

**Certifikovaná metodika
metodika R15/2017**

**Využití polymerázové řetězové reakce, PCR-RFLP techniky
a sekvenační analýzy k determinaci homozygotů, vnitrodruhových
heterozygotů a mezidruhových hybridů rodu *Salvelinus*
v chovných zařízeních**

**Mgr. Jan Mendel, Ph.D.
Ing. Karel Halačka, CSc.
prof. Dr. Ing. Jan Mareš**

Brno 2017

Metodika vznikla za finanční podpory projektu NAZV QJ1210013 – Technologie chovu sladkovodních ryb s využitím recirkulačních systémů dánského typu se zaměřením na metody efektivního řízení prostředí a veterinární péče a projektu NAZV QJ1510077 – Zvýšení a zefektivnění produkce lososovitých ryb v ČR s využitím jejich genetické identifikace.

Podíl projektů: NAZV QJ1210013 60 %, NAZV QJ1510077 40 %

Podíl autorů: Mgr. Jan Mendel, Ph.D.¹ 80 %, Ing. Karel Halačka, CSc.¹ 10 %,
prof. Dr. Ing. Jan Mareš² 10 %

Adresa autorů: ¹Ústav biologie obratlovců Akademie věd ČR v.v.i., Květná 8, Brno 603 65

²Oddělení rybářství a hydrobiologie, Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie
a včelařství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1,
Brno 613 00

Oponenti:

Oponent z praxe: prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr. rer. agr.,

Fakulta rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Zátiší 728/II
389 25 Vodňany

Oponent za státní správu: Ing. Petr Chalupa,

Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Ministerstvo zemědělství, Těšnov 65/17,
110 00 Praha 1

1. Cíl metodiky

Cílem metodiky je poskytnout relevantní informace a spolehlivé nástroje k determinaci nejčastěji chovaných ryb rodu *Salvelinus* v ČR a v evropských státech. Metodika obsahuje optimalizovaný postup identifikace čtyř druhů (*Salvelinus fontinalis*, *Salvelinus alpinus*, *Salvelinus umbla*, *Salvelinus namaycush*) v homozygotním i heterozygotním stavu a v jejich hybridních kombinacích. Metodika popisuje aktuální stav identifikace uvedených druhů ryb v ČR včetně jejich nedostatků a současně navrhuje nové a spolehlivé řešení s využitím polymerázové řetězové reakce, restriční techniky PCR-RFLP a sekvenace. Vizualizace a separace fragmentů je prováděna buď na agarózovém gelu anebo na přístroji Fragment Analyzer™.

2. Popis metodiky

V intenzivních chovech lososovitých ryb, jmenovitě sivenů, se setkáváme především s chovem sivena amerického (*Salvelinus fontinalis*), sivena arktického (*Salvelinus alpinus*) a jejich hybrida sivena alsaského (*S. fontinalis* × *S. alpinus*; Sparctic charr, Elsäßer Saibling; Reiter 2006). V evropských chovech se můžeme rovněž setkat i s výskytem sivena alpského (*Salvelinus umbla*) a jeho křížence (*S. fontinalis* × *S. umbla*) a sivena obrovského (*Salvelinus namaycush*), včetně jeho kříženců (*S. namaycush* × *S. fontinalis*, *S. namaycush* × *S. alpinus* a *S. namaycush* × *S. umbla*). Současná determinace je založena především na morfologických charakteristikách, které nejsou vždy průkazné, a v případě kříženců různých filiálních generací zcela selhává (Gross et al., 2004). Identifikace je často subjektivní a založená především na důvěře ke zdroji, od kterého je chovný materiál pořizován. Tento klasický postup může být zatížen chybou, kterou nemusí chovná zařízení vůbec odhalit. V 90. letech minulého století byly v ČR učiněny pokusy identifikovat variabilitu sivenů pomocí alozymové analýzy, ale nebylo v ní dále pokračováno (V. Šlechta osobní sdělení).

Značné zpřesnění a zvýšení spolehlivosti v identifikačním procesu poskytuje nová kombinovaná technika složená z polymerázové řetězové reakce (PCR), restriční techniky PCR-RFLP a sekvenování. První z těchto metod vychází z primerového designu autorů Chow & Hazama (1998), ovšem neamplifikuje celý 1. intron S7 r-proteinu (cca 900 bp), ale jen jeho menší diagnostickou část nazvanou hypervariabilní oblast Johanna Gregora Mendela (JGM oblast, 524–589 bp). Nově navržený design unikátních primerů a výskyt diagnostických indelů vymezuje druhově specifickou délku tohoto regionu, který je následně vizualizován buď na agarózovém gelu nebo na kapilární elektroforeze. Druhá metoda skenuje pomocí aplikace dvou restričních systémů unikátní druhově-specifické motivy v JGM regionu a vzniklé restriční vzory (RE vzory) tak ještě více zpřesňují druhovou a hybridní identifikaci. V mnoha případech postačí jedna z uvedených metod, ovšem ve složitějších případech, je kombinace obou metod nezbytná. V případě rozlišení druhu *S. umbla* od *S. alpinus*, je nezbytné využít i Sangerovu sekvenační techniku, pokud není využíváno automatické separace na přístroji Fragment Analyzer™. Tuto třetí metodu lze současně využít i pro potvrzení všech homozygotních, heterozygotních a hybridních variant. Celé determinační schéma je podstatně zjednodušeno zařazením přístroje Fragment Analyzer™ pro automatickou separaci fragmentů na kapilární elektroforeze. Je zde zohledňován zájem chovatele, kde vedle nízkých determinačních nákladů je kladen důraz i na rychlost laboratorního potvrzení a jeho spolehlivost. Spolehlivá a rychlá identifikace napomáhá zabránit ekonomickým ztrátám v intenzivních chovech ryb a současně ještě na úplném počátku chovného řetězce odhalit druhové falšování či neúmyslné záměny nebo jen nesprávnou manipulaci při jednotlivých krocích chovného procesu.

2. 1 Princip polymerázové řetězové reakce (PCR)

Metoda umožňující namnožit in vitro požadovaný cílový úsek DNA pomocí specifických oligonukleotidových primerů, termostabilní polymerázy a dalších reagensů. Současně je využíváno zautomatizova-

ných a zoptimalizovaných třech teplotních fází opakujících se v každém cyklu. V kombinaci s elektroforézou je velmi jednoduchou a levnou identifikační technikou.

