

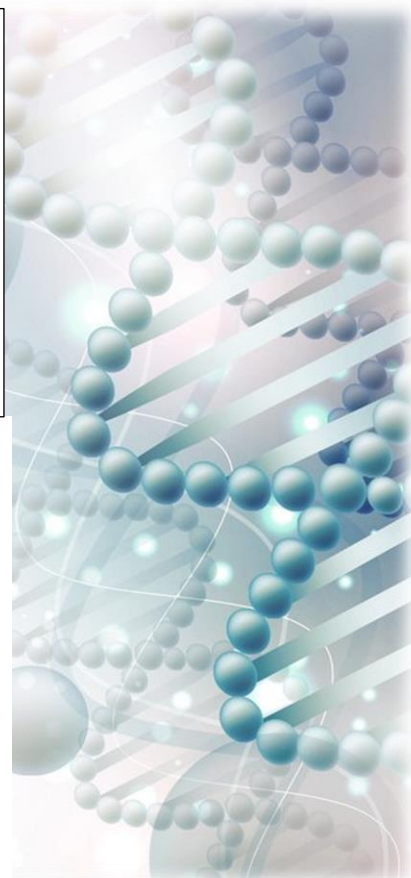


ČMSCH
a.s.

ČESKOMORAVSKÁ
SPOLEČNOST
CHOVATELŮ

OPTIMALIZACE AUTOMATIZOVANÝCH POSTUPŮ IZOLACE DNA Z ALTERNATIVNÍCH ZDROJŮ

Daniela Schröffelová a kolektiv



2021

CERTIFIKOVANÁ METODIKA



Ministerstvo zemědělství
Těšnov 65/17
110 00 Praha 1

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

č. MZE-59116/2021-18141

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády č. 107 ze dne 8. 2. 2017 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády č. 837 ze dne 29. 11. 2017.

Název metodiky: **Optimalizace automatizovaných postupů izolace DNA z alternativních zdrojů**

Autoři: **Daniela Schröffelová, Vladimír Šteiger, Jarmila Hromádková, Josef Kučera, David Lipovský, Marie Křížová, Michaela Přibáňová**

Název organizace: **Českomoravská společnost chovatelů, a.s.**

Místo vydání: **Hradištko pod Medníkem**

Rok vydání: **2021**

ISBN **978-80-87633-05-2**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu NAZV č. **QK1810253**

Využívá projekt „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví, rybolov“? **ANO**

V případě, že projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolov“, je výsledek typu Nmet zdarma k dispozici všem zájemcům na webové stránce: www.cmsch.cz

V Praze dne 10. 11. 2021

.....
Razítko a podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy Ing. Miroslava Czetmayer Ehrlichová
Funkce zástupce odborného útvaru státní správy: ředitelka Odboru zemědělských komodit

Souhlas ředitele Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V Praze dne 16. 11. 2021

.....
Mgr. Jan Radoš

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

OPTIMALIZACE AUTOMATIZOVANÝCH POSTUPŮ IZOLACE DNA Z ALTERNATIVNÍCH ZDROJŮ

Autoři:

Daniela Schröffelová
Vladimír Šteiger
Jarmila Hromádková
Josef Kučera
David Lipovský
Marie Křížová
Michaela Přibáňová

Oponenti:

Ing. Juraj Saksún
Odbor zemědělských komodit, Oddělení hospodářských zvířat, MZe ČR, Praha
Prof. Ing. Peter Strapák, PhD.
Ústav chovu zvierat, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Certifikovaná metodika je výstupem z řešení projektu NAZV

Projekt: QK1810253

*„Navýšení spolehlivosti celostátního genomického hodnocení dojeného skotu
zařazením krav s domácí užitkovostí do genotypované referenční populace“*

2021

ISBN 978-80-87633-05-2

Copyright © 2021 ČMSCH, a.s.

Obsah:

I.	CÍL METODIKY.....	1
II.	VLASTNÍ POPIS METODIKY	1
II. 1.	Úvod	1
II. 2.	Přehled možných zdrojů DNA.....	1
II. 3.	Volba metody izolace DNA	2
II. 3. 1.	Princip volby metody.....	2
II. 3. 2.	Zvolená metoda izolace DNA.....	2
II. 4.	Postup izolace DNA.....	2
II. 5.	Systém hodnocení kvality DNA extraktů	6
II. 6.	Zhodnocení výsledků automatizovaných postupů izolace gDNA chlupových cibulek a TSU na robotických linkách.....	6
III.	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	7
IV.	POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	8
V.	EKONOMICKÉ ASPEKTY	8
VI.	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	9
VII.	SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE.....	11

I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je modifikovat manuální metody izolace genomické DNA (gDNA) používané ke stanovení SNP genotypů skotu microarray's technologií (BovineChips Illumina) pro izolační robotické linky.

gDNA bude izolována ze dvou – v předcházející fázi projektu vytipovaných a prověřených – biologických zdrojů, které jsou aktuálně plošně odebírány za účelem SNP genotypizace v chovech skotu. Jsou to chlupové cibulky a TSU (Tissue Sample Unit a/nebo odběrové ušní známky).

