



ČMSCH | ČESKOMORAVSKÁ
a.s. | SPOLEČNOST
CHOVATELŮ

ROBOTIZOVANÁ METODA IZOLACE DNA V ZÁVISLOSTI NA TYPU VZORKU

Daniela Schröffelová a kolektiv



2021

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Česká plemenářská inspekce

Slezská 100/7, Praha 2, 120 00

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

8763/2021-ČPI

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

Název metodiky:

Robotizovaná metoda izolace DNA v závislosti na typu vzorku

Autoři: Daniela Schröffelová, Vladimír Šteiger, Jarmila Ilromádková, Marie Křížová, Josef Kučera, David Lipovský

Název organizace/cí: Českomoravská společnost chovatelů, a.s. Benešovská 123, Hradištko 252 09

Místo vydání: Českomoravská společnost chovatelů, a.s. Benešovská 123, Hradištko 252 09

Rok vydání: 2021

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu/podpory na rozvoj výzkumné organizace v rámci řešení projektu QK1910320 „Výzkum postupů šlechtění dojeného skotu s cílem zvýšit odolnost k nemocem využitím genomických plemenných hodnot, rozvoje systému sběru zdravotních dat a cílené genotypizace skotu“ NAZV Ministerstva zemědělství ČR.

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

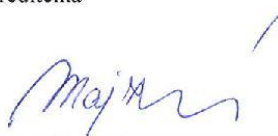
Ing. Zdenka Majzlíková

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

ředitelka


V Praze dne 1. 11. 2021

Česká plemenářská inspekce
Slezská 100/7
120 00 Praha 2
1


.....
Podpis/elektronický podpis zástupce
odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V Praze dne 3. 11. 2021


.....
Podpis/elektronický podpis
ředitele/ředitelky Odboru vědy, výzkumu
a vzdělávání

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

ROBOTIZOVANÁ METODA IZOLACE DNA V ZÁVISLOSTI NA TYPU VZORKU

Autoři:

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

Oponenti:

Ing. Zdenka Majzlíková
Česká plemenářská inspekce, Praha
prof. Ing. David Zapletal, Ph.D.
Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, Veterinární univerzita, Brno

Certifikovaná metodika je výstupem z řešení projektu NAZV

Projekt: QK1910320

„Výzkum postupů šlechtění dojeného skotu s cílem zvýšit odolnost k nemocem využitím genomických plemenných hodnot, rozvoje systému sběru zdravotních dat a cílené genotypizace skotu“

2021

ISBN 978-80-87633-06-9

Copyright © 2021 ČMSCH, a.s.

Obsah:

I.	CÍL METODIKY.....	1
II.	VLASTNÍ POPIS METODIKY	1
II. 1.	Úvod	1
II. 2.	Izolace a purifikace DNA.....	1
II. 2. 1.	Volba zdroje DNA.....	1
II. 2. 2.	Volba metody izolace DNA	2
II. 2. 3.	Postup izolace DNA.....	2
II. 2. 3. 1.	Příprava buněk.....	2
II. 2. 3. 2.	Lyze buněk	3
II. 2. 3. 3.	Extrakce DNA	4
II. 2. 3. 4.	Integrace robotických linek do procesu izolace DNA	4
II. 2. 3. 5.	Posouzení kvality izolované DNA izolované v robotických linkách.....	7
II. 2. 3. 6.	Zhodnocení výsledků izolace genomické DNA z chlupových cibulek a TSU na robotických izolátorech a výkonnosti izolátorů NIMBUS96 a NEXOR96.....	7
III.	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	8
IV.	POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	8
V.	EKONOMICKÉ ASPEKTY	9
VI.	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	10
VII.	SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE.....	12

I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je popsat izolaci genomické DNA v kvalitě vhodné pro analýzu polymorfismu SNP na microarray's - Bovine Chips Illumina. DNA bude extrahovaná z komplexních biologických vzorků plošně odebíraných v chovech skotu, zejména ze dvou předem vytipovaných zdrojů DNA – chlupové cibulky a TSU (Tissue Sample Unit a/nebo odběrové ušní známky), s důrazem na maximální možnou míru integrace robotických linek do izolačního procesu.

