

Ústav biologie obratlovců AV ČR
Mendelova univerzita v Brně

Certifikovaná metodika

METODIKA R16/2017

Příprava a uchování vzorků ryb pro průtokovou cytometrii

Ing. Karel Halačka, CSc.
Ing. Lukáš Vetešník, Ph.D.
prof. Dr. Ing. Jan Mareš

Brno

2018

Metodika vznikla za finanční podpory projektu TAČR TG03010048 Komercializace výsledků zoologického výzkumu - aplikace využitelné v praktické ochraně přírody, dílčího projektu 100106 Příprava a uchování vzorků pro průtokovou cytometrii a Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012-2018 „KUS“ QJ1510077 Zvýšení a zefektivnění produkce lososovitých ryb v ČR s využitím jejich genetické identifikace. Uvedené projekty přispěly k rozvoji výzkumných organizací ÚBO AV ČR v.v.i. a Mendelovy univerzity v Brně.

Podíl projektů: TAČR TG03010048 - 90 %; KUS“ QJ1510077 - 10 %

Oponenti:

Oponent z praxe:

prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr.rer.agr.,

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod

Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany

Oponent za státní správu:

Ing. Petr Chalupa

Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství

Oddělení rybářství a včelařství

Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Osvědčení o uznání certifikované metodiky 53020/2018 – MZE – 16232 N_{met} –

Certifikovaná metodika ze dne 13.9.2018

Vydalo: Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství,

Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Podíl autorů:

Ing. Karel Halačka, CSc, 80 %; Ing. Lukáš Vetešník, Ph.D., 10 %; prof. Dr. Ing. Jan

Mareš 10%

Adresa autorů:

Ústav biologie obratlovců Akademie věd ČR v.v.i., Květná 8, Brno 603 65

Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav zoologie, rybářství,

hydrobiologie a včelařství, Oddělení rybářství a hydrobiologie, Zemědělská 1, 613 00

Brno

Mendelova univerzita v Brně

ISBN 978-80-7509-582-4

Obsah

1. Cíl metodiky	4
2. Vlastní popis metodiky	4
2.1. Polyploidie	4
2.2. Průtoková cytometrie	5
2.2.1 Měření a příprava vzorků	6
2.2.2. Kvalita vzorků	7
2.3. Vzorky pro analýzu v průtokové cytometrii	7
2.3.1. Odběr vzorků	7
2.3.1.1. Heparin	7
2.3.1.2. Odběr a analýza krve	7
2.4. Tkáň	11
2.4.1. Měření čerstvého materiálu	11
2.4.1.1. Krev	11
2.4.1.2. Ploutev	11
2.4.1.3. Svalová tkáň	11
2.4.2. Měření vzorků jednotlivých tkání	11
2.5. Fixace	15
2.5.1. Druhy fixace	15
2.5.1.1. Alkohol	16
2.5.1.2. Formaldehyd	16
2.5.1.3. Zmražení	16
2.5.2. Fixace a měření fixovaných vzorků	17
2.6. Metodická doporučení	27
3. Novost metodiky	28
4. Popis uplatnění certifikované metodiky	28
5. Ekonomické aspekty	28
6. Poděkování	29
7. Seznam použité související literatury	30
8. Seznam publikací předcházející metodice	30

1. Cíl metodiky

Průtoková cytometrie umožňující rychlé měření obsahu DNA buněk našla široké využití v ichtyologii i rybářské praxi. Cílem metodiky je přispět k optimalizaci práce na průtokovém cytometru a to pomocí při výběru, odběru a možnostech fixace analyzovaná tkáň a interpretace získaných dat. Cílovou skupinou dané metodiky jsou zejména osoby z rybářské praxe a ichtyologové zabývající se problematikou populační struktury ryb ve volných vodách, s čímž souvisí i například omezená možnost fixačních prostředků a technik, případně snaha analýz materiálu původně neuchovaného pro účely stanovení ploidie (dočasné pracovní či archivní preparáty, muzejní materiál, atd.). Při výběru druhů k ověření byly preferovány představitelé polyploidních komplexů či hospodářsky využívané druhy se známou existencí polyploidních jedinců.

2. Vlastní popis metodiky

Tato metodika obsahuje ucelený metodický postup doporučený na základě závěrů z výsledků recentně provedených experimentů zaměřený na možné rozdíly při odběru vzorků krve (vliv heparinizace), při výběru odlišné tkáň (krev, ploutev, svalová tkáň) a při použití různých způsobů fixace (zmražení, alkohol a formaldehyd různé koncentrace).

2.1. Polyploidie

Polyploidie (znásobení chromozomových sad) je neobyčejně důležitým evolučním mechanismem nepochybně přispívajícím k obrovské diverzitě současných ryb. Její studium má význam například při výzkumu diploidně-polyploidních druhů/komplexů nebo evoluční polyploidie (jeseteři (*Acipenseriformes*), sekavci rodu *Cobitis*, piskoři rodu *Misgurnus*, karas stříbřitý *Carassius gibelio*, apod.).

U ryb lze polyploidní stavy poměrně snadno vyvolat i experimentálně čehož se využívá s úspěchem v akvakultuře (pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), losos obecný (*Salmo salar*), někteří tichomořští lososi r. *Oncorhynchus*, pstruh obecný (*Salmo trutta*), siven americký (*Salvelinus fontinalis*), lín obecný (*Tinca tinca*), amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*), amur černý (*Mylopharyngodon piceus*), aj.) (např. Benfey 1999, Piferrer et al 2009). Zde jsou hlavními důvody zájmu o výzkum a indukci triploidů některé potenciální projevy užitkových vlastností: zvýšený růst triploidů za předpokladu, že sterilita zabrání růstové depresi spojené s pohlavním dozráváním diploidů; snížení sexuálního a teritoriálního chování ryb vedoucí k nižší intenzitě stresu a menšímu plýtvání energií; zvýšené přežití, pokud je reprodukce spojena s vyšší mortalitou diploidů; lepší organoleptická kvalita masa nebo sterilita při vysazování nepůvodních druhů či nepůvodních populací do volných vod.

Klíčovou úlohu v diagnostice polyploidních jedinců má průtoková cytometrie.

2.2. Průtoková cytometrie

Jedná se o přímou metodu stanovení, která vychází z kvantifikace obsahu DNA pomocí průtokového cytometru.

Metoda je velmi rychlá (výsledek je možné znát za několik minut po získání vzorku), přesná (jsou analyzovány velká množství částic – obvykle v řádu tisíců), příprava vzorku je jednoduchá. Je možné stanovovat velikost genomu na základě výpočtu absolutního obsahu DNA, ale především úroveň ploidie stanovené jako relativní obsah DNA. U některých přístrojů lze provádět i manipulační operace – např. třídít buňky s vybranými vlastnostmi (cell sorting). Sortování je určeno především pro vědecké účely.

Jistou nevýhodou je poměrně velká finanční náročnost. Dominantní podíl zde zaujímá pořizovací cena přístroje, významné jsou ale i náklady na „spotřební materiál“ (barvicí roztok, speciální zkumavky, sítko, pipety, injekční stříkačky adt. podle konkrétní situace – tj. minimálně cca 30-50 Kč).

Tato metoda je založena na obarvení cílových částic, resp. jejich jaderné DNA určitým specifickým barvivem. K nejčastěji používaným patří DAPI (4',6 – diamidin – 2 - fenylyndol), fluorescenční barvivo, které se pevně váže na AT bohaté oblasti v DNA (Vinogradov 1998). Pro svou silnou fluorescenci a schopnost procházet buněčnou membránou se běžně používá ve fluorescenční mikroskopii pro obarvení buněčných jader, kromě jaderné DNA se váže i na DNA mitochondriální.

Naše sledování bylo realizováno na přístroji PARTEC PA (Ploidy Analyser; Partec GmbH), využívající k excitaci UV rtuťové lampy, a který je pro svůj poměr cena/výkon, spolehlivost, jednoduchost obsluhy a nastavení využíváný řadou pracovišť. Pro analýzu vzorků byl použit standardně dodávaný roztok CyStain® DNA 1 step (Sysmex CZ s.r.o.), umožňující fluorescenční barvení (UV fluorescenční excitace – emise 435/500nm) fixovaného i nefixovaného materiálu.

Výsledky jsou na přístroji při měření průběžně zobrazovány formou histogramu intenzity fluorescence částic obarvených daným fluoresceinem. V případě nalezení dostatečně kvalitního píku/ů přístroj charakterizuje obsah DNA pomocí modu („mode“; nejčetnější hodnoty), průměru („mean“) a variačního koeficientu („CV%“). V některých případech lze získat dostatečně objektivní výsledek (například úroveň ploidie) i u histogramů nižší kvality, kdy hodnota není modu/průměru není zobrazena, přímým odečtem hodnoty na obrazovce přístroje.

Obr. 1: Průtokový cytometr PA



Je třeba zdůraznit, že získané hodnoty jsou relativní, tj. závisí na okamžitém nastavení přístroje. V případě potřeby se proto používá standard, tj. referenční vzorek, pomocí něž se přístroj nastaví, resp. se získané hodnoty přepočítají. V našem případě byl jako referenční vzorek používán krev diploidního karasa stříbřitého (*Carassius auratus*). C-value erytrocytů při využití průtokové cytometrie se v rámci jednotlivých autorů pro tento druh se pohybuje v rozmezí 1,77 (použitý standard *Homo sapiens*, *Rana temporaria*; Vinogradov 1998) do 2,08 pgDNA.jádro⁻¹ (*M. musculus*; Ojima a Yamamoto 1990) - viz www.genomesize.com.

2.2.1 Měření a příprava vzorků

Pro analýzy bylo použito vzorku tkáně o velikosti cca 0,1-0,2 cm³, v případě krve jedna kapka co nejmenšího objemu. Tkáně byly homogenizovány pomocí nůžek na Petriho misce s 1-1,5 ml barvicího roztoku. Suspenze byla pipetována přes sítko (CellTrics® 30 µm, green; Partec) do měřicí zkumavky, objem doplněn na 2 ml.