2. 2 Princip PCR-RFLP techniky

Metoda využívá kombinace přítomnosti/nepřítomnosti restrikčního místa v namnoženém úseku způsobené mutacemi a jeho rozpoznávání/nerozpoznávání příslušnou restrikční endonukleázou (RE). Vznik/ztráta restrikčního místa způsobuje proměnlivost délek restrikčních fragmentů podléhající v populaci mendelovské segregaci. Tento polymorfismus délek restrikčních fragmentů (RFLP) je následně rozpoznáván na elektroforéze. Jedná se o relativně levnou metodu pro velké vzorkovací sety a pro snadné určení hybridů.

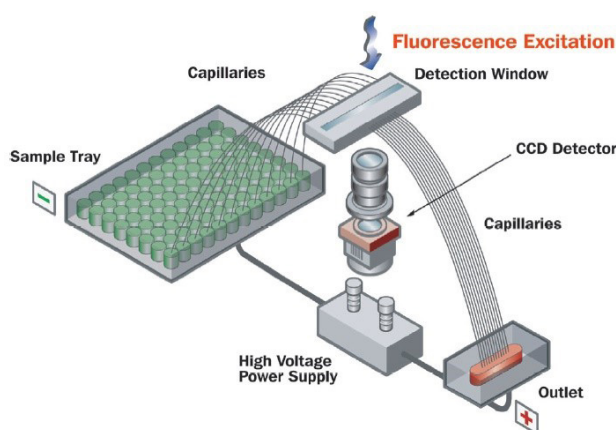
2. 3 Princip sekvenační analýzy

Sangerova (enzymatická) metoda je založena na terminaci replikace nového řetězce podle matrice zkoumané sekvence dideoxynukleozidtrifosfátem (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Příslušné nukleotidy na sebe již nemohou vázat další nukleotid, protože místo OH skupiny na svém 3' uhlíku deoxyribózy mají navázán pouze samotný vodík a tím je reakce ukončena. V sekvenační PCR jsou použity jak degenerované nukleotidy, tak i běžné deoxyribonukleotidtrifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) v poměru 1 : 99. Tím vznikají v reakci různě dlouhé oligonukleotidy, protože degenerované nukleotidy se do řetězců zařazují s menší pravděpodobností. Každý degenerovaný nukleotid je označen jinou fluorescenční barvou. Vše probíhá v jediné reakci, kdy jednotlivé fragmenty lišící se o jeden fluorescenčně značený nukleotid postupují kapilární elektroforézou před CCD kameru, která snímá laserovým paprskem vyvolanou fluorescenci. Přídavný software následně převádí emisní maxima do čitelných elektroferogramů. Jedná se o potvrzovací metodu s determinačním prahem na úrovni jednotlivých nukleotidů.

2.4 Analýza na kapilárovém fragmentačním analyzátoru – Fragment Analyzer™

Fragmentační analyzátor poskytuje automatizovaný kapilárový systém s CE značkou a využívá různé gelové soupravy a sady kapilár po 12, 48 a 96 (Obr. 1). Systém využívá multikanálovou paralelní fluorescenční detekci pro zpracování dsDNA fragmentů. Systém s detekčním limitem od 5 pg/ml poskytuje vysoké rozlišení (2–3 bp) za nízké spotřeby vzorků a vysoké reprodukovatelnosti. Umožňuje rychlou separaci kratších fragmentů do 15–30 minut. Analytický software PROSize 2.0™ je využíván pro analýzu dat i scoring a nabízí různé formáty zobrazení výsledků (elektroforetogram, excel, pdf).

Obr. 1. Kapilárový fragmentační analyzátor Fragment Analyzer™ (převzato z brožury výrobce Advanced Analytical)



2.5 Použitá zařízení

- a) UV crosslinker BLX-254 (Vilber Lourmat, Francie) pro sterilizaci nástrojů a pipet
- b) parní sterilizátor Vaposteri/P (BMT, ČR) pro sterilizaci laboratorního plastu
- c) Helios γ (Thermo Spectronic, VB) pro kontrolu koncentrace a čistoty DNA templátu
- d) FlowBox (Steril Gemini, Itálie) pro zajištění sterilního prostředí
- e) výrobce ledu (Brema GB902, Itálie)
- f) zařízení na úpravu vody (Aqual 25, ČR)
- g) MS2 Minishaker (IKA, USA) pro homogenizaci směsí
- h) Centrifuge 5804R + rotory (Eppendorf, Německo) pro odstředování a separaci
- ch) termocykler Mastercycler Pro (Eppendorf, Německo) pro PCR amplifikaci
- i) mikrovlnná trouba (Sharp, Německo) pro přípravu gelu
- j) váhy (Kern 440-33N, Německo)
- k) sady pipet (Eppendorf Research plus, Německo)
- l) horizontální elektroforéza se zdrojem (midi, VB; Consort E143, Belgie)
- m) gelový dokumentační a analytický systém GeneGenius Match (Trigon-plus, Česká republika) pro vizualizaci fragmentů
- n) ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Life Technologies, USA) pro sekvenční analýzu
- o) Fragment AnalyzerTM (Advanced Analytical Technologies, USA) pro vizualizaci fragmentů

2.6 Použité reagensie

20x SB pufr (složení: 8g NaOH, 45 g kyseliny borité na 1L H₂O), lyofilizované primery (rozpuštěné v dd-H₂O na koncentraci zásobního roztoku 100 μ M a naředěné v pracovním roztoku na 10pmol/ml), PPP Master Mix (Top-Bio, Česká republika; obsahuje: 75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl₂, 200 μ M dATP, 200 μ M dCTP, 200 μ M dGTP, 200 μ M dTTP, 2,5 U Taq-Purple DNA polymerázy, stabilizátory a aditiva), PEG/Mg/NaAc (26 % PEG (polyethylen glykol, Wt 8000), 6,5 mM MgCl₂ .6 H₂O, 0,6 M NaAc (octan sodný 3H₂O) s celkovým pH = 6–7), 0,5 M EDTA (186,1 g EDTA rozpuštěné v 800 ml ddH₂O, pomocí 5M NaOH upravené pH na 8,0 a doplněné ddH₂O do objemu 1000 ml), dsDNA 935 Reagent Kit nebo citlivější kity DNF-477 nebo DNF-474, reagensie a komponenty pro provoz přístroje Fragment AnalyzerTM dle výrobce.