Metodika zahrnuje postup pro primární kontrolu kvality izolované gDNA po izolaci v robotických linkách, s ohledem na potřebu vyřazení nekvalitních extraktů gDNA z analytických procesů ještě před aplikací na microarray's. Součástí definovaného postupu je stanovení limitní hodnoty koncentrace a čistoty výtěžku roboticky izolované gDNA v závislosti na nárocích následného analytického procesu.

Modifikací a optimalizací izolačních metod pro robotické linky, budou tato zařízení integrována do velkopružného tzv. „industry modelu“ provozu rutinní servisní laboratoře. Vysoká míra automatizace metod izolace gDNA v robotických linkách účelně zrychlí celkový analytický proces, navýší průchodnost vzorků laboratoří a současně umožní eliminaci rizika náhodných chyb vznikajících v důsledku selhání lidského faktoru při manuálních metodách izolace genomické DNA.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

II. 1. Úvod

Plné využití potenciálu SNP technologií je podmíněno prováděním cílené, výkonné a plošné SNP genotypizace početných stád skotu, tj. předpokládá rutinní, efektivní laboratorní analýzy velkého počtu vzorků gDNA v krátkém čase.

SNP microarray's technologii (BovineChips Illumina) lze charakterizovat jako analytickou metodu uzpůsobenou pro „industry model“ provozu laboratoře. Její efektivní provozování je možné pouze v případě, že je laboratoř schopna v preanalytické fázi procesu izolovat z velkého počtu odebraných biologických zdrojů dostatečné množství kvalitních gDNA extraktů, v sériích po 96 vzorcích. Takto vysoké počty extraktů není možné získat v manuálních izolačních protokolech, proto je nutné integrovat do procesu izolace robotické linky a modifikovat izolační metody za současného zachování kvality a výtěžku izolované gDNA.

Proveditelnost a následně i získaná výpovědní hodnota výsledků SNP genotypizace (tzv. „call rate“) je na kvalitě extraktu gDNA primárně závislá.

II. 2. Přehled možných zdrojů DNA

DNA lze teoreticky izolovat z jakéhokoliv vzorku odebraného z těla hospodářského zvířete, který obsahuje plnohodnotné buňky s buněčným jádrem v limitní kvantitě a zachované kvalitě (Sebastianelli *et al.*, 2008).

Laboratoř disponuje širokou škálou izolačních metod, kterými je schopna získat gDNA prakticky z jakéhokoliv zdroje. Výběr vhodného zdroje gDNA při plošné genotypizaci skotu má však svá specifika a omezení. Vychází z kompromisu chovatelských možností při odběru a vzorkování a metodických nároků v laboratorním analytickém procesu (Schröffelová *et al.*, 2018, 2020).

K molekulárně biologické analýze lze rutinními postupy získat DNA i z „alternativních“, biologických zdrojů: chlupové cibulky, vzorky z biopsií tkání (např. TSU), stěry sliznic, sperma, popřípadě i některé biologicky nedegradované části kadáverů (Gielda and Rigg, 2017).

Jako nejvhodnější zdroje gDNA u skotu z hlediska chovatelských a laboratorních nároků byly již dříve doporučeny odběry chlupových cibulek, TSU (Tissue Sample Unit), případně nasálních stěrů (Schröffelová *et al.*, 2018, 2020). Od plošného odběru zdroje gDNA nasálním stěrem bylo upuštěno v důsledku záchytu četných nekvalitně provedených odběrů a především kvůli výskytu chimerismu. Tento jev byl popsán v souvislosti s vícečetnou graviditou u skotu v souvislosti s ověřováním původu (Owen, 1945; Verdonck *et al.*, 1996; Ron *et al.*, 1995).

II. 3. Volba metody izolace DNA

II. 3. 1. Princip volby metody

V současnosti máme k dispozici řadu tradičních i moderních metod izolace DNA, které se v závislosti na výchozím biologickém zdroji liší. Základní kroky izolace DNA u jednotlivých metod jsou ale v principu stejné. Je vždy nutné připravit biologický materiál a uvolnit z něj nukleové kyseliny, dále oddělit nukleové kyseliny z „nadmolekulárních“ struktur, purifikovat DNA a nakonec ji eluovat (Vondrejs a Storchová, 1997).