V průběhu měření byl přístroj nastaven tak, že výše uvedený standard vykazoval hodnotu 50 (osa X na histogramu), kontrola nastavení byla prováděna vždy po 5 měřených vzorcích. V případě odchylky bylo nastavení přístroje opět upraveno na danou hodnotu. Vzorky byly měřeny 30-45 minut po homogenizaci (ponechány při pokojové teplotě v neprůhledném stojanu), před měřením krátce protřepány.

2.2.2. Kvalita vzorků

Klíčovým pro získání objektivních výsledků je kvalita vzorku, tj odběr vzorku, typ tkáně, druh fixace a stáří vzorku. Cílem dané metodiky je proto popis odběru a fixace vzorků pro použití průtokové cytometrie s přihlédnutím na jejich další využití.

2.3. Vzorky pro analýzu v průtokové cytometrii

V praxi je analýza nejčastěji prováděna ze třech typů tkání: krve (s nebo bez použití heparinu), ploutve (obvykle tzv. „finklipu“) a svaloviny. V některých případech jsou využívány i samčí pohlavní orgány, resp spermie, jikry (ve stadiu očních bodů u kostnatých ryb nebo ve stadiu neurulace u jeseterovitých), vykulený plůdek, resp. jeho ocasní části apod. Vzorky lze měřit buď čerstvé bezprostředně po odběru, nebo fixované.

2.3.1. Odběr vzorků

2.3.1.1. Využití heparinu

Při odběru tří výše uvedených tkání prakticky jen u krve je možný alternativní postup spočívající v použití či nepoužití heparinu. Heparinizace se používá zejména v případech, kdy je měřen hematokrit, počítán počet krvinek apod., kdy je třeba vyloučit tvorbu krevních sraženin. Pokud jsou heparinizovány přímo pomůcky na odběr, tj. injekční jehla/stříkačka, je heparin obsažen v celém krevním vzorku. Použití heparinu však ovlivňuje barvení buněk pomocí DAPI (např. Grossgebauer, 1980). Posouzení možného ovlivnění výsledků měření vzorků krve ryb na průtokovém cytometru bylo předmětem prvního sledovaného okruhu.

2.3.1.2. Odběr a analýza krve

Odběr krve u ryb se obvykle provádí punkcí cév nebo srdce pomocí injekční jehly a stříkačky. Vzhledem k rychlé srážlivosti krve ryb se často využívá heparinizace odběrového náčiní. Z toho důvodu byl proveden test, zda použití heparinu neovlivní výsledek měření na průtokovém cytometru.

K odběru bylo vybráno celkem 59 jedinců ryb: kapr obecný (*Cyprinus carpio*; 12 ks), karas (*Carassius* sp. 13 ks: *Carassius auratus* 9 ks; *C. gibelio* diploidní 3 ks, *C.g.* triploidní 1 ks); sekavec sp.; (12 ks) (diploidní *Cobitis elongatoides*, 9 ks; triploidní *Cobitis elongatoides x tanaitica*, 3 ks), bolen dravý (*Aspius aspius* 12 ks) a keříčkovec červenolemý (*Clarias gariepinus*; 10 ks). Odběr byl realizován za pomoci inzulinové stříkačky (standardní inzulinová stříkačka - OMNICAN 50-50I.U./0,5ML 30GX12 inzulin; B BRAUN - s integrovanou jehlou) z podocasní žíly. Každá ryba byla odebrána čtyřikrát (u sekavců vzhledem k jejich malé velikosti byly realizovány pouze první dva odběry /0, H1/):

Při prvním kontrolním odběru (0) byla použita čistá injekční stříkačka. U druhého odběru (H1) byla použita injekční stříkačka, do které byl 30 minut před odběrem nasát heparin (Heparinum natricum, 5000 UI/1ml), vystříknut a poté opakovaným rychlým pohybem pístu odstraněno maximum zbylé tekutiny. Při třetím (H2) a čtvrtém (H3) odběru byl do stříkačky natažen heparin těsně před odběrem, poté opatrně vystříknut tak, aby zůstal v jehle a na dně stříkačky. V prvních třech odběrech bylo odebráno minimální množství krve, které je postačující pro měření ploidy na průtokovém cytometru (objevení se krve v horní části jehly na dně inzulinové stříkačky, tj. cca < 0,001 ml). U čtvrtého odběru bylo odebráno 0,1 ml krve, ta byla ve stříkačce promíchána.

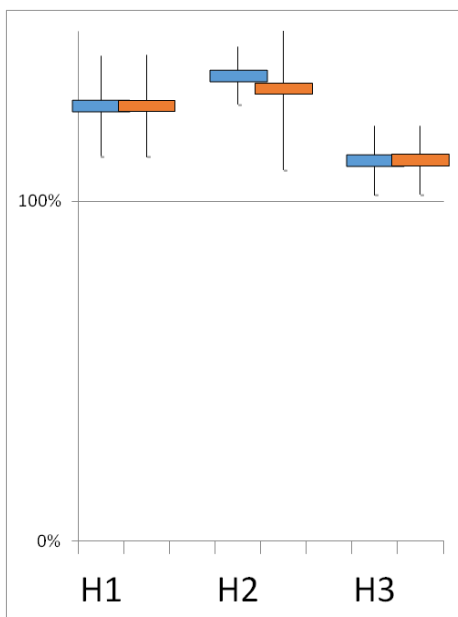
Krev z každého odběru byla následně standardním způsobem zpracována pro analýzu v průtokovém cytometru. Kapka krve byla přidána k 1,5 ml barvicího roztoku (CyStain 1-step), přelita přes sítko do měřicí zkumavky. Měření probíhalo v rozmezí 30 – 60 minut po smísení krve do barvicího roztoku, zkumavky umístěny v polystyrenovém stojanu a ponechány při pokojové teplotě. U každého vzorku po krátkém promíchání realizována tři opakovaná měření, měřen byl modus, průměrná hodnota a CV%. Používán minimální průtok měřené suspenze (obvykle 0,1 ul/s) aby se počet měřených částic pohyboval v řádově desítkách za sekundu. Měřeno bylo vždy minimálně několik tisíc částic. Výsledky měření byly následně zprůměrovány a přepočteny na procentickou hodnotu (kontrolní měření, tj. krev bez přítomnosti heparinu = 100%)

Tab. 1: Hodnoty obsahu DNA při jednotlivých variantách odběru krve (průměrná relativní hodnota vůči odběru bez použití heparinu, v závorce směrodatná odchylka/). Všechny rozdíly modálních i průměrných hodnot byly vzájemně vysoce průkazné vyjma průměrných hodnot H1 x H2.

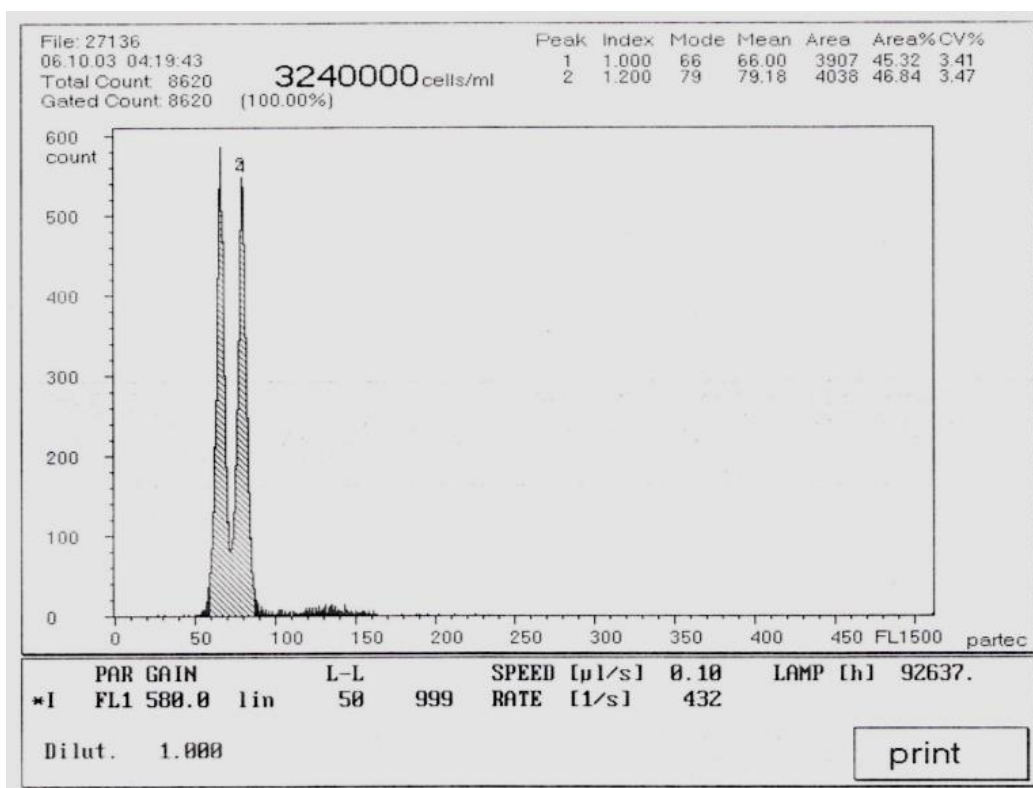
	H1	H2	H3
MODUS	1,28 /0,148/	1,37 /0,085/	1,12 /0,101/
PRŮMĚR	1,28 /0,150/	1,33 /0,238/	1,12 /0,100/
CV%	2,42 /0,520/	3,05 /0,623/	2,96 /0,587/

Získané výsledky ukázaly, že použití heparinu výrazně ovlivnilo výsledky měření, kdy došlo k navýšení hodnot až o takřka 40%. Vliv heparinu byl patrný i při odběru většího množství krve (> 0,1 ml).