2.7 Použitý sběrový materiál

Bylo analyzováno více než 450 jedinců, kteří byli sesbírání ze 14 komerčních chovů a jezer a rovněž i z mezinárodních obchodních řetězců (Česko, Slovensko, Rakousko, Německo, Dánsko, Anglie)

2. 8 Použité metody

2. 8. 1 Odběr vzorků

Determinace se provádí z malého kousku ploutevní tkáně (0,4×0,4 cm), který byl uchováván v 96% ETOH.

2. 8. 2 Dekontaminační procedury

Metoda PCR se vyznačuje vysokou citlivostí, proto je nezbytné dodržovat striktní pravidla dobré laboratorní praxe. Procesy extrakce DNA a přípravy mastermixů je vhodné prostorově oddělit. Všechny nástroje před použitím vysterylizovat např. v přístroji UV crosslinker BLX-254 (Vilber Lourmat, Francie) a veškerý plast např. v parním sterilizátoru Vaposteri/P (BMT, Česká republika). Při manipulaci je doporučováno využít špičky s filtry. Při amplifikaci je vhodné zařazovat negativní kontrolu (ddH₂O) pro vyloučení kontaminace použitých reagensů a plastů.

2. 8. 3 Izolace DNA, kontrola čistoty a koncentrace

Izolaci lze realizovat pomocí komerčně dodávaných kitů, např. ZR Genomic DNA-Tissue MiniPrep nebo MicroPrep (Zymo Research, USA) podle návodu výrobce. K izolaci DNA lze použít množství až 25 mg tkáně. Koncentraci a čistotu DNA templátu lze kontrolovat např. spektrofotometrem Helios γ (Thermo Spectronic, VB).

2. 8. 4 Příprava PCR mastermixu

Reagencie pro monoplexní PCR byly optimalizovány do reakční směsi a je doporučováno 12,5 ml PPP Master Mixu, 10 pmol/ml unikátně navržených primerů SalS7F (5'-TGGATGGCCGTTGTGTAATGA-3') a SalS7R (5'-CCGAGTGGTCCATGCCGACT-3'), 3 ml vyizolované DNA doplněné ddH₂O do celkového objemu 25 ml.

2. 8. 5 Teplotní profil PCR reakce

Amplifikace diagnostického regionu probíhá pro všechny popisované taxony a jejich hybridy dle jednotného PCR protokolu v termocykleru za následujících podmínek: úvodní denaturace 2 min 95 °C, poté následuje 30 cyklů po 30 s při 95 °C, 45 s při 60 °C, 1 min při 72 °C a na závěr finální elongace 10 min při 72 °C.

2. 8. 6 Příprava PCR-RFLP mastermixu

Amplifikovaný PCR produkt může být štěpen (podle protokolu výrobce) druhově specifickou restriktázou TasI a/nebo PaeI.

a) TasI mastermix

32 ml směs:

ddH₂O – 18 ml

10x Buffer B – 2 ml

PCR produkt – 10 ml

TasI enzym – 2 ml (10U)

Inkubovat v termocycleru přes noc (alternativně 1–16 hodin) při teplotě 65 °C.

b) PaeI mastermix

32 ml směs:

ddH₂O – 18 ml

10x Buffer B – 2 ml

PCR produkt – 10 ml

PaeI enzym – 2 ml (10U)

Inkubovat v termocycleru přes noc (alternativně 1–16 hodin) při teplotě 37 °C.

2. 8. 7 Separace a vizualizace amplikonů a naštěpených PCR-RFLP fragmentů na agarózovém gelu

Produkty PCR amplifikace i restrikčního štěpení spolu s negativní a pozitivní kontrolou se oddělují v 1,7% agarózovém gelu na horizontální elektroforéze za použití SB pufru a Midori Green Advance barvení při napětí 10V/cm po dobu 50 minut. Jako velikostní standardy lze použít DNA marker 155-970 (Top-Bio, Česká republika) a FastGene 50bp DNA Ladder (Nippon Genetics Europe GmbH, Německo). Jednotlivé fragmenty vizualizujeme pomocí gelového dokumentačního a analytického systému GeneGenius Match (Trigon-plus, Česká republika).

Příprava agarózového gelu a elektroforézy

a) Připravíme ddH₂O naředěný 1× SB pufr ze zásobního 20× koncentrovaného roztoku pufru pro přípravu agarózového gelu i pro využití jako elektroforetického pufru.

b) Navážíme do kádinky 1,7 g agarózy a zamícháme do 100 ml 1× SB pufru. Vložíme do mikrovlnné trouby a povaříme při 180 °C na 3 min.

c) Po kompletním rozvaření agarózy (čirý roztok) zchladíme ve vodní lázni na cca 65 °C a přidáme 5 ml Midori Green Advance barvení, rozmícháme.

d) Umístíme vaničku (10 cm×10 cm) do horizontální elektroforézy, vložíme hřebínek (pro vytvoření jamek) a opatrně naléváme rozvařenou agarózu bez bublin ve vrstvě cca 1 cm. Skleněnou tyčinkou odstraníme vytvořené bubliny, aby roztok byl pokud možno co nejvíce homogenní.

e) Gel necháme vychladnout a ztuhnout cca 25 min. Vaničku zorientujeme čelem k negativní elektrodě a poté odstraníme hřebínek.

f) Elektroforézu naplníme 1x koncentrovaným SB pufrem, tak aby gel byl ponořen cca 1 mm.

g) Postupně nanášíme 10 ml PCR produktu nebo naštěpených PCR-RFLP fragmentů podle prováděné metody. Nanášíme na gel přímo, protože barvička pro nanášení do gelu je již obsažena v PPP Master Mixu.

h) Na začátek a na závěr nanášíme DNA standard, pozitivní kontrolu do pozic dle potřeby a na úplný konec negativní kontrolu.

2. 8. 8 Vizualizace a separace amplikonů a naštěpených PCR-RFLP fragmentů pomocí přístroje Fragment Analyzer™

Smícháme čerstvý gel s interkalační barvičkou v poměru 1 ml Dye : 10 ml dle počtu analyzovaných vzorků. Umístíme nový Inlet Buffer zásobník do přístroje. Napipetujeme do A řady 1× Inlet Buffer (1 ml/well) a do H řady Capillary Storage Solution (1 ml/well). Umístíme Marker zásobník do přístroje a napipetujeme směs LM/UM v objemu 30 ml/well. Poté zakápneme minerálním olejem, aby nedocházelo k jeho vypařování. PCR produkty nebo směs z restrikčního štěpení naředíme na potřebnou koncentraci dle uživatelského manuálu zvoleného kitu. Směs vzorků s ředícím roztokem (1× TE) v poměru 2 ml : 22 ml rozpipetujeme do pozic 1–11 v řádku a do pozice 12 vložíme 24 ml žebříku. Takto připravenou destičku vložíme do přístroje. Vložíme potřebné údaje do ovládacího softwaru stroje, automaticky naplníme kapiláry gelem a připravíme veškeré komponenty pro správný chod stroje. Spustíme automatickou separaci fragmentů v podmínkách kvalitativní analýzy.

