

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Katedra genetiky, šlechtění a výživy zvířat
Akademický rok: 2004/2005

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petra VRABCOVÁ**

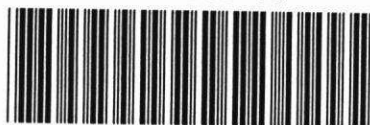
Studijní program: **B4131 Zemědělství**

Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**

Název tématu: **Diagnostika dědičných poruch zdraví na molekulární úrovni**

0114700329

Knihovna JU - ZF



3114700329

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Úkolem diplomantky je metodicky zvládnout diagnostiku nejdůležitějších dědičných poruch zdraví molekulárně genetickými postupy. Analýzy budou provedeny u skotu, při výběru pokusného materiálu se zaměří zejména na rozhodující část populace, tj. plemeníky a event. také na elitní část samičí populace. Budou vyhodnocena rizika v populaci skotu chovaného v České republice.

Práce bude členěna do obvyklých kapitol:

- 1) Úvod - přehled literatury, zejména z vědeckých časopisů v angličtině
- 2) Materiál a metodika - popis laboratorních metod používaných pro genotypizaci
- 3) Výsledky a diskuze - analýza zkoumaných dědičných chorob
- 4) Závěr - shrnutí zjištěných výsledků a formulace chovatelských doporučení

Při zpracování bakalářské práce práce budou dodržena obvyklá formální pravidla.

Rozsah práce: 30 stran textu
Rozsah příloh: 3 - 5 tabulek, fotografie gelů
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- Fries, R., Ruvinsky, A. (1999): The Genetics of Cattle. CABI Publishing, 710 pp.
Millar P., et al. (2000): Mendelian inheritance in cattle. Wageningen Pers, 590 pp.
Kuehn, C. (1997): Molekulargenetische Grundlagen fuer Erbdefekte beim Rind. Arch. Tierz., 40, Sonderheft, 121 - 127.
Harlizius, B. et al. (1996): Isolation of the bovine uridine monophosphate synthase gene to identify the molecular basis of DUMPS in cattle. J. Anim. Breed. Genet., 113, 303 - 309.
Nagahata, H. et al. (1993): Bovine Leukocyte Adhesion Defeciency in Holstein Cattle. Can. J. Vet. Res., 57, 255 - 261.

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Jindřich Čítek, CSc.
Katedra genetiky, šlechtění a výživy zvířat

Datum zadání bakalářské práce: 8. března 2005
Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2006

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice ④


prof. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.

děkanka

L.S.



prof. Ing. Václav Řehout, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 8. března 2005

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci na téma „ Diagnostika dědičných poruch zdraví na molekulární úrovni“ vypracovala samostatně a uvedla v ní veškerou literaturu a ostatní zdroje, které jsem použila.

V Českých Budějovicích, 13. dubna 2006


Petra Vrabcová

Děkuji panu doc. Ing. Jindřichu Čítkovi, CSc., vedoucímu diplomové práce za cenné rady a připomínky, které mi při vypracování této práce poskytl. Dále bych chtěla poděkovat Kamile Šenkýřové za spolupráci v laboratoři.

OBSAH:

1. Úvod	1
2. Literární přehled	
2.1 Historie genetiky	2
2.2 Základy dědičnosti	3
2.3 Mutace	4
2.3.1 Mutace genové	4
2.3.2 Mutace chromozomové	5
2.3.3 Mutace genomové	6
2.4 Geneticky podmíněné choroby	6
2.4.1 <i>BLAD</i>	7
2.4.2 Citrulinemie	8
2.4.3 <i>DUMPS</i>	8
2.4.4 <i>CVM</i>	9
2.4.5 <i>MSUD</i>	10
2.5 Přehled metod pro detekci a testování dědičných poruch zdraví	10
3. Materiál a metodika	
3.1 Izolace	19
3.2 Metodický postup při genotypizaci lokusů pro dědičné poruchy zdraví	20
3.2.1 Citrulinemie	21
3.2.2 <i>BLAD</i>	22
3.2.2 <i>DUMPS</i>	23
4. Výsledky a diskuze	24
4.1 Výsledky testování	25
5. Závěr	28
Seznam použitých zkratk	29
6. Literatura	31

1. ÚVOD

Dědičné choroby postihují všechny druhy a chovy domestikovaných zvířat. Tyto defekty vedou ke značným ekonomickým ztrátám při šlechtění. Ve většině případů jsou důvodem dědičných chorob u šlechtěných zvířat recesivní mutace. Pro jejich kontrolu ve šlechtitelských programech je klíčová detekce fenotypově normálních heterozygotních přenašečů. Znalost genetických defektů na molekulární bázi umožňuje přímou detekci nosičů na úrovni DNA brzy po narození, nebo již studiem embryonálních buněk.

Samotná podstata genetických chorob může být různá. V některých případech metabolických chorob je na vině nedostatek enzymu, který katalyzuje určitou metabolickou dráhu (případ klasických metabolických chorob jako jsou fenylketonurie nebo galaktosemie). V jiných případech může být na vině porucha syntézy strukturní částice buňky (např. membránových kanálů u cystické fibrózy nebo membránových receptorů u familiární hypercholesterolemie) nebo je poškozena syntéza strukturního proteinu, což se dotýká celých tkáňových systémů (osteogenesis imperfecta, svalové dystrofie). Často lze následek deficitu produktu mutovaného genu odvodit logicky (mutace v genech pro syntézu globinových řetězců způsobují příslušné hemoglobinopatie; nedostatek některých srážecích faktorů způsobuje hemofilii atd.).

Je třeba si uvědomit, že ne vždy negativně působí deficit produktu, ale díky mutaci se může syntetizovat pozměněný produkt, který může mít mnohem negativnější vliv, než jeho samotný nedostatek. V potaz je také nutno brát všechny biochemické a fyziologické interakce, které se týkají sledovaného produktu (Ellder, 2001).

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Historie genetiky

Genetika je vědou poměrně mladou. Za zakladatele genetiky je považován Johann Gregor Mendel (1822 - 1884). Tento mnich z brněnského kláštera se v 2. polovině 19. století zabýval hybridizačními pokusy u rostlin. Za objekt svého zájmu si zvolil hrách. Při následném křížení sledoval 7 dědičných znaků (tvar semen a lusků, zbarvení děloh, květů a nezralých lusků, délku stonku a postavení květů). Po matematickém zhodnocení výsledků zjistil, že se nedědí přímo znaky, ale "vlohy" pro ně. Mendel tak dal za vznik klasické genetiky. Mendelovy zákony a meziálelární vztahy patří k základům a dodnes mají své využití třeba i v medicíně u sledování monogenně dědičných onemocnění. Ve své době však neměla jeho práce vůbec žádný ohlas a byla dokonce zapomenuta (<http://genetika.wz.cz>).

Ke znovuobjevení Mendelovy práce a ke vzniku genetiky jako plnohodnotného vědního oboru tak dochází až na počátku 20. století. Dochází zde k potvrzení pravdivosti Mendelových zjištění. To je spojeno se jmény holandského profesora Huga de Vriese (1848 - 1935), rakouského profesora Ericha Tschermaka von Seysenegg (1871 - 1962) a profesora Carla Corrense (1863 - 1933). Mezi další významné vědce patří anglický profesor William Bateson (1861 - 1926), který jako první použil termín genetika (1906), heterozygot a homozygot. Dán Wilhelm Johannsen (1857 - 1927) zase jako první zavádí pojmy gen, genotyp a fenotyp.

Klíčovým okamžikem byl samozřejmě objev DNA. Jako nositelka genetické informace byla prokázána již v roce 1944 týmem Američana Oswalda T. Averyho. Další poznatky ohledně komplementarity bází přinesl Erwin Chargaff. Na jejich práci navazují James D. Watson a Francis H. Crick, kteří roku 1953 předložili strukturní model dvojšroubovice DNA. Crick se dále věnoval proteosyntéze a genetickému kódu. Zanedlouho je potvrzen tripletový genetický kód. Roku 1966 jsou k jednotlivým tripletům přiřazeny aminokyseliny, které kódují (Watson, 1982).

2.2 Základy dědičnosti

DNA se skládá se ze dvou dlouhých polynukleotidových vláken složených ze 4 typů nukleotidových podjednotek. Vlákna jsou k sobě připojena vodíkovými můstky mezi bázemi nukleotidů. Ty jsou tvořeny pětiuhlíkovým sacharidem (deoxyribosa), na něž jsou navázány dusíkaté báze a jedna nebo více fosfátových skupin (Alberts *et al.*, 1998)

Genetická informace je v buňkách přenášena z DNA přes RNA do proteinů. Konverze genetické informace z DNA do RNA a dále do proteinu se nazývá genová exprese. DNA se od RNA liší v některých aspektech. Obsahuje cukr ribosu místo deoxyribosy a bázi uracil místo thyminu. RNA je v buňce syntetizována jako jednovláknová molekula, která se často balí do trojrozměrné struktury. Pro vyjádření genetické informace uložené v DNA je nukleotidová sekvence nejprve přepsána do RNA. Transkripce je katalyzována enzymem RNA- polymerázou. V nukleotidové sekvenci je zapsáno, kde má transkripce začít a kde má skončit (Žurovec, 1999).

V buňkách vzniká několik typů RNA- informační (mediátorová, mRNA), ve které jsou uloženy informace pro syntézu proteinů. Ribosomální (rRNA), která je součástí ribosomů a transferová (tRNA), která má funkci adaptoru při proteosyntéze.