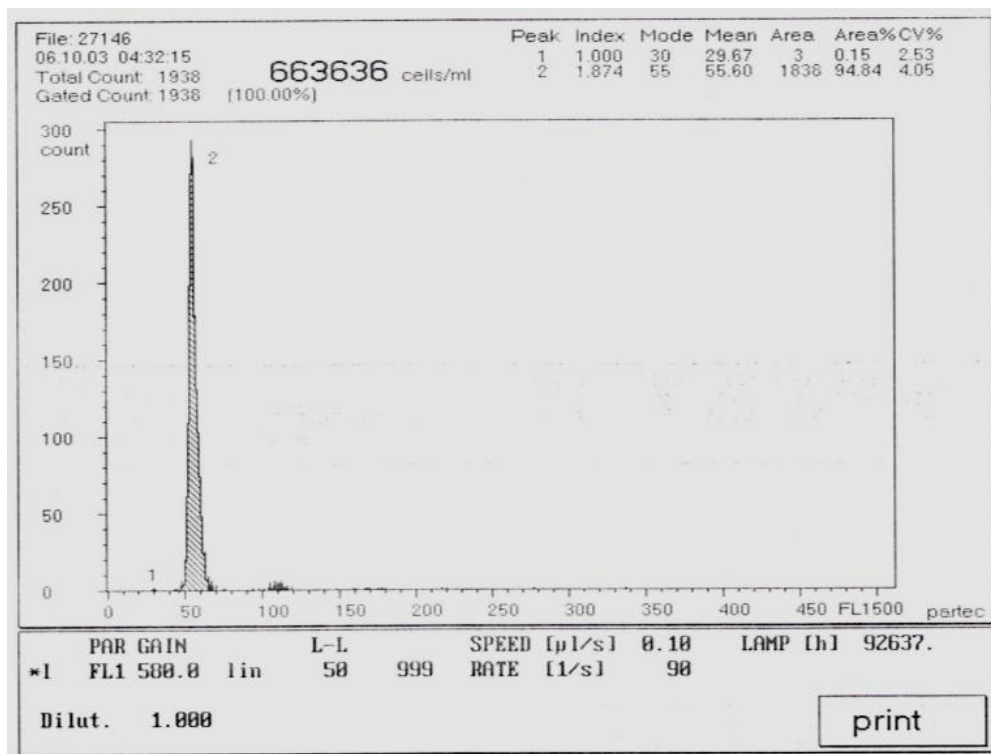
Obr. 2.: Rozdíly v naměřené hodnotě obsahu DNA při jednotlivých variantách odběru krve (modus – modře, průměr – oranžově, 100% odběr bez aplikace heparinu))



Obr. 3.: Histogram výsledku měření krve téhož jedince kapra obecného při různém způsobu odběru (levý pík varianta H1 – „mean“ 66,00; pravý pík H2 – 79,18)



Obr. 4.: týž jedinec při měření krve odebrané bez aplikace heparinu („mean“ 55,60)



Vzhledem k tomu, že ovlivnění získaných hodnot je výrazné (např. při posuzování ploidie by triploidní jedinec byl takto identifikován jako tetraploidní), je třeba použití heparinu při odběrech krve zvážit.

V případě odběru jen malého množství krve (například u malých jedinců nebo se zřetelem na minimalizaci stresové zátěže) je nutné heparin nepoužívat. V případě potřeby většího množství krve nebo nutnosti použít heparin vzhledem k dalším měřením je třeba minimalizovat jeho množství a odebrat krev o objemu větším než 0,1 ml (je však otázkou, zda v tomto případě bude mít nižší koncentrace heparinu požadovaný efekt). Lze doporučit i v tomto případě nepoužívat v rámci jednoho měření vzorky odebrané bez a s aplikací heparinu.

2.4. Tkáň

2.4.1. Měření čerstvého materiálu.

2.4.1.1. Krev

Vzorky krve lze u ryb dosahujících určité minimální velikosti (cca 2-3 cm) získat poměrně dobře a to i bez usmrcení jedince. Vhodný je odběr z podocasní žíly, k měření postačí zcela malé množství krve (při odběru inzulinovou stříkačkou zcela postačí množství, kdy se krev začne objevovat nad koncem jehly na dně stříkačky). Odebírá se u živých jedinců, lze zkusit odebrat i u čerstvě usmrcených ryb.

2.4.1.2. Ploutev

Lze odebírat u živých, čerstvě usmrčených nebo i fixovaných ryb. Je možno využít i finklipů odebraných pro účely molekulárně-genetických analýz. U čerstvých nebo kvalitně fixovaných postačí ploutev o ploše několika desítek mm² (u genetických zdrojů ryb je podle §4, odst. c) vyhl. MZe č. 72/2017 Sb. dostačující odštížek ploutve 50 mg). V případě samců není vhodné odebírat z řitní ploutve, která bývá zejména v období výtěru pokryta spermii, které pak při měření mohou vytvářet další samostatný pík.

2.4.1.3. Svalová tkáň

Odebírá se u usmrčených jedinců, obvykle čerstvých, lze ale zkusit odběr i fixovaných ryb. U čerstvých nebo kvalitně fixovaných postačí sval o objemu několika desítek mm³.

2.4.2. Měření vzorků jednotlivých tkání

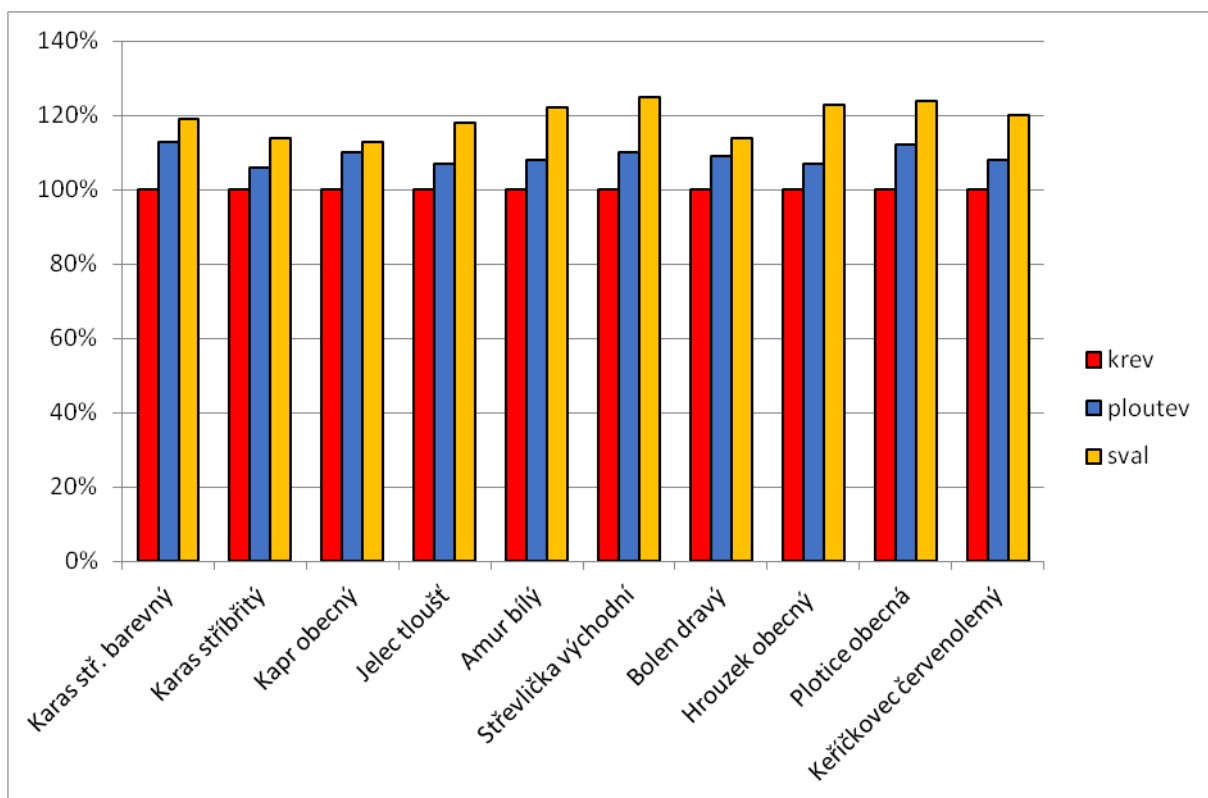
V rámci tohoto okruhu byl sledován možný rozdíl v hodnotách při měření na průtokovém cytometru v závislosti na druhu měřené tkáně.

Sledováno bylo celkem 104 ks ryb: karas stříbřitý (*Carassius gibelio* 3n) (8 ks), karas stříbřitý (*Carassius gibelio* 2n) (11 ks), kapr obecný (*Cyprinus carpio*) (15 ks), hrouzek obecný (*Gobio obtusirostris*) (12 ks), plotice obecná (*Rutilus rutilus*) (5 ks), jelec tloušť (*Squalius cephalus*) (6 ks), podoustev (*Vimba vimba*) (5 ks), amur bílý (*Ctenopharangodon idella*) (18 ks), střevlička východní (*Pseudorasbora parva*) (6 ks), bolen dravý (*Aspius aspius*) (10 ks) a keříčkovec červenolemý (*Clarias gariepinus*) (10 ks). Každému jedinci byla odebrána krev, po usmrcení pak vzorek prsní ploutve a svalové tkáně ze hřbetní oblasti (bez kůže). Vlastní měření probíhalo analogicky jako v předchozí části. Při měření pevné tkáně byla tato homogenizována pomocí nůžek na Petriho misce s cca 2 ml barvicího roztoku a poté suspenze přepipetována přes sítko do zkumavky, v níž probíhalo měření.

Výsledky měření získané od každého jedince byly přepočteny na relativní hodnoty, kdy hodnota krve byla použita jako referenční, tj. 100%.

Jak dokládá níže uvedený graf, hodnoty obsahu DNA jednotlivých orgánů se u všech sledovaných druhů ryb lišila. Hodnoty naměřené u ploutví jsou tak v průměru až o 10 % vyšší než u vzorků krve, v případě svalů až o takřka 20 % a byl tak nalezen vysoce průkazný statistický rozdíl.