2. 8. 9 Přečišťování a příprava sekvenačního mastermixu

V případě potvrzovací fáze u všech testovaných druhů a jejich hybridů nebo jen pro spolehlivé rozlišení druhů *S. alpinus* a *S. umbla* je pokračováno přečištěním PCR produktu od nezreagovaných komponent pomocí kitu DNA Clean & Concentration-5 (Zymo Research, USA) nebo směsí ExoSAP-IT™ dle návodu výrobce anebo pomocí levnější precipitace směsí PEG/Mg/NaAc:

Postup

- 1) 25 ml 1PEG/Mg/NaAc pipetujeme do ependorfky s 25 ml amplifikátu (1:1), vortex a 10–15 minut necháme stát
- 2) centrifugace (14 000 ot/20 min/4 °C)
- 3) supernatant špičkou odsajeme a k peletu přidáme 2x 200 ml 96 % EtOH. Opatrně při promývání DNA. Chvilí nechat stát, vortex
- 4) centrifugace (14 000 ot/5 min/4 °C)
- 5) odsajeme a promyjeme 200 ml 70% EtOH
- 6) centrifugace (14 000 ot/5 min/4 °C)
- 7) odsajeme, pelet zůstává na dně a vysušíme
- 8) pelet rozpustíme ve 25 ml ddH₂O.

Kontrolu přítomnosti PCR produktu provádíme na agarózové elektroforéze s DNA standardem poskytujícím informaci o délce a koncentraci namnoženého produktu.

Poté buď přečištěné vzorky zašleme na sekvenování do komerčního servisu (např. Macrogen Europe, Holandsko) nebo využijeme vlastních genetických analyzátorů (např. ABI PRISM) a pokračujeme přípravou sekvenačního mastermixu a sekvenační PCR s teplotním profilem dle návodu výrobce BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kitu.

Sekvenační mastermix:

Přečištěný PCR produkt 30–70 ng

Reaction Mix 2 ml + 2 ml reakčního pufru

Primer 10 pmol/ml

ddH₂O doplnit do 10 ml

Obsah protřepeme, centrifugujeme a vložíme do PCR cykleru.

Sekvenační PCR podmínky

96 °C / 30 sec.

50 °C / 20 sec.

60 °C / 4 min

25 cyklů

Následuje druhé přečišťování od nezreagovaných komponent buď komerčním kitem (např. ZR DNA Sequencing Clean-up) dle návodu výrobce anebo pomocí levnější precipitace směsí EtOH/EDTA (pro 10 ml PCR sekvenační směs):

- 1) po sekvenační PCR vzorek krátce stočit a přenést špičkou do zkumavky pro sekvencování
- 2) přidáme 2,5 ml 125 mM EDTA ke každé (ředění: 5 ml zásobní 0,5 M EDTA: 15 ml ddH₂O)
- 3) přidáme 25 ml 100% EtOH
- 4) uzavřeme a 4× převratíme (mix), krátce stočíme
- 5) inkubujeme v Troom 15 min.
- 6) spin 2000–3000/30min/4 °C (nebo 1400–2000/45 min/4 °C)
- 7) přidáme 30 ml 70% EtOH
- 8) spin 1650/15 min/4 °C
- 9) odpipetujeme a vysušíme při 60 °C/15 min. ve tmě (nepřesušit).
- 10) lze přerušit a dát do ledničky zavíčkované pro příhodný čas analýzy nebo pokračovat resuspendováním v TSR pufru (formamidu nebo H₂O) 15 ml (20 ml) - dle koncentrace DNA.

Poté již provádíme finální přípravu vzorku pro genetický analyzátor

Vzorek pro sekvenátor připravíme následovně:

- 1) pelet ve zkumavce rozpustíme ve 20 ml formamidu (i méně dle koncentrace)
- 2) důkladně protřepeme na vortexu a krátce centrifugujeme
- 3) denaturujeme 2 min při 95 °C v termocycleru

4) rychle zchladíme na ledu 2 min

5) znovu protřepeme a centrifugujeme. Stále držíme vzorky na ledu, než vložíme do sekvenátoru.

Poté provádíme sekvenační analýzu na genetickém analyzátoru dle návodu a softwaru výrobce.

2. 8. 10 Kontrola kvality

Při determinačních testech sivenů používáme pro eliminaci vlivu jakýchkoli kontaminací jako negativní kontrolu ddH₂O, tzn. vzorek bez DNA. Jako pozitivní kontroly jsou používány vzorky druhových homozygotů: *Salvelinus alpinus* (zdroj DAN; Dánsko), *Salvelinus umbla* (zdroj WOLaMON; Rakousko), *Salvelinus namaycush* (zdroj NEM; Německo), *Salvelinus fontinalis* (zdroj Pra a Lit; Česká republika)

2. 8. 11 Vyhodnocení výsledků

Jedná se o kombinovaný design determinace čtyř nejčastěji chovaných druhů sivenů v Evropě. V některém případě postačí prostá vizualizace PCR produktu na kapilární nebo agarózové elektroforéze, někdy přidání jednoho nebo dvou PCR-RFLP testů. V případě jednoznačného průkazu genomu *S. umbla* ve vzorku může být použito Sangerova sekvenování nebo metodiky využívající citlivosti přístroje Fragment Analyzer™.

2. 8. 11. 1 Determinační PCR test JGM oblasti

Nový design primerů vymezující pouze hypervariabilní část 1. intronu S7 r-proteinu (JGM oblast) a přítomnost indelů (indel 1–5) v diagnostickém regionu poskytují druhově specifické délky amplifikovaných PCR produktů (Tab. 1, Obr. 2 a 3). Tento velmi rychlý a levný test dokáže díky existenci unikátních indelů 1 a 3 odlišit dvě homozygotní varianty *S. fontinalis* (SfA a SfB) od ostatních tří druhů – *S. alpinus*, *S. namaycush* a *S. umbla*. Rovněž dokáže odhalit sivena amerického v jeho hybridním stavu. Což lze např. využít pro determinaci sivena alsaského (mezidruhového hybridu – *S. alpinus* × *S. fontinalis* nebo ve formě *S. umbla* × *S. fontinalis*) nebo pro identifikaci hybridu sivena amerického se sivenem obrovským zvaným „splake“ (*S. namaycush* × *S. fontinalis*).