Cílem robotizace a automatizace metod izolace DNA je účelně zrychlit celkový analytický proces, navýšit průchodnost vzorků laboratoří v zavedeném velkopřechodném tzv. „industry“ modelu provozu a současně eliminovat riziko náhodných chyb vznikajících v důsledku selhání lidského faktoru při manuálních metodách izolace genomické DNA.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

II. 1. Úvod

Stanovení SNP profilu metodou genotypizace na microarray's (BovineChips) a výpočet genomické plemenné hodnoty (gPH) jedince se v posledních letech staly standardní součástí plemenářské práce v chovu skotu. Analýza SNP navíc souběžně nabízí možnost interpretovat ze získaných dat status konkrétních genů s vlivem na zdraví a užitkovost, jako alternativu k přímým testům bodových mutací. SNP analytická data korelována s monitorovanými daty o zdravotním stavu mohou vést k odhalení dosud neznámých genů s možným vlivem na geneticky podmíněné znaky zdraví a užitkovosti.

Kvalitně izolovaná DNA vstupující do procesu je primární a nutnou podmínkou možnosti provedení analýzy SNP BovineChip technologií. Kvalita izolátu DNA rozhodujícím způsobem ovlivňuje celkovou míru úspěšnosti genotypizace na microarray's (BovineChips) vyjádřenou tzv. call rate. Nekvalitní DNA zapříčiní absenci analytických dat (nebo jejich částí) a tím diskriminuje nekvalitně stanovený SNP genotyp jedince z dalšího bioinformatického zpracování.

Plné využití potenciálu bioinformatických analýz dat získaných SNP genotypizací předpokládá velké kvantum genotypů zařazených do datového zpracování. Takové kvantum analytických dat je možné generovat pouze v laboratoři s velkopřechodným modelem provozu. Možnost provádět v krátkém čase požadovaný počet SNP analýz a poskytnout očekávaný počet SNP genotypů k bioinformatickému zpracování, je podmíněna rutinním využíváním automatických - robotických linek a k nim kompatibilních metod izolace genomické DNA.

II. 2. Izolace a purifikace DNA

První fází většiny molekulárně-genetických metod je izolace DNA vhodně zvolenou metodou z favorizovaného biologického zdroje.

II. 2. 1. Volba zdroje DNA

Genomickou DNA lze teoreticky izolovat z jakékoliv živočišné tkáně obsahující eukaryotická buněčná jádra (Sebastianelli *et al.*, 2008).

Výběr vhodného zdroje DNA při plošné genotypizaci skotu má 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 „tradičním“ biologickým materiálům pro izolaci DNA hospodářských zvířat patřily vzorky nesrážlivé žilní krve. Moderní metody izolace umožňují získat DNA i z jiných, „alternativních“, biologických zdrojů: chlupové cibulky, vzorky z biopsií tkání (např. TSU), stěry sliznic, sperma, popřípadě i některé biologicky nedegradované části kadáverů (Giolda and Rigg, 2017).

Diskutabilní je možnost izolace DNA z reziduálních, degradovaných a jinak nestandardních zdrojů (použité pejetý po inseminaci, biopsie embryí apod.). I z takto nestandardních zdrojů je možné vhodně zvolenou a manuálně praktikovanou metodou izolovat genomickou DNA a následným nabohacením výtěžku *in vitro* docílit možnosti aplikovat takto upravenou DNA na microarray. Tento složitý, časově náročný a finančně

nákladný postup však nelze aplikovat při plošné genotypizaci velkého počtu vzorků (Beránek *et al.*, 2012), ani v něm uplatnit model robotického zpracování.

Jako nejvhodnější zdroje DNA u skotu byly z hlediska chovatelských a laboratorních nároků zvoleny **odběry chlupových cibulek a TSU (Tissue Sample Unit)**.