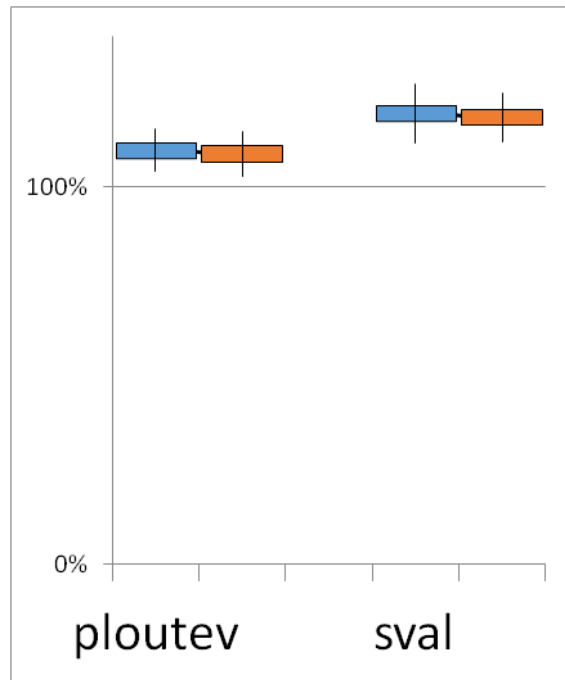
Obr. 5: Relativní hodnoty obsahu DNA u jednotlivých druhů ryb při měření krve, ploutve a svalové tkáně (jednotlivé sloupce vyjadřují vždy zprůměrované hodnoty „modu“ a „průměru“ dané tkáně jedinců jednotlivého druhu).



Tab. 2.: Statistická průkaznost rozdílů průměrných hodnot obsahu DNA stanovených podle krve, ploutve a svalu u jednotlivých druhů ryb (* - 0,05; ** - 0,01; *** - 0,001)

		Karas stř. barevný	Karas stříbřitý	Kapr obecný	Jelec tloušť	Amur bílý	Stěvlička východní	Bolen dravý	Hrouzek obecný	Plotice obecná	Keříčkovec červenolemý
krev x ploutev	modus	***	**	***	**	***	***	***	***	***	*
	průměr	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
krev x sval	modus	***	***	*	***	***	***		***	***	***
	průměr	***	*	***	***	**	***	***	***	***	
ploutev x sval	modus	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	průměr	**	***	***	***	***	***	**	***	**	***

Obr. 6.: Relativní průměrné hodnoty (modus a průměr) obsahu DNA u sledované skupiny ryb při měření u jednotlivých typů tkáně (modus – modře, průměr – oranžově; krev = 100%).

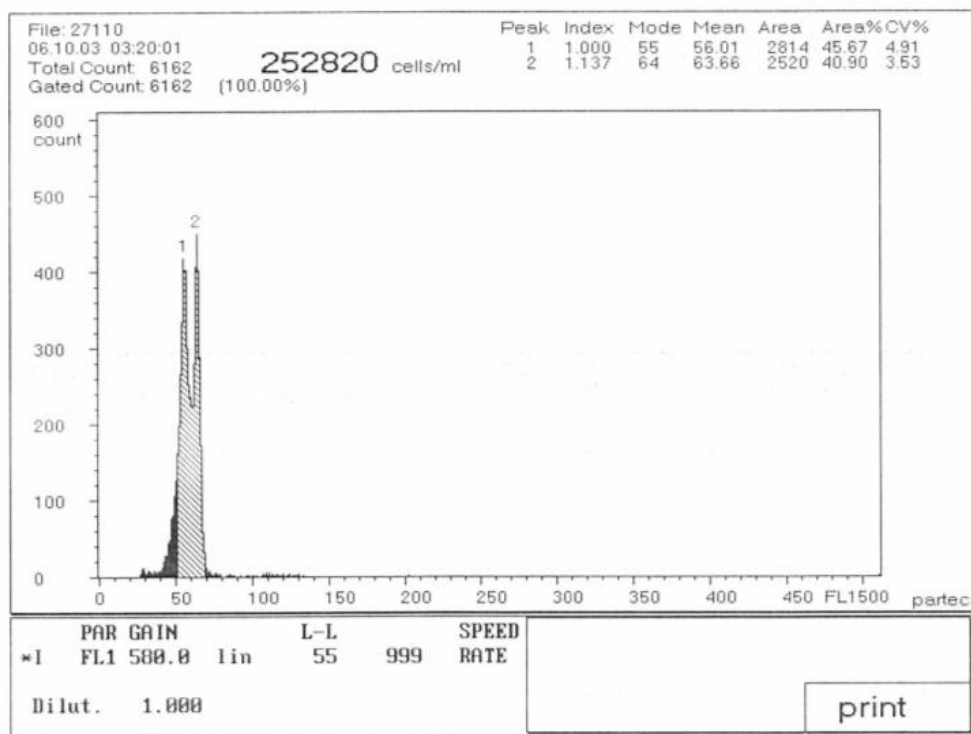


Tab. 3: Hodnoty obsahu DNA získané při měření jednotlivých vybraných tkání (průměrná relativní hodnota vůči krvi, v závorce směrodatná odchylka/). Všechny rozdíly modálních i průměrných hodnot byly vzájemně vysoce průkazné.

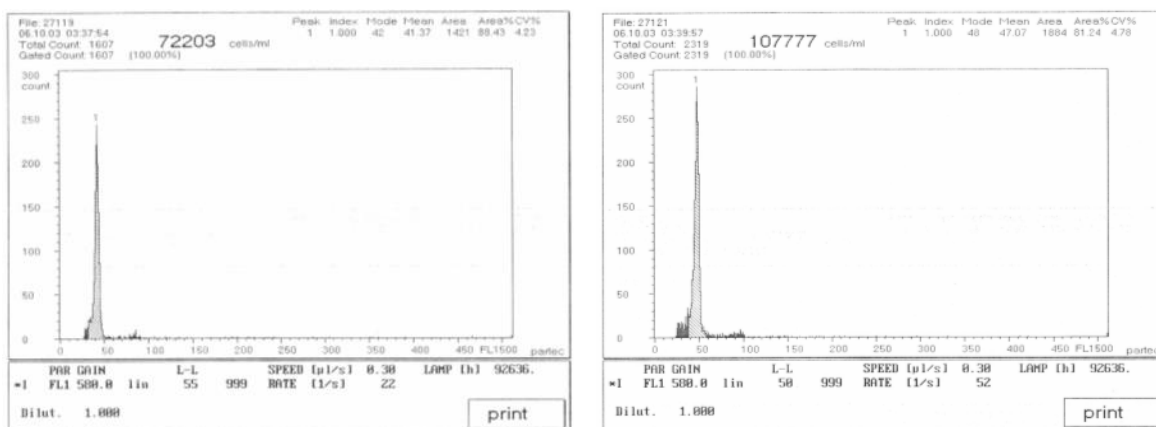
	ploutev	sval
MODUS	1,099 /0,056/	1,195 /0,077/
PRŮMĚR	1,087 /0,059/	1,185 /0,065/
CV%	5,340 /1,020/	4,983 /0,985/

Lze tedy doporučit při měření určitá skupiny jedinců provádět měření na témže orgánu, v případě nutnosti použít odlišný orgán je nutno počítat s výše uvedenými rozdíly.

Obr. 7.: Histogram měření obsahu DNA vzorku krve (levý pík) a ploutve (pravý pík) téhož jedince kapra obecného



Obr. 8.: Histogramy měření obsahu DNA ploutve („mean“ 41,37) a svalů („mean“ 47,07) téhož jedince bolena dravého



2.5. Fixace

2.5.1. Druhy fixace

Fixací se rozumí konzervace buněk a tkání aby se zabránilo jejímu rozkladu - autolýze - (zejména působením buněčných enzymů) i heterolýze (poškození tkání

mikroorganismy) zkoumaného materiálu a zamezil se růst bakterií a plísní. Při fixaci dochází k denaturaci proteinů, takže fixovaný materiál již není totožný s nativní tkání.

Metody fixace mohou být fyzikální či chemické. K fyzikálním metodám fixace patří použití nízkých teplot. Je využíváno skutečnosti, že činnost enzymů je vázána na vodné prostředí, proto ustane, když ovlivníme transportní funkci vody. Chemické metody fixace jsou založeny na denaturaci bílkovin pomocí chemických fixačních prostředků. K fixaci lze použít celou řadou fixačních prostředků a tekutin, avšak nejrozšířenější jsou dva způsoby: fixace aldehydy, které příčně svazují polypeptidové řetězce proteinů, a tak tkáň zpevňují, a koagulační fixativa, nejčastěji alkoholy.

Druh použité fixace spolu se stářím vzorku jsou významným faktorem pro úspěšnou analýzu pomocí průtokového cytometru. V praxi výběr fixace záleží často na potřebě využít daný vzorek na další účely, tj. zejména molekulárně-genetické analýzy. V tom případě je nejčastějším fixativem alkohol v koncentraci 75 – 96 %. V některých případech, zejména když je fixován celý jedinec nebo je primárně potřeba provádět například histologické studie nebo allozymovou elektroforézu, je používám formaldehyd nebo jsou buď vybrané orgány/tkáně nebo celí jedinci zmrazeni.

2.5.1.1. Alkohol

V případě vzorků určených pro průtokovou cytometrii se provádí nejčastěji fixace alkoholem. Jedním z důvodů je, v případě použití čistého, nedenaturované alkoholu, možnost použít takto fixované vzorky pro další molekulárně-genetické analýzy. K dobré fixaci je nutno použít roztok o koncentraci vyšší než 70%. Při fixaci je však třeba počítat s ředěním fixačního roztoku vodou ze vzorku, je proto lépe použít alkohol o vyšší koncentraci a v dostatečném objemu. To může být problematické při fixaci vzorku o objemu srovnatelném s použitou fixační nádobou, kdy i použití 96% alkoholu nezajistí dostatečnou výslednou koncentraci dosahující výše uvedených 70%.

Ověřit úspěšnost fixace alkoholem o různých koncentracích a dobu použitelnosti vzorku pro analýzu na průtokovém cytometru byl jedním z cílů této metodiky. Současně byly ověřeny ještě dva další způsoby fixace – pomocí formaldehydu a pomocí mrazu.