Vhodnou metodu izolace DNA volíme na základě několika různých faktorů, ke kterým patří vlastnosti výchozího biologického vzorku-zdroje DNA, předpokládaný výtěžek a kvalita DNA nárokováná následnou analytickou metodou, robustnost a opakovatelnost metody izolace a v neposlední řadě i časová a finanční náročnost metody izolace (Raška, 2006, Beránek, 2006).

V našem případě je rovněž důležitým kritériem volby možnost modifikovat izolační metodu pro automatizaci v robotických linkách.

II. 3. 2. Zvolená metoda izolace DNA

V předchozí fázi projektu byla v manuálních protokolech prověřena ideální volba metody izolace gDNA v závislosti na specifitě zdrojů – chlupové cibulky a TSU. Z nabízeného spektra metod extrakce DNA z hrubých lyzátů se pro použití v rutinní laboratoři s velkou průchodností vzorků jeví postupy založené na vazbě DNA na pevnou fázi magnetických částic (Schröffelová *et al.*, 2018).

Princip metody se odvíjí od fyzikálně-chemických vlastností částic, které jsou schopny navázat bioreaktivní molekuly díky reakci na vnější magnetické pole. Magnetické částice se přidávají ke hrubému lyzátu vzorku a dojde k navázání cílených molekul DNA. Následně dojde pomocí magnetu k přitáhnutí takto modifikovaných částic ke stěně zkumavky (destičky, hřebene) zbylý roztok s nenavázanými látkami je odstraněn. Po promytí dojde k uvolnění částic s navázanými molekulami DNA do přidaného roztoku a následně proběhne oddělení navázaných molekul od magnetických částic. Takto byly získány samostatné cílené molekuly DNA, vhodné pro použití k dalším analýzám. (Hůska *et al.*, 2008)

Magnetická separace DNA je vysoce vhodná k automatizaci a robotizaci a používá se především pro zpracování velkých počtů vzorků v laboratořích s velkou průchodností.

II. 4. Postup izolace DNA

Ze vzorků chlupů odebraných do unifikovaných odběrových sad /odběrové sady byly vyvinuty a odzkoušeny v předchozí fázi projektu (Schröffelová *et al.*, 2018)/, se mechanicky – ustřížením nůžkami – odebere přiměřené množství chlupových cibulek, v počtu cca 20-25, v závislosti na kvalitě chlupů (Obrázek č. 1).



Obrázek č. 1 Stříhání a proteolýza chlupových cibulek

Proteolýza biologických vzorků proběhla ve zkumavkách, za reakčních podmínek uvedených v Tabulce č. 1.

Biologický vzorek	Proteinase QPK (μl)	Pufr (μl)	Teplota / Doba trvání proteolýzy	Poznámka
CHLUPOVÉ CIBULKY - 25-30 chlupových cibulek	20	200 TL	56° C 60 + 30min	mezi 60/30 mechanické protřepání-vortex
TSU - raw liquid TSU - 100 μl	20	200 TL	56° C 60 + 30min	mezi 60/30 mechanické protřepání-vortex

Tabulka č. 1 Podmínky proteolýzy chlupových cibulek a konzervační tekutiny odebrané z TSU (Tissue Sample Unit)

Aluminiová víčka **vzorkovnic s ušními štěpy - TSU** - byla před izolací DNA perforována speciálním bodcem tak, aby se bioptická ušní tkáň dostala do rezervoáru a byla smáčena v konzervační tekutině (raw liquid TSU). Rezervoár s obsahem byl poté manuálně oddělen z TSU. Z rezervoáru byl odebrán alikvot (100 μ l) konzervační tekutiny (**Obrázek č. 2**).



Obrázek č. 2 TSU a oddělený rezervoár s konzervační tekutinou

Další proces izolace DNA poté probíhal pro oba zdroje, tj. pro chlupové cibulky i raw liquid TSU společně v jednom robotickém protokolu.

Po proteolýze biologických vzorků ve zkumavkách a centrifugaci (9000 g/5 min) byl hrubý lyzát roboticky ze zkumavek přenesen do izolačních destiček.

Proces přenosu hrubých lyzátů do destičkového formátu tzv „PLATE creating“ probíhá roboticky, v zařízení TECAN EVO Freedom (**Obrázek č. 3**).



Obrázek č. 3 „PLATE creating“ v robotickém zařízení TECAN EVO Freedom

V destičkovém (= PLATE) formátu prochází 96 vzorků DNA celým izolačním procesem jako nedílný celek, čímž se eliminuje možnost záměny vzorků a unifikují se izolační podmínky pro sérii všech 96 současně izolovaných DNA zdrojů. Izolovaná gDNA uchovávaná ve formátu 96 jamkových destiček má malé prostorové nároky při archivaci v mrazících zařízeních.

Takto automatizovaný a racionalizovaný proces izolace zjednodušuje evidenci, minimalizuje mezikrokové záznamy a umožňuje navýšit průchodnost vzorků laboratoří.