V eukaryontní DNA je většina genů tvořena velkým počtem kódujících úseků (exony) oddělených delšími nekódujícími oblastmi (introny). Při transkripci eukaryontních genů jsou do primárního transkriptu přepsány introny i exony. Introny jsou z primárního transkriptu odstraněny v buněčném jádru procesem nazývaným sestřih. V reakci katalyzované malými ribonukleotidovými částicemi (snRNP) jsou introny vystřiženy a exony jsou spojeny. Hotová mRNA je transportována do cytoplazmy. Translace nukleotidové sekvence mRNA do proteinu se odehrává v cytoplazmě na velkých ribonukleoproteinových částicích nazývaných ribosomy. Ty nasedají na začátek mRNA a pohybují se směrem k jejímu 3'- konci za současné syntézy proteinu. Nukleotidová sekvence mRNA je čtena po trojicích nukleotidů (kodonech). Každý kodon má přiřazenu jednu aminokyselinu. Přiřazení aminokyseliny k určitému kodonu je dáno genetickým kódem. Kombinací čtyř různých nukleotidů můžeme získat 64 odlišných kodonů. Většinu AMK určuje více než jeden kodon (Watson, 1982).

tRNA fungují jako adaptory při proteosyntéze. Enzymy nazývané aminoacil-tRNA- syntetázy připojují správné aminokyseliny k daným tRNA. Každá tRNA obsahuje sekvenci tří nukleotidů nazývanou antikodon, která se páruje s kodonem v mRNA na základě

komplementárního párování bází. Proteosyntéza začíná v místě, kde ribosom nalezne v mRNA iniciační kodon (AUG), a vyžaduje přítomnost proteinů souhrně nazývaných iniciační faktory. Kompletní protein je uvolněn z ribosomu, pokud se ribosom zastaví na jednom z terminačních kodonů (UAA, UGA, UAG). Postupné začleňování aminokyselin do rostoucího polypeptidového řetězce je pravděpodobně katalyzováno molekulou rRNA ve velké podjednotce ribosomu. (Alberts *et al.*, 1998)

2.3 Mutace

Mutace jsou změny v genotypu organismu oproti normálnímu stavu. Velká většina mutací je naprosto náhodných. Mutace mají většinou nepříznivý vliv na fenotyp organismu, ovšem některé mají vliv pozitivní a tudíž mají vliv na evoluci. Mutace vzniklé díky chybě při replikaci DNA se nazývají mutace spontánní (dochází k nim bez zásahu z vnějšího prostředí). Pravděpodobnost jedné takovéto chyby se pohybuje v řádech asi 10^{-7} . Četnost těchto mutací je tedy velice nízká, navíc buňky jsou do jisté míry schopné tyto chyby díky reparačním enzymům likvidovat. Většina mutací je tedy tzv. indukovaných, tj. vyvolaných vnějšími mutagenními faktory. Těmi může být např. záření (UV, RTG), chemické látky (areny, těžké kovy, peroxidy....). Takovéto mutace umíme již i uměle vyvolat. Mutace v somatických buňkách dospělého organismu mohou být příčinou vzniku nádorového onemocnění, nebo v důsledku odumírání buněk, urychleného stárnutí tkání a orgánů a rozvoje degenerativních procesů v organismu. Mutace v gametických buňkách obou pohlaví jsou příčinou snížené plodnosti svých nositelů (rodičů), spontánních abortů nebo vrozených vad potomků (<http://genetika.wz.cz>).

2.3.1 Mutace genové

Probíhají na úrovni molekuly DNA. Výsledkem je poškozená nukleotidová sekvence, díky tomu se mění kodony a dojde k chybě v proteosyntéze (syntetizují se úplně jiné aminokyseliny). Pokud je poškozen gen regulující množení a diferenciaci buňky, může to vést až k nekontrolovatelnému bujení (nádorová onemocnění).

U genových mutací může dojít k: inzerci- vsunutí nové báze, delecii- ztráta páru nukleotidů, tranzici- výměna purinové báze za jinou purinovou a pyrimidinové báze za jinou

pyrimidinovou, transversi- purinová báze je vyměněna pyrimidinovou a naopak a inverzi- převrácení dvou nebo více po sobě následujících párů bází (Alberts *et al.*, 1998)

Fenotypovým projevem genové mutace je nonsense- mutace (mutace beze smyslu), kdy v důsledku mutace se v mRNA objeví kodon nekódující žádnou aminokyselinu. Na tomto místě se pak zastaví syntéza molekuly bílkoviny a na místo velké molekuly bílkoviny se syntetizuje jen krátký peptidový řetězec s úplně jinými vlastnostmi. Dalšími fenotypovými projevy jsou missense mutace- mutace měnící smysl kodonu, silent mutace- mutace nemění smysl kodonu a frameshift což je posunová mutace (<http://genetika.wz.cz>).

2.3.2 Mutace chromozomové

Též nazývané aberace. Dochází k nim např. při crossing-overu . Chromozómové úlomky se špatně spojují, může ale dojít i ke ztrátě celého bloku. Tyto mutace porušují průběh meiózy a způsobují nefunkčnost gamet.

Druhy: delece- dochází ke ztrátě části chromozomu, inverze- vzniká při převrácení části chromozomu, duplikace- dojde ke zdvojení části chromozomu, translokace- vzniká při připojení části chromozomu na nesprávný chromozom. Translokace mohou být balancované (kdy je zachováno stejné množství genetické informace v buňce) nebo nebalancované (kdy původní množství není dodrženo). Reciproké translokace jsou vzájemné translokace mezi dvěma nehomologními chromosomy. Chromosomy si vymění nehomologní úseky, počet chromosomu však zůstane stejný. Robertsonské translokace jsou zvláštní případy translokace, kdy dochází k fúzi dvou akrocentrických chromosomů (po ztrátě satelitu) Jedinec s takovouto balancovanou translokací má o chromosom méně, ale původní množství genetické informace - proto většinou nemá žádné fenotypové projevy (<http://genetika.wz.cz>)

Dále může nastat fragmentace, což je rozpad chromozomu na fragmenty. Je to krajní případ chromosomové aberace, kdy vlivem silných mutagenů a vysoké chromosomální nestability dojde k rozpadu chromosomu na fragmenty. Buňka s takovýmto chromosomem se nemůže dále mitoticky dělit a může u ní být navozena apoptóza (Watson, 1982).

2.3.3 Mutace genomové

Dochází ke změně samotného genomu, většinou jde buď o znásobení celé chromosomové sady- polyploidie (jedinec je $3n$ - triploidní nebo i více - polyploidní), nebo ke změně počtu jednotlivých chromozómů ze sady- aneuploidie. Také může dojít k redukci celých chromosomových sad, tzv. haploidii. Základní možnosti jsou trisomie- místo páru máme tři chromozomy, tetrasomie -čtyři chromozomy nebo monosomie- jeden chromozom. Nulisomie (žádný) nebo polysomie (více) jsou již vzácnější. Základní příčinou jsou gametické aneuploidie (nulisomie či disomie), které jsou způsobeny nondisjunkcí (neoddělením) chromosomů během meiózy. Takováto gameta pak po splnutí s normální (euploidní) gametou dá za vznik monosomické nebo trisomické gametě. To mívá za následek vznik různých genetických chorob. Je nutno podotknout, že ne všechny takovéto mutace jsou slučitelné se životem (Watson, 1982).

2.4 Geneticky podmíněné choroby

Genetické poruchy způsobují fyzické nebo funkční anomálie, které mají negativní dopad na vitalitu (DGfZ, 1986)

U zvířat je jejich výskyt monitorován již od roku 1957, kdy se touto problematikou začala zabývat například v USA Asociace holštýnského skotu. Snaží se identifikovat přenašeče s nevhodnou recesivitou. Podrobněji se zabývají například achondroplasií (1,2 & 3), syntaktilií, *BLAD*, *CVM*, dwarfismem, *DUMPS*, citrulinemií, prolongovaná gravidita, poruchy orstění, poruchy kůže, kongenitální porférie a další (Zabek a Rys, 1998).

U *DUMPS* a citrulinemie se jedná o dědičné metabolické poruchy. Metabolická porucha postihuje primárně enzymy. Známý jsou však i stavy, kdy má postižený enzym aktivitu naopak zvýšenou. Porucha je dána mutací v genu příslušného enzymu, vedoucí k produkci mutantního enzymu s narušenou funkcí, případně k úplné zástavě jeho produkce. Společným obecným důsledkem metabolické poruchy je tendence k akumulaci nezpracovaného substrátu v buňkách a v tělesných tekutinách a k jeho případnému alternativnímu zpracování. Jako negativní faktor může působit akumulovaný nezpracovaný substrát samotný (zejména u poruch degradace), případně následky přetížení metabolické cesty, která zprostředkuje jeho alternativní zpracování, nebo nedostatek produktu enzymové reakce. Poslední varianta přichází v úvahu zejména u poruch syntézy biologicky důležitých

molekul, jako jsou glykoproteiny, peptidové hormony a další (Ellder, 2001).

Množství známých dědičně podmíněných poruch neustále roste.

Přehled vybraných dědičných onemocnění

2.4.1 *BLAD* (**B**ovine **L**eukocyte **A**dhesion **D**eficiency- Deficience bovinní leukocytární adheze)

Je to letální autosomálně recesivní onemocnění mladého holštýnského skotu. Poprvé bylo identifikováno před rokem 1980 u Holštýnsko- fríského skotu. *BLAD* je charakterizován silně sníženou hladinou exprese $\beta 2$ heterodimerického integrinu. Integriny jsou adhezivní molekuly, které zprostředkovávají vstup a přechod neutrofilů přes membrány a zničení vniknuvších patogenů (Kehrli *et al.*, 1992, Poli *et al.*, 1996). Heterozygotní přenašeči nemají klinické příznaky, ale heterozygotní krávy a býci mají 25% šanci produkovat homozygotní zvířata které jsou touto chorobou nakaženi.