2.5.1.2. Formaldehyd

Formaldehyd se používá jako vodný roztok 35 – 40% formaldehydu, který se přidává do fixačních tekutin nebo také samostatně jako 4 – 10% roztok. Je jedním z nejpoužívanějších fixačních prostředků v histologii, ale také se používá při fixaci celých menších živočichů. Je možné jej používat samostatně, jinak se také vyskytuje jako

součástí fixačních tekutin. Jeho výhodou je dobré srážení bílkovin, zachovávání mitochondrií, nerozpouští tuky a tkáně je v něm možné uchovávat delší dobu. Je třeba pamatovat, že formaldehydové páry jsou silně agresivní a dráždí všechny sliznice a roztoky formaldehydu působí dráždivě na kůži.

Jeho možné použití pro průtokovou cytometrii bylo zvoleno z důvodu jeho častému využívání u muzejních vzorků organismů nebo histologických vzorků, kdy výše uvedená fixáž alkoholem není dostatečně kvalitní.

2.5.1.3. Zmražení

Nejedná se o typickou fixaci pro průtokovou cytometrii, bývá však využívána v případě vzorků allozymové elektroforézy, zmražení se používá i v rybářské praxi. Zmražené vzorky lze využít i pro molekulárně-genetické analýzy, ne však pro histologii.

2.5.2. Fixace a měření fixovaných vzorků.

Pro ověření metodiky vhodné fixáže a doby použitelnosti vzorku pro průtokovou cytometrii bylo zvoleno 6 způsobů:

1/ 1% roztok formaldehydu

2/ 4% roztok formaldehydu

3/ 50% roztok alkoholu

4/ 70% roztok alkoholu

5/ 96% roztok alkoholu

6/ zmražení na -10°C

Fixována byla svalová tkáň celkem 18 jedinců 3 druhů ryb (karas stříbřitý *Carassius gibelio*; 6 diploidních a 6 triploidních jedinců; plotice obecná *Rutilus rutilus* 3 jedinci; kapr obecný *Cyprinus carpio* 3 jedinci). Pro zachování stejných podmínek fixáže a omezení ředění fixáže byly označené pásky svaloviny jednotlivých jedinců dány hromadně do nádob o objemu 500 ml s danou fixáží (v případě mrazu do mrazničky, jednotlivé vzorky umístěny do malých plastových sáčků s uzávěrem, před uzavřením v maximální možné míře minimalizovat obsah vzduchu).

Nefixované vzorky byly měřeny po odebrání, fixované 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 a 300 dní od fixace.

Obdobně jako u svalové tkáň byla provedena u těchto ryb i fixace ploutve. Vzhledem k menšímu množství tkáně byla provedena jen dvě měření a to 120 a 300 dní po fixaci.

Vlastní měření probíhalo analogicky jako v případě měření pevných tkání v předchozí části. K homogenizaci bylo použito větší množství tkáně (0,1- 0,2 cm³), před zákrokem umístěné na 20 minut do fyziologického roztoku. Vzhledem k nižšímu počtu

měřitelných částic byla rychlost průtoku suspenze vyšší než v předchozích, obvykle 1 – 2 ul/s, tak aby byla zachována intenzita měření v desítkách částic za sekundu.

Sledována byla kvalita vzorku (histogramu na průtokovém cytometru), změna naměřené hodnoty obsahu DNA u jednotlivých fixativ a to ve vztahu ke stáří vzorku. Kvalita vzorku byla hodnocena podle následující stupnice A - E, kdy rozhodující byla kvalita/přítomnost píku, množství „šumu“ způsobeného fragmenty buněk a schopnost přístroje vypočítat hodnotu modus/průměr/CV%:

A – kvalitní pík bez přítomnosti „šumu“, přístrojem byla vypočtena hodnota modus/průměr/CV% (CV% < 5);

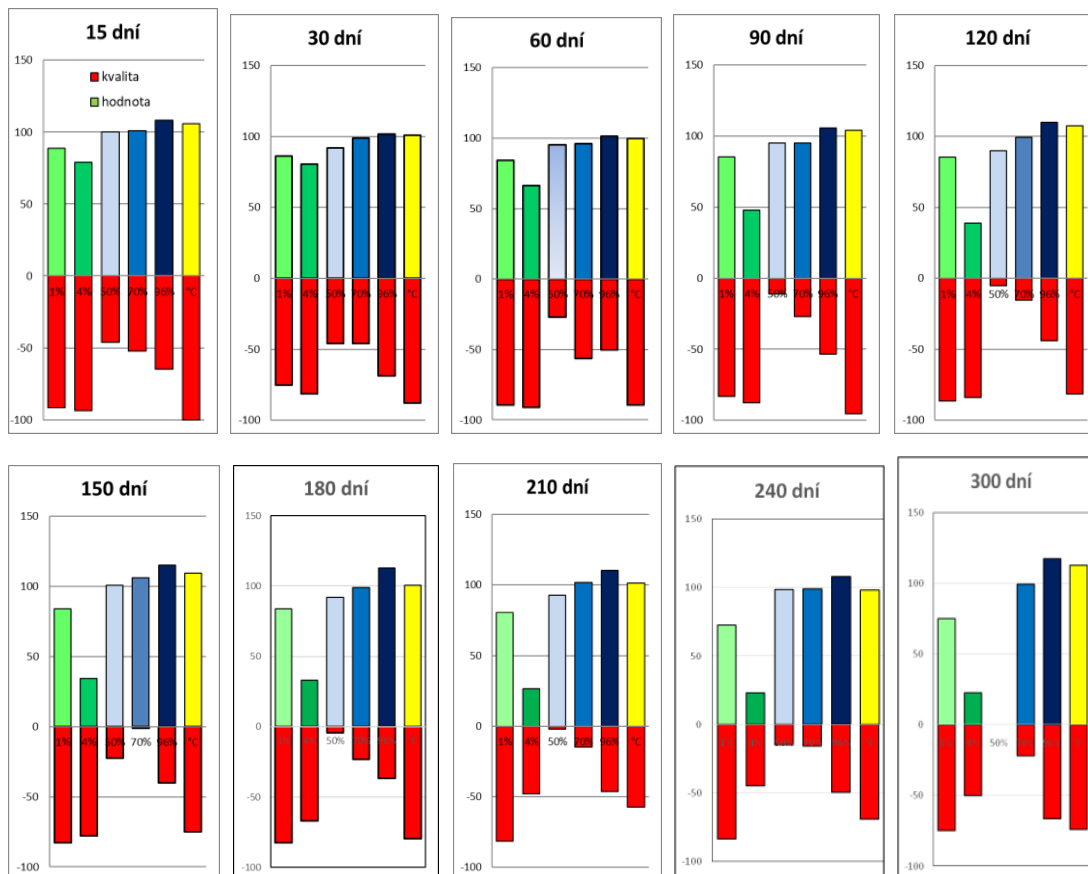
B - pík horší kvality s přítomností šumu (CV% > 5), přístrojem vypočtena hodnota modus/průměr/CV%;

C - pík sice relativně kvalitní ale hodnota modus/průměr/CV% nebyla přístrojem vypočítána, hodnotu píku lze však pro potřeby detekce úrovně ploidie spolehlivě stanovit;

D - pík horší kvality, hodnota modus/průměr/CV% nebyla vypočítána, polohu píku lze určit spíše spekulativně;

E – množství šumu zcela bez existence píku, hodnota modus/průměr/CV% nebyla vypočítána ani nelze odhadnout.

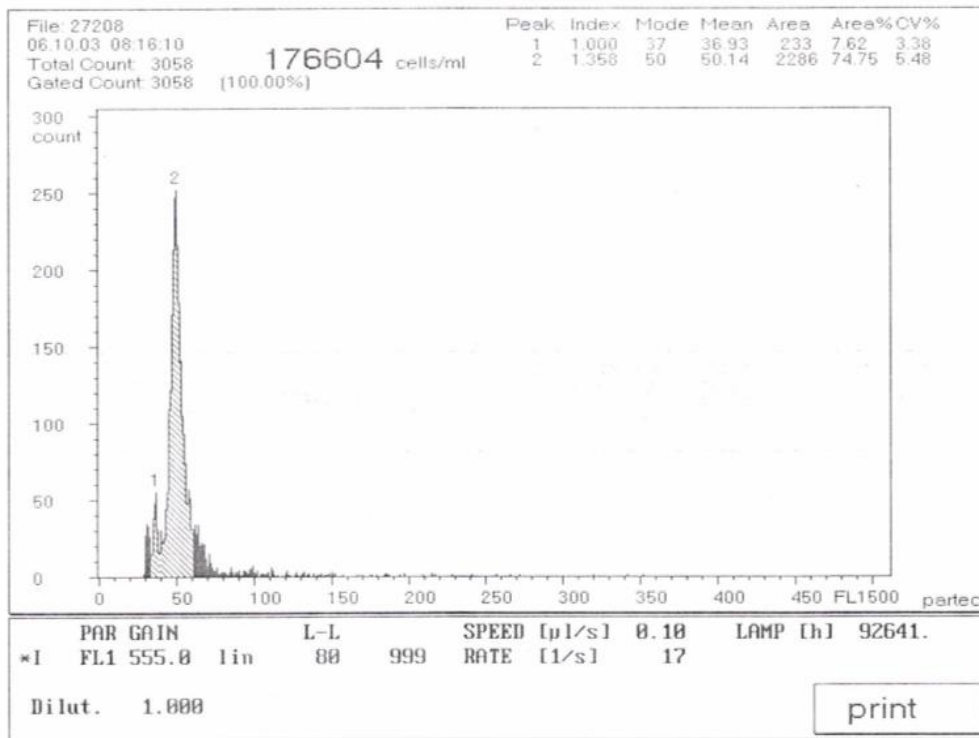
Obr. 9.: Průměrné naměřené hodnoty obsahu DNA (horní část grafu) a kvality histogramu (dolní část grafu) u měřených vzorků svalové tkáně 15 až 300 dní od fixace u jednotlivých druhů fixáže (1% formaldehyd, 4% formaldehyd, 50% alkohol, 75 % alkohol, 96% alkohol, zmražení).