Vlastní extrakce DNA z hrubých lyzátů přenesených do 96 jamkových destiček probíhají ve dvou alternativních izolačních automatech NIMBUS96 a NEXOR96. Obě robotická zařízení pracují na principu magnetické separace DNA, liší se pouze způsobem fixace magnetických kuliček s imobilizovanou DNA na povrchu k externímu magnetu.

Každý z izolátorů využívá k extrakci DNA sofistikované kity reagentů, které jsou ideálně kompatibilní s konkrétním robotickým zařízením.

A) Robotický izolátor HAMILTON Firefly NIMBUS96



Obrázek č. 4 HAMILTON Firefly NIMBUS96



Obrázek č. 5 Magnetický stojánek zařízení NIMBUS96, detail magnetických partikulí v destičce

V izolátoru NIMBUS96 (Obrázek č. 4) reagují magnetické kuličky s navázanými cílovými molekulami DNA na vnější magnetické pole, které tvoří magnet v magnetickém stojánku (Obrázek č. 5). Magnetické kuličky s imobilizovanou DNA jsou magnetickým stojánkem přitahovány ke dnu 96 jamkové destičky a volný roztok s nenavázanými koextráty (proteiny, organické a mechanické nečistoty) je z jamek odstraněn robotickým pipetováním. Poté jsou magnetické kuličky opakovaně promyty vhodnými promývacími pufrů (SPM Wash Buffer, VHB Buffer). Nakonec jsou kuličky s navázanými molekulami DNA převedeny do elučního pufru (Elution Buffer), který zruší vazbu DNA k magnetickým kuličkám.

V posledním kroku se magnetické kuličky v eluátu (již bez navázané DNA) přitáhnou magnetem ke dnu 96 jamkové destičky a eluát DNA se přenese – odpipetuje – do eluční destičky.

V podmínkách provozu rutinní laboratoře se k magnetické extrakci DNA v izolátoru NIMBUS96 používá komerčně dostupný, výrobcem zařízení doporučený, sofistikovaný izolační kit reagensií: *OMEGA Mag-Bind Blood&Tissue DNA HDQ Kit 96* (Omega Bio-Tec. Inc. M6399) a kompatibilní plastové pipetovací špičky HAMILTON.

B) Automatický extraktor DNA NEXOR96



Obrázek č. 6 Izolátor NEXOR96, detail magnetických prstů s rezidui magnetických partikulí

Extraktor NEXOR96 využívá metodu fixace magnetických kuliček s imobilizovanou DNA na magnetické hroty chráněné jednorázovými hřebeny (**Obrázek č. 6**). Hroty s hřebeny, na kterých je magneticky fixovaná DNA, se vnořují do 96 jamkových destiček s jednotlivými promývacími pufry, které se pohybují v karuselu pod magnetickým separátorem. V posledním kroku se hřebeny s imobilizovanou (opakovaně promytou a pročištěnou DNA) vnoří do destičky s elučním pufrem, který zruší vazbu DNA na povrch magnetických partikulí. Partikule (již bez navázané DNA) zůstávají fixovány na magnetických hrotech a jsou z eluátu DNA odstraněny.

V extraktoru neprobíhá žádné pipetování, zařízení nenárokuje žádné pipetovací špičky ani verifikace přesnosti pipetování. V období pandemie covid19 se vzhledem k trvalému nedostatku pipetovacích špiček na světových trzích jeví tento benefit izolátoru NEXOR96 jako velmi významný z hlediska zabezpečení provozu rutinní laboratoře.

K magnetické extrakci DNA na izolátoru NEXOR96 se používá kompatibilní kit reagensií *qMag-DNA03*, výrobce *Yantai Addcare Bio-Tech Limited Company-ChromoX., China*. Součástí kitu jsou všechny potřebné reagenzie připravené přímo k použití přímo v 96 jamkových destičkách, rovněž i jednorázové hřebeny. Celý postup izolace DNA je podrobně popsán ve *Standardních operačních postupech SOP ZL1312, IX. revidované a doplněné vydání, kapitola I. B8): Izolace DNA na magnetických kuličkách* (Schröffelová et al., 2018) a v instrukčním manuálu *OMEGA Mag-Bind Blood&Tissue DNA HDQ Kit 96* (Omega Bio-Tec. Inc. M6399 December 2015).

Výsledkem izolace je 96 DNA extraktů v „plate formátu“ - 96 jamková destička. V tomto formátu prochází funkční vzorky do analytické fáze SNP genotypizace.

II. 5. Systém hodnocení kvality DNA extraktů

Základním kritériem hodnocení kvality izolované DNA před uvolněním z preanalytické fáze do analytické fáze SNP genotypizace (= microarray's - Bovine chips analýze) je měření koncentrace a čistoty DNA extraktu.