II. 2. 2. Volba metody izolace DNA

V posledních 30 letech došlo k zavedení mnoha metod, které se liší nároky na laboratorní techniku, množství výchozího materiálu, finanční dostupnost a následné využití DNA (Surzycki, 2000).

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

Metody izolace DNA využívají rozdílné rozpustnosti biologických makromolekul, adsorpce na pevný podklad či jiný vhodný nosič nebo centrifugace v gradientních roztocích (Šmarda *et al.*, 2005).

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).

II. 2. 3. Postup izolace DNA

II. 2. 3. 1. Příprava buněk

Před izolací DNA je třeba oddělit z biologického zdroje dostatečný alikvot biologického materiálu, u kterého předpokládáme přítomnost buněk obsahujících buněčná jádra v množství potřebném k získání předpokládaného výtěžku DNA v kvalitě a kvantitě nárokané SNP technologií.

V případě odběru chlupů do sofistikované odběrové sady (**Obrázek 1.**) je nutné oddělit požadované množství (15-20 chlupových cibulek) do vhodné zkumavky, ve které bude provedena proteolýza. Tento úkon nelze robotizovat a provádí se ručně – ustřížením (**Obrázek 2**).



Obrázek 1. Odběrová sada



Obrázek 2. Stříhání chlupových cibulek

V případě odběru TSU lze provést izolaci DNA z výšeče ušní chrupavky odebrané do TSU, nebo přímo z alikvotu prezervační tekutiny (Obrázek 3.) odebraného z rezervoáru, který je nedílnou součástí TSU a/nebo odběrové ušní známky a slouží k uchování tkáně od provedení odběru k provedení izolace.



Obrázek 3. Vzorek ušní tkáně odebraný do TSU

II. 2. 3. 2. Lyze buněk

Lyze buněk je prvním krokem při izolaci DNA. U buněk s kompaktní buněčnou stěnou je k uvolnění jejich vnitřního obsahu obvykle nutné tuto stěnu rozrušit lyzí. Lyze se provádí mechanicky, chemicky nebo kombinací obou postupů. Výběr způsobu indukce buněčné lyze závisí na typu buňky. Mezi chemické metody patří enzymatická lyze nebo lyze organickými činidly (Vondrejs a Storchová, 1997; Šmarda *et al.*, 2005). Přítomné detergenty rozrušují fosfolipidové membrány a proteinázy zas degradují veškeré proteiny, čímž je docíleno uvolnění DNA z buňky. Po rozrušení buněčné stěny a cytoplazmatické membrány se uvolní buněčný obsah a v pufovaném roztoku tak vzniká komplexní směs degradačních produktů biomembrán, DNA, RNA, proteinů, lipidů, sacharidů nízkomolekulárních látek a uhlovodíků (Brown and Audet, 2008; Goldberg, 2008)

V případě izolace DNA z chlupových cibulek a TSU volíme enzymatickou lyzi za přítomnosti proteolytického enzymu - Proteináza K - ve vhodně zvoleném pufovaném prostředí.

Z pohledu zabezpečení vysoké průchodnosti vzorků laboratoří je žádoucí minimalizovat počet alternativních výchozích zdrojů DNA s výrazně odlišnými nároky na lyzační podmínky (rozdílné proteolytické enzymy, aditiva, lyzační teploty apod.) a do nejvyšší možné míry unifikovat proces prvního kroku – lyze buněk – pro všechny alternativní zpracovávané zdroje.

V Tabulce 1. Uvádíme podmínky proteolýzy z jednotlivých zdrojů DNA. Pro úplnost uvádíme i zdroje „nesrážlivá krev“ a „sperma“, které se po proteolýze můžou rovněž integrovat do robotických izolačních protokolů. Jejich příprava před proteolýzou je pracná a časově náročná, proto tyto dva zdroje v modelu velkopřechodných - robotických izolací DNA nefavorizujeme.