Byly zaznamenány výrazné rozdíly jak v naměřené hodnotě obsahu DNA, tak i v kvalitě histogramu u jednotlivých druhů fixáže.

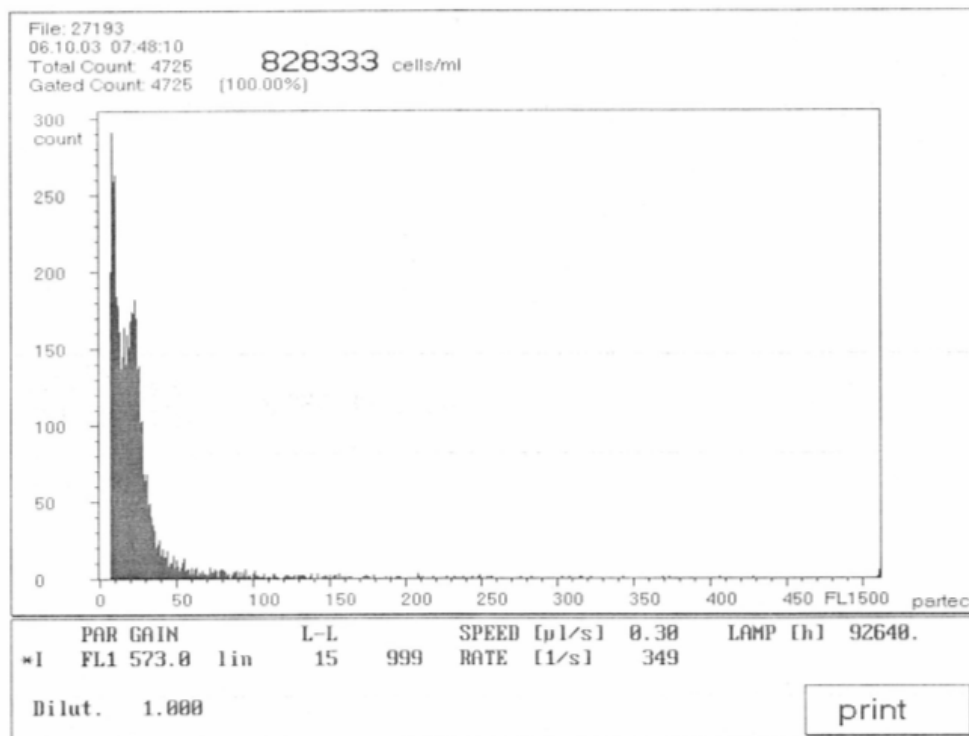
1/ 1% formaldehyd – dochází ke snížení naměřených hodnot (na konci experimentu pokles v průměru na 75%) kvalita histogramu však zůstává vysoká, zpracovatelnost vzorku lze garantovat minimálně po dobu jednoho roku

Obr. 10.: Histogram měření obsahu DNA triploidního jedince karase stříbřitého fixovaného 180 dní v 1 % formaldehydu, naměřená hodnota je o cca 1/3 nižší než původní, kvalita histogramu („B“) však stále umožňuje výpočet jednotlivých ukazatelů.



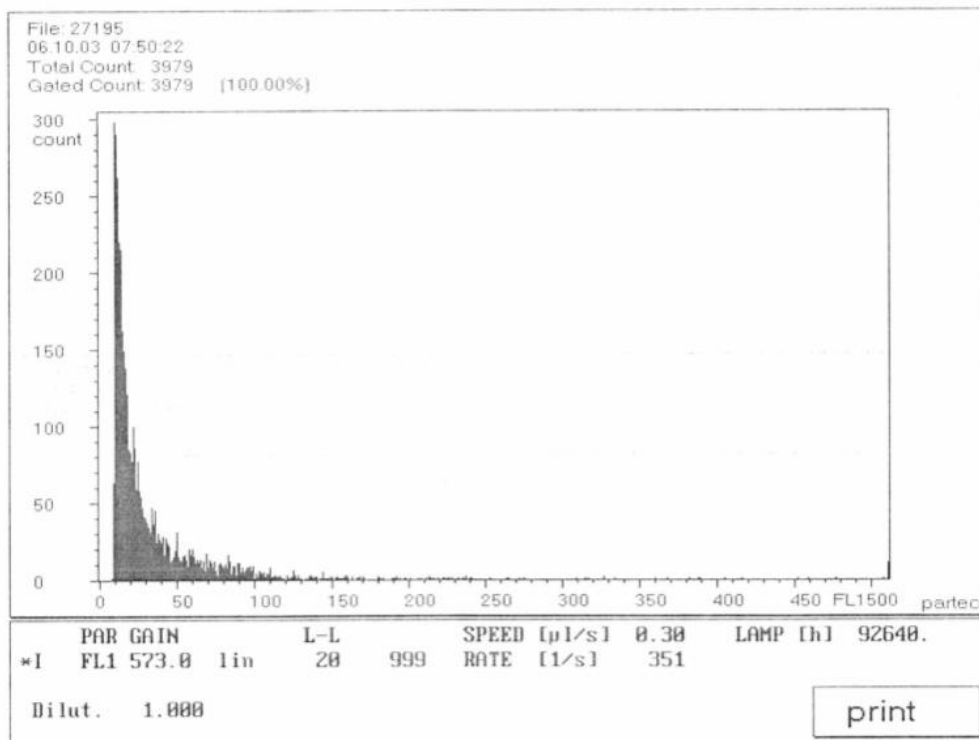
2/ 4% formaldehyd – snížení naměřených hodnot výraznější než u 1% formaldehydu (pokles až na 25%), čímž v některých případech již nelze odečíst i když kvalita histogramu zůstává vysoká (zejména v případě, že daný druh ryby má hodnotu obsahu DNA nízkou (např. plotice)), vzorky je nutno zpracovat v průběhu několika měsíců

Obr. 11.: Histogram měření obsahu DNA triploidního jedince karase stříbřitého fixovaného 180 dní v 4 % formaldehydu, naměřená hodnota se již značně liší od hodnoty původní (pokles o cca 2/3), lze pozorovat zřetelný, objektivně měřitelný pík, kvalita histogramu „C“.



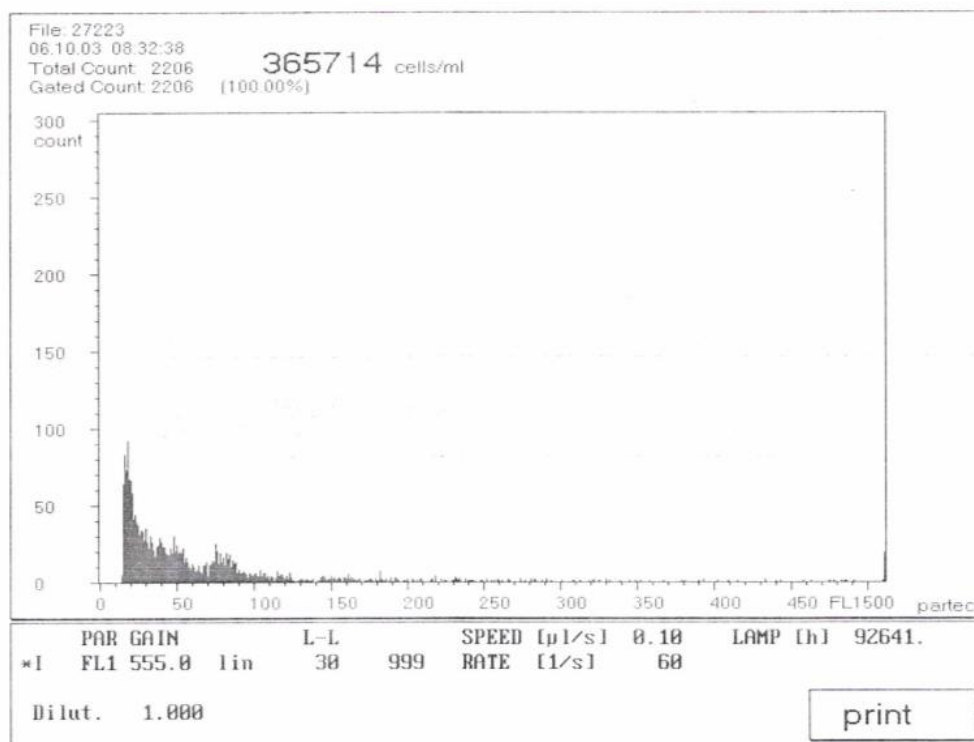
3/ 50% roztok alkoholu – i když naměřená hodnota obsahu DNA zůstává zachována, kvalita vzorku rychle klesá, nutno zpracovat v průběhu několika týdnů

Obr. 12.: Histogram měření vzorku karasa stříbřitého fixovaného 180 dní 50% alkoholem, obsah DNA nelze stanovit ani na spekulativní úrovni, kvalita histogramu „E“