Projevy nemoci se začínou objevovat mezi prvním a druhým týdnem věku. Příznaky jsou například: bakteriální infekce, pneumonie, enteritidy, průjmy, ulcerózní stomatitidy (záněty střev) a další. Pokud je nezačneme včas léčit, tak zvířata umírají do 2- 4 měsíců věku. Takto nemocná zvířata mají velké množství zralých neutrofilů (více jak 100 000) a jsou bez lymfocytů a monocytů. Jsou také hypoalbuminemické (způsobuje otoky), hyperglobulinemické, mají málo kreatinu, urea nitrogenu (dusík močoviny) a glukosy. Některá zvířata mohou žít do dvou let, ale mají zakrnělý růst a trpí vracejícími se infekcemi kůže, gastrointescinálního (trávicího) a dýchacího traktu. Trávicí a dýchací trakt bývá nejvíce náchylný, dochází zde k nekróze (odumírání).

Bylo provedeno několik studií, které dokázaly, že heterozygoti mohou mít sníženou odolnost vůči mastitidám (Nagahata *et al.*, 1997, Ackermann *et al.*, 1996)

Molekulární povaha *BLAD* je jednoduchá bodová mutace (A- G) na pozici 383 v cDNA na genu CD18. Tato mutace vede k záměně glycinu za aspartamovou kyselinu na pozici 128 v proteinu D128G (Shuster *et al.*, 1992, Jorgensen *et al.*, 1993).

2.4.2 Citrulinemie

Je to autosomálně recesivní onemocnění. Nemoc byla poprvé identifikována u lidí, ale nedávno byla nalezena i u mléčných plemen skotu v Austrálii. Klinické příznaky této nemoci plynou z amoniakové otravy, které vznikají díky poruše v močovém cyklu. Tento cyklus je biochemický proces, kde potencionálně toxický amoniak (je produktem katabolismu proteinů) je převedený do močoviny, která je exkretovaná do moči. Porucha v cyklu vyvstává z nedostatku enzymů zapojených v cyklu. Jedná se o argininosukcinát synthetasu (*ASS*). Absence tohoto enzymu vede k nahromadění citrulinu a mnohem vážnějšímu amoniaku (Healy *et al.*, 1990).

Zdá se, že doposud všechny případy tohoto smrtelného onemocnění dobytka jsou zapříčiněny nesmyslnou mutací (nonsense mutace), která má terminační funkci. Normální bovinní *ASS* je peptid obsahující 412 aminokyselin. Mutace je způsobená tranzicí cytosin- thymin a nastane v 86 kodonu uvnitř exonu 5 v genu kódujícím *ASS* (Healy *et al.*, 1990).

Postižená (homozygotní) telata jsou neschopná vylučování amoniaku a jeví neurologické symptomy, které se neustále zhoršují a vedou ke smrti do týdne po narození (Grupe *et al.*, 1996, Lin *et al.*, 2001).

2.4.3 *DUMPS* (**D**eficine of **U**ridine **M**onophospate **S**ynthesa- Deficiencie uridin- 5'-monofosfát syntázy)

UMPS je enzym zodpovědný za přeměnu orcitové kyseliny na uridin monofosfát, který je podstatnou součástí pyrimidinových nukleotidů. Má 2 enzymatické funkce:

1, fosforibosyltransferáza

2, orotidin monofosfát dekarboxyláza

což koresponduje s dvěma posledními kroky v syntéze pyrimidinu.

Protože pyrimidiny jsou podstatnou součástí nukleových kyselin může mít deficiencie *UMPS* těžké následky

DUMPS je autosomálně recesivní, embryonálně letální. Jedna z mála chorob, která byla identifikována jako embryonálně letální (embryonálně letální onemocnění jsou z principu obtížně identifikovatelné, jejich jediná manifestace je přeběhnutí). Jediná známá příčina je non- sense mutace v kodonu 405 genu pro *UMPS*. Důsledkem je úplná deficiencie *UMPS*. Homozygotní stav se projeví embryonální mortalitou do 40 dnů (Shanks,

1990, Robinson *et al.*, 1993). Praktickým dopadem tohoto defektu je to, že krávy přenašečky vykazují vyšší četnost dřívějšího přeběhnutí se, protože jejich březost je ukončena časným spontánním abortem (Fries, Ruvinsky, 1999). Přeběhnutí může mít mnoho různých příčin, nebylo by možné identifikovat mutaci z údajů o reprodukci. Mutace byla identifikována náhodou (na univerzitě v Illinois). Při jedné studii byl studován obsah kyseliny orotické v kravském mléce. Některé krávy měly vyjimečně vysokou hladinu této kyseliny. Další testy ukázaly, že mají jen 50% aktivitu *UMPS*.

Heterozygotní přenašeči poruchy jsou běžně identifikováni měřením aktivity enzymu *UMP* syntáz v erythrocytech, játrech, slezině, ledvinách, svalech a mléčné žláze (Shanks, 1990) Přenašeči jsou fenotypově normální, ale mají jen 50% aktivitu *UMPS*. Vylučují zvýšenou hladinu kyseliny orotické v mléce, moči a krvi.

V současnosti je již známa struktura genu pro *UMPS* a také test na přenašeče, založený na PCR diagnostice. *DUMPS* způsobuje bodová mutace (C- T) na kodonu 405 v exonu 5 (Viana *et al.*, 1998). Gen pro *UMP* syntázu byl v bovinním genomu lokalizován na chromozomu 1 (q31- 36) (Harlizius *et al.*, 1996)

2.4.4. *CVM* (**C**omplex **V**ertebral **M**alformation- Komplex vertebrálních malformací)

Je to dědičné onemocnění. První zprávy pocházejí od dánských veterinářů. Byly uveřejněny v bulletinu zemědělského výzkumu z roku 2000. V létě 2001 byl v Dánském institutu Zemědělských věd identifikován gen a mutace, zodpovědné za tuto chorobu. Defekt byl zpětně vystopován k americkému vynikajícímu plemeníkovi Berlin- M Ivanhoe Bell. Bell byl předtím jako otec využíván po celém světě a celkový dopad na mortalitu holštýnských telat byl značný.(Revell, 2001, Agerholm *et al.*,2001). Ze zaznamenaných případů porodů s *CVM* ve stádech pozorovaných v Dánsku a USA, bylo zjištěno, že k otelení dochází ve 250 dnech na místo 283 dní březosti. Bližší studie udávají, že pokud je plod homozygotní pro *CVM*, 29% krav potratí do 100. dne březosti, 45% ve 150. dni a 77% potratů je zaznamenáno ve 260 dnech (Nielsen *et al.*, 2003). Následkem této nemoci jsou předčasně narozená mrtvá telata. Hlavním znakem je znetvořená páteř. Nejedná se však o určující znak. Takto zdeformovanou páteř můžeme nalézt i u mláďat se skoliózou a kyfózou. Další určující znaky jsou zkrácené nohy a zdeformované paznehty. Veterináři a genetici vedou o *CVM* rozsáhlý výzkum. Předběžné výsledky zkoumání naznačuje, že se jedná o přenášení recesivního znaku

(Nielsen *et al.*, 2003). U tohoto onemocnění se jedná o missence mutaci prohozením G→ T v genu SLC35A3 (Kanae *et al.*, 2005).

2.4.5 MSUD (Maple Syrup Urine Disease)

MSUD je letální, autozomálně podmíněná porucha (Healy and Dennis 1995). Vyplývá z chybějící α - ketoacid dehydrogenázy (BCK dehydrogenáza). Její chybění v metabolismu se vyznačuje hromaděním aminokyselin (leucin, isoleucin a valin) a jejich příslušných keto kyselin (ketoisocapronová kyselina a keto- β - methylvalerová kyselina). MSUD bylo identifikováno jak u člověka tak u krav. Toto onemocnění se v lidské populaci vyskytuje vzácně, ale je relativně běžný u herefordských krav v Austrálii a Kanadě. Může se vyskytovat i v USA a Velké Británii (Harper *et al.*, 1989, Zhang *et al.*, 1990, Healy a Dennis 1995, Dennis a Healy 1999).

Během 12- 48 hodin se u nemocných krav projeví poškození centrálního nervového systému, apatie a naježená srst. V dalším stádiu nastupuje kóma a úhyn nastává po 48- 72 hodinách (Fries and Ruvinsky 1999). Mutace nastává prohozením cytosinu s thyminem (CAG→ TAG)(Zhang *et al.*, 1990).