Biologický vzorek		Proeinase K (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 třepání-vortex
TSU	raw liquid TSU - 100 μl	20	200 TL	56°C 60+30min.*	*mezi 60/30 mechanické třepání-vortex
	Tkáň - výšeče ušní chrupavky - cca1x1x1xmm	20	200 TL	56°C přes noc	+15 μl DTT
SPERMA - propraná pejeta/peleta (vT ₁₀ E ₁)= zbavena komerčních ředidel		25	200 TL	56°C 45+45min.	+25 μl DTT
NESRÁŽLIVÁ KREV - 200 μl		20	200 AL	56°C 60min.	

Tabulka 1. Podmínky proteolýzy jednotlivých zdrojů DNA

II. 2. 3. 3. Extrakce DNA

Po proteolýze buněk dochází k dalšímu důležitému kroku a tím je extrakce DNA z hrubého lyzátu, její zakoncentrování, odstranění nežádoucích látek koextrahovaných s DNA a převedení DNA do vhodného pufru (Šmarda *et al.*, 2005).

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.

Aplikace magnetických částic (magnetické kuličky = partikule, Mag-Bind) při izolaci DNA zahrnuje tři procesy:

- 1) navázání DNA na povrch magnetické částice:** DNA se reverzibilně váže na magnetické kuličky potažené vhodným povrchem – protilátkami proti DNA, silikátem, iontoměničím nebo povrchem s jinými vhodnými funkčními skupinami.
- 2) pročištění DNA:** DNA navázaná na magnetických částicích se zbaví nežádoucích koextrátů – po navázání DNA se kuličky pomocí magnetu oddělí od roztoku s kontaminujícími látkami a opakovaně se promyjí. DNA je navázána na povrchu částic, což umožňuje rychlou výměnu pufrů nebo reagentů.
- 3) oddělení izolované DNA od magnetických částic:** Purifikovaná DNA se po promytí z povrchu magnetických partikulí uvolní změnou pufrového prostředí, které zruší vazbu DNA k povrchu magnetické partikule. Magnetické partikule jsou ve finále vnějším magnetickým polem odseparovány z roztoku izolované DNA.

K fixaci a separaci magnetických částic z roztoků se používá vnější magnetické pole (externí magnetický separátor); z tohoto důvodu se nemusí používat k jejich izolaci centrifugace. Magnetické separátory a magnetické částice různých typů pro extrakci DNA (převážně ve formě komplexních kitů reagensií) jsou v současnosti komerčně dostupné (Hůska *et al.*, 2008; Trachtová a Rittich, 2011)

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

II. 2. 3. 4. Integrace robotických linek do procesu izolace DNA

K magnetické separaci hrubých proteolyzátů z chlupových cibulek a TSU jsou v laboratoři využívány tři robotické linky.

Prvním krokem robotické extrakce je tzv. „PLATE creating“ tj. přenesení roztoků hrubých lyzátů ze zkumavek, ve kterých proběhla proteolýza, do formátu 96 jamkové destičky. Tato fáze izolace DNA již probíhá roboticky, v automatické **pipetovací stanici TECAN EVO Freedom (Obrázek 4. a Obrázek 5.)**.