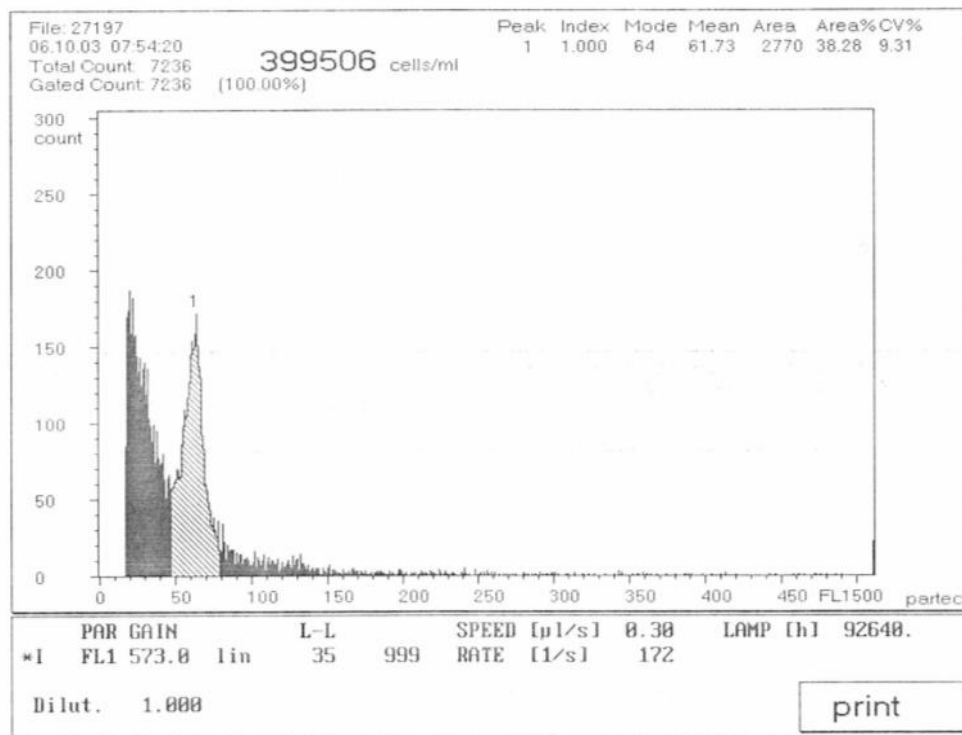
4/ 70% roztok alkoholu – i zde zůstává hodnota obsahu DNA zachována, uchování vzorku poněkud lepší než u alkoholu nižší koncentrace

Obr. 13.: Histogram měření obsahu DNA triploidního jedince karasa stříbřitého fixovaného 180 dní v 70% alkoholu, i když zřetelnost píku je spíše spekulativní, hodnota je však zachována, kvalita histogramu „D“.



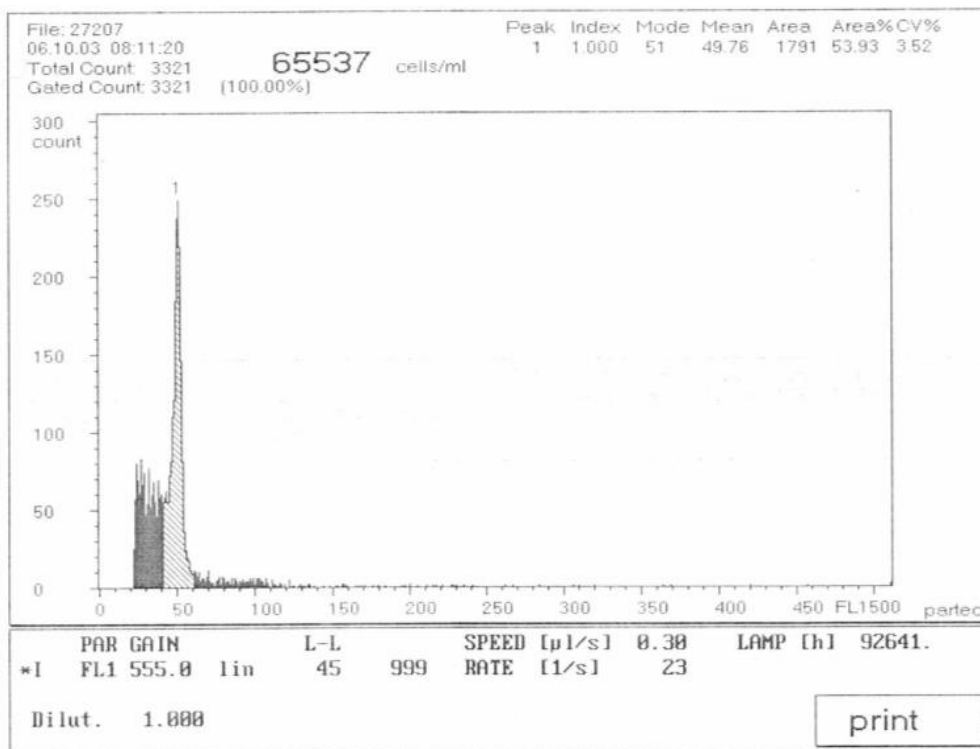
5/ 96% roztok alkoholu – hodnota obsahu DNA zůstává zachována, resp. dochází k mírnému zvýšení, kvalita vzorku kolísá, lze předpokládat měřitelnost vzorků po dobu několika měsíců

Obr. 14.: Histogram měření diploidního jedince karasa stříbřitého fixovaného 300 dní v 96% alkoholu, i když je kvalita poněkud snížena, stále umožňuje výpočet jednotlivých hodnot, poloha píku přibližně odpovídá počáteční hodnotě, kvalita histogramu „B“.



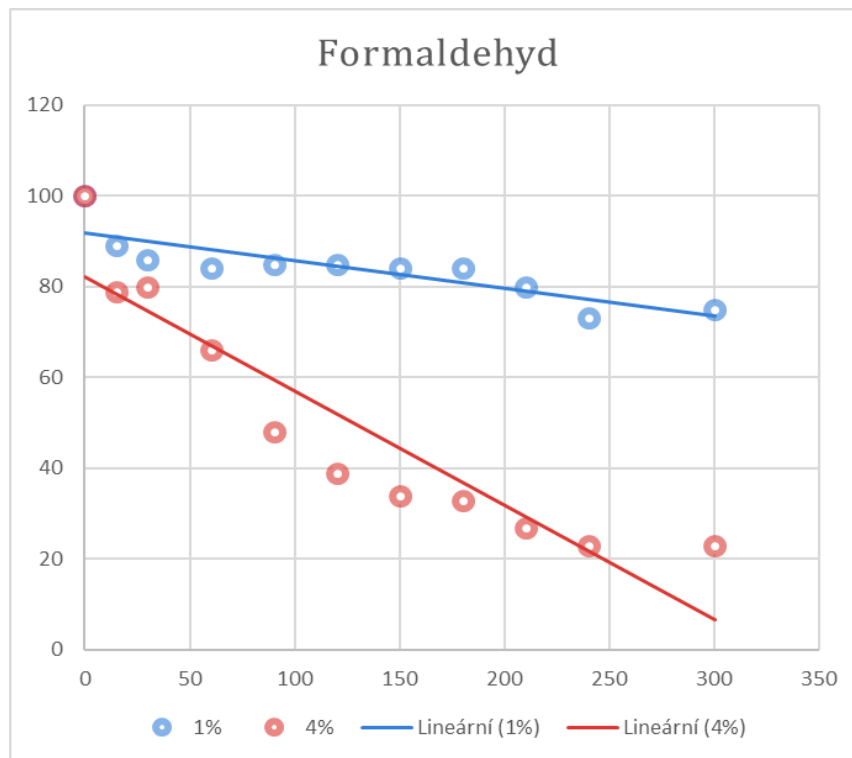
6/ zmražení - hodnota obsahu DNA stálá, kvalita měření zůstává zachována i po dobu několika měsíců, lze předpokládat i výrazně více

Obr. 15.: Histogram měření obsahu DNA svalu karasa stříbřitého fixovaného po dobu 300 dní mrazem, i přes dlouhodobou fixaci lze získat výsledky sice s přítomností „šumu“ ale v dostatečné kvalitě a v hodnotě odpovídající čerstvému vzorku, kvalita histogramu „B“.



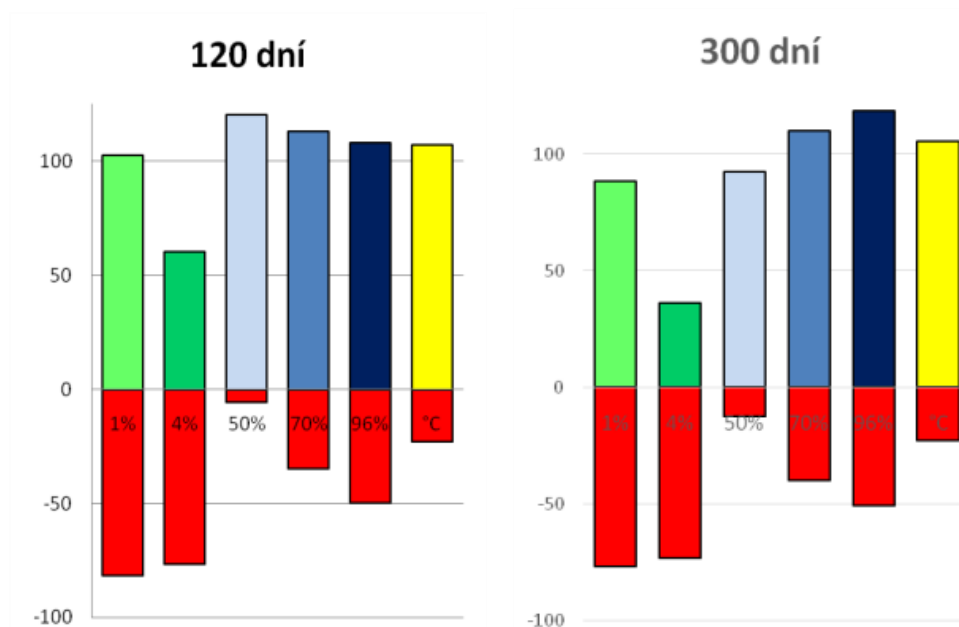
Vzhledem ke změnám v naměřené hodnotě v závislosti na druhu fixáže a době fixace vyplývá potřeba v rámci měření dané skupiny ryb použít shodnou fixáž a provést měření v úzkém časovém intervalu.

Obr. 16.: Pokles naměřených hodnot obsahu DNA u vzorků fixovaných formaldehydem (o koncentraci 1 a 4%) v průběhu experimentu



Výše uvedené u fixované svalové tkáně závěry platí do jisté míry i v případě fixované ploutve, významný je ale pokles kvality měření v případě zmrazení. Bohužel tedy tento způsob fixace, vykazující prakticky nejlepší výsledek v případě svalů nelze u ploutví doporučit. Zdá se, že jemná tkáň ploutevního lemu v mrazu degraduje a pro zachování vyšší kvality by bylo potřeba speciálních technik, například doplnění fixáží, čímž dochází ke ztrátě jednoduchosti tohoto typu uchování vzorku. Tyto postupy jsou tak již mimo rámec dané metodiky zaměřené spíše na praktické využívání dané techniky v běžné praxi (rybářské provozy, terénní výzkumy).