V rutinním provozu je koncentrace a čistota DNA extraktu měřena na kapilárním spektrofotometru NanoDrop2000. Roztok nukleových kyselin se spektrofotometricky vyhodnocuje při vlnové délce 260 nm a 280 nm a 230 nm. Absorbance při 260 nm odráží koncentraci nukleové kyseliny, absorbance při 280 nm odráží její čistotu, tj. míru přítomnosti proteinů a jiných koextrátů. Vzájemné poměry absorbancí při 260 nm, 280 nm a někdy i 230 nm se využívají ke stanovení poměru čistoty (purity ratios R).

Hodnota poměru čistoty je citlivá na přítomnost kontaminantů ve vzorku, jako jsou zbytková rozpouštědla a činidla užívaná k purifikaci DNA (Barbas *et al.*, 2007).

V rámci modifikace manuálních izolačních postupů pro využití v robotických linkách byly stanoveny limitní hodnoty čistoty a koncentrace DNA extraktu z robotických izolací gDNA. Akceptovatelný limit vycházel z doporučených hodnot, které na čistotu a koncentraci gDNA klade analytická fáze SNP microarray's – Bovine Chips Illumina technologie. Doporučené hodnoty: měřeno spektrofotometricky – NanoDrop: R 260/280 a 260/230 = 1,8 – 2,1 + limitní koncentrací 50 ng/μl (*Infinium® HTS Assay Protocol Rev. A October 2013*).

II. 6. Zhodnocení výsledků automatizovaných postupů izolace gDNA chlupových cibulek a TSU na robotických linkách

	NIMBUS96		NEXOR96	
	<i>chlupové cibulky</i>	<i>TSU (liquid)</i>	<i>chlupové cibulky</i>	<i>TSU (liquid)</i>
počet zdrojů DNA zařazených do izolačního procesu	6593	671	8915	621
rozmezí koncentrace gDNA extraktů – ng/μl	899,7 – 5,2	38,7 – 9,5	1135,7 – 12,2	54,7 – 12,7
průměrná koncentrace gDNA extraktů – ng/μl	354,8	19,4	401,5	27,5
průměrná čistota gDNA extraktů – R260/280 (NanoDrop)	1,89	1,49	1,80	1,58
počet gDNA extraktů splňujících kritéria pro aplikaci na BovineChip	6549 (99,3 %)	664 (98,9 %)	8839 (99,1 %)	615 (99,0 %)

Tabulka 2. Vyhodnocení výsledků izolace gDNA z robotických izolátorů NIMBUS96 a NEXOR96

	NIMBUS96	NEXOR96
denní průchodnost vzorků procesem izolace – počet extraktů gDNA	3 x 96	6 x 96
VÝHODY ROBOTICKÉHO ZAŘÍZENÍ	<ul style="list-style-type: none"> - flexibilní volba počtu izolovaných vzorků (8-96) - flexibilní volba elučního objemu (5-1000 μl) - vyšší čistota extraktu 	<ul style="list-style-type: none"> - absence pipetování - komfort předpřipravených kitů reagentů - vysoká rychlost izolace - uživatelský komfort provozu zařízení
NEVÝHODY ROBOTICKÉHO ZAŘÍZENÍ	<ul style="list-style-type: none"> - spotřeba velkého množství pipetovacích špiček - nutnost kalibrace přesnosti pipetování - manuální příprava reagentů do rezervoárů 	<ul style="list-style-type: none"> - fixní počet izolovaných vzorků (96) - fixní eluční objem (100 μl) - relativně nižší čistota extraktu

Tabulka 3. Porovnání robotických izolátorů NIMBUS96 a NEXOR96 z hlediska výkonu a komfortu provozu

Shrnutí výsledků:

- aplikaci v robotických linkách s vysokým podílem automatizace ideálně vyhovuje metoda izolace gDNA na magnetických partikulích
- metoda umožňuje využití dvou alternativních izolačních robotů NIMBUS96 a NEXOR96 s rozdílným principem fixace partikulí na externí magnet: magnetická destička – magnetické prsty
- chlupové cibulky a TSU – favorizované zdroje gDNA vytipované v předchozí fázi projektu (Schröffelová *et al.*, 2018) jsou vhodné pro robotické zpracování
 - a) gDNA extrakty z chlupových cibulek vykazují vyšší koncentrace (ng/μl) a čistotu (R260/280) než extrakty z TSU, kladou však větší nárok na manuální fázi zpracování zdroje – stříhání chlupových cibulek
 - b) gDNA extrakty z TSU sice vykazují nižší koncentraci (ng/μl) a čistotu (R260/280), tyto však v naprosté většině případů postačují k zařazení gDNA extraktů do procesu SNP genotypizace s korektním call rate ve výsledku. Odebrání alikvoty zdroje DNA z TSU nárokuje méně manuální práce a TSU je zdroj výrazně vhodný k robotizaci
- oba zvolené zdroje DNA je možné v chovech skotu alternativně plošně odebírat za účelem robotických izolací gDNA pro SNP genotypizaci
- izolace gDNA v robotických linkách NIMBUS96 a NEXOR96 spolehlivě poskytuje gDNA extrakty s nárokovanou koncentrací a čistotou, s benefitem široké možnosti uplatnění robotizace procesu, která garantuje velkou průchodnost vzorků laboratoří a tím podporují možnost plošného genotypování SNP technologií
- metodikou izolace gDNA praktikované v robotických linkách byla prověřena možnost snížit akceptovatelnou koncentraci gDNA extraktu na hodnotu ≥ 10 ng/μl oproti limitní koncentraci 50 ng/μl doporučené výrobcem analytických reagentů Bovine Chips Illumina (*Infinium® HTS Assay Protocol*), což umožňuje zařadit do SNP genotypizace vzorky DNA získané ze zdrojů nižší kvality
- byla potvrzena relevance požadavku na čistotu DNA extraktu: $R260/280 \geq 1,80$
- druhý ze standardně měřených ukazatelů čistoty $R260/230$ lze akceptovat v hodnotě $R260/230 \geq 1,40$, což je významně nižší nárok, než uvádí *Infinium® HTS Assay Protocol*
- do dalšího analytického procesu lze zařadit všechny roboticky izolované extrakty gDNA, které splňují limit: **koncentrace ≥ 10 ng/μl + čistota: $R260/280 \geq 1,80$ a $R260/230 \geq 1,40$**
- srovnání robotických linek NIMBUS96 a NEXOR96 z hlediska jejich výkonnosti a komfortu provozu dokládá, že provozu v laboratoři s velkou průchodností vzorků lépe vyhovuje izolátor NEXOR96, doplněný alternativním provozem zařízení NIMBUS96

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novost metodiky spočívá v integraci robotických izolací gDNA do procesu SNP genotypizace, doložení jeho úspěšného zvládnutí a zavedení do rutinního provozu. Laboratoř iGenetiky ČMSCH, a.s., jako jediný poskytovatel služeb v oblasti agrigenomiky v České republice, přizpůsobila metodický potenciál své činnosti požadovanému velkopřůchodnému tzv. „industry modelu“.

Pro robotické protokoly byly modifikovány dříve používané metody izolace gDNA z unikátních zdrojů DNA, specifických pro oblast agrigenomiky – chlupové cibulky a TSU.

Předkládaná metodika sumarizuje zjištění z procesu zavádění robotických metod izolace a na velkém počtu provedených úspěšných izolací gDNA hodnotí a objektivně dokládá důležitost a smysluplnost procesu robotizace metod izolace gDNA.

Izolace gDNA z favorizovaných biologických zdrojů standardně probíhá v robotických zařízeních NEXOR96 a NIMBUS96. Laboratoř iGenetiky ČMSCH a.s. je první laboratoří v ČR, kde byla tato zařízení instalovaná a uvedena do rutinního provozu.

V rámci modifikace metody izolace DNA pro robotické linky byla prověřena hypotéza, že robustnost SNP technologie genotypizace umožňuje snížení limitních hodnot pro koncentraci a čistotu DNA extraktu oproti

hodnotám doporučeným výrobcem analytických reagensů Bovine Chips Illumina (*Infinium® HTS Assay Protocol*).

Vysokou mírou uplatnění robotizace byly vytvořeny komplexní podmínky pro plošnou SNP genotypizaci skotu a provádění velkého počtu SNP analýz v krátkém čase, za současného snižování nákladů.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika popisuje integraci robotických linek do procesu izolace gDNA ve velkopřůchodné rutinní laboratoři. Využitím robotických linek se významně urychlí a standardizuje izolace gDNA a navýší průchodnost vzorků v následných molekulárně-genetických analýzách.

Metodika najde uplatnění ve všech oblastech rutinního testování DNA, kde je potřeba saturovat molekulárně-genetické metody velkým počtem extraktů na vstupu do analytické fáze procesu.

Uživatelé metodiky mohou být servisní laboratoře s ambicí praktikovat velkopřůchodný tzv. „industry model“ činnosti. Zjištění se neomezují pouze pro oblast agrigenomických servisních subjektů, ale jsou univerzální a lze je aplikovat například při izolacích DNA a/nebo RNA v souvislosti s plošným testováním spojeným s protipandemickými opatřeními.