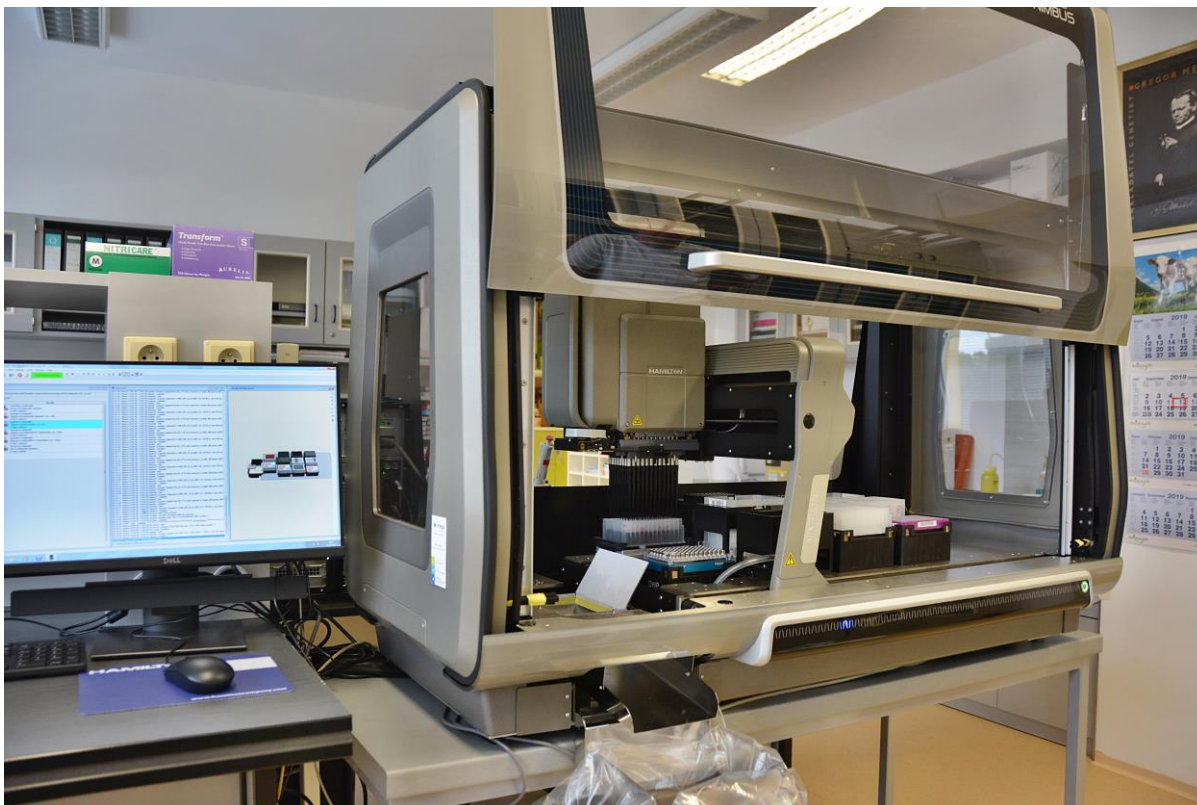


Obrázek 4. a Obrázek 5. „PLATE creating“ v robotickém zařízení TECAN EVO Freedom

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, které se liší způsobem fixace magnetických kuliček s imobilizovanou DNA na povrchu k externímu magnetu.

A) Robotický izolátor HAMILTON Firefly NIMBUS96



Obrázek 6. HAMILTON Firefly NIMBUS96



Obrázek 7. Magnetický stojánek v zařízení NIMBUS96, detail magnetických partikulí v destičce

V izolátoru NIMBUS96 reagují magnetické kuličky s navázanými cílovými molekulami DNA na vnější magnetické pole, které tvoří magnet v magnetickém stojánku (**Obrázek 7.**). 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 pipetováním. Poté jsou magnetické kuličky opakovaně promyty vhodnými promývacími pufrů. Nakonec jsou kuličky s navázanými molekulami DNA převedeny do elučního pufru, 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 přenes – 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 8. a Obrázek 9. 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 9**). Hroty s hřebeny, na kterých je magneticky fixovaná DNA, se vnořují do 96 jamkových destiček s jednotlivými promývacími pufrů, 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 pufrů, 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.

II. 2. 3. 5. Posouzení kvality izolované DNA izolované v robotických linkách

Při hodnocení kvality DNA jsme vycházeli z nároků na kvalitu a koncentraci gDNA doporučenou pro aplikaci na mikroarray's – BovineChips Illumina.

Doporučené hodnoty měřeno spektrofotometricky:

NanoDrop: R 260/280 a 260/230 = 1,8 – 2,1

Limitní koncentrace: 50ng/μl (*Infinium® HTS Assay Protocol Rev. A October 2013*).

Již dříve byla prověřena možnost snížit limitní hranici požadavku na minimální koncentraci a čistotu DNA extraktu na hodnoty: koncentrace ≥ 10 ng/μl a čistota R260/230 $\geq 1,40$, což umožnilo zařadit do SNP genotypizace vzorky izolované DNA získané ze zdrojů nižší kvality (Schröffelová *et al.*, 2020). Tato možnost - dříve prověřena v manuálních izolačních protokolech – byla potvrzena v robotických protokolech pro oba robotické izolátory - NIMBUS96 a NEXOR96.