2. 8. 11. 2 Determinační PCR-RFLP testy

Citlivější rozlišení homozygotů, heterozygotů a mezidruhových hybridů umožňuje druhá technika, která využívá přítomnosti/nepřítomnosti restričních motivů v primery zúžené oblasti JGM, typických pro dvě restriční endonukleázy PaeI (restriční motiv: „GCATG↓C“) a TasI (restriční motiv: „↓AATT“). Získané restriční vzory jsou pak druhově specifické (Obr. 3).

a) TasI zkouška

Rozlišovací schopnost restriktázy TasI je využívána jednak pro jednoznačnou identifikaci druhů *S. alpinus*, *S. fontinalis* a také k rozlišení hybridu sivena alsaského. Díky přítomnosti specifických substitucí a čtyř indelů 1–4 (Obr. 3) je pro *S. alpinus* diagnostický restriční fragment 243 bp, pro *S. fontinalis* typu „A“ 305 bp a typu „B“ 394 bp. Restriční vzor pro vnitrodruhového heterozygota sivena amerického obou typů (SfA a SfB) je tvořen diagnostickými fragmenty 305/394 bp a navíc jedinci typu „B“ postrádají fragment o délce 86 bp. Pro vizuálně jednoznačnější potvrzení mezidruhových hybridů sivena alsaského typu „A“ a typu

„B“ lze pozorovat restriční vzor 305/243 bp, resp. 394/243 bp. V případě sivena alsaského v hybridní kombinaci *S. umbla* × *S. fontinalis* je detekován restriční vzor 247/305 bp, resp. 247/394 (Tab. 1, Obr. 4 a, b a 5).

b) PaeI zkouška

Rozlišovací schopnost restriktázy PaeI je využívána především pro jednoznačnou determinaci druhu *S. namaycush* v homozygotním stavu a pro průkaz jeho participace v hybridních událostech nebo řízeném křížení. Jedinečný homozygotní PaeI vzor se specifickými fragmenty „488 bp“ a „36 bp“ spolehlivě rozlišuje sivena obrovského od ostatních testovaných druhů, u kterých tento enzym postrádá svůj typický restriční motiv, a tedy nedochází k naštěpení PCR produktu. Rovněž hybridní *S. namaycush* × *S. fontinalis*, *S. namaycush* × *S. alpinus* a *S. namaycush* × *S. umbla* jsou snadno rozpoznatelní (Tab. 1 a Obr. 2 a 5).

2. 8. 11. 3 Sekvenační analýza JGM oblasti 1. intronu S7 r-proteinu

Pro spolehlivé rozlišení druhů *S. umbla* a *S. alpinus* a jejich hybridů je potřeba vizualizovat „umbla“ specifickou 4nt inzerci vyskytující se v pozici 449–452 bp společného alignmentu (indel 5; Obr. 3). K tomu jsme použili rakouského sběru z jezer Wolfgangsee a Mondsee, kde se druh *S. umbla* hojně vyskytuje a dále sekvenační analýzy JGM regionu za použití stejných PCR i sekvenačních primerů SalS7F a SalS7R.

Techniky sekvenování lze využít obecně pro všechny čtyři taxony, protože laboratorní design je vyladěný do jednotného protokolu. Navíc sekvenací zviditelníme kompletně diagnostické pozice (substituce a indely), typické pro konkrétní druh. Determinace sivenů byla použita i jako příkladová studie do národní a evropské přihlášky vynálezu č. PV 2015-957 (Mendel et al., 2015), resp. EP 16207282.1 (Mendel et al., 2016).

2. 8. 11. 4 Analýza fragmentů na přístroji Fragment Analyzer™

Jako alternativu ke způsobu determinace klasickým postupem (na agarózovém gelu) je velmi elegantní způsob rutinní identifikace diagnostických fragmentů JGM oblastí a RE vzorů za využití přístroje Fragment Analyzer™ a analytického softwaru PROSize™. Nízké provozní náklady (bez fluorescenčního značení primerů nebo přečišťování PCR a RE fragmentů), separace s vysokým rozlišením (2–3 bp) a automatický scoring dat dovolují nabídnout bezkonkurenčně nejrychlejší a nejjednodušší způsob identifikace sivenů v chovných zařízeních. Je postupováno podle návodu výrobce, kdy je využíváno fluorescenční excitace světelným zdrojem 1000 mW LED s excitační vlnovou délkou 470 nm a vysoce citlivého CCD detektoru (Obr. 1). Po rychlé automatické separaci fragmentů proběhne kvalitativní analýza a zpracování dat pomocí uživatelsky jednoduchého softwaru PROSize™ 2.0. Velkou výhodou tohoto stanovení je možnost překrytí elektroforetogramů jednotlivých vzorků a snadná vizualizace odlišných a stejných fragmentů. Příklady zpracování výsledků homozygota a hybrida na přístroji Fragment Analyzer™ zobrazují Obr. 6 a 7.

2. 9 Závěr

Metodika popisuje způsob jaderné determinace a vizualizace homozygotů, vnitrodruhových heterozygotů a mezidruhových hybridů rodu *Salvelinus* v chovných zařízeních:

I. Klasický způsob determinace a vizualizace

Obecně prvním krokem je prostá agarózová elektroforéza amplifikovaných unikátních JGM oblastí jednotlivých druhů. Pokud je požadována ještě přesnější determinace, pak jako druhý krok navazují jednotlivé PCR-RFLP testy dle konkrétního typu druhové identifikace, popř. sekvenační analýza. Konkrétněji:

- Pro průkaz *S. fontinalis* v homozygotním i heterozygotním stavu lze využít jednoduchého PCR testu diagnostické oblasti JGM s porovnáním jeho délek na agarózovém gelu. Pro jednoznačnou identifikaci vnitrodruhových heterozygotů sivena amerického (SfA a SfB) lze využít determinačního PCR-RFLP testu s restriktázou TasI
- Pro průkaz druhu *S. namaycush* v homozygotním i heterozygotním stavu, tedy i „splake“ křížence lze využít kombinace PCR testu JGM oblasti a determinačního PCR-RFLP testu s restriktázou PaeI
- Pro průkaz druhu *S. alpinus* a *S. umbla* v homozygotním i heterozygotním stavu a křížence sivena alsaského lze využít PCR testu diagnostické oblasti JGM a/nebo determinačního PCR-RFLP testu s restriktázou TasI
- Pro zpřesnění diagnostiky, zda se jedná o druh *S. umbla* v homozygotním i heterozygotním stavu a pro spolehlivé vyloučení druhu *S. alpinus*, je nezbytné využít Sangerovy sekvenační metody jako jednoznačného průkazu typické umbla-diagnostické 4nt inserce (indel 5). Zjištěná podobnost obou druhů je vysvětlována obecně uznávaných faktem, že *S. umbla* je glaciálním reliktem druhu *S. alpinus*.
- Pro potvrzení správnosti výše uvedených testů a pro získání dalších diagnostických druhově specifických pozic lze u všech čtyř druhů snadno využít sekvenační analýzy diagnostického regionu JGM i díky jednotně vyladěnému designu unikátních primerů, reagensií a profilu teplot v PCR reakci.

II. Způsob determinace a vizualizace pomocí přístroje Fragment Analyzer™

Díky citlivosti metody a možnosti digitálního překryvu elektroforetogramů při scoringových analýzách je determinační schéma uživatelsky příjemnější. A to ve smyslu jak značné redukce manuálních kroků a zjednodušení identifikace fragmentů nebo determinačních vzorů, tak i zautomatizování rutinního vyhodnocování a reportingu. Rovněž nezanedbatelná je i úspora času a lidských zdrojů.

III. Srovnání novosti postupů

Metodika přináší nový determinační přístup v souladu s § 2, ods. 1, písm. a) bod 2 zákona č. 130/2002 Sb. Popsaných metodických postupů bylo dosaženo systematickou tvůrčí prací v aplikovaném výzkumu, kterým byly experimentální a teoretické práce prováděné s cílem získání nových poznatků zaměřených na budoucí využití v praxi.

V předložené metodice jsou shrnuty poznatky získané při monitorování výskytu jednotlivých druhů a jejich hybridů v chovných zařízeních. Doposud v chovných zařízeních s produkcí sivenů nebyl molekulo-

lárně-genetický přístup provozován. Unikátní determinační design poskytuje chovatelským subjektům rychlý a levný identifikační nástroj kontroly. Je spolehlivou náhradou nebo doplňkem mnohdy nedosta-
tečné současné rozlišovací techniky.

IV. Popis uplatnění metodiky

Metodika je určena pro rybochovná zařízení a recirkulační farmy s chovem lososovitých ryb, veterinární diagnostické laboratoře, univerzitní a vědecká pracoviště, komerční genetické laboratoře, laboratoře zemědělské a potravinové inspekce atd., jež řeší rychlou a spolehlivou determinaci jednotlivých druhů sivenů a jejich hybridů. Je využitelná v rámci i mimo ČR. Metodika bude uplatněna „Smlouvou o uplatnění certifikované metodiky“ uzavřenou mezi Ústavem biologie obratlovců v. v. i. a firmou BioFish s. r. o. se sídlem Horní Paseky 40, Ledec nad Sázavou.

V. Ekonomické aspekty

Ekonomický přínos metodiky vychází z předpokladu včasné druhové diagnostiky. Používání předloženého metodického postupu přináší zrychlení a zpřesnění druhové identifikace, což vede k zamezení ztrát plynoucích z druhové záměny. Například u sivenů amerických je typické časté zaplísnění v období výtěru, což v případě řízených kříženců se sivenem arktickým téměř vymizí, a navíc hybridní jedinci jsou i odolnější vůči bakteriálním infekcím. Siven arktický zase potřebuje nižší teplotu vody než siven americký, který snadněji snáší výkyvy teplot. Jejich vzájemní hybridi (Sparctic charr, Elsässer Saibling) snášejí snadněji vyšší teploty a rostou rychleji než jejich rodičovské druhy. Jsou více robustní, a tudíž žádanější v chovech a populárnější pro sportovní rybolov. Siven alsaský bývá ovšem fertilní a musí se obnovovat a zpětně křížit s rodičovskými druhy. Což může vést k nekontrolovaným a obtížně odhalovaným hybridizacím kmenových hejn. Geneticky kontrolovaný chov vede tedy k zefektivnění chovu a ke snížení ztrát o řádově několik jednotek až desítek procent. Což při realizační ceně kalkulované na úrovni 115 Kč za 1 kg a hodnotě zefektivnění chovu na úrovni 5 % při produkci např. 100 tun v rámci produkční kapacity jedné firmy ekonomický dopad převyšující 500 tis. Kč ročně. Na druhou stranu v případě chovných hejn je preferován výskyt jen „čistých“ druhových homozygotů a kontaminace kříženci, díky špatné chovné praxi nebo špatnému zdroji násad, může být zcela fatální. Proto monitoring čistoty a integrity chovu je zcela zásadní v období úzké celoevropské propojenosti a všudypřítomné globalizace. A v neposlední řadě jednoznačný průkaz druhové příslušnosti rovněž nabývá na významu v éře různých chovných programů vytvářející produkty na bázi marker asistované selekce (MAS) s vazbou na QTL (lokusy kvantitativních znaků zasluhující speciální pozornost).

Díky nalezení levného kombinovaného designu v podobě prostého porovnání druhově specifických délek unikátní JGM oblastí a/nebo jejich štěpení pomocí levného restrikčního enzymu jsou náklady na využívání metodiky v řádu desítek až stovek korun (podle počtu analýz a zvolené metody).

6. Poděkování

Metodika vznikla za finanční podpory projektu NAZV QJ1210013 – Technologie chovu sladkovodních ryb s využitím recirkulačních systémů dánského typu se zaměřením na metody efektivního řízení prostředí a veterinární péče a projektu NAZV QJ1510077 – Zvýšení a zefektivnění produkce lososovitých ryb v ČR s využitím jejich genetické identifikace.

7. Seznam použité literatury

CHOW S., HAZAMA K. 1998. Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular ecology*, 7, 1255–1256.

GROSS R., GUM B., REITER R., KÜHN R. 2004. Genetic introgression between Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*) in Bavarian hatchery stocks inferred from nuclear and mitochondrial DNA markers. *Aquaculture International* 12: 19–32.

MENDEL J., HALAČKA K., VETEŠNÍK L. 2015. Způsob identifikace evropských sladkovodních ryb a hybridů v biologických materiálech metodou S7iCAPS. Národní patentová přihláška PV 2015–957.

