2006 Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Studijní obor: Všeobecné zemědělství
Katedra: Genetiky, šlechtění a výživy zvířat

Diplomová práce

Vybrané dědičné choroby skotu

Vedoucí diplomové práce

doc. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

Jméno autora

Jana Šťastná

Knihovna JU - ZF

3114703785

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „Vybrané dědičné choroby skotu“ vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů, které uvádím v seznamu literatury.

V Českých Budějovicích, 11. května 2006

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Jindřichu Čítkovi, CSc. Za vedení, pomoc, odborné rady a připomínky, které mi poskytoval během vypracování celé práce.

České Budějovice, květen 2006

OBSAH

1.Úvod 5

2.Literární přehled 6

2.1. Struktura savčího genomu 7

2.2. Genetický polymorfismus 7

2.3. Markery 8

2.4. Popis nejdůležitějších molekulárně – genetických metod pro detekci a testování polymorfismů 8

2.5. Analyzované choroby 12

3. Cíl práce 16

4. Materiál a metody 16

4.1. Izolace DNA 16

4.2. PCR/RFLP 17

4.3. Seznam zkratek 21

5. Výsledky a diskuse 22

6. Závěr 26

7. Seznam literatury 27

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Struktura savčího genomu

Termín genom použil poprvé Winkler (1920) a sestavil jej ze slov GENes a chromosOME. Označil ho jako kompletní sadu chromozómů a jejich genů. Pojmem genom rozumíme soubor veškerého genetického materiálu buňky nebo jedince. Eukaryota mají diferencované jádro a jaderná DNA je lokalizovaná v chromozómech. V každém chromozómu je jedna molekula dvoušroubovicové lineární DNA. Většina eukaryotních genů je tvořena exony a introny, jejichž počet i délka je variabilní.
Genom savců obsahuje v haploidní sadě přibližně 3 miliardy bází (Ringo 2004). Genom skotu obsahuje 70 - 100 tisíc genů uložených ve 30 lineárních chromozómech. Celková délka měřená v počtu bází je přibližně 6,2 mld. bp (Dvořák *a kol.* 2000).

Sekvence typického savčího genu je rozdělena na několik funkčních částí. Na 5´konci je lokalizována promotorová oblast obsahující iniciační (startovací) nukleotid A v místě +1. Před tímto místem a za ním následuje několik nukleotidů obsahujících pyrimidinovou bázi. Dále obsahuje tzv. TATA box (Hognessův box), důležitý pro správné navázání *RNA-polymerázy II* a pro iniciaci transkripce, TATA box se nachází obvykle mezi nukleotidy -34 a -26 od iniciačního místa transkripce +1. Proti směru transkripce od TATA boxu až do vzdálenosti -100 a dále se nachází krátké specifické sekvence sloužící jako vazebná místa pro různé regulační proteiny (transkripční faktory) např. CATT. Pentanukleotid CATTC hned po směru transkripce za iniciačním nukleotidem +1, je rozpoznávací sekvencí pro enzym katalyzující modifikaci 5´konce strukturou zvanou „čepička" (Rosypal *a kol.* 1989). Začátek přepisu je tedy určen adeninem a iniciačním (start) metionovým kodonem (ATG), který označuje začátek translace všech eukaryotických genů. Sekvence mezi začátkem transkripce a start kodonem se označuje jako 5´- UTR (nepřekládaná oblast). Následuje různý počet exonů oddělených introny, které začínají donorovým (GT) a končí akceptorovým (AG) místem sestřihu. V posledním exonu se nachází stop kodon následovaný 3´- UTR, která obsahuje sekvenci AATAAA, označovanou jako polyadenylační signál. Jsou zde i jiné regulační oblasti jako vazebná místa transkripčních faktorů lokalizovaná v promotoru, zesilovače transkripce a zeslabovače transkripce (Alberts *a kol.* 1998)

Strukturní geny savců tvoří asi 5-10% genomové DNA (u člověka je to jen asi 3%). Na zbytku se podílí regulační a nekódující sekvence (Rosypal a kol., 1989). Délka intronů je od několika desítek až po několik tisíc bp, exony mají délku 50 – 600 bp. Malé strukturní geny mají kolem 500 bp, středně velké až velké jsou dlouhé od 1200 bp do 20000 bp, obří geny obsahující až 2 miliony bp (Hruban a Majzlík 2000).

Karyotyp skotu se skládá z 29 párů autozomů a 1 páru pohlavních chromozomů. Délka genomu skotu je odhadována v rozsahu 2820 cM (Barendse *et al.* 1993) až 3000 cM (Fries a Ruddle 1986).

Každá populace je charakteristická určitou strukturou, alelovými četnostmi a výskytem homozygotních a heterozygotních genotypů. Genová proměnlivost populace je utvářena působením mutací, selekce, migrace, inbreedingu a genetického driftu.

2.2 Genetický polymorfismus

Genetický polymorfismus je výskyt dvou a více alternativních alelických forem určitého genu v populaci s frekvencí nad 1%. Znak tvořený více fenotypovými formami nazýváme polymorfním, zatímco znak tvořený jen jednou formou je označován jako monomorfní. Genetický polymorfismus tvoří významnou část vnitropopulační genetické variability, která umožňuje přežití a vyvíjení se populace.

Bodový polymorfismus je způsoben změnou v sekvenci bází, nejčastěji bodovou mutací (většinou záměna nukleotidů (inzerce) nebo ztráta (delece) několika bází) v určitém místě DNA. Odhaduje se, že u eukaryot je polymorfní přibližně každý 500. nukleotid v kódujících sekvencích DNA a každý 50. v nekódujících sekvencích. Prakticky je bodový polymorfismus detekován jako polymorfismus délky restrikčních fragmentů RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) respektive CAPS (*Clevead Amplified Polymorphic Sequence*) a v poslední době také SNP (*Single nukleotide polymorphism*) (Alberts a kol., 1998)

Takto definované polymorfní místo se chová jako mendelisticky děděný gen s kodominantní dědičností. Jednotlivé varianty se vyskytují s určitou frekvencí, která se může v jednotlivých populacích lišit.

2.3 Markery

Genetický marker je vysoce polymorfní znak, který vykazuje mendelistickou kodominantní dědičnost a současně je snadno a jednoznačně detekovatelný. Umožňuje jednoduše detekovat odlišnosti v primární genetické informaci, kterou DNA nese. DNA markerovací systémy jsou založeny na polymorfizmu v sekvencích DNA u analyzovaných jedinců (populací).

Dle využití při mapování genomu rozdělujeme markery do tří typů:

I. typ – kódující exprimované geny, které mohou být kandidátními geny pro QTL (lokusy pro kvantitativní znaky). Mají nízkou hladinu polymorfizmu, proto jsou málo použitelné pro studium diverzity rodin a populací. Využívají se v komparativním (srovnávacím) mapování.

II. typ – vysoce variabilní sekvence DNA, především mikrosatelity a minisatelity. Vlivem vysokého stupně polymorfizmu jsou mikrosatelity vysoce informativní v populačních studiích a při určování rodičovství, dále pak jsou základem pro vazbové mapování genů.

III. typ – polymorfismus jednotlivých nukleotidů (SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*), mohou ležet uvnitř kódujících genů, častěji se však nacházejí v nekódujících intronech nebo intergenových oblastech. Využívají se pro populační i rodinné studie. Vyskytují se v genomu každých 500 – 1 000 bp (Caetano-Anollés, 1997).

