Výhodou kolonkové metody je především rychlost, jednoduchost, vysoká spolehlivost a dobrá kvalita a čistota získané DNA. Podstatou této metody je adsorpce DNA na silikátovou membránu, její promytí a následné uvolnění do zkumavky. Prvním krokem je příprava biologického materiálu, ze kterého bude DNA izolována, a jeho případná homogenizace. Na obrázcích jsou nejčastější materiály používané pro izolaci DNA u zvířat, tj. krev, tkáň (např. svalovina) a chlupové cibulky, jejichž výhodou je snadný neinvazivní odběr a snadné uložení a odeslání materiálu chovateli na analýzu.

K biologickému materiálu se přidává lyzační pufr a proteináza K, po inkubaci při zvýšené teplotě dojde k vytvoření lyzátu, ve kterém je DNA uvolněna z buněčného jádra a proteiny jsou degradovány. Vzniklý lyzát je přepipetován na kolonu se silikátovou maticí.

V dalším kroku je pomocí centrifugace DNA navázána na silikátovou matici uvnitř kolony. V dalších dvou krocích je navázaná DNA promývána pomocí promývací pufru a tím jsou odstraněny všechny nečistoty. Přечиštěná DNA je v posledním kroku uvolněna do roztoku elučního pufru. Takto izolovanou DNA použijeme pro další analýzy.

Po izolaci DNA je vždy potřebné ověřit její množství, tzn. jestli se izolace zdařila. Nejběžnějším způsobem ověření množství izolované DNA je agarózová gelová elektroforéza. V tomto případě použijeme 2 % agarózový gel. Nejprve si navážíme 2 g agarózy, což je přечиštěný polysacharid z mořských řas. Tento bílý prášek rozvaříme ve 100ml elektroforetického pufru, v našem případě se jedná o TBE pufr (TRIS-BORÁT + EDTA). Tím dostaneme 2 % koncentraci gelu. Rozvaření probíhá v mikrovlnné troubě do té doby, než je roztok zcela homogenní a čirý.

Po důkladném rozvaření přidáme vizualizační barvu, v našem případě GoodView, vše nalijeme do připravené vaničky a vložíme hřebínky. Gel necháme ztuhnout.

Po ztuhnutí gel vložíme do elektroforetické vany naplněné elektroforetickým TBE pufrem, vyjmeme hřebínky a do vzniklých jamek nanášíme vzorky DNA. DNA musí být smíchána s nanášecím pufrem, který obsahuje indikátorovou barvu (obvykle bromfenolovou modř) a hustou látku, např. sacharózu nebo glycerol. To umožní správné nanesení DNA na dno jamky.

Součástí každého gelu musí být i minimálně jeden sloupeček s tzv. velikostním standardem. Jedná se o směs DNA různých a přesně definovaných velikostí, které slouží k tomu, abychom dokázali odvodit či ověřit velikost vzorků.

Po nanesení všech vzorků DNA elektroforetickou vanu připojíme pomocí elektrod ke zdroji elektrického napětí, nastavíme potřebné parametry – v našem případě 130 V a 30 minut, a elektroforézu spustíme. Po skončení separace vizualizujeme výsledek pomocí UV světla. Na výsledném elektroforetogramu vidíme v první jamce napipetovaný velikostní standard pro hrubou kvantifikaci výsledků, v dalších jamkách poté izolovanou DNA různé intenzity, tedy různé kvantitativy. Po tomto elektroforetickém ověření izolace je DNA použita pro další kroky molekulárně-genetické analýzy.

Poslední obrázek týkající se elektroforézy nám ilustruje souhrnně základní kroky agarózové gelové elektroforézy.

Dalším krokem je multiplexní PCR. Multiplexní PCR je jednou z mnoha modifikací PCR reakce. Její podstata spočívá v tom, že během jedné reakce dochází k namnožení více fragmentů DNA, a to v závislosti na počtu primerů přidaných do reakce. Vše probíhá v termálním cyklu. Zde je nastaven teplotní profil jednotlivých kroků reakce a počet opakování.

Výsledkem je mikrozkmavka obsahující amplikony různých délek. Počet amplikonů odpovídá počtu MS, které jsou u daného jedince stanovovány. Jak ale tuto reakci vyhodnotit, jak odečíst velikosti jednotlivých PCR produktů? Při použití klasické agarózové elektroforézy nelze všechny lokusy, resp. alely rozlišit. Díky tomu, že byly do reakce přidány fluorescenčně značené primery, lze k odečtu výsledků použít kapilárovou elektroforézu probíhající v genetickém analyzátoru. Na multiplexní PCR tedy navazuje fragmentační analýza.

Samotná fragmentační analýza probíhá ve speciálním genetickém analyzátoru. Analýza je založena na kapilární elektroforéze a následné fluorescenční detekci jednotlivých amplifikovaných fragmentů. Jejím cílem je zjistit délku fragmentu DNA, která je omezena dvěma primery (jeden primer je fluorescenčně značený, druhý značený není). Výhoda použití této metody spočívá v tom, že lze analyzovat více fragmentů současně. Fragmenty se musí lišit délkou nebo být označeny fluorescenční barvou. Ke každému vzorku je nutné přidat tzv. velikostní standard. Ovládání genetického analyzátoru probíhá podobně jako v případě sekvenování, demonstraci činnosti tohoto přístroje můžete vidět v kapitole modulu 1: Ukázka sekvenování.

Po dokončení fragmentační analýzy dojde k vyhodnocení výsledků ve speciálním programu, např. GeneMapperu. Nejprve je potřeba zkontrolovat kvalitu surových dat. Ta vypadají takto. Na obrázku můžete vidět výsledný elektroforetogram setu 17 MS u koní. Jednotlivé MS jsou rozděleny do 4 barev, a to z toho důvodu, aby se jejich alely velikostně nepřekrývaly a výsledné genotypy byly správně odečteny a určeny. Každý MS se skládá z jednoho nebo dvou píků, které označují alely daného MS. Pokud se v genotypu vybraného MS vyskytne jedna alela, zkoumaný jedinec je v něm homozygotní. Pokud má MS detekovány dvě alely, jedná se o heterozygota. Výsledkem fragmentační analýzy je tedy stanovený set MS daného jedince. Při ověřování rodičovství u zvířat se porovnávají vybrané sety MS rodičů a potomka.

Obecně platí, že příslušný lokus (resp. gen) se vždy u jedince vyskytuje na dvou homologických chromozomech, přičemž každý z nich je zděděn od konkrétního rodiče. Na základě toho lze poté určit, zda je daný jedinec potomek uvedených rodičů. Vše si ukážeme na konkrétním příkladu. Na tomto obrázku vidíte výsledné genotypy setu 17 MS koní u potomka a jeho případných rodičů. Úkolem je zjistit, zda jsou uvedení rodiče opravdu rodiči daného potomka. Pokud jsou, bude mít potomek v genotypech svých MS jednu alelu od otce a druhou od matky. Jak můžeme u potomka vidět, genotypy jednotlivých lokusů se opravdu skládají z jedné alely zděděné od otce (vyznačeno modrou barvou) a z jedné alely zděděné od matky (vyznačeno červenou barvou). V tomto případě genetické testování rodičovství potvrdilo. Mohou nastat další případy, kdy genetická analýza vyloučí jednoho z rodičů, případně vyloučí oba rodiče.