II. 2. 3. 6. Zhodnocení výsledků izolace genomické DNA z chlupových cibulek a TSU na robotických izolátorech a výkonnosti izolátorů NIMBUS96 a NEXOR96

	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 %)
denní průchodnost vzorků procesem izolace – počet extraktů gDNA	3 x 96	3 x 96	6 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 reagensí - 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 2. Vyhodnocení výsledků izolace gDNA a výkonnosti izolátorů

Výsledky studie robotických izolací gDNA dokládají:

- favorizované zdroje DNA – chlupové cibulky a TSU – jsou vhodné pro robotické zpracování
 - a) gDNA extrakty z chlupových cibulek vykazují vyšší koncentrace (ng/μl) a čistotu (R260/280) než 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 alikvotu zdroje gDNA 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
- metoda izolace DNA na magnetických partikulích je ideální volbou metody vzhledem k možnosti využití dvou alternativních izolačních robotů NIMBUS96 a NEXOR96 s rozdílným principem fixace partikulí na externí magnet (magnetická destička – magnetické prsty)
- v robotickém modelu izolace byla potvrzena (dříve v manuálních izolačních protokolech prověřena) možnost snížit limitní hranici požadavku na minimální koncentraci DNA extraktu na hodnotu koncentrace ≥ 10 ng/μl oproti limitní koncentraci 50 ng/μl doporučené výrobcem analytických reagensů Bovine Chips Illumina (*Infinium® HTS Assay Protocol*), což umožnilo zařadit do SNP genotypizace vzorky DNA získané ze zdrojů nižší kvality
- v robotickém protokolu byl rovněž potvrzen limit čistoty R260/230 $\geq 1,40$, což je významně nižší nárok, než uvádí *Infinium® HTS Assay Protocol*
- ze srovnání výkonnosti zařízení NIMBUS96 a NEXOR96 z hlediska výkonnosti + výhod a nevýhod provozu vychází jako zařízení „první volby“ izolátor NEXOR96, doplněný v rutinním provozu izolacemi na zařízení NIMBUS96

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Využití potenciálu SNP BovineChips technologie nárokuje velkopřůchodný tzv. „industry“ model laboratorního zpracování velkého počtu vzorků v krátkém čase. Tento model rutinního provozu může fungovat pouze s vysokým podílem automatizace a robotizace používaných laboratorních metod.

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.

Izolace gDNA z favorizovaných biologických zdrojů (chlupové cibulky a TSU) standardně probíhá v robotických zařízeních NEXOR96 a NINBUS96. Laboratoř iGenetiky ČMSCH a.s. je první laboratoř v ČR, kde byla tato zařízení instalovaná a uvedena v rutinní provoz.

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

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.

Novost metodiky spočívá v integraci robotických izolací gDNA do procesu SNP genotypizace, doložení jeho úspěšného zvládnutí a zavedení do rutinního provozu.

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.

Uživateli 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.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Navýšení průchodnosti vzorků servisní laboratoří a generování SNP dat ve velkých sériích, pro které vytváří robotizace izolací DNA na vstupu ideální podmínky, povede v konečném důsledku ke snížení ceny za stanovený SNP genotyp, čímž bude umožněno navýšení počtu genotypovaných jedinců. Navyšování 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 dojeného skotu, včetně ukazatelů zdraví a odolnosti.

Robotizací mechanicky se opakujících, odborně nenáročných procesů, se částečně řeší nedostatek kvalifikovaného personálu. Zavádění robotických je linek nezbytné jak z důvodu nedostatku pracovních sil, tak i z pohledu eliminace výskytu náhodných chyb v důsledku selhání lidského faktoru (záměna vzorku, chyba při pipetování).

Modifikací manuálních metod izolace DNA pro robotické linky NEXOR96 a NIMBUS96 dochází ke snížení přímých materiálových nákladů (kity reagentů, 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.