2.5 Přehled metod pro detekci a testování dědičných poruch zdraví

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerázová řetězová reakce je biochemická reakce, která využívá enzym DNA-polymerázu ke kopírování DNA. DNA-polymeráza je schopná syntetizovat komplementární vlákno podle templátu jednovláknové DNA tak, že přidává k existujícímu úseku druhého vlákna nové nukleotidy ve směru 5' → 3'. K tomu kromě templátového vlákna a nukleotidtrifosfátů potřebuje krátký existující úsek druhého vlákna, tzv. primer, který můžeme syntetizovat uměle jako oligonukleotid (Weaver, 2005). Pokud známe sekvenci templátového vlákna, můžeme si připravit primer, který bude za vhodných teplotních podmínek tvořit vodíkové můstky s komplementární sekvencí v templátovém vlákně, tedy hybridizovat. V případě primeru ale nehovoříme o hybridizaci, ale o tzv. nasedání primeru. Takto jsme schopni určit od kterého místa a kterým směrem (od 3'-konce primeru) se má začít syntetizovat komplementární vlákno. Hovoříme o tzv. extenzi primeru (prodlužování primeru přidáváním dalších nukleotidů na 3'-konci). Podle jednoho templátového vlákna tímto

způsobem vznikne jen jedna kopie. Templátová vlákna vznikají denaturací původně dvouvláknové DNA. Primery na tato vlákna nasedají v protisměrné orientaci, takže po opakovaných cyklech denaturace, nasedání primeru a extenze primeru DNA-polymerázou vznikají produkty, které slouží jako templáty pro nový reakční cyklus. Máme-li tedy teoreticky na začátku k dispozici dvě templátová vlákna (jednu dvojvláknovou molekulu), pak vzniknou v prvním cyklu dvě kopie. Pro další cyklus máme k dispozici už čtyři vlákna, podle kterých vzniknou 4 kopie. Celkem osm templátových vláken slouží v dalším cyklu k syntéze dalších osmi vláken, takže se produkt hromadí geometrickou řadou. Ze 2 vláken získáme po 30 cyklech teoreticky celkem $230 = 107\,370\,000$ kopií (Knoll a Vykoukalová 2002).

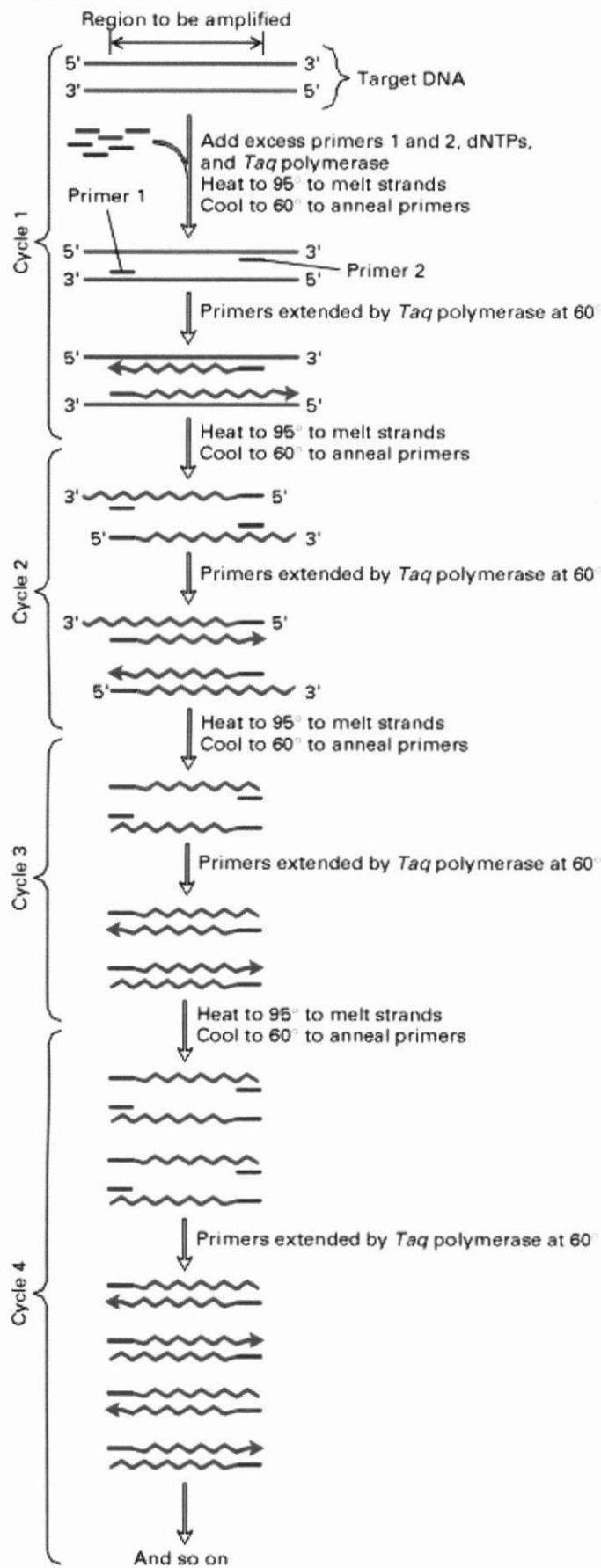
Požadavky na DNA- polymerázu a primery: Na začátku každého cyklu musíme denarovat templátovou DNA vysokou teplotou, která ničí normální DNA-polymerázy, musíme při PCR používat tzv. termostabilní polymerázy. Tyto enzymy pocházejí z bakterií, žijících v extrémních podmínkách. Jejich proteinová struktura je uzpůsobena tak, že odolává po určitou dobu i teplotám kolem 95 °C. Nejčastěji se používá tzv. Taq-polymeráza, nazvaná podle bakterie *Thermus aquaticus*. Dnes používané termostabilní polymerázy jsou dále vylepšeny metodami genové manipulace tak, aby byly ještě odolnější a lépe vyhovovaly svému použití (Křemen *et al.*, 1998).

Pro každou PCR, která má za cíl amplifikovat konkrétní úsek templátové DNA, je potřeba navrhnout vhodný pár primerů. Při návrhu primerů musíme zajistit, aby oba primery nasedly při stejné teplotě jen na přesně komplementární sekvenci v templátové DNA. Kdyby nasedaly nejen na přesně komplementární sekvence, tedy i jinde v templátové DNA, nedošlo by k efektivní amplifikaci zvoleného úseku. Proto musejí mít oba primery shodnou, nebo téměř shodnou teplotu tání. Ta závisí na délce molekuly a na její sekvenci, přesněji řečeno na poměru G-C párů a A-T párů v sekvenci. Kromě požadavku na shodnou teplotu tání musí konkrétní pár primerů splňovat i další požadavky - nesmí tvořit tzv. dimery a vlásenky. Dimer vzniká spárováním dvou primerů navzájem. Vlásenky vznikají spárováním konců stejného primeru navzájem (Šmarda *et al.*, 2005).

Cyklické změny teplot reakční směsi lze řídit automatizovaně pomocí tzv. termocykleru. Zkumavky s reakční směsí jsou v termocykleru uloženy v kovovém bloku, jehož teplota je řízena podle programu. Obvyklé je sestavování reakční směsi tzv. "na ledu", aby se zabránilo předčasné aktivitě Taq-polymerázy.

Výsledek PCR amplifikace lze detekovat na gelu, tzn. že se vzorek reakční směsi nanese na start agarózového nebo polyakrylamidového gelu a podrobí se elektroforéze (Šmarda *et al.*, 2005).

Obr. č. 1 Průběh PCR reakce



ELFO (elektroforéza)

Nejdůležitější technika na separaci nukleových kyselin. Je to fyzikálně chemická metoda pro dělení látek v elektrickém poli. Zařízení se skládá z elektroforetické vany s anodou, katodou a pufrem, vlastního držáku gelu, ve kterém bude docházet k separaci, a externího zdroje stejnoměrného napětí. Gelový přípravek se nalije do vaničky (agarózová ELFO) nebo mezi skla (PAGE ELFO) a nechá se ztuhnout. Jamky pro umístění vzorků se tvoří pomocí tzv. hřebenů s definovanou šířkou. DNA migruje směrem k anodě. Rychlost pohybu studované DNA závisí na jejích vlastnostech (např. elektrický náboj, prostorové uspořádání), na vlastnostech nosiče (gelu), vlastnostech pufru a na přivedeném napětí. Obecně platí, že větší molekuly se pohybují pomaleji.

Agarózová elektroforéza

Jako prostředí pro dělení slouží gel z agarózy (polysacharid izolovaný z mořských řas). Koncentrace agarózy určuje velikost pórů a tím propustnost pro DNA určité velikosti. Homogenita a rozlišovací schopnost je nižší než u PAGE, ale špičkové vysoce kvalitní agarózy se vlastnostem polyakrylamidu přibližují. Výhodou je velmi snadná příprava gelů.

PAGE (polyakrylamidová elektroforéza)

U PAGE slouží jako prostředí pro dělení gel tvořený polyakrylamidem (PAA). Gel má vynikající homogenitu a rozlišovací schopnost. Gely se tvoří polymerací monomerů akrylamidu křížově nesíťovaného pomocí látky bis-akrylamid. Koncentrace polyakrylamidu určuje velikost pórů podobně jako u agarózy. PAGE mají tři velké výhody oproti agarozovým:

- a) jejich dělicí schopnost je tak velká, že mohou separovat molekuly DNA, jejichž velikost se liší až 500 krát (tj. od 1bp do 500 bp)
- b) mohou pojmout mnohem větší množství DNA než agarózové gely (až 10 μg DNA)
- c) DNA získaná z PAGE je extrémně čistá

Vizualizace DNA fragmentů v gelu

EtBr (ethidium bromid)

Nejpoužívanější metoda barvení. Detekuje dvouřetězcové i jednořetězcové molekuly, ale citlivost k jednořetězcům je výrazně nižší. Je to silný mutagen a toxická látka.

Další fluorescenční barviva

Obecně jsou citlivější než EtBr a dávají nižší pozadí. Nevýhodou jsou změny mobility fragmentů DNA při vyšším množství nanesené DNA při barvení gelu v průběhu ELFO.

1) barvení stříbrem

metoda používaná na barvení PAA gelu.

2) autoradiografie

DNA se značí pomocí radioaktivních izotopů

3) neradioaktivní značení

Využívá se na různých neradioaktivních látek např.: fluorescein, biotin, digoxigenin

(Knoll a Vykoukalová 2002).