Výsledek integrace robotických linek do izolačního procesu se v konečném důsledku projeví v účelném navýšení četnosti SNP analýz a jejich plošné aplikaci v chovu skotu v ČR. Nárůst získaných analytických dat povede k navýšení využití potenciálu SNP technologií v oblasti šlechtění a chovu zejména u dojeného skotu.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Robotizací mechanicky se opakujících, odborně nenáročných procesů, se částečně řeší současný nedostatek kvalifikovaného personálu. Zavádění robotických linek je nezbytné jak z důvodu nedostatku pracovních sil, tak i zejména z pohledu eliminace výskytu náhodných chyb v důsledku selhání lidského faktoru (záměny vzorků, náhodné chyby v pipetování). Automatizací se sníží podíl neefektivně vynaložených nákladů a sníží nutnost opakování SNP analýz.

Modifikací manuálních metod izolace DNA pro robotické linky NEXOR96 a NIMBUS96 dochází ke snížení přímých materiálových nákladů (kity reagensů, spotřební plast) o cca 11,7 Kč na jednu izolaci.

Při hodnocení benefitu snížení přímých materiálových nákladů je rovněž nutno brát zřetel na trvalý nárůst cen spotřebního materiálu pro molekulárně-biologické technologie a jeho nedostupnost v důsledku covid19 pandemie. Využívání dvou alternativních robotických linek NEXOR96 a NIMBUS96 s rozdílným principem fixace partikulí na externí magnet, vytváří ideální model přístrojového vybavení rutinní laboratoře, který umožní zachovat její provoz i v případě akutního nedostatku spotřebního materiálu pro některou z instalovaných robotických linek.

Za předpokladu plošné genotypizace stád, zejména u dojeného skotu, lze predikovat trvalé zvyšování počtu prováděných SNP genotypizací. V nadcházejícím roce lze očekávat požadavek na provedení 15 000 SNP genotypizací u Hoštýnského skotu (program FIT COW) a 17 000 SNP genotypizací u Českého Strakatého skotu (program CATTLE GENOM), což znamená úsporu na úrovni cca 400 000 Kč v přímých nákladech na izolaci DNA, která byla od 1.9. 2021 promítnuta do snížení ceny SNP genotypování.

Navýšení průchodnosti vzorků servisní laboratoří a generování SNP dat ve velkých sériích, pro které vytváří robotizace izolací DNA na vstupu ideální podmínky, zároveň povede v konečném důsledku ke snížení ceny za stanovený SNP genotyp, čímž bude umožněno navýšení počtu genotypovaných jedinců. Navýšování objemu dat vstupujících do bioinformatického hodnocení povede ke zpřesnění a zrychlení výpočtů gPH, díky kterým chovatelé začlení genomickou selekci plemenných zvířat do rutinního managementu svých stád. Získávají tak selekční nástroj, díky kterému se výrazným způsobem zpřesňuje výběr nejcennějších jedinců pro rozšíření žádoucích produkčních i mimoprodukčních vlastností v populaci jednotlivých druhů hospodářských zvířat.

VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- 1 Barbas, C., Burton, D., Scott, J., & Silverman, G. (2007):**
Quantitation of DNA and RNA.
Cold Spring Harbor Protocols, 2007(11), pdb.ip47. doi:10.1101/pdb.ip47
- 2 Beránek, M., Vlčková, J., Hypiusevová, V., Živný, P., Palička, V. (2006):**
Comparison of various methods used for extraction of genomic DNA from human plasma.
Klin. Biochem. Metab., 14, s. 21–24.
- 3 Gielda, L. and Rigg, S. (2017):**
Extraction of amplifiable DNA from embalmed human cadaver tissue.
BMC Res Notes, 10:737, s. 1–5.
- 4 Hůska, D., Baloun, J., Trnková, L., Adam, V., Kizek, R. (2008):**
Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA.
CHEMagazín, 18 (3): 14-15.
- 5 Owen, R.D. (1945):**
Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins.
Science, 102 (2651), s. 400–401
- 6 Raška, M. (2006):**
Základní postupy práce s nukleovými kyselinami
http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/II.workshop/II.%20workshop_Milan%20Raska.doc
- 7 Ron, M., Blank, Y., & Band, M. (1995):**
Determination of the optimal tissue source and number of microsatellites for detection of zygotic origin of cattle twins.
Animal Biotechnology, 6(1), s. 27–39.
- 8 Sebastianelli, A., Sen, T., Bruce, I. J. (2008):**
Extraction of DNA from soil using nanoparticles by magnetic bioseparation.
Letters in Applied Mikrobiologie, Apr, s. 488–491
- 9 Schröffelová, D. (2020):**
Standardní operační postupy SOP ZL1312,
IX. revidované a doplněné vydání, s. 18-20.
- 10 Schröffelová, D., Hromádková, J., Šteiger, V., Němcová, L., Štěrbová, M., Kučera, J., Lipovský, D. (2020):**
Optimalizace preanalytické fáze SNP genotypizace.
Funkční vzorek, vypracováno v rámci výzkumného projektu MZe NAZV QK1910320
- 11 Schröffelová, D., Němcová, L., Hromádková, J., Kučera, J., Lipovský, D., Šteiger, V., Přibáňová, M. (2018):**
Optimalizace odběru alternativních biologických vzorků pro návaznou kvalitní izolaci genomické DNA.
Certifikovaná metodika vypracovaná v rámci výzkumného projektu MZe NAZV QK1810253
- 12 Vondrejs, V. a Storchová, Z. (1997):**
Genové inženýrství I.,
Praha: Karolinum