Za předpokladu plošné genotypizace stád, zejména u dojného skotu, lze predikovat trvalé zvyšování počtu prováděných SNP genotypizací. V nadcházejícím roce lze v rámci realizace programů FIT COW (SNP genotypizace u Hoštýnského skotu) a CATTLE GENOM (genotypizace u Českého Strakatého skotu) očekávat požadavek na provedení min 35 000 SNP genotypizací, 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.

VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- 1 Beránek, M., Hegerová, J., Drastíková, M. (2012):**
„Alternativní“ biologický materiál pro rutinní analýzu nukleových kyselin – validace preanalytické fáze vyšetření DNA.
Klin. Biochem. Metab., 20 (41)No. 1, s. 31–37.
- 2 Beránek, M., Vlčková, J., Hypiusová, 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 Brown, R. B. and Audet, J. (2008):**
Current techniques for single-cell lysis.
Journal of The Royal Society Interface, 5(Suppl_2), S131-S138
- 4 Giolda, L. and Rigg, S. (2017):**
Extraction of amplifiable DNA from embalmed human cadaver tissue.
BMC Res Notes, 10:737, s. 1– 5.
- 5 Goldberg, S. (2008):**
Mechanical/Physical Methods of Cell Disruption and Tissue Homogenization.
Methods Mol Biol, 424:3-22.
- 6 Hůska, D., Baloun, J., Trnková, L., Adam, V., Kizek, R. (2008):**
Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA.
CHEMagazín, 18 (3): 14-15.
- 7 Raška, M. (2006):**
Základní postupy práce s nukleovými kyselinami
http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/II.workshop/II.%20workshop_Milan%20Raska.doc
- 8 Sebastianelli, A., Sen, T., Bruce, I. J. (2008):**
Extraction of DNA from soil using nanoparticles by magnetic bioseparation.
Letters in Applied Mikrobiology, 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 Surzycki, S., (2000):**
General Aspects of DNA Isolation and Purification.
Part of the Springer Lab Manuals book series (SLM), s. 1-32.

- 13 Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J., (2005):**
Metody molekulární biologie.
Masarykova univerzita, Brno, 188 s.
- 14 Trachtová, Š., Rittich, B., (2011):**
Izolace DNA z mléčných a probiotických výrobků pomocí magnetických mikročástic.
Mlékařské listy, 7-10.
- 15 Vondrejs, V. a Storchová, Z. (1997):**
Genové inženýrství I.,
Praha: Karolinum
- 16 Infinium® HTS Assay Protocol Guide ,**
ILLUMINA PROPRIETARY Part # 15045738, Rev. A October 2013
- 17 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., 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
- 2 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
- 3 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.
- 4 Schröffelová D. a kol. (2020):**
Standardní operační postupy – SOP ZL1312 Laboratoře iGenetiky ČMSCH, a.s. (zkušební laboratoř 1312)
Zpracováno v rámci akreditace metody: Detekce SNP pomocí microarrays technologie na genotypovacích Infinium Bead Chips Illumina v celogenomové DNA teplokrevných zvířat – skot. Viz. Osvědčení o akreditaci č.227/2019 podle ČSN EN ISO/IEC 17025:2018 a příloze k osvědčení https://www.cai.cz/OA/pdf/P227_2019_CS.pdf

Název:

Robotizovaná metoda izolace DNA v závislosti na typu vzorku

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 %)

Ing. Marie Křížová (podíl na vzniku metodiky 10 %)

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

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

Oponenti:

Ing. Zdenka Majzlíková, Česká plemenářská inspekce, Praha

prof. Ing. David Zapletal, Ph.D., Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, Veterinární univerzita, Brno

Zpracováno za podpory MZe ČR, úkol MZe NAZV QK1910320:

„Výzkum postupů šlechtění dojeného skotu s cílem zvýšit odolnost k nemocem využitím genomických plemenných hodnot, rozvoje systému sběru zdravotních dat a cílené genotypizace skotu“