2.4. Popis nejdůležitějších molekulárně-genetických metod pro detekci a testování polymorfismů DNA

PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Tato metoda nachází uplatnění v mnoha oblastech molekulární genetiky. Využívá se pro klonování genomové DNA, v soudnictví pro genetický fingerprinting, v lékařství pro prenatální diagnostiku genetických chorob, určení přítomnosti cizího genomu infekčního původu, detekci jednotlivých alel polymorfních lokusů, sekvenování DNA a pro další účely.

Metoda PCR byla poprvé popsána v roce 1985 (Saiki *et al.* 1985). Autoři byli v roce 1993 oceněni Nobelovou cenou. Metoda slouží k získávání dostatečného množství specifické DNA pro další analýzy. Podstatou je enzymatická amplifikace určitého úseku

DNA, na kterém leží sledovaný gen. K tomuto účelu se využívá specifických sekvencí DNA – primery. Primery hybridizují s oběma vlákny denaturované matricové DNA v opačné orientaci. Tím je syntetizována oblast mezi primery a vzniknou dva dvouvláknové produkty, které slouží jako templát v dalším cyklu. V dalších cyklech dochází znovu k namnožení fragmentů, vytvořených v předchozím cyklu reakce a z každé původní molekuly templátové DNA tak vzniká 2^n kopií, kde n je počet cyklů. V praxi je však amplifikace limitována koncentrací substrátu a aktivitou enzymu. Skutečná účinnost metody je proto nižší. Saiki *et al.* (1988) odhadli skutečnou účinnost reakce na 60-85%.

Reakce probíhá v termálním cykleru, kde se v několika cyklech opakuje sled optimálních teplot pro jednotlivé kroky amplifikace. Probíhá inkubací vzorků při třech teplotách odpovídajících třem krokům v amplifikačním cyklu: denaturaci, annealingu a elongaci.

PCR v reálném čase (*Real-Time PCR*)

Jedná se o moderní metodu sledování průběhu PCR v reálném čase na základě sledování intenzity fluorescenčního signálu.

Používá se pro kvantifikaci genomové DNA nebo mRNA, analýzu bodu tání produktu (*melting analysis*) při ověřování identity a kvality amplifikátu a při genotypizaci pro přímé stanovení genotypu (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997).

RFLP (*Restriction Fragment Lenght Polymorphism*)

Pomocí této metody se identifikují alely na základě přítomnosti nebo absence specifického restrikčního místa.

Tato metoda souvisí s objevem specifických restrikčních endonukleáz, které štěpí řetězec DNA uvnitř specifické sekvence nukleotidů (Smith a Wilcox, 1970).

Genomová DNA je štěpena příslušnou restrikční endonukleázou, separována na agarózovém gelu a přenesena na pevnou membránu pomocí southern blot. Po hybridizaci značenou sondou a vizualizaci lze zjistit polymorfismus ve velikosti vzniklých restrikčních fragmentů DNA. Touto metodou lze identifikovat i polymorfismus uvnitř markerů I. typu, je-li jako sonda použita komplementární DNA (cDNA). Dále se tato metoda používá pro vazebné i komparativní mapování a odhalení variability v kandidátních genech pro ETL (*Economic Trait Loci*) (Karp a Edwards, 1997). Tato metoda se v současnosti příliš nepoužívá, z důvodu časové i materiální náročnosti. Dalším úskalím je potřeba velkého množství DNA o vysoké kvalitě a používání radioaktivního značení.

PCR/RFLP

Tato metoda je modifikací, kdy po amplifikaci úseku DNA metodou PCR následuje rozštěpení některé z přítomných variant PCR produktu specifickou restrikční endonukleázou. Cílová sekvence použité endonukleázy je shodná s místem, kde došlo ke změně polynukleotidového řetězce. Insercí, delecí nebo substitucí štěpné místo buď zaniká nebo vzniká nové, pro jinou endonukleázu. Výsledek se zjišťuje pomocí elektroforézy na agarózovém gelu a vizualizace fragmentů je nejčastěji prováděna použitím ethidium bromidu na UV světle (Sambrook *et al.* 1989).

AFLP (*Amplified Fragment Lenght Polymorfism*)

Tato metoda je založena na detekci DNA restrikčních fragmentů pomocí PCR amplifikace. Amplifikace restrikčních fragmentů je založena na ligaci dvouvláknových (ds) adaptorových sekvencí na konec restrikčního místa, což slouží jako „univerzální" vazebné místo pro primery PCR. Touto metodou se detekuje polymorfismus v délce fragmentu, v restrikčním místě nebo v místě selektivních bází (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997).

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Tato metoda stejně jako podobná metoda AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*), je metodou pro tvorbu genomového fingerprintingu u druhů, kde máme jen velmi málo informací o sekvenci, kterou chceme amplifikovat. K zahájení PCR se používá krátký a málo specifický oligonukleotid (10NT), který se váže na příslušná místa amplifikované DNA.

RAPD vykazují vysoký stupeň polymorfizmu, a proto mohou být genetickými markery pro tvorbu genetických map, mapování QTL, fingerprinting, měření genetických vzdáleností mezi populacemi atd.. Mají však dominantní charakter, a proto nelze odlišit hetero- a homozygotní genotyp (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997).

Sekvenování

Pro sekvenování DNA byly vyvinuty dvě metody:

I. Sangerova metoda (1977) – tato metoda využívá syntézy komplementárního řetězce DNA polymerázami *in vitro*, přerušované náhodně v místě jednotlivých bází.

II. Maxim-Gilbertova metoda (1977) – při této metodě se štěpí DNA v místě určitých bází chemicky.

Sekvenování je metoda, při které se stanovuje přímo sekvence nukleotidů DNA. Do sekvenační reakce se dává směs normálních nukleotidů s modifikovanými dideoxynukleotidy (ddNTP), které nemají OH vazebnou skupinu. Zařazením těchto nukleotidů do řetězce DNA se reakce zastavuje. Získáme tak fragmenty o různé délce, které končí vždy příslušným ddNTP. Posloupnost bází se vyhodnocuje po separaci na polyakrylamidovém gelu nebo kapilární elektroforézou (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997).

DNA array (*DNA chips, biochips*)

DNA arrays patří mezi nejnovější biotechnologické metody, které využívají dvou základních strukturních vlastností dvoušroubovicové DNA: sekvenční komplementaritu a složení ze dvou řetězců. Základem je hybridizace značeného vzorku DNA k DNA o známé sekvenci. Tyto metody se uplatňují při studiu expres genů, detekci SNP a genotypování (Knoll a Vykoukalová 2002).

Elektroforéza

Nejdůležitější metoda na separaci nukleových kyselin. Jedná se o fyzikálněchemickou metodu pro dělení látek v elektrickém poli. Jako analytická metoda je elektroforéza jednoduchá, rychlá a přitom vysoce citlivá metoda (Andrews, 1993)

I. Agarózová elektroforéza

Agarózová elektroforéza respektive agarózový gel je využíván zejména pro dělení nukleových kyselin. Velikost pórů agarózového gelu lze řídit pomocí koncentrace agarózy v gelu. Velikost pórů je obecně velká, což umožňuje separovat velké makromolekuly jako jsou nukleové kyseliny. Výhodou této metody separace je její metodičnost a jednoduchá příprava (Garfin, 2000).

II. Polyakrylamidová elektroforéza (PAGE – *Polyakrylamide Gel Electrophoresis*)

a) Denaturační PAGE – na gel se nanáší denaturovaná, jednořetězcová DNA a dělení probíhá za přítomnosti denaturantu v gelu. Molekuly separují jen na základě své velikosti. Využívá se hlavně pro určení velikosti DNA, při testování mikrosatelitů a sekvenování.

b) Nedenaturační PAGE – vzorek se na gel nanáší nedenaturovaný, je zde možnost barvení. Separace je ovlivněna také prostorovou strukturou DNA.