- 13 Verdonck, L. F., van Blokland, W. T. M., BosboomKalsbeek, E. K., van Heugten, H. G., Tilanus, M. G. J., de Weger, R. A. (1996):**
Complete donor T cell chimerism is accomplished in patients transplanted with bone marrow grafts containing a fixed low number of T cells.
Bone Marrow Transplant., 18, s. 389 –395.
- 14 Infinium® HTS Assay Protocol Guide ,**
ILLUMINA PROPRIETARY Part # 15045738, Rev. A October 2013
- 15 OMEGA Mag-Bind Blood&Tissue DNA HDQ Kit 96**
Omega Bio-Tec. Inc., M6399, December 2015

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- 1 Schröffelová, D., Přibáňová, M., Kučera, J., Němcová, L., Lipovský, D. (2018):**
Identification of Beta-Casein Alleles and Genotypes Using PCR and RFLP Methods and Illumina iScan Microarray Technologies in Holstein Cattle
Mezinárodní konference XXVIIIth Genetic Days 2018, České Budějovice, Book of abstracts, p. 17
- 2 Přibyl, J., Bauer, J., Motyčka, J., Přibyllová, J., Šplíchal, J., Vostrá-Vydrová, H., Vostrý, L. (2018):**
Step of Agreement of Pedigree and Genomic Relationship in Genomic Evaluation of Dairy Cattle
Mezinárodní konference XXVIIIth Genetic Days 2018, České Budějovice, Book of abstracts, p. 25
- 3 Schröffelová, D., Lipovský, D. (2018):**
Informace o genotypování v ČMSCH, internetová aplikace evidence genotypování
Odborný seminář pro chovatelskou veřejnost Nové poznatky ve šlechtění dojného skotu, Hradištko, Sborník referátů, p. 31-33
- 4 Přibyl, J., Zavadilová, L.:**
Genomický odhad plemenných hodnot
Odborný seminář pro chovatelskou veřejnost Nové poznatky ve šlechtění dojného skotu, Hradištko, Sborník referátů, p. 26-27
- 5 Schröffelová, D., Němcová, L., Hromádková, J., Kučera, J., Lipovský, D., Šteiger, V., Přibáňová, M. (2018):**
Optimalizace odběru alternativních biologických vzorků pro návaznou kvalitní izolaci genomické DNA.
Certifikovaná metodika vypracovaná v rámci výzkumného projektu MZe NAZV QK1810253
- 6 Schröffelová, D., Hromádková, J., Šteiger, V., Němcová, L., Štěrbová, M., Kučera, J., Lipovský, D. (2020):**
Optimalizace preanalytické fáze SNP genotypizace.
Funkční vzorek, vypracováno v rámci výzkumného projektu MZe NAZV QK1910320
- 7 Přibáňová, M., Schröffelová, D., Lipovský, D., Kučera, J., Šteiger, V., Hromádková, J., Němcová, L. (2020):**
Using of SNPs from Illumina BovineSNP50K BeadChip v3 for imputation of microsatellite alleles for parentage verification and QTL reporti.
Czech J. Anim. Sci., Czech J. Anim. Sci., 65: 482–490.

Název:

Optimalizace automatizovaných postupů izolace DNA z alternativních zdrojů

Autor:

Ing. Daniela Schröffelová, CSc. (podíl na vzniku metodiky 40 %)

Ing. Vladimír Šteiger (podíl na vzniku metodiky 25 %)

Ing. Jarmila Hromádková (podíl na vzniku metodiky 15 %)

doc. Dr. Ing. Josef Kučera (podíl na vzniku metodiky 5 %)

Ing. David Lipovský (podíl na vzniku metodiky 5 %)

Ing. Marie Křížová (podíl na vzniku metodiky 5 %)

Ing. Michaela Přibáňová, Ph.D. (podíl na vzniku metodiky 5 %)

Oponenti:

Ing. Juraj Saksún, Odbor zemědělských komodit, Oddělení hospodářských zvířat, MZe ČR, Praha

Prof. Ing. Peter Strapák, PhD., Ústav chovu zvierat, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Zpracováno za podpory MZe ČR, úkol MZe NAZV QK1810253:

„Navýšení spolehlivosti celostátního genomického hodnocení dojeného skotu zařazením krav s domácí užitkovostí do genotypované referenční populace“