Obr. 17.: Průměrné naměřené hodnoty obsahu DNA (horní část grafu) a kvality histogramu (dolní část grafu) u měřených vzorků ploutve 120 a 300 dní od fixace u jednotlivých druhů fixáže (1% formaldehyd, 4% formaldehyd, 50% alkohol, 75 % alkohol, 96% alkohol, zmražení)



Tab. 4: Porovnání základních parametrů u sledovaných typů fixáže

parametr	typ fixáže		
	formaldehyd	alkohol	zmražení
náklady	nízké	vyšší, zejména při použití čistého alkoholu	nutnost permanentního chlazení
ovlivnění měřených hodnot	postupem času výrazné	sval minimální, ploutev výrazný	sval minimální, ploutev výrazný
pokles kvality vzorků	nízký	výrazný	sval nízký, ploutev výrazný
možnost jiného využití	histologie	molekulárně-genetické analýzy, omezeně histologie	molekulárně-genetické analýzy, elektroforéza
zdravotní rizika	dráždivý, toxický	toxický	nejsou

2.6. Metodická doporučení

Odběr krve

Nevhodnost heparinizace odběrového náčiní při použití barvení roztokem DAPI, zejména u jedinců, u nich nelze počítat s odběrem většího množství krve.

Měření různých tkání

Nutnost přihlížet při vyhodnocování výsledků k typu použité tkáně, nejlépe používat v rámci hodnocené skupiny stejný typ.

Způsob fixace a doba zpracovatelnosti vzorku

Nutnost zabezpečit odpovídající doporučení koncentrace fixáže zejména v případě alkoholu.

Některé druhy fixace jsou časově dosti omezené, k zajištění kvalitního měření nutnost zpracovat v krátkém časovém horizontu.

U vzorků fixovaných s použitím formaldehydu výrazně klesá v závislosti na stáří vzorku hodnota získaná při měření na průtokovém cytometru.

V případě použití vzorku ploutví lze doporučit zpracování v co nejkratším časovém intervalu (cca v řádu týdnů), fixace mrazem nebo alkoholem o nízké koncentraci nelze doporučit.

3. Novost metodiky

V současné době není k dispozici adekvátní zdroj literatury zabývající se uceleně problematikou vzorků využívaných v rámci detekce velikosti genomu ryb pomocí průtokové cytometrie. V rámci metodiky byly ověřeny vybrané postupy tematicky spadající do přípravy vzorků, které se v průběhu předchozí mnohaleté práci na průtokovém cytometru ukázaly jako významné. Metodika shrnuje faktory odběru vzorků, rozdíly ve výsledcích při měření jednotlivých tkání (ploutev, sval, krev) a na základě ucelené série měření udává rozdíly v zachování kvality vzorků při použití různých druhů fixází (formaldehyd, alkohol, zmražení).

4. Popis uplatnění certifikované metodiky

Předložená metodika je určena pro praktické využití jednak při analýze vzorků ryb na průtokovém cytometru, ale i při odběru těchto vzorků a to jak z v rámci chovu ryb tak i v rámci výzkumu. Metodika bude uplatněna „Smlouvou o uplatnění certifikované metodiky“ uzavřenou mezi Ústavem biologie obratlovců v.v.i., Mendelovou univerzitou v Brně a Veterinární a farmaceutickou univerzitou Brno.

5. Ekonomické aspekty

Ekonomické aspekty lze rozdělit do několika skupin:

Pro uživatele metodiky dojde k omezení nákladů na analýzy nečitelných vzorků – i když jsou náklady na analýzu jednoho vzorku ve srovnání s jinými molekulárně-genetickými metodami poměrně nízké, přesto představují sumu cca 30 – 50 Kč (jednorázové speciální jednorázové zkumavky, sítko, barvicí a čistící roztoky, obsluha přístroje). U skupiny několika desítek analyzovaných vzorků to tak znamená ztrátu i několika tisíc korun.

Dobrá kvalita vzorku výrazně ovlivňuje i čas na analýzu, neboť u vzorků nižší kvality je třeba například častěji upravovat nastavení přístroje, opakovat měření či přípravu vzorku. Dochází tak k mnohonásobnému navýšení časové náročnosti a tím i nákladů na obsluhu.

V případě znalostí o možnostech fixáže, lze minimalizovat náklady spojené s odběrem vzorků, zejména jsou-li spojeny s odchovem jedinců, exkurzí či náročným odlovem (optimální druh fixáže pro daný projekt, dodržení vhodných termínů analýz, apod.).

Špatná interpretace výsledků (pokud například nebyly brány v úvahu možné změny, zapříčiněné použitím heparinovaných odběrných pomůcek, analýzou různých tkání, použitím více způsobů fixáže nebo měření v různých časových odstupech po odběru) může mít následně významný dopad na účel, kvůli němuž byly analýzy realizovány, ať již se jedná o produkční účely či vědecký výzkum.

Celkový ekonomický přínos pro uživatele metodiky lze odhadnout podle počtu analyzovaných vzorků a náročnosti na jejich získávání a laboratorní zpracování na několik desítek tisíc korun ročně.

6. Poděkování

Metodika vznikla za finanční podpory Technologické agentury České republiky Programu aplikovaného výzkumu, experimentálního vývoje a inovací GAMA - Komerzializace výsledků zoologického výzkumu - aplikace využitelné v praktické ochraně přírody TG03010048 a NAZV Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012-2018 „KUS“ QJ1510077. Metodika je výsledkem řešení výzkumných projektů, které sloužily k podpoře rozvoje výzkumných organizací - ÚBO AV ČR v.v.i. a Mendelovy univerzity v Brně.

7. Seznam použité související literatury

Amberg D. C., Burke D. J., Strathern J. N., 2006: Yeast Vital Stains: DAPI Stain of Nuclear and Mitochondrial DNA. Article in Cold Spring Harbor Protocols

Benfey T.J., 1999: The physiology and behaviour of triploid fishes. Rev. Fish. Sci. 7: 39-67

Dellinger M., Geáze M., 2001: Detection of mitochondrial DNA in living animal cells with fluorescence microscopy. Journal of Microscopy, 204, 3: 196-202

Flajšhans M., Petr Ráb P., 2013: Polyploidie u ryb Živa 6: 261-264

Grossgebauer K., 1979: Staining of acid mucopolysaccharides appearing on and in various cell types by DAPI. Microsc Acta. Nov;82(3):291-3.

Grossgebauer K., 1980: Fluorescent staining of nuclear envelope coated with heparin. Microsc Acta. 83(1):49-54.

Le Comber S. C., Smith C., 2004: Polyploidy in fishes: patterns and processes. Biological Journal of the Linnean Society, 82: 431–442

Ojima, Y. and K. Yamamoto (1990). Cellular DNA contents of fishes determined by flow cytometry. *La Kromosomo II* 57: 1871-1888. - [Species listed](#) | Record id: [359]4

Piferrer F., Beaumont A., Falguière J-C., Flajšhans M., Haffray P., Colombo L., 2009: Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture, 293, 3–4: 125-156

Svobodová Z., Pravda D., Modrá H., 2012: Metody hematologického vyšetřování ryb. Vodňany: Edice metodik Fakulty rybářství a ochrany vod, 122: 38 s.

Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. Cytometry 1983; 3: 328 –331

Vinogradov AE. Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship. Cytometry 1998; 31:100 –109.

Williamson D. H., Fennell D. J., 1979: Visualization of yeast mitochondrial dna with the fluorescent stain “DAPI” Methods in Enzymology Volume 56: 728-733

<http://www.genomesize.com/>

8. Seznam publikací předcházející metodice

Falatová L., Koščo J., Halačka K., 2014: Reprodukčná variabilita diploidno-polyploidného komplexu rodu *Cobitis* „Zoológia 2014“, 19. Feriancove dni 20. – 22. november 2014, Prešovská univerzita v Prešove: 62

Fedorčák J., Koščo J., Halačka K., Manko P., 2017: Growth differences in different biotypes of the hybrid complex of *Cobitis elongatoides* × *Cobitis tanaitica* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cobitidae) in the Okna River (Danube River basin), Slovakia. *Acta Ichthyol. Piscat.* 47 (2): 125–132

Fedorčák J., Pekárik L., Halačka K., Šmiga Ľ., Manko P., Hajdú J., Vetešník L., Koščo J., 2017: Microhabitat preferences of triploid *Cobitis* fish and diploid progenitors in two streams in Slovakia (Danube River Basin). *Limnologica* (in press)

Halačka K., Falatová L., Šmiga Ľ., Fedorčák J., Koščo J., 2014: Rozdíly v morfologii respirační soustavy sekavců ve vztahu k jejich ploidnímu statusu. Sborník konference „Zoológia 2014“, 19. Feriencove dni 20. – 22. november 2014, Prešovská univerzita v Prešove: 72

Manko P., Košuthová L., Šmiga Ľ., Fedorčák J., Ševc J., Falatová L., Halačka K., Koščo J., 2016: Potrava a potravná aktivita plžov rodu *Cobitis* – existuje rozdelenie potravnéj niky diploidov a polyploidov? *Sborník abstraktů z XV. České rybářské a ichthyologické konference (RyblKon 2016)*: 59

Manko P., Šmiga Ľ., Košuthová L., Ševc J., Fedorčák J., Falatová L., Halačka K., Koščo J., 2014: Rozdiely v potrave plža (*Cobitis*) vo vztahu k pohlaviu, veľkosti a ploídii. Sborník konference „Zoológia 2014“, 19. Feriencove dni 20. – 22. november 2014, Prešovská univerzita v Prešove: 138

Certifikovaná metodika: **Příprava a uchování vzorků ryb pro průtokovou cytometrii.**

Halačka Karel, Lukáš Vetešník, Mareš Jan

Tisk: Ediční středisko Mendelovy univerzity v Brně

Vydání: první, 2018

Náklad: 100 ks

Počet stran: 32

ISBN 978-80-7509-582-4