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism- polymorfismus délky restričních fragmentů)

Pomocí této metody se identifikují alely na základě přítomnosti nebo absence specifického místa. Její velkou výhodou je, že je schopna identifikovat polymorfismus i uvnitř markerů, když je jako sonda použita komplementární DNA (cDNA). Metoda je vhodná pro vazbové i komparativní mapování a odhalení variability v kandidátních genech pro ekonomicky významné znaky (Knoll a Vykoukalová 2005).

PCR- RFLP

Pomocí PCR na základě genomové DNA amplifikuje specifická sekvence (např. úsek genu). Tento fragment DNA se štěpí panelem restričních endonukleáz. V případě bodové mutace v restričním místě toto místo zaniká nebo naopak vzniká nové. To má za následek vznik fragmentů DNA různé velikosti, které jsou separovány na agarózovém gelu.

Vizualizace se provádí pomocí ethidiumbromidu. Výhodou této metody je její nenáročnost a možnost určení místa mutace. Mezi nevýhody patří to, že pravděpodobnost detekce mutace je relativně nízká a závisí na počtu použitých enzymů (Knoll a Vykoukalová 2005). Tato metoda se používá k rutinní detekci známých polymorfních míst, ale také při diagnostice dědičné podmíněných poruch zdraví.

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms)

Tato metoda je založena na detekci DNA restričních fragmentů pomocí PCR amplifikace. Amplifikace restričních fragmentů je založená na ligaci ds adaptorových sekvencí na konec restričního místa, což slouží jako „univerzální“ vazebné místo pro primery při PCR.

Postup analýzy

1) Štěpení genomové DNA restriční endonukleázou

- 2) Ligace adaptorů ke koncům štěpů (připojení pomocí DNA ligázy)
- 3) PCR
- 4) Analýza fragmentů na PAGE

Pomocí metody se detekuje polymorfismus v délce fragmentu, v restričním místě nebo v místě selektivních bází. Typický AFLP fingerprint obsahuje 50 až 100 amplifikovaných restričních fragmentů, z čehož až 80 % lze využít jako markery (Knoll a Vykoukalová 2005).

Sekvencování

Je to metoda, při které se stanovuje přímo sekvence nukleotidů DNA. Chemická metoda založená na degradaci řetězce chemickými činidly (Maxam a Gilbert, 1997), které odbourávají řetězec po specifický nukleotid, se dnes provádí již vyjímečně. Většina sekvenčních metod je založena na enzymatické reakci (Sanger *et al.*, 1977). Do sekvenční reakce se dává směs normálních nukleotidů s modifikovanými nukleotidy- dideoxynukleotidy ddNTP, které nemají –OH skupinu nutnou pro navázání dalšího nukleotidu. Jejich zařazením do řetězce DNA se reakce zastaví. Tak jsou získány fragmenty různé délky končící vždy příslušným ddNTP. Posloupnost bází se vyhodnocuje po separaci na polyakrylamidovém gelu nebo kapilární elektroforézou. Značení se provádí radioaktivně, stříbrem, chemiluminiscencí nebo fluorescenčně několika způsoby:

- a) značení primeru od kterého se odvíjí sekvencovaná DNA
- b) přímé značení sekvencovaných nukleotidů
- c) přímé značení koncových nukleotidů

(Knoll a Vykoukalová 2005)

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – náhodně amplifikovaná polymorfni DNA)

Tato metoda, stejně jako podobná metoda označovaná AP-PCR (arbitrarily primed – PCR), je metoda pro tvorbu genomového fingerprintu u druhů, kde je málo známo o sekvenci, kterou budeme amplifikovat. K zahájení PCR se používá krátký málo specifický oligonukleotid, který se váže na příslušná místa amplifikované DNA (Knoll a Vykoukalová 2005).

Real – time PCR (PCR v reálném čase)

Moderní metoda umožňující sledování průběhu PCR v reálném čase na základě sledování intenzity fluorescenčního signálu.

Použití:

- 1) Kvantitativní PCR v reálném čase pro kvantifikaci genomové DNA (např. viry, GMO) nebo mRNA (studium exprese)
- 2) Analýza bodu tání produktu – pro ověření identity a kvality amplifikátu
- 3) Genotypizace – přímé stanovení genotypu

Na provádění real – time PCR je třeba speciální typ cycleru, který kromě cyklování umí odečítat intenzitu fluorescence ve vzorku a obsahuje řídicí i vyhodnocovací jednotku (Knoll a Vykoukalová 2005).

SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism- konformační polymorfismus jednořetězcové DNA)

Tato metoda je založená na konformačním polymorfismu jednotlivých řetězců DNA. Byla poprvé popsána v roce 1989. Vzorek (produkt PCR) se nanáší po denaturaci na nedenační polyakrylamidový gel. Jednořetězcová DNA v tomto prostředí získává v závislosti na složení nukleotidů určitou specifickou konformaci, která ovlivňuje mobilitu DNA v gelu. To umožňuje separaci vláken DNA lišících se jedním nebo více nukleotidy (Knoll a Vykoukalová 2005).

2.5.9 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis- denaturační gradientová gelová elektroforéza)

Tato metoda slouží pro detekci jednonukleotidových záměn v DNA. Základem je PAGE s lineárním gradientem denaturačních činidel (obvykle močovina+ formamid). Na gel se nanáší PCR produkt o velikosti 150- 1000 bp v nedenačovaném stavu. Separace fragmentů je založena na rozdílné mobilitě fragmentů při různém stupni denaturace dvoušroubovice za konstantní teploty gelu. Molekula s obsahem párů bází o nižší energii je dříve částečně denaturována a tím se pohybuje v gelu pomaleji než DNA se stabilnějším párem bází.

Využívá se dvou typů gradientových gelů: a) perpendikulární gradient b) paralelní gradient (Knoll a Vykoukalová 2005).

CDGE (Constant Denaturant Gel Electrophoresis- gelová ELFO při konstantní koncentraci denaturantu)

Tato metoda je odvozená od DGGE. K separaci dochází při optimální konstantní koncentraci denaturantů. Tento postup je vhodný pro rutinní testování polymorfizmu (Knoll a Vykoukalová 2005).

TGGE, TTGE (metody založené na teplotním gradientu)

Kromě denaturačních činidel lze částečné nebo úplné denaturace molekuly DNA dosáhnout teplotou. Při elektroforéze v teplotním gradientu je koncentrace denaturantu konstantní v celém gelu, ale mění se stupňovitě teplota- vzniká lineární teplotní gradient. Podle způsobu zajištění teplotního gradientu lze rozlišit dvě metody:

- a) **TTGE-** temporal temperature gradient electrophoresis- teplota se postupně mění v průběhu elektroforézy v celém gelu.
- b) **TGGE-** thermal gradient gel electrophoresis- teplotní gradient je tvořen přímo pomocí stupňovitě zahřívání plotny, na které gel leží (Knoll a Vykoukalová 2005).

HA (Heteroduplexní Analýza)

Tato metoda využívá konfirmačních změn v dsDNA. Heteroduplexní molekuly jsou složeny ze dvou rozdílných řetězců a jsou detekovatelné na PAGE díky své výrazně nižší mobilitě.

Heteroduplexy se mohou tvořit:

- a) během PCR u vzorku heterozygota
- b) smícháním obou homozygotů před PCR
- c) záměrně smícháním obou typů po PCR, jejich denaturací a následnou renaturací (Knoll a Vykoukalová 2005).

CSGE (Conformation Sensitive Gel Electrophoresis)

Je variantou heteroduplexní analýzy. U této metody se zvyšuje citlivost detekce jednoho nesprávně spárovaného páru nukleotidů (Knoll a Vykoukalová 2005).

VIHOČESKÁ UNIVERZITA
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
ústřední knihovna
Studentská 13
270 65 České Budějovice

DNA array (biočipy)

DNA čipy jsou nejnovější biotechnologické techniky využívající dvou základních strukturních vlastností dvoušroubovicové DNA: sekvenční komplementarity a složení ze dvou řetězců. Základem je hybridizace značeného vzorku DNA k DNA o známé sekvenci.

Výhodou přístupu je to, že lze zároveň provádět tuto hybridizaci na stovky až tisíce různých známých DNA a testovat tak velké množství genů obsažených ve vzorku. Využití např. studium exprese genů a genotypování.

Rozlišení podle metody a použití:

- a) macroarray- provádějí se na speciálních foliích. Využívají se pro screening knihoven. Značení se provádí fluorescenčně, chemiluminiscenčně i radiografií. Výhodou je, že není třeba speciální zařízení na odečet.
- b) microarrays- používají se speciálně upravená sklíčka (např. na bázi silikonu) a fluorescenční značení. Lze provádět větší počet analýz a přitom spotřeba vzorku i ostatních chemikálií je výrazně nižší než u macroarrays.

Aktivní biočipy

Jsou zvláštním typem DNA array. Každá pracovní ploška přístroje je vodivě spojena se zdrojem napětí a tím lze ovládat jednak polaritu a výši napětí, ale i snímat jeho změny. To umožňuje lépe snímat hybridizaci. Výhodou je, že čip je opakovatelně použitelný (Knoll a Vykoukalová 2005).

3. MATERIÁL A METODIKA

šetřování panelu býků černostrakatého skotu, kteří zahájili v roce 2003 testační příprařování.

blace

Pro izolaci byly použity metody dle Gemmel, Akiyama (1996) nebo dle Kawasaki (1990). Pro izolace ze spermatu byla použita metoda dle Ashwell *et al.* (1996) .