Padeeri *et al.* (1999) detekoval s použitím metody PCR/RFLP u homozygotně dominantních jedinců jeden proužek o velikost 100 bp, heterozygotní stav je determinován dvěma pruhy o velikosti 100 a 200 bp a u nemocných telat byl detekován jediný pruh o velikosti 200 bp (homozygotně recesivní založení).

DUMPS (Deficience uridin - 5 ´-monofosfát syntézy) je genetická porucha, která ovlivňuje biosyntézu pyrimidinu a je děděna jako jednoduchý, dvoualelový lokus na autozómu (Shanks and Greiner,1992, Kuhn a Shanks,1994). Dědičná deficience tohoto enzymu je známa u člověka jako recesivní choroba, tzv.dědičná orotická acidurie. Porucha je způsobena bodovou mutací, tranzicí kdy cytosin je nahrazen thyminem (C→T) na kodonu 405 v exonu 5 (Viana *et al.*, 1998). Gen pro UMP syntézu je lokalizován v bovinním genomu na chromozomu 1. Enzym uridin – 5- monofosfát (UMP) syntéza katalyzuje přeměnu orotické kyseliny na UMP, což je prekurzor všech dalších pyrimidinových nukleotidů a běžná složka mléka krav a dalších přežvýkavců (Shanks *et al.*, 1989). UMP syntéza je nutná pro syntézu pyrimidinových nukleotidů, které jsou stavebními kameny DNA a RNA, růst a vývoj homozygotně recesivních jedinců je tudíž zastaven a vede k embryonální mortalitě okolo 40. dne březosti (Shanks, Robinson, 1990). Praktickým dopadem této poruchy je výskyt vyšší četnosti přeběhnutí se a to z důvodu ukončení jejich březosti časným spontánním potratem (Fries and Ruvinsky, 1999). Autozomálně DUMPS byl pozorován u dojného skotu, a to zejména v USA u holštýnsko – fríského plemene (Shanks, Robinson, 1989). Robinson a Shanks (1990) u některých krav ze stáda Univerzity v Illinois zaznamenali 5-10 krát vyšší koncentraci kyseliny orotické v mléce. Zvýšená hladina kyseliny orotické v mléce byla evidentní v různých stádiích laktace a stav přetrvával od jedné laktace ke druhé. Kyselina se dále vylučovala do moči a krve laktujících zvířat. Robinson a Shanks (1990) uvádějí, že při deficienci enzymu UMP syntézy, docházelo k akumulaci kyseliny orotické.

Deficit uridin monophosphat syntázy (UMPS) je smrtelný. Porucha se vyskytuje hlavně u holštýnsko – fríského plemene (Shanks a Robinson, 1990). To ukazuje na autozomální model dědičnosti. U heterozygotů nevykazuje škodlivé účinky, ale u homozygotů způsobuje zárodečnou úmrtnost kolem 40. dne březosti (Shanks and Robinson, 1989; Shanks *et al.*, 1992). Molekulární základ pro tuto změnu byl stanoven v genu pro UMP syntázu (Schwennger *et al.*,1993). Heterozygoti mají polovinu normální aktivity enzymu a proměnlivost v letech a v pohlaví nebyla dostatečně velká pro toleranci charakteristickou pro normální jedince (Jones *et al.*,1984).V průměru je polovina potomků z křížení mezi heterozygotním a geneticky zdravým rodičem normální. Druhá polovina

potomků představuje nosiče. Heterozygotní přenašeči poruchy jsou identifikováni měřením aktivity enzymu UMP syntézy v erytrocytech v játrech, slezině, ledvinách, svalech a mléčné žláze, přičemž tato aktivita je u nositelů snížena (Shanks, 1990) a redukována na polovinu normálních hladin (Schwenger *et al.*, 1994, Robinson, Shank, 1990). V praxi dopad tohoto defektu znamená, že krávy přenašečky vykazují vyšší četnost časného přeběhnutí, jejich březost je ukončena časným zmetáním (Fries, Rusinsky, 1999). Eliminace této poruchy z populace je řešena evidencí inseminačních stanic a to za pomoci testu na UMP syntázu aktivitu v erytrocytech u samců (Robinson *et al.*, 1984).

Schwenger *et al.* (1993) a Grzybowski *et al.* (1998) publikovali možný model detekce recesivní alely, která podmiňuje poruchu DUMPS. Jedná se využití molekulární metody PCR-RFLP s definovanými primery (5´CAA ATG GCT GAA GAA CAT TCT G 3´ A 5´GCT TCT AAC TGA ACT CCT CGA GT 3´) a následném štěpení restrikční endonukleázou Ava I. Výsledné fragmenty mají pro geneticky zdravé jedince velikost 53 + 36 + 19 bp a pro heterozygotní přenašeče velikost 89 + 53 + 36 + 19 bp.

BLAD (deficience bovinní leukocytární adheze) jedná se o letální autozomálně recesivní onemocnění u holštýnského skotu. Porucha je charakterizována silně sníženou hladinou exprese β2 heterodimerického integrinu.Porucha BLAD je determinována jednoduchou bodovou mutací, kdy dochází k záměně guanin za adenin na pozici 383 na genu 18. Následkem této mutace je následná záměna glycinu za kyselinu aspartamovou (Shuster *et al.*, 1992).

Integriny jako adhezivní molekuly zprostředkovávají vstup a přechod neutrofilů přes membrány a podílí se na eliminaci patogenů (Kehrli *et al.*, 1992, Poli *et al.*, 1996, Natonek, 2000). Integrity jsou složeny z identických β podjednotek (CD18) a strukturně variabilních podjednotek (CD11a, CD11b, CD11c) pro integrity LFA-1, Mac-1 a p150. Exprese β2 integrinů vyžaduje intracelulární asociaci podjednotek CD11 a CD18. Onemocnění BLAD způsobuje defekty v podjednotce CD18 a tím brání expresi všech β2 integrinů (Natonek, 2000).U neutrofilů získaných z telat trpících BLAD byla exprese leukocytárních integrinů na povrchu buněk snížená, dále byla pozorována snížená schopnost agregace v reakci na chemické stimuly a snížená schopnost migrace přes membránu bovinních endoteliárních buněk (Pareek and Kaminski, 1996). Výsledky krevních testů postižených telat ukázaly přetrvávající a zřetelnou leukocytózu s převahou segmentovaných neutrofilů. Defektní leukocytární adheze vede k neadekvátní imunitě sliznice a nemocná zvířata mají vážné a opakované slizniční infekce, jako je pneumonie, záněty dásní a ozubice, vypadávání zubů, tvorba hnisu, pomalé hojení ran a omezený růst

(Nagahata *et al.*, 1994). Adherentní aktivita a fagocytóza kvasinek byly také velmi omezené. To je důkazem toho, že schopnost neutrofilů fagocytovat je spojena s C3b receptorem. Markantně snížené množství CD18 na povrchu neutrofilů u telat s BLAD bylo prokázáno fluorescenčními histogramy (Nagahata *et al.*, 1994). Zhoršenou schopnost využití potravy, tendenci pomalejšího růstu, sníženou odpověď na léčbu pozorovali Jorgensen, Madsen (1997). BLAD bývá spojený s hypoalbuminémií, hyperglobulinémií a také častou hypoglykémií (Gourreau *et al.*,1998). BL/TL krávy (nositelky BLAD mutace) produkují na první laktaci více mléka a mléčného proteinu než jejich zdravé polosestry (Lubieniecki *et al.*, 1999).