MENDEL J., HALAČKA K., VETEŠNÍK L. 2016. Method of identification of European freshwater fish and hybrids in biological materials using S7iCAPS method. Evropská patentová přihláška EP 16207282.1.

REITER R. 2006. Leistungen und Qualitätseigenschaften jeweils zweier Herkünfte des Seesaiblings (*Salvelinus alpinus*) und des Bachsaiblings (*Salvelinus fontinalis*) sowie ihrer Kreuzungen. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft.

8. Seznam publikací předcházející metodice

HALAČKA, K., VÍTEK, T., MAREŠ, J. 2013. A co ještě víme o chovaných rybách? Zkušenosti s chovem ryb v recirkulačním systému dánského typu. Sborník příspěvků. Vyd: Mendelova univerzita v Brně, Brno 12. 12. 2013, ISBN 978-80-7375-919-3, s. 63–67.

MENDEL, J. 2013. Genetická identifikace u nás chovaných sivenů. Zkušenosti s chovem ryb v recirkulačním systému dánského typu. Sborník příspěvků. Vyd: Mendelova univerzita v Brně, Brno 12. 12. 2013, ISBN 978-80-7375-919-3, s. 59–62.

MENDEL, J. 2016. Zdrojový materiál pro produkci lososovitých ryb v ČR – minulost a současnost. Zkušenosti s chovem ryb, optimalizací prostředí a veterinární péčí v recirkulačním systému. Sborník příspěvků. Vyd: Mendelova univerzita v Brně, Brno 15. 11. 2016, ISBN 978-80-7509-441-4, s. 62–65.

MENDEL, J. 2016. Kontrolovaný chov – přínos genetiky pro účely chovu lososovitých ryb. Zkušenosti s chovem ryb, optimalizací prostředí a veterinární péčí v recirkulačním systému. Sborník příspěvků. Vyd: Mendelova univerzita v Brně, Brno 15. 11. 2016, ISBN 978-80-7509-441-4, s. 71–75.

Tab. 1. Schéma jaderné determinace selektovaných druhů rodu *Salvelinus*, jejich heterozygotů a hybridů pomocí agarózové elektroforézy nebo kapilárního fragmentačního analyzátoru Fragment Analyzer™

Druh/heterozygot/hybrid	Test PCR JGM oblastí (bp)	Test PCR-RFLP 1	Délka fragmentů	Test PCR-RFLP 2	Délka fragmentů
<i>Salvelinus alpinus</i>	524	TasI	243,175,86,20	PaeI	neštěpí
<i>Salvelinus namaycush</i>	524	TasI	243,175,86,20	PaeI	488, 36
<i>Salvelinus umbla</i> *	528	TasI	243,179,86,20	PaeI	neštěpí
<i>Salvelinus fontinalis</i> _varianta A	583	TasI	305,172,86,20	PaeI	neštěpí
<i>Salvelinus fontinalis</i> _varianta B	589	TasI	394,175,-,20	PaeI	neštěpí
Heterozygotní kombinace <i>S. fontinalis</i>					
<i>S. fontinalis</i> _A x <i>S. fontinalis</i> _B	583/589	TasI	305/394	x	x
Mezidruhová hybridní kombinace					
<i>S. fontinalis</i> _A x <i>S. alpinus</i>	583/524	TasI	305/243	x	x
<i>S. fontinalis</i> _B x <i>S. alpinus</i>	589/524	TasI	394/243	x	x
<i>S. fontinalis</i> _A x <i>S. namaycush</i>	583/524	TasI	305/243	PaeI	583/488,36
<i>S. fontinalis</i> _B x <i>S. namaycush</i>	589/524	TasI	394/243	PaeI	589/488,36
<i>S. fontinalis</i> _A x <i>S. umbla</i>	583/528	TasI	305/243,179	x	x
<i>S. fontinalis</i> _B x <i>S. umbla</i>	589/528	TasI	394/243,179	x	x
<i>S. alpinus</i> x <i>S. namaycush</i>	524	x	x	PaeI	524/488,36
<i>S. umbla</i> x <i>S. namaycush</i>	528/524	TasI	243,179/243,175	PaeI	528/488,36
<i>S. umbla</i> x <i>S. alpinus</i> *	528/524	TasI	243,179/243,175	x	x

*determinace pomocí průkazu diagnostické 4nt inzerce v pozici 449–452 společného alignmentu. x = neprovádí se. Zvýrazněny diagnostické fragmenty.

Obr. 2. Vizualizace neštěpených unikátních JGM oblastí a naštěpených diagnostických fragmentů pomocí restriktázy PaeI na agarózovém gelu u jednotlivých druhů sivenů a jejich hybridů

L = FastGene 50bp DNA Ladder

1 = *S. namaycush* (neštěpená JGM oblast; 524 bp)

2 = *S. namaycush* (PaeI štěpení; 488, 36 bp)

3 = *S. alpinus* (neštěpená JGM oblast; 524 bp)

4 = *S. umbla* (neštěpená JGM oblast; 528 bp)

5 = *S. fontinalis* varianta A (neštěpená JGM oblast; 583 bp)

6 = *S. fontinalis* varianta B (neštěpená JGM oblast; 589 bp)

7 = heterozygot *S. fontinalis* A/B (neštěpená JGM oblasti; 583/589 bp)

8 = s. alsaský s variantou A (neštěpené JGM oblasti; 524/583 bp)

9 = s. alsaský s variantou B (neštěpené JGM oblasti; 524/589 bp)

10 = hybrid *S. umbla* × *S. fontinalis* A (neštěpené JGM oblasti; 528/583 bp)

11 = hybrid *S. umbla* × *S. fontinalis* B (neštěpené JGM oblasti; 528/589 bp)

12 = hybrid *S. alpinus* × *S. umbla* (neštěpené JGM oblasti; 524/528 bp)

13 = hybrid *S. namaycush* × *S. fontinalis* A (PaeI štěpení; 488,36/583 bp)

14 = hybrid *S. namaycush* × *S. fontinalis* B (PaeI štěpení; 488,36/589 bp)