Metoda dle Gemmel, Akiyama (1996): 100 μ l krve a 300 μ l pufu (100 mM NaCl; 50 mM Tris- HCl; 1% SDS; 50 mM EDTA; pH 8,0) bylo inkubováno s proteinázou K (100 μ g.ml⁻¹) 2 hodiny při teplotě 50°C a poté přes noc při 37°C. Po přidání 300 μ l 5M LiCl a následném promíchání byly vzorky míchány 30 min s 600 μ l chloroformu a odstředěny (15 000 rpm). Supernatant byl přemístěn do nové zkumavky, v níž byla DNA precipitována 10násobným objemem izopropylalkoholu. Po odstředění byl supernatant odstraněn, k peletě DNA byl přidán 70% etanol a po jeho odpaření byla peleta resuspendována ve 100- 200 μ l TE pufu.

Metoda dle Kawasaki (1990): Používáme krev, která nebyla odebrána do heparinu. 50 μ l krve smícháme s 500 μ l TE pufu (100 mM Tris- HCl; pH 8,5; 1 mM EDTA). Stočíme při 1000 rpm (25°C, 5 minut). Odstraníme supernatant. Tento postup opakujeme 3x. Po následním promytí také odebereme supernatant a peletku leukocytů převrstvíme 100 μ l izolačního pufu (50 mM KCl; 20 mM Tris- HCl; pH 8,3; 2,5 mM MgCl₂; 0,5% Tween 20) a proteinázou K. Eppendorfku se směsí necháme inkubovat 2 hodiny nebo přes noc v chladničce nebo v termostatu při teplotě 54°C.

Izolace DNA ze spermatu: 1den- Očistíme nůžky na vatičce EtOH, ustrihneme špičku spermatu a drátkem vytlačíme sperma do eppendorfky. Přidáme 800 μ l PBS (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2 g Na₂HPO₄ · 12H₂O; 0,24 g KH₂PO₄; doplnit do 1 l vodou; upravit pomocí HCl pH na 7,4), stočíme při 4°C/ 1000 rpm/ 6 min. Poté PBS vylijeme (ne odpipetovávat) a nahradíme 100% izopropylalkoholem. Nepromícháváme a opět stočíme, opakujeme 4x, mezi 2. a 3. promytím se peleta opět vznesne pomocí pipety. K sedimentu přidáme 160 μ l roztoku 3 (0,6 g Tris; 2,9 g NaCl; 0,1 g NaOH; doplníme na 0,5 l vodou) a 12,8 μ l mercaptoethanolu. Nemícháme, jen převrstvíme. 30minut inkubujeme při 55°C ve vodní lázni. Přidáme 24 μ l *protinázy K* (25 μ g/ml), opět nemícháme, pouze trochu protřepeme a inkubujeme přes noc při 37- 40°C. 2den- do směsi přidáme 200 μ l absolutního ethanolu a protřepeme. Směs s precipitovanou DNA opatrně přemístíme do JETQUICK micro- spin kolonky a centrifugujeme 1 min/ 11 000

pm. Přecentrifugovaný zbytek odstraníme a napipetujeme 500 µl pufru KX rozředěného absolutním ethanolem a centrifugujeme 1 min/ 11 000 rpm. Opakujeme předchozí krok, ale přidáváme 500 µl pufru K2. Přecentrifugovaný zbytek odstraníme a centrifugujeme 1 min/ 11 000 rpm, aby byl ze silica membrány odstraněn zbylý roztok. Vložíme JETQUICK microspin kolonku do nové sterilní 1,5 ml eppendorfky a přidáme 100 µl 10mM Tris- HCl (pH 8,5) nebo sterilní vodu zahřátou na 70°C. Po aplikaci spin kolonky 2 min při pokojové teplotě vyčkáme a poté centrifugujeme 2 min/ 11 000 rpm.

3.2 Metodický postup při genotypizaci lokusů pro dědičné poruchy zdraví

U PCR probíhá amplifikace *in vitro*, používáme termocyclery: T3 Termocycler (Biometra) a T Gradient (Biometra). Amplifikuje se ta část pokusu, která nese mutaci způsobující patologický stav.

Elektroforéza PCR na 2,5 % polyakrylamidovém gelu provádíme při 120 V cca 0,5 hodiny.

RFLP následuje po amplifikaci (PCR) a spočívá v inkubaci amplifikátu s restričním enzymem (RE) a puftrem, dodávaným s restriktázou. Pro každý lokus je opět restriktáza specifická. RE mají své specifické sekvence, kterými vyhledají místo v amplifikátu a mezi dvěma nukleotidy ho rozštěpí. Pokud v tomto specifickém místě dojde k mutaci, jeden nukleotid se vymění za jiný, nenajde RE svou cílovou sekvenci a amplifikát zůstane vcelku.

Fragmenty se rozdělují elektroforézou na 3% agarozovém gelu obarveném ethidium bromidem a vyhodnocovány na UV transiluminátoru při vlnové délce 302 nm.

Hotstart zabezpečuje deaktivaci *proteinázy K*, která se nachází v roztoku izolované DNA. Až poté bylo do reakční směsi každého vzorku přidáno požadované množství *Taq- polymerázy*. Aby se zamezilo nežádoucímu spájení fragmentů, byl PCR produkt do testování uchováván v mrazícím boxu při -20°C.

Příprava *Taq- polymerázy*: *Taq- polymeráza*: 0,2 x X

H₂O: 1,8 x X

X= počet vyšetřovaných vzorků

3.2.1 Citrulinemie

PCR

Primery:

CITR 1

5'GTG TTC ATT GAG GAC ATC 3'

CITR 2

5'CCG TGA GAC ACA TAC TTG 3'

Tab. č. 1 Složení reakční směsi PCR pro citrulinemii

puf	2 µl
MgCl ₂	1,2 µl
dNTP's	2 µl
Citr 1	1 µl
Citr 2	1 µl
DNA	1,3 µl
Taq- polymeráza	2 µl
H ₂ O	9,5 µl
celkem	20 µl

Tab. č. 2 Teplotní režim PCR pro Citrulinemii

Hotstart	95°C	5 min
Denaturace	95°C	50 sec
Annealing	55°C	50 sec
Elongace	72°C	50 sec
Konečná elongace	72°C	5 min
Pauza	4°C	

RFLP

Tab. č. 4 *Ava II*: G↓GWCC (W= A nebo T)

puf	1,7 µl
<i>Ava II</i>	1 µl
PCR produkt	15 µl

3.2.2 BLAD

PCR

Primery:

BLAD 1

5'GTC AGG CAG TTG CGT TCA A 3'

BLAD 2

5'GAG GTC ATC CAC CAT CGA GT 3'

Tab. č. 5 Složení reakční směsi PCR pro BLAD

pufř	2 µl
MgCl ₂	2,4 µl
dNTP's	2 µl
BL 1	1 µl
BL 2	1 µl
DNA	1,3 µl
Taq- polymeráza	2 µl
H ₂ O	8,3 µl
celkem	20 µl

Tab. č. 6 Teplotní režim PCR pro BLAD

Hotstart	95°C	5 min
Denaturace	95°C	50 sec
Annealing	61°C	50 sec
Elongace	72°C	50 sec
Konečná elongace	72°C	5 min
Pauza	4°C	

RFLP

Tab. č. 7 Hae III: GG↓CC

pufř	1,7 µl
Hae III	1 µl
PCR produkt	15 µl

3.2.2 DUMPS

PCR

Primery:

DUMPS 1

5' GCA AAT GGC TGA AGA ACA TTC TG 3'

DUMPS 2

5' GCT TCT AAC TGA ACT CCT CGA GT 3'

Tab. č. 8 Složení reakční směsi PCR pro DUMPS

bufr	2 µl
MgCl ₂	2,4 µl
INTP's	2 µl
Du 1	1 µl
Du 2	1 µl
DNA	1,3 µl
Taq- polymeráza	2 µl
H ₂ O	8,3 µl
celkem	20 µl

Tab. č. 9 Teplotní režim PCR pro DUMPS

Hotstart	95°C	5 min
Denaturace	95°C	1 min
Annealing	60°C	1 min
Elongace	72°C	50 sec
Konečná elongace	72°C	5 min
Pauza	4°C	

RFLP

Tab. č. 10 *Ava* I G↓YCGRG (Y= C nebo T; R= G nebo A)

bufr	1,7 µl
<i>Ava</i> I	1 µl
PCR produkt	15 µl

4. Výsledky a diskuse

Analýzy vybraných recesivních dědičných poruch zdraví byly prováděny v panelu býků holštýnského skotu v inseminaci. Analyzován byl rovněž omezený počet vybraných elitních plemenic, matek býků nebo dárkyní embryí. U býků byly genotypizovány lokusy pro citrulinémii a *DUMPS*. Býci, u kterých nebyl doposud znám status, byli rovněž testováni na *BLAD*. U plemenic byl zjišťován genotyp pro *CVM*, *BLAD*, *DUMPS* a citrulinemii.