Gerardi (1996) pozoroval při štěpení restrikčními endonukleázami u zdravých zvířat délky fragmentů 100, 200 a 300 bp u nemocných jedinců štěpí fragmenty o délce 200 a 400 bp. Viana *et al.* (1998) popsal délku fragmentů zdravých jedinců 191 a 152 bp, u heterozygotních přenašečů pozoroval délky fragmentů 343, 191 a 152 bp a u nemocných jedinců pozoroval pouze jeden fragment o délce 343 bp.

(Nagahata *et al.*, 1994). Adherentní aktivita a fagocytóza kvasinek byly také velmi omezené. To je důkazem toho, že schopnost neutrofilů fagocytovat je spojena s C3b receptorem. Markantně snížené množství CD18 na povrchu neutrofilů u telat s BLAD bylo prokázáno fluorescenčními histogramy (Nagahata *et al.*, 1994). Zhoršenou schopnost využití potravy, tendenci pomalejšího růstu, sníženou odpověď na léčbu pozorovali Jorgensen, Madsen (1997). BLAD bývá spojený s hypoalbuminémií, hyperglobulinémií a také častou hypoglykémií (Gourreau *et al.*,1998). BL/TL krávy (nositelky BLAD mutace) produkují na první laktaci více mléka a mléčného proteinu než jejich zdravé polosestry (Lubieniecki *et al.*, 1999).

Gerardi (1996) pozoroval při štěpení restrikčními endonukleázami u zdravých zvířat délky fragmentů 100, 200 a 300 bp u nemocných jedinců štěpí fragmenty o délce 200 a 400 bp. Viana *et al.* (1998) popsal délku fragmentů zdravých jedinců 191 a 152 bp, u heterozygotních přenašečů pozoroval délky fragmentů 343, 191 a 152 bp a u nemocných jedinců pozoroval pouze jeden fragment o délce 343 bp.

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo genotypizování vybraných recesivně dědičných poruch zdraví u panelu býků používaných k inseminaci v ČR.

4. MATERIÁL A METODY

Jako výchozí materiál pro izolace DNA byly použity vzorky krve a spermatu. Materiál byl dodán ve formě inseminačních dávek z inseminačních stanic a krve z SVÚ Brno. Analýzy probíhaly u býků, kteří vstupovali do testů v roce 2004, a to u plemen černostrakatého a českého strakatého skotu. Jako základní genetický přístup byla použita metoda analýzy PCR-RFLP.

4.1 Izolace DNA

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

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

Metoda dle Kawasaki (1990): 60 µl krve bylo vícekrát promyto 500 µl TE pufru (100 mM Tris-HCl; pH 8,5; 1 mM EDTA). Po každém promytí následovalo odstředění (1 min při 14 000 ot.), po kterém byl odpipetován supernatant. Po třetím až čtvrtém promytí (dle čistoty supernatantu) bylo k sedimentu přidáno 100 µl lyzačního pufru (50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8,3; 2,5 mM $MgCl_2$; 0,5% Tween 20) s *proteinázou K* (20 mg/ml) a směs byla inkubována při teplotě 56°C po dobu 12 hodin.

Metoda dle Ashwell *et al.* (1996): inseminační dávka byla suspendována v 1ml PBS pufru a 4x centrifugována (4°C; 6 min; 9 000 ot.). Potom bylo k sedimentu přidáno 200 µl PBS, 800 µl roztoku A (0,6g Tris; 2,9g NaCl; 0,4g NaOH, doplnit redestilovanou vodou do 0,5 l) a 16 µl β-mercaptoetanolu. Vše bylo důkladně promícháno pipetou a vloženo na 30 minut do lázně 50°C. Po přidání 30 µl *proteinázy K* (25 $mg.ml^{-1}$) byly vzorky přes noc inkubovány při 37 - 40°C. Druhý den byl nejprve každý vzorek rozdělen do dvou označených zkumavek (1,5 ml). Dále byla 2x provedena extrakce chloroformem (protřepat 6 min; centrifugovat 6 min; 15°C; 8 000 ot.) a každý vzorek byl pipetou přenesen do nové onačené zkumavky. DNA byla precipitována po přidání izopropylalkoholu, po silném protřepání a odstředění (10 min; 4°C; 10 000 ot.). Sraženina byla promyta 100 ml 70% alkoholu (nechat stát 5 min). Poté byl pipetou odstraněn alkohol, zkumavky byly ponechány 10 min otevřené na vzduchu. Pro laboratorní postupy byla DNA resuspendována ve 100 – 200 µl TE pufru (dle velikosti sraženiny). Z takto získaného zásobního roztoku bylo odebráno 5 – 10 µl a doplněno do konečného objemu 100 µl.

Vzorky DNA jsou pro potřeby dalších analýz skladovány v mrazících boxech při teplotě -20°C.

4.2 PCR/RFLP

Principem PCR je v tomto případě amplifikace části genomické DNA, která potencionálně obsahuje defektní mutaci. U choroby Bovinní citrullinemie se hledaná defektní mutace lokalizována v kodonu 86 (CGA→ TGA) na chromozomu. U poruchy BLAD je bodová mutace lokalizována na chromozomu 18 (A→G) na pozici 383. Onemocnění DUMPS je determinováno bodovou mutací (C→T) na kodonu 405 v exonu 5 na chromozomu 1.

Pro amplifikaci byly použity primery uvedené v Tab.1. Amplifikace probíhala v podmínkách *in vitro* v automatickém programovatelném termocykleru (Bioscience).

Složení reakční směsi a teplotní režim PCR byl optimalizován do podoby uvedené v tabulkách číslo 2 a 3.

MENDELOVA UNIVERZITA
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
Ústřední knihovna
Studentská 13
České Budějovice

Tab.1.: Použité primery

Dědičná choroba	Primer
DUMPS	5′ CAA ATG GCT GAA GAA CAT TCT G 3′
	5′ GCT TCT AAC TGA ACT CCT CGA GT 3′
BLAD	5′TCT AAC TGA ACT CCT CGA GT 3′
	5′ CCA CGC CCA TCA TTC TGG GGC AG 3′
Bovinní citrullinemie	5′ TTC CTG GGA CCC CAG GGA CCG TGT TCA TTG AGG ACA TC 3′
	5′ TTC CTG GGA CCC CGT GAG ACA CAT ACT TG 3′

Tab. 2.: Složení reakční směsi PCR (celkový objem reakční směsi 20 µl)

	DUMPS	Bovinní citrullinemie	BLAD
10x PCR pufr	2 µl	2 µl	2 µl
$MgCl_2$ (1,5 mM)	1,2 µl	1,2 µl	2,4 µl
dNTPs (40 µM)	2 µl	2 µl	2 µl
Primer 1 (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl
Primer 2 (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl
DNA	1,3 µl	1,3 µl	1,3 µl
Taq-polymeráza (1U)	2 µl	2 µl	2 µl
H_2O	9,5 µl	9,5 µl	8,3 µl

Tab.3.: Teplotní režim PCR

	DUMPS	BLAD	Bovinní citrullinemie
Hotstart	94 °C / 5 min.	94 °C / 3 min.	94 °C / 5 min.
Denaturace	94 °C / 1 min.	94 °C / 30 s	94 °C / 45 s
Annealing	60 °C / 1 min	61 °C / 30 s	55 °C / 45 s
Elongace	72 °C / 30 s	72 °C / 30 s	72 °C / 45 s
Konečná elongace	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 4 min
Počet cyklů	35	35	30

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*. Vzniklý PCR produktu byl kontrolně vizualizován na 1,5% agarózovém gelu s etidiumbromidem. Aby se zamezilo nežádoucímu spájení fragmentů, byl PCR produkt do genotypizace uchováván v mrazícím boxu při -20°C.