Délky fragmentů u vybraných lokusů jsou následující:

BLAD

Restrikční enzym: *Taq I*

TL (dominantní homozygot): 52+32+17 bp

BL/TL (heterozygot): 84+52+32+17 bp

BL (recesivní homozygot): 84+17 bp

Restrikční enzym: *Hae III*

TL: 65+36 bp

BL/TL: 65+46+36+19 bp

BL: 46+36+19 bp

DUMPS

Restrikční enzym: *Ava I*

TD (dominantní homozygot): 53+36+19 bp

DP (heterozygot): 89+53+36+19 bp

(hypoteticky recesivní homozygot): 89+19 bp

Citrulinemie

Restrikční enzym: *Ava II*

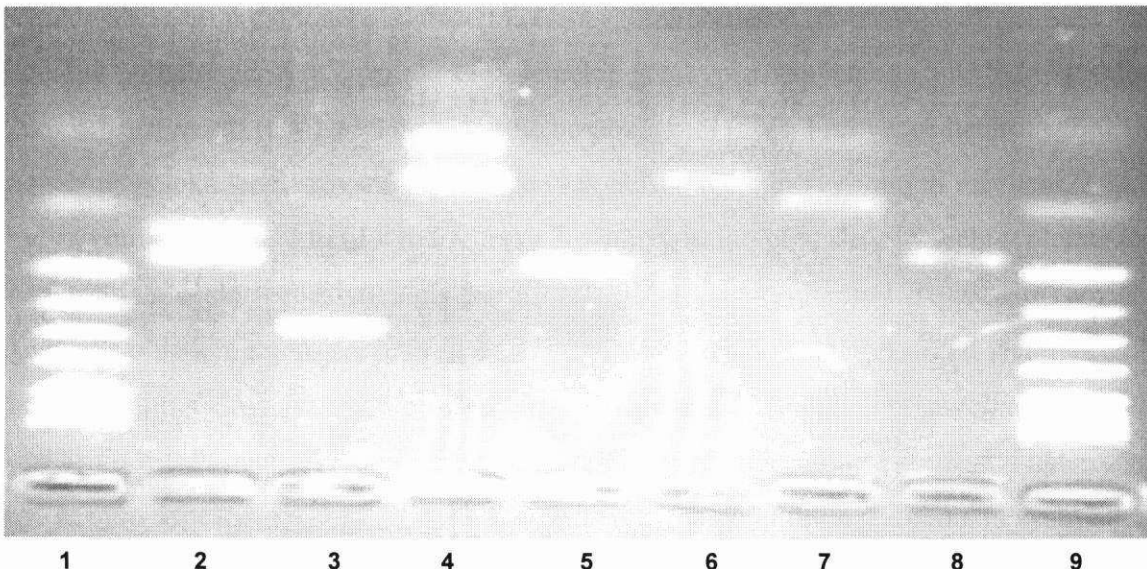
dominantní homozygot (zdravý): 99+78 bp

heterozygot (přenašeč): 177+99+78 bp

recesivní homozygot (postižený): 177 bp

PCR produkty sledovaných lokusů a fragmenty po restriktivním štěpení jsou zobrazeny na obr. 2.

Obr. 2 Genotypizace lokusů pro *BLAD*, *DUMPS* a citrulinemii



1. velikostní marker pUC19/*HaeIII* 2. RFLP citrulinemie (dominantní homozygot) 3. PCR produkt citrulinemie 4. RFLP *DUMPS* (TD) 5. PCR produkt *DUMPS* 6. RFLP *TaqI* *BLAD* (TL) 7. RFLP *HaeIII* *BLAD* (TL) 8. PCR produkt *BLAD* 9. velikostní marker pUC19/*HaeIII*

4.1 Výsledky testování

V březnu 2003 byl navázán kontakt se Svazem chovatelů holštýnského skotu. Po vzájemných konzultacích byl dohodnut postup při screeningu populace černostrakatých býků tak, že majitelé býků resp. dovozci poskytnou krev nebo inseminační dávku odchovaného nebo dovezeného býka holštýnského skotu od plemeníků, kteří vstupují do testačního připarování. Podařilo se získat ročník 2003 testovaných býků. Na populaci holštýnského skotu jsme se zaměřili proto, že je ve srovnání s jinými plemeny relativně častěji postižena genetickými poruchami zdraví, je tedy nutné na ni při sledování genetického zdraví klást větší pozornost.

Byly získány vzorky od 325 býků. Od 183 býků byly dodány inseminační dávky, které poskytly 4 šlechtitelské firmy. Sperma bylo získáno jak od býků odchovaných v ČR, tak od zahraničních. Od 142 býků, kteří byli připraveni k testačnímu připarování, byly získány vzorky krve, které poskytly Státní veterinární ústav Brno.

Dále byli testováni býci slovenského strakatého plemene ($n=17$), holštýnského plemene používaného na Slovensku ($n=3$) a v Polsku ($n=12$). Dále bylo testováno 111 elitních holštýnských plemenic.

Výsledky testování na *BLAD*, *DUMPS* a citrulinemii byly u býků negativní, tzn. že v analyzovaném panelu nebyl nalezen heterozygotní přenašeč recesivní alely pro sledované dědičné poruchy zdraví. V panelu 111 plemenic genotypizovaných na *CVM* bylo 21 shledáno jako heterozygotní (*CV*) a 90 dominantně homozygotní (*TV*). Frekvence heterozygotů 18,9% je poměrně vysoká, analyzované plemenice však nejsou náhodně vybraným vzorkem. Záměrně byly vybírány ty, které mají v rodokmenu heterozygotního přenašeče. Všechny plemenice byly negativní na výskyt recesivní alely pro *BLAD*, *DUMPS* a citrulinémií. To je velmi pozitivní zjištění s ohledem na skutečnost, že *BLAD* byl v 90. letech minulého století v chovech holštýnského skotu závažným problémem. Je evidentní, že zavedení přísných restričních opatření s cílem vymýtit recesivní vlohu z populace, zejména zákazu používání heterozygotních býků, bylo úspěšné, když se *BLAD* jak u plemeníků, tak u elitních plemenic nevyskytuje. V běžné populaci krav je však alela přítomná, proto je žádoucí pokračovat v kontrole a zejména u býků důsledně dodržovat zásadu, že používán může být pouze plemeník s ověřeným homozygotně dominantním genotypem.

Např. Hradil (1994) genotypizoval 438 zvířat, která měla pozitivní předchůdce v posledních třech generacích. Z 377 býků a 61 krav, kteří byli testováni bylo 65 býků a 4 plemenice pozitivní na *BLAD*. Vyšší četnost byla vypořádána u červené varianty holštýnsko-frízského skotu, z 64 býků bylo 34 zvířat pozitivních. Jorgensen *et al.* (1993) prováděli výzkum *BLAD* u Dánského holštýnsko-frízského skotu. Celkem bylo testováno 1611 zvířat. Odhad pomocí PCR testu u 450 dánských krav narozených v roce 1991 uvádí, že jsou přenašečky. U genotypizace 783 býků z Porýnské AI asociace (Duesmann, 1994) bylo zjištěno, že 13% bylo pozitivních mezi srpnem 1992 a březnem 1993, 3,5% testovaných býků bylo pozitivních mezi květnem a prosincem 1993. Tento výzkum dokládá, že se výskyt onemocnění *BLAD* postupně snižoval.

Gilbert *et al.* (1993) testoval 18 kusů krav, které byly připouštěny v letech 1975-1991. Po testování bylo 14 z nich potvrzeno, že byly homozygotní pro *BLAD* gen.

Grobet *et al.* (1993) testoval holštýnské býky s neznámým *BLAD* statusem, zjistil 5 homozygotních a 5 heterozygotních býků. Dále bylo testováno 15 holštýnských býků s neznámým statusem, 3 byli diagnostikováni jako heterozygotní. Testoval rovněž 49 býků belgického modrého a 14 červenobílého plemene, všechny výsledky byly negativní, tzn. že

v uvedeném panelu se nevyskytoval heterozygotní přenašeč, což opět potvrzuje, že výskyt je problémem především u holštýnského skotu.

Je evidentní, že zavedení přísných restriktivních opatření s cílem vymýtit recesivní vlohu z populace skotu chovaného v ČR, zejména zákazu používání heterozygotních býků, bylo úspěšné, když se *BLAD* jak u plemeníků, tak u elitních plemenic nevyskytuje. V běžné populaci krav je však alela přítomná, proto je žádoucí pokračovat v kontrole a zejména u býků důsledně dodržovat zásadu, že používán může být pouze plemeník se ověřeným homozygotně dominantním genotypem.

Výskyt letálních recesivních dědičných onemocnění je většinou sporadický, ale při dlouhodobém latentním šíření heterozygotními přenašeči může dojít ke zvýšení frekvence alely, vyššímu výskytu recesivních homozygotů. To má významný vliv na velké ekonomické ztráty. Díky inseminaci a využívání malého počtu špičkových býků zejména v holštýnské populaci může dojít relativně rychle k celosvětovému rozšíření dědičné poruchy. Příkladem z nedávné doby je *BLAD*, nebo v současné době problém komplexu vertebrálních malformací (*CVM*). Molekulárně genetické metody poskytují účinný nástroj pro kontrolu genetického zdraví populací hospodářských zvířat.

Populace býků, jejichž sperma začíná být používáno v inseminaci je pečlivě kontrolováno. V dalších letech je nutné zaměřit pozornost na elitní část samičí populace, protože testací lze přispět ke zlepšení genetického zdraví matek býků a snížit riziko výskytu komplexu vertebrálních malformací u narozených býčků.

Námi zjištěný negativní výskyt nepřítomnosti alely pro *BLAD*, *DUMPS*, a citrulinemii je velice pozitivním zjištěním. To však neznamená, že u skotu se tato onemocnění v běžné populaci nevyskytují. Proto by testace zejména plemeníků na *BLAD* a *CVM* měla pokračovat.

5. Závěr

Byl sledován výskyt některých recesivních chorob v populaci skotu v České republice. U 325 býků vstupujících v roce 2003 do testace nebyl nalezen skrytý heterozygotní přenašeč *BLAD*, *DUMPS* a citrulinémie. Z 111 elitních holštýnských plemenic podezřelých z přenašečství komplexu vertebrálních malformací (*CVM*) bylo 90 dominantních homozygotů a 21 heterozygotů. Při testaci na výskyt *BLAD*, *DUMPS* a citrulinémie byly tyto plemenice shledány jako dominantní homozygoti.

Doporučuje se pokračující testace zejména plemeníků, ale také elitních plemenic na *BLAD* a *CVM*.

Díky molekulárně genetickým metodám je nám možné odhalení heterozygotů, kteří přenášejí recesivní alelu na potomstvo. Tyto metody jsou významným nástrojem umožňujícím rychlé zlepšení genetického zdraví populace.

Seznam použitých zkratek

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> , délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů
AMFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> , délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů
AP-PCR	<i>Arbitrally Primed PCR</i> , polymorfismus náhodné amplifikované DNA
bp	<i>base pair</i> , pár bází
ASS	argininosukcinát syntetáza
BLAD	<i>Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency</i> , Deficience bovinní leukocytární adheze)
CDGE	<i>Constant Denaturant Gel Electrophoresis</i> , gelová elektroforéza při konstantní koncentraci denaturantu
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementární DNA
CVM	<i>Complex Vertebral Malformation</i> , komplex vertebrálních malformací
dNTP	<i>deoxyribonucleotide</i> , deoxyribonukleotid
ddNTP	<i>dideoxyribonucleotide</i> , dideoxyribonukleotid
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> , denaturační gradientová elektroforéza
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	<i>double strand DNA</i> , dvouvláknová DNA
DUMPS	<i>Deficine of Uridine Monophospate Synthesa</i> , Deficience uridin- 5' - monofosfát syntázy
EDTA	chelaton 3 (disodium ethylendiaminetetraacetate)
ELFO	Elektroforéza
EtBr	ethidium bromid
HA	<i>Heteroduplex Analysis</i> , heteroduplexní analýzy
kb	<i>kilo base</i> , tisíc bází
mRNA	<i>messeger RNA</i> , mediátorová RNA
MSUD	<i>Maple Syrup Urine Disease</i>
n	počet sledování
PAA	<i>polyakrylamid gel</i> , polyakrylamidový gel
PAGE	<i>Polyakrylamide Gel Electrophoresis</i> , polyakrylamidová elektroforéza
PCR	<i>Polymerase Chain reaction</i> , polymerázová řetězová reakce
PCR/RFLP	délkový polymorfismus restričně štěpené amplifikované DNA

rRNA	<i>ribosomal RNA</i> , ribozomální RNA
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i> , polymorfismus délky restričních fragmentů
RNA	<i>ribonucleotacid</i> , ribonukleová kyselina
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> , konformační polymorfismus jednořetězcové DNA
tRNA	transferová RNA
TTGE	Thermal Gradient Gel Elektrophoresis
TTGE	Temporal Temperature Gradient Elektrophoresis
UMPS	Uridine Monophosphate Synthesa

6. Literatura

- Ackermann M. R., Kehrli M. E., Laufer J. A., Nusz L. T. (1996): Alimentary and Respiratory Tract Lesions in Eight Medically Fragile Holstein Cattle with Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD). *Vet. Pathol.*, 33 (3), 273- 281.
- Agerholm J. S., Bendixen C., Andersen O., Arnbjerg J. (2001): Complex vertebral malformation in Holstein calves. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13, 283- 289.
- Alberts, B., D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (1998): *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky*. 1. vydání. Espero Publishing. Ústí nad Labem. 630s.
- Dennis J. A. and P. J. Healy (1999): Definition of the mutation responsible for maple syrup urine disease in pool shorthorns and genotyping pool shorthorns and pool herefords for maple syrup urine disease alleles. *Res. Vet. Sci.*, 67, 1- 6.
- DGFZ (1986): Empfehlungen zur Berücksichtigung von Erbfehlern in der Tierzucht. *Zuechtungskunde*, 58: 151- 153.
- Duesmann K. (1994): Incorporation of a polymerase chain reaction for bovine leukocyte adhesion deficiency into the routine monitoring of AI bulls. *Tierärztliche Hochschule. Hannover. Germany*. pp.159.
- Ellder M. (2001): O dědičných metabolických poruchách. *Sanquis*, 16, 12.
- Fries R., Ruvinsky A. (1999): *The Genetics of Cattle*. CAB International. Wallingford. 710 pp.
- Gilbert R. O., Rebhun W. C., Kim C. A., Kehrli M. E. Jr., Shuster D. E., Ackermann M. R. (1993): Clinical manifestations of leukocyte adhesion deficiency in cattle 14 cases (1977- 1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202: 445- 449.
- Grobet L., Charlier C., Hanset R. (1993): Genomic diagnosis of bovine leukocyte adhesion deficiency. *Annal.de Med. Vet.* 137: 27- 31.
- Grupe S., Dietl G., Schwerin M. (1996): Population survey of citrullinemia on German Holsteins. *Livest. Prod. Sci.*, 45(1), 35- 38.
- Harlizius B., Schröber S., Tammen I., Simon D. (1996): Isolation of the bovine uridine monophosphate synthase gene to identify the molecular basis of DUMPS in cattle. *J. Anim. Breed. Genet.*, 113, 303- 309.
- Harper P., Dennis J. A., Healy P. J., Brown G. K. (1989): Maple syrup urine disease in calves: a clinical, pathological and biochemical study. *Austr. Vet. J.*, 66, 46- 49.

- Healy P. J. and J. A. Dennis (1995): Heterozygote detection for maple syrup urine disease in cattle. *Austr. Vet. J.*, 72, 346- 348.
- Healy P. J., Harper P. A. W., Denis J. A. (1990): Bovine citrullinemia: a clinical, pathological, biochemical and genetic study. *Austr. Vet. J.*, 67(6), 255- 258.
- Hradil R. (1994): Application of molecular genetic method to the BLAD and PSS testing in bovine and pigs in Czech Republic. Processing of the XXIV International Conference on Animal Genetics. Prague. pp 83.
- <http://genetika.wz.cz>
- Jorgensen C. B., Agerholm J. S., Pedersen J., Thomsen P. D. (1993): Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency in Danish Holstein- Friesian Cattle. I. PCR Screening and Allele Frequency Estimation. *Acta Vet. Scand.*, 34 (3), 231- 236.
- Kanae Y., Endoh D., Nagahata H., Hayashi M. (2005): A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction-primer introduced restriction analysis. *J. Vet. Diagn. Incest.*, 17 (3), 258- 262.
- Kehrli M. E., Shuster D. E., Ackermann M. R. (1992): Editorial. Leukocyte Adhesion Deficiency Among Holstein Cattle. *Cornell. Vet.*, 82 (2), 103- 109.
- Knoll, A. a Vykoukalová Z. (2002): Molekulární genetika zvířat: (metody detekce polymorfizmů DNA genů), 1. vydání, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, s168.
- Křemen J., Pohreich P., Stříbrná J. (1998): Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně. *Karolinum*. 114s.
- Kuczka A., Kuhlmann E., Schwenger B. (1993): Controlling bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD). *Tierzuchter*. 45: 32- 35.
- Lin D. Y., Huang Y. C., Chen J. C., Yang T. W., Shiao T. F., Chang H. L. (2001): Investigation of citrullinemia of dairy cattle in Taiwan. *J. Taiwan Livest. Res.*, 34 (4), 279- 284.
- Nagahata H., Miura T., Tagaki K., Othake M., Noda H., Yasuda T., Nioka K. (1997): Prevalence and Allele Frequency Estimation of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) in Holstein- Friesian Cattle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 59 (4), 233- 238.
- Nielsen U. S., Aamand G. P., Andersen O., Bendixen C., Nielsen V. H., Agerholm J. S. (2003): Effects of complex vertebral malformation on fertility traits in Holstein cattle. *Livest. Prod. Sci.*, 79, 233- 238.
- Poli M. A., Dewey R., Semorile L., Lozano M. E., Albarino C. G., Romanowski V., Grau O. (1996): PCR Screening for Carriers of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD)

and Uridine Monophosphate Synthase (DUMPS) in Argetine Holstein Cattle. J. Vet. Med. A., 43, 163- 168.

Revell S. (2001): Complex vertebral malformation in a Holstein calf in the UK. VetRec, 24, 659- 660.

Robinson J. L., Popp R. G., Shank R. D., Oosterhof A., Veerkamp J. H. (1993): Testing for deficiency of uridine monophosphate synthase among Helstein- Frisian cattle of North America and Europe. Livest. Prod. Sci., 36, 287- 298.

Shank R. D. (1990): Editorial. Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase Among Holstein Cattle. Am J. Vet. Res., 51 (5), 800- 802.

Shuster D. E., Kehrl M. E., Ackermann M. R., Gilbert R. O. (1992): Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. PNAS, 80 (19): 9225- 9229.

Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. (2005): Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita. Brno - Kraví Hora. 188s.

Viana J. L., Fernandez A., Iglesias A., Santamarina G. (1998): Diagnóstico y control de las principales enfermedades genéticas (citrulinemia, DUMPS y BLAD) descritas en ganado Holstein- Frisón. Med. Vet., 15 (10), 538- 544.

Watson J. D. (1982): Molekulární biologie genu. 3. vydání. Academia. Praha.

Weaver R. F. (2005): Molecular biology. Mc Graw Hill. 852s.

Zabek T. and A. Rys (1998): Gene defect in farm animals. Biul. Inform. Inst. Zootech. 36: 5- 13.

Zhang B., Healy P. J., Zhao Y., Crabb D. W., Harris R. A. (1990): Premature translation termination of the pre- E1 α subunit of the branched chain α - ketoacid dehydrogenase as a cause of maple syrup urine disease in polled hereford calves. J. Biol. Chem., 265, 2425- 2427.

Žurovec M. (1999): Molekulární biologie živočichů. JČU. Biologická fakulta. 312s.

ČESKÁ UNIVERZITA
V BRNĚ
VETERINÁRNÍ FAKULTA
ústřední knihovna
Studentská 13
602 00 Brno