Po PCR byly amplifikáty genu nesoucí příslušnou mutaci analyzovány restrikčním štěpením za podmínek uvedených v tabulce 4.

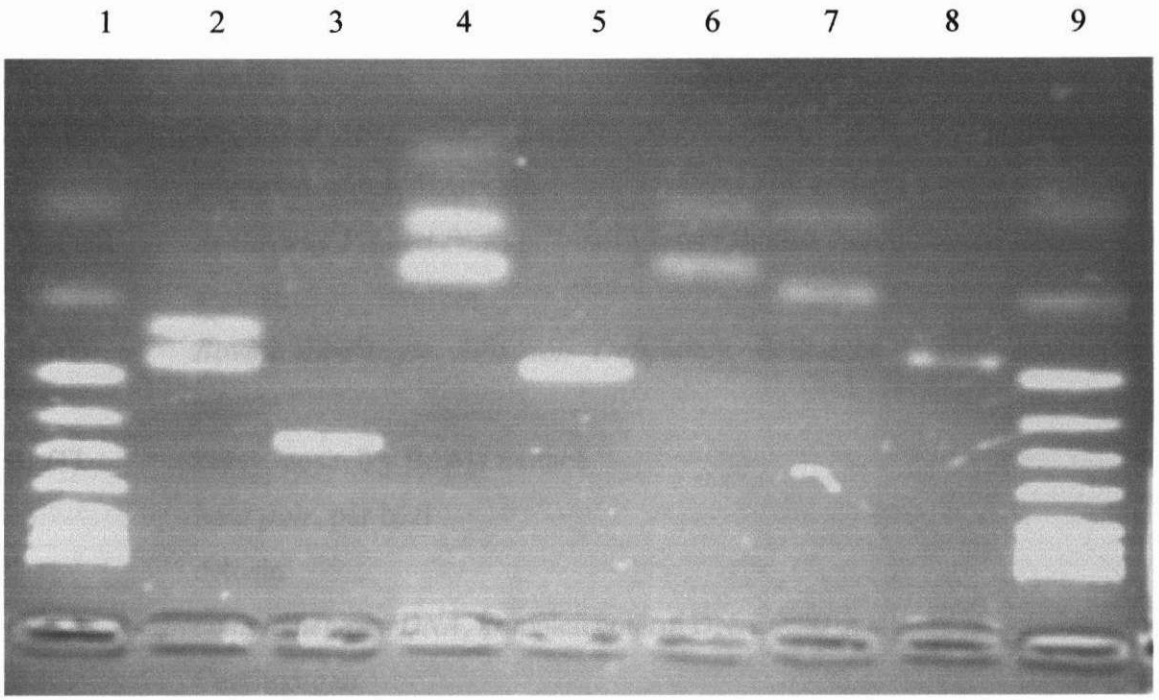
Tab.4.: Restrikční štěpení

	BLAD	DUMPS	Bovinní citrullinemie
Pufr	1,7 µl	1,7 µl	1,7 µl
Restrikční endonukleáza	Taq I - 1 µl (10U) nebo Hae III - 1 µl (10U)	Ava I - 1 µl (10U)	Ava II - 1 µl (10U)
PCR amplifikát	15 µl	15 µl	15 µl
Inkubace	65 °C / 37 °C (2 hod / 6 hod)	37 °C (6 hod)	37 °C (6 hod)

Fragmenty jsou vizualizovány pomocí elektroforézy na 3% agarózovém gelu s ethidium bromidem a vizualizovaný na UV transmitátoru.

Výsledek elektroforeogramu je znázorněm na odbázku 1. Po PCR s primery pro BLAD bylo provedeno štěpení restriktázou *Hae III*, fragmenty měly velikost 65 a 36 bp, při štěpení restrikční endonukleázou *Taq I* měly fragmenty velikost 52, 32 a 17 bp (na obrázku velmi špatně viditelný). Po PCR s primery pro DUMPS a štěpení restriktázou *AVA I* byly zjištěny fragmenty o velikosti 53, 36 a 19 bp a po amplifikaci s primery pro bovinní citrullinemii a štěpení restrikční endonukleázou *AVA II* měly výsledné fragmenty velikost 99 a 78 bp. Všechny zjištěné formace fragmentů představují zdravá zvířata a žádný z fragmentů nedeterminuje sledované poruchy. V tabulce 5. jsou shrnuty velikosti štěpených fragmentů pro studované poruchy podle různých autorů.

Obrázek1.: Vizualizace



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

Tab.5.: Zjištěné velikosti štěpených fragmentů pro studované choroby dle různých autorů

Onemocnění	Velikost fragmentů (bp)			Autor
	Geneticky zdravý jedinec	Přenašeč	Nemocný	
DUMPS	53, 36 a 19	89, 53, 36 a 19	89	Grzybowski *et al.* 1998
Bovinní citrullinemie	100	100 a 200	200	Padeeri *et al.* 1999
	99 a 78	177, 99 a 78	177	Viana *et al.*, 1998
BLAD	100, 200 a 300	100, 200, 300 a 400	200 a 400	Gepardi 1996
	191 a 152	343, 191 a 152	343	Viana et al., 1998
	32 a 26	58, 32 a 26	58	Kahrli 1998

4.3. SEZNAM ZKRATEK

A	adenin
AFLP	*Amplified Fragment Lenght Polymorfism*, délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů
AP-PCR	*Arbitrarily Primed PCR*, polymorfismus náhodně amplifikované DNA
ASS	argininsukcinátsyntáza
BLAD	*Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency*, deficience bovinní leukocytární adheze
BL/TL	krávy, nositelky BLAD mutace
bp	*base pair*, pár bází
C	cytosin
cDNA	*complementary DNA*, komplementární DNA
cM	Centimorgan
dNTP	*deoxyribonucleotide*, deoxyribonukleotid
ddNTP	*dideoxyribonucleotide*, dideoxyribonukleotid
DNA	*deoxyrbonucleoticacid*, deoxyribonukleová kyselina
DUMPS	*Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase*, deficience uridin - 5′ - monofosfát syntézy
EDTA	chelaton 3 (disodium ethylendiaminetetraacetate)
ELFO	Elektroforéza
MAS	*Marker Assisted Selection*, selekce s podporou markerů
PAGE	*Polyakrylamide Gel Electrophoresis*, polyakrylamidová elektroforéza
PCR	*Polymerase Chain Reaction*, polymerázová řetězová reakce
PCR/RFLP	délkový polymorfismus restrikčně štěpené amplifikované DNA
QTL	*Quantitative Trait Loci*, lokusy kvantitativních znaků
RFLP	*Restriction Fragment Lenght Polymorphism*, polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RNA	*ribonucleoticacid*, ribonukleová kyselina
SVÚ	Státní veterinární ústav
T	thymin
UMPS	uridin – 5 –monofosfát syntéza

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem práce bylo genotypizování vybraných recesivně dědičných poruch u panelu býků používaných k inseminaci v ČR.

Jako výchozí materiál pro izolace DNA byly použity vzorky krve a spermatu. Materiál byl dodán ve formě inseminačních dávek z inseminačních stanic a krve poskytnuté SVÚ Brno. Analýzy byly provedeny u býků, kteří vstupovali do testace v roce 2004, a to u plemen holštýnského a českého strakatého skotu. Jako základní genetický přístup byla zvolena metoda analýzy PCR/RFLP.

Genotypizace metodou PCR/RFLP byla prováděna na recesivně děděné choroby bovinní citrullinemie, DUMPS a BLAD. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

Tab.6.:Velikosti fragmentů pro studované choroby

Onemocnění	Velikost fragmentů (bp)		
	Geneticky zdravý jedinec	Přenašeč	Nemocný
DUMPS	53, 36, 19	89, 53, 36, 19	89, 19
Bovinní citrullinemie	99 a 78	177, 99, 78	177
BLAD	65 a 36	65, 46, 36, 19	46, 36, 19
	52, 32, 17	84, 52, 32, 17	84, 17

V rámci předkládané práce bylo genotypizováno 195 býků, z toho 113 býků holštýnského plemene a 82 býků českého strakatého plemene. U žádného ze vzorků nebyla nalezena alela podmiňující patologický stav.

Shwenger *et al.* (1994) studoval poruchu DUMPS, studii prováděl na celkovém souboru 102 jedinců, z toho 52 geneticky zdravých jedinců a 50 jedinců přenašečů a jejich matek, plemen holštýnského a red holštýnského skotu. Analýzou polosourozenců potvrdil hypotézu korelace fenotypového projevu onemocnění – snížení enzymatické aktivity UMPS a jeho genetické determinaci. Robinson *et al.* (1984) uvádí frekvenci kurantní defektní alely u sledované populace amerického holštýnského skotu 2% u krav a 7% u býků.

Grzybowski *et al.* (1998) publikoval možný model detekce recesivní alely, která podmiňuje poruchu DUMPS. Pro geneticky zdravé jedince detekoval fragmenty o velikosti velikost 53, 36 a 19 a pro heterozygotní přenašeče velikosti fragmentů 89, 53, 36 a 19, teoretická recesivně homozygotní sestava podmiňující poruch DUMPS by měla velikost fragmentu 89. U holštýnského skotu vlivem šlechtění na vysokou mléčnou užitkovost dochází k prodloužení inseminačního intervalu a servis periody (Hradecká *et al.*,2004). Protože tyto poruchy v cyklu mohou být způsobeny poruchou DUMPS v populaci, bylo by vhodné genotypizovat na poruchu DUMPS všechna špičková zvířata povinně.

Dennis *et al.* (1989) se zabýval výskytem recesivně děděné poruchy bovinní citrullinemie. Metodu PCR/RFLP označil jako nejjednodušší a nejekonomičtější postup pro genotypizaci této choroby. Identifikaci a eliminaci přenašečů onemocnění považuje za důležitou nejen z hlediska zdravotního stavu zvířat, ale i z hlediska ekonomického efektu. Padeeri *et al.* (1999) detekoval pro bovinní citrullinemii s použitím metody PCR/RFLP u homozygotně dominantních jedinců jeden proužek o velikost 100 bp, heterozygotní stav je determinován dvěma pruhy o velikosti 100 a 200 bp a u nemocných telat byl detekován jediný pruh o velikosti 200 bp (homozygotně recesivní založení). Viana *et al.* (1998) detekoval pro tuto poruchu fragmenty o velikosti 99 a 78 pro geneticky zdravé jedince, 177, 99 a 78 bp pro přenašeče a fragment o délce 177 bp podmiňoval onemocnění.

Genotypizace na BLAD je velmi důležitá. Je možno ji dnes dělat jak z krve a spermatu u býků, tak u matek budoucích býků a plemenic. Lze také využít genotypizaci embryí. Plemenní býci holštýnského plemene mohou být zařazováni na inseminační stanice pouze v případě, že mají negativní výsledky vyšetření na BLAD. Analýza těchto býků nám umožňuje utvořit si představu o genetickém zdraví populace mladých býků. V 90. letech byl zjištěn častý výskyt BLAD u populace skotu v ČR. Hradil (1994) testoval 377 plemenných býků holštýnského plemene, z toho jich bylo pozitivních 65, dále 61 plemenic, z toho 4 byly pozitivní, u plemene red holštýn bylo testováno 64 plemenných býků a 34 jich bylo pozitivních. Arrayet *et al.*,(2002) ve své studii uvádí frekvenci mutované alely pro BLAD 13% ze všech sledovaných zvířat. Pro krávy byla frekvence mutované alely 16,2% a u býků 9,9%. Dále se ve své studii zabýval fenotypovou expresí heterozygotní sestavy alel a uvádí, že jak heterozygotní samice vykazují statisticky průkazné rozdíly v šířce hlavy, u býků nebyly rozdíly statisticky průkazné. Shuster *et al.* (1992) pozoroval zastoupení kurantní alely ve sledované populaci 14,1% u býků a 5,8% u samic. Dále uváděl, že se ve Spojených státech amerických každý rok narodí přibližně 16.000 telat, která jsou přenašeči. Nagahata *et al.* (1997) nenašel ve své studii, která

zahrnovala 796 jedinců žádné zvíře s recesivně homozygotním genotypem, jedinců s heterozygotní sestavou bylo 8,1%. Gerardi (1996) pozoroval při štěpení restrikčními endonukleázami u zdravých zvířat délky fragmentů 100, 200 a 300 bp u nemocných jedinců štěpí fragmenty o délce 200 a 400 bp. Viana *et al.* (1998) popsal délku fragmentů zdravých jedinců 191 a 152 bp, u heterozygotních přenašečů pozoroval délky fragmentů 343, 191 a 152 bp a u nemocných jedinců pozoroval pouze jeden fragment o délce 343 bp. Kehrli (1998) identifikoval pomocí metody PCR/RFLP fragmenty o velikosti 32 a 26 bp pro jedince geneticky zdravé, 58, 32 a 26 bp pro heterozygotní přenašeče poruchy a pro nemocné jedince s recesivně homozygotní sestavou identifikoval fragment o velikost 58 bp. Vzhledem k tomu, že u poruchy BLAD probíhá dlouhodobě selekce v rámci kontroly dědičnosti zdraví, naznačuje současný zjištěný stav vynikající efektivitu přijatých opatření. Podobná opatření přijaly i ostatní země.

Ve šlechtění holštýnského skotu dochází v posledních letech k podstatným změnám. Stejně jako v zahraničí i u nás se postupně mění šlechtění od jednostranné orientace na znaky reprodukce a co nejvyšší výkon zvířat, směrem ke šlechtění na celkový genotyp zvířete, jehož výsledkem mají být zvířata nejen s vysokou produkcí, ale hlavně ekonomická, zdravá, s dobrou plodností a dlouhověkostí. Program u holštýnského skotu je orientován na vysokou mléčnou užitkovost, obsah proteinu v mléce a funkční exteriér. Dále se výzkumná pracoviště zaměřují na parametry telení. V současné době stále přetrvává ekonomický problém, kdy dojnice jsou schopny vydržet v průměru do páté až šesté laktace. V posledních letech jsou ve šlechtění skotu stále významnější tzv. funkční znaky a vlastnosti. Tyto samotné neposkytují žádnou produkci, ale ovlivňují její kvalitativní a kvantitativní ukazetele a jako takové mohou mít významný dopad na vlastní efektivitu chovu.

Inseminační stanice využívají nejlepší zdroje ze zahraničních i domácích populací. Ročně vstupuje do testace několik desítek mladých býků všech významných plemen. Pro ověření genetického zdraví jsou býci testováni významnými evropskými i tuzemskými firmami i v rámci zahraničních populací skotu. Dosahované výsledky plně potvrzují, že je v tomto trendu třeba i nadále pokračovat. Cíle programů inseminačních stanic jsou zaměřeny na efektivní zvyšování konkurenceschopnosti chovatele a jeho rentabilitu. Jako otci jsou převážně vybíráni nejlepší býci testovaní v ČR (60 – 70%) a býci ze zahraničí (30 – 40%). Podstatným zdrojem býků do programu, je intenzivní využívání samičího materiálu z nukleových stád.

Embryotransfer - tato progresivní biotechnologická metoda řízení reprodukce, která se neustále rozvíjí, umožňuje chovatelům i šlechtitelům intenzivněji a efektivněji realizovat plemenářský a šlechtitelský program. Využívání embryotransferu v chovu má za následek reálný genetický zisk a tím i nesporný ekonomický efekt. U této metody lze provádět včasnou genotypizaci na dědičné poruchy zdraví. Genotypizace plemenných býků stejně tak jako dárkyní embryí zvyšuje prestiž našeho chovatelství v zahraničí. Zdravé a bezzávadné inseminační dávky by pomohly zvýšit uplatnění českých dodavatelů na evropském i mimoevropském trhu.

I když v předkládané práci nebyl nalezen heterozygotní přenašeč recesivní alely, je velmi důležité v genotypizaci BLAD pokračovat a to je možno i u embryí při embryotransferu, aby se neopakovala situace, která byla v našich chovech v 90. letech. Přijatá opatření by se však neměla týkat pouze býků, ale i vynikajících plemenic jako možných dárkyní embryí a budoucích potencionálních matek býků. Musíme stále počítat s tím, že je možný výskyt heterozygotních krav – přenašeček v našich chovech.

6. ZÁVĚR

V předkládané práci byly genotypizováni býci holštýnského a českého strakatého skotu, kteří vstupovali do testace v roce 2004. Jako výchozí materiál pro izolace DNA byly použity vzorky krve a spermatu. Jako základní genetický přístup byla zvolena metoda analýzy PCR/RFLP.

Výsledky lze shrnout takto:

- V rámci předkládané práce bylo genotypizováno 195 býků, z toho 113 býků holštýnského plemene a 82 býků českého strakatého plemene.
- U žádného ze vzorků nebyla nalezena alela podmiňující patologický stav pro BLAD, DUMPS a bovinní citrullinemii.
- Štěpení restriktázou *Hae III* pro BLAD poskytlo fragmenty o velikost 65 a 36 bp, při štěpení restrikční endonukleázou *Taq I* rovněž pro BLAD měly fragmenty velikost 52, 32 a 17 bp, štěpení restriktázou *AVA I* byly zjištěny fragmenty o velikosti 53, 36 a 19 bp pro DUMPS a pro bovinní citrullinemii poskytla restrikční endonukleáza *AVA II* výsledné fragmenty velikost 99 a 78 bp.
- V genotypizaci BLAD je vhodné dále pokračovat. Vzhledem k vzniklé situaci v 90. letech mohou stále být v chovech heterozygotní krávy – přenašečky.

7. SEZNAM LITERATURY

Alberts, B., Bray, 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.

Arrayet, J.L., Oberbauer, A.M., Famula T.R., Garnát, I., Olejen, J.W., Imhoof, J., Kehrli, M.E.Jr., Graham, T.W. (2002): Growth of Holstein calves from birth to 90 days: The influence of dietary zinc and BLAD status. J Anim Sci. 80: 545-552.

Ashwell, M.S, Rexroad, C.E.Jr., Miller, R.H. Van Raden, P.M. (1996): Mapping economictrait loci fe somatic cell score inholstein cattle using microsatelite markers and selective genotyping. Animal genetics. 27:235-243.

Barendse, W., Armitage, S.M., Ryan, A.M., Moore, S.S., Clayton, D., Georges, M., Womack, J.E., Hetzel, J. (1993): A genetic map of DNA loci on bovine chromosome 1. Genomics 18: 602 - 608.

Caetano – Anollés, G. and Gresshoff, P.M. (1997): DNA markers. Protocols, Applications, and Overviews. – Wiley – Liss, Inc., New York.

Denis, J.A., Healy, P.J., Beaudet, A.L., Obrien, W.E. (1989): Molecular Definition of Bovine Argininosuccinate Synhetase Deficiency. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 7947 – 7951.

Denis, J.A., Healy, P.J., Beaudet, A.L., O´Brien, W.E.: Molecular definition of bovine argininosuccinate synthetase deficiency. Proc. Nat. Acad. Sci. 86: 7947 – 7951, 1989.

Dvořák, J. (2000): Principy a možnosti využívání genetických markerů ve šlechtění skotu. Stav. Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce skotu. In: Sb. 8. mezinárodní konference, 8 - 9.2.2000, 29 - 31.

Fries, R., Ruddle, F.H. (1986): Gene mapping in domestic animals. In: 10th Beltsville Symposium in Agricultural Research: Biotechnologi for Solving Agricultural Problems, St. John. 10: 19- 37.

Fries, R., Rusinsky, A. (1999): The genetics of Cattle. CAB International Walingford. 710 pp.

Gardin (2000): Electrophoretic Methods. Academic Press, Inc.

Gemmem, N.J., Akiyama, S. (1996): An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. Trends in Genetics, 12:338 -339.

Gerardi, A.S. (1996): Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency: A brief overiew of a modern disease and its implications. Folia Veterinaria, 40 (3 – 4), 65 – 69.

Gourreau, J.M., Vander Masen, L., Braque, R. (1998): Le défaut d´adhérence des leukocytes chez les bovins (BLAD). Le Point Vet., 29 (191), 67 -74.

Grupe, S., Dietl, G., Schwerin, M. (1996): Population survey of citrullinemia on German Holstein. Livest. Prod. Sci., 45 (1), 35 – 38.

Grzybowski, G., Grzybowski, T., Wozniak, M., Chacinska – Buczek, I., Smuda, E., Lubieniecki, K.(1998): Badania przesiewowe na obecność genu wczesnej obumieralności zarodków DUMPS u bydla w Polse. Med. Wet., 54 (3), 189 -193.

Harper, P.A.W., Healy, P.J., Denis, J.A., O´Brien, J.J., Rayward, D.H. (1986): Citrullinemia as a cause of neurological disease in neonatal Friesian calves. Australian Veterinary Journal 63: 373 – 379.

Harper, P.A.W., Healy, P.J., Denis, J.A. (1989): Animal Model of Human Disease – Citrullinemia (Arginosuccinate Synthetase Deficiency). American Journal of Pathology 135: 1213 – 1215.

Hartnell, A., Moqbel, R., Walsh, G.M., Bradley, B., Kay, A.B. (1990): Fcγ and CD11/CD18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils. Imunology 69, 264 – 270.

Healy, P.J., Harper, P.A.W., Denis, J.A. (1990): Bovine Citrullinaemia – A Clinical, Pathological, Biochemical and Genetic Study. Australian Veterinary Journal 67: 255 – 258.

Hoefer (1994): Protein electrophoresis, Aplocation guide. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco.

Hradecká, E., Řehout, V., Čítek, J. (2004): Biometrické hodnocení faktorů ovlivňujících délku inseminačního intervalu a servis periody. Collection of Scientific Papers, Fakulty of Agriculture in České Budějovice : Series for Snímal Science. 21 (1), 8. 61 – 68.

Hradil, R. (1994): Application of molekula genetic methods to the BLAD and PSS trstiny in bovine and pigs in Czech Republic. In: XXIV International Konference on Animal Geneties, Prague, 83 – 84.

Hruban, V., Majzlík, I.(2000): Obecná genetika. ČZU Praha, 1. vydání: 316.

Jones, L.R., Harden, K.K., Bragg, D.S.A., Robinson, J.L. (1986): Influence of age, sex, lactational state, and exogenous growth hormone on erytrocyte UMP synthese in dairy cattle. Komparative Biochemical and Physiology B 84 : 489 – 495.

Jones, C., Miller, Y.E., Palmer, D., Morse, H., Kirby, M., Patterson, D. (1984): Regional mapping of human chromosome 3. (Abstract) Cytogenet. Cell.genet. 37: 500.

Jorgensen, C.B., Agerholm, J.S., Pedersen, J., Thomsen, P.D. (1993): Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency in Danish Holstein – Friesan Cattle. I. PCR Screening and Allene Frequency Estimation. Acta Vet. Scand., 34 (3), 231 – 236.

Kawasaki, E.S. (1990): Sample preparation from blood, cells and another fluids. PCR protocols: a Gude to Methods and Applications. New York. Academic Pess: 146-152.

Kehrli, M.E. (1998): Identification and prevalence of a genetic defekt that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. Proc. Natl Acad Sci USA.1998, 89 (19): 9225 – 9229.

Knoll, A. a Vykoukalová Z. (2002): Molekulární genetika zvířat: (metody detekce polymorfizmů DNA genů), 1.vydání, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, s168.

Kun, M.T., Shanks, R.D. (1994): Association of Deficiency of Uridine Monophosphate Synthese with Production and Reproduction. J. Dairy Sci., 77, 589 – 597.

Kobayashi, K., Ichiki, H., Saheki, T., Tatsuno, M., Uchiyama, C., Nukada, O., Yoda, T. (1987): Structure of an abnormal messenger RNA for argininsuccinate synthetase in citrullinemia. Hum. Genet. 76: 27 – 32.

Lewis, A.J. (1976): In Mechanism of neurological Disease, Little, Brown and Co, Boston, p 212.

Lin, D.Y., Huang, Y.C., Chen, J.C., Yang T.W., Shiao, T.F., Chang, H.L. (2001): Investgation of citrullinemia of dairy cattle in Taiwan. J. Taiwan Livest. Res., 34 (4), 279 – 284.

Lubieniecki, K., Grzybowski, G., Lukaszewicz, M., Lubieniecki, J. (1999): Association between the presence of Allene BL in the geonome of dairy cows and their productivity. Snímal Science Papers and Reports, 17 (4): 189 – 194.

Nagahata, H., Hatakeyama, K., Noda, H., Nochi, H., Tamoto, K. (1994): Two cases of Holstein calves with bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) (Case report). Dtsch. Tierärztl. Wschr., 101 (2), 53 – 56.

Nagahata, H., Miura, T., Tahali, K., Othake, M., Noda, H., Yasuda, T., Nioka, K. (1997): Prevalence and Allene Frequency Estimation of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) in Holstein – Friesian Cattle in Japan. J. Vet. Med. Sci., 59 (4), 233 – 238.

Natonek, M. (2000): Identyfikacja mutaci BLAD u bydla metoda PCR – RFLP. Biul. Inform., 38 (4), 29 – 33.

Odhrli, M.E., Shuster, D.E., Ackermann, M.R. (1992): Editorial. Leukocyte Adhesion Deficiency Among Holstein Cattle. Cornell. Vet., 82 (2), 103 – 109.

Padeeri, M., Vijaykumar, K., Grupe, S., Narayan, M.P., Schwerin, M., Kumar, M.H. (1999): Incidence of hereditary Citrullinemia and bovine leukocyte adhesion deficiency syndrome in Indian dairy cattle (Bos taurus, Bos indicus) and bufalo (Bubalus bubalis) population. Archiv fur Tierzucht – Archives of Animal Breeding 42: 347 – 352.

Pareek, C.S., Kaminski, S. (1996): Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and its worldwide prevalence. J. Appl. Genet., 37 (3), 299 – 311.

Poli, M.A., Deset, 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 Monohoshate Synthese (DUMPS) in Argentine Holstein Cattle. J. Vet. Med. A., 43, 163 – 168.

Ringo, J.(2004): Fundamental Genetics. 1.vydání. Cambridge press.

Robinson, J.L., Dombrowski, D.B., Clark, J.H., Shanks, R.D. (1984): Oratate in milk and urine of dairy cos with a partial deficienty of uridine monophosphate synthese. Journal of Dairy Science 67: 1024 – 1029.

Robinson, J.L., Shanks R.D. (1990): Review. The inherited deficienty of uridine monophosphate synthese in dairy cattle. J. CAAS, 1, 1-4.

Rosypal, S., Rosypalová, A., Vondrejs, V.(1989): Molekulární genetika. 2.vydání. Státní pedagogické nakladatelství, n.p. Praha.

Saiki, R.K., Scharf, S.J., Falkoona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erich, H.A., Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. Science, 230, 1350-1354.

Sambrook, J., Fritéz, E.F., Maniatis, T.(1989): Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harb. Lab. Press, USA.

Shanks, R.D., Robinson, J.L. (1989): Embryonic Mortality Attributed to Inherited Deficienty of Uridine Monophosphate Synthese. J. Dairy Sci., 72, 3035 – 3039.

Shanks, R.D., Bragg, D. ST. A., Barton, E.P. (1989): Uridine Monophosphate synthese of Persey Bulls. J. Dairy Sci., 72, 722 – 725.

Shanks, R.D., Robinson J. L. (1990): Editorial. Deficienty of Uridine Monophosphate Synthese Aminy Holstein Cattle. Cornell. Vet., 80 (2), 119 – 122.

Shanks, R.D. (1990): Reproductive consequences of deficiency of uridine monophosphate synthese in Holstein cattle. Am. J. Vet. Res., 51 (5), 800 – 802.

Shanks, R.D., Greiner, M.M. (1992): Relationship Between Genetic Merit of Holstein Bulls and Deficienty of Uridine – 5´- Monophosphate Synthese. J. Dairy Sci., 75 (7), 2023 -2029.

Shuster, E., Brad T. Bosworth, Kehrli, M.E.Jr. (1992): U.S. Department of Agricultural Research Service, National Snímal Disease Center, Metabolit Diseases and Imunology Research Unit, Ames, IA 50010-0070 (USA).

Schwenger B., Schröber S., Simon, D. (1993): DUMPS Cattle Carry a Point Mutation in the Uridine Monophosphate Synthese Gene. Genomics, 16, 241 – 244.

Schwenger B., Tamen, I., Aurách, C. (1994): Detection of the homogenous recessive genotype for deficienty of uridine monophosphate synthese by DNA Tyliny aminy bovine embryo produced in vitro. J. Repris. Fert., 100, 511-514.

Smith, H.O., Wilcox, K.W. (1970): A estriction enzyme from Heamophilus influenzae. Purification and general propeties. Journal of Moleclar Biotechnologi, 51: 379-391.

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

Walser, M. (1983):In The metabolit Basis of Inherited Disease, edited by J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, D.S. Frederickson, J.L. Goldstein and M.S. Brown, 5th edition, McGraw – Hill, New York, p 419.

[illegible] UNIVERZITA
[illegible]LÉKAŘSKÁ FAKULTA
[illegible]