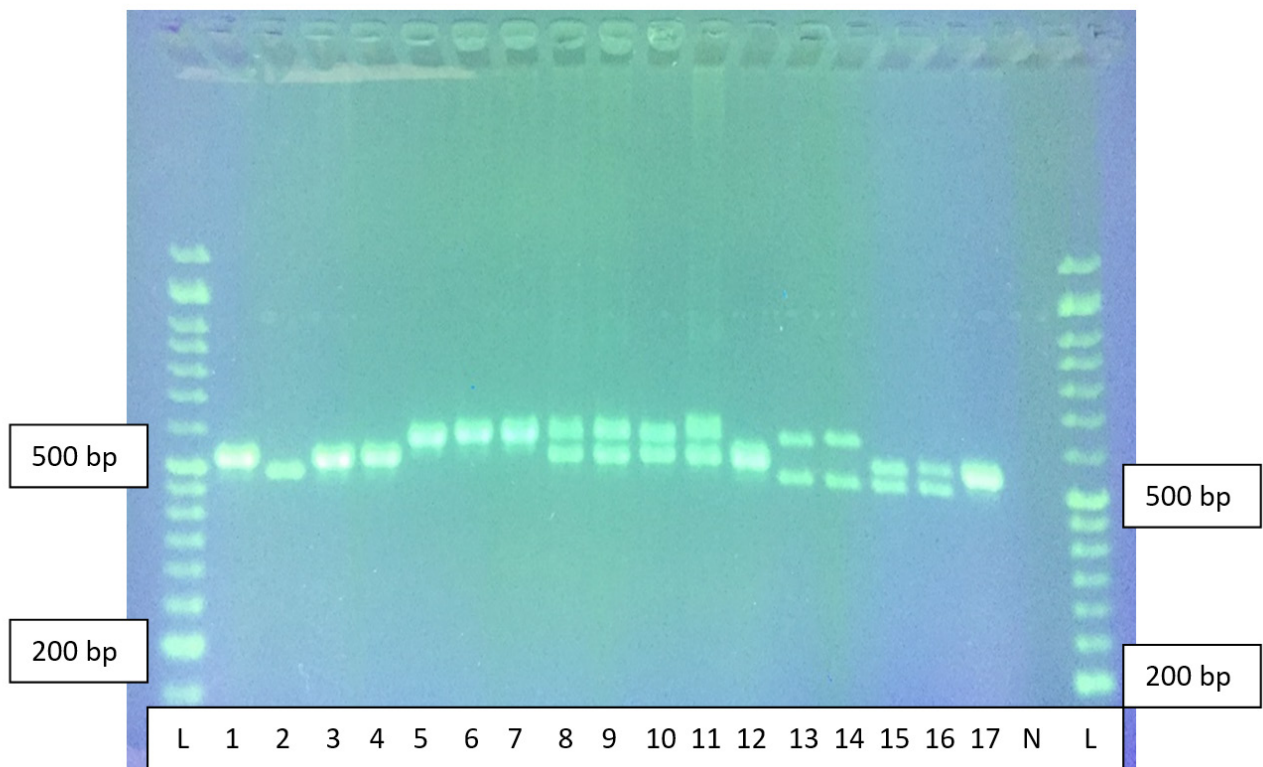
15 = hybrid *S. namaycush* × *S. alpinus* (PaeI štěpení; 488,36/524 bp)

16 = hybrid *S. namaycush* × *S. umbla* (PaeI štěpení; 488,36/528 bp)

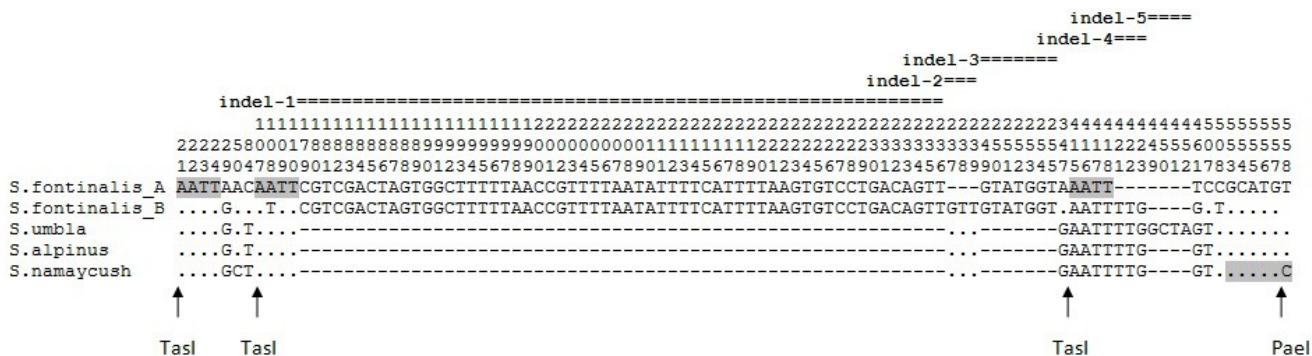
17 = hybrid *S. namaycush* × *S. umbla* (neštěpené JGM oblasti; 524/528 bp)

18 = negativní kontrola

L = FastGene 50bp DNA Ladder



Obr. 3. Diagnostické pozice JGM oblastí pro rozlišování vybraných druhů sivenů, jejich mezidruhových hybridů a vnitrodruhových heterozygotů (100 diagnostických pozic; stejný nukleotid = „.“; indel = „-“; vyšedlé pozice = restriční motiv a šipka = místo štěpení restriktázou)



Obr. 4a. Unikátní délky JGM oblastí dvou nejčastěji chovaných druhů sivenů *S. fontinalis* a *S. alpinus* (invertovaná verze vizualizace gelu)

M = Marker (155–970 bp)

1 = *S. alpinus* (unikátní délka JGM oblasti 524 bp)

2 = *S. fontinalis* varianta A (unikátní délka JGM oblasti 583 bp)

3 = *S. fontinalis* varianta B (unikátní délka JGM oblasti 589 bp)

4 = heterozygot *S. fontinalis*A/B (diagnostický vzor 583/589 bp)

5 = hybrid *S. alpinus* × *S. fontinalis* varianta A (diagnostický vzor 524/583 bp)

6 = hybrid *S. alpinus* × *S. fontinalis* varianta B (diagnostický vzor 524/589 bp)

N = negativní kontrola

M = Marker (155–970 bp)

Obr. 4b. *TasI* stanovení s restrikcí vzory u homozygotů *S. alpinus* a *S. fontinalis* (varianta A a B), jejich vnitrodruhových heterozygotů a mezidruhových hybridů (invertovaná verze vizualizace gelu)

M = Marker (155–970 bp)

7 = *S. alpinus* (diagnostický fragment 243 bp)

8 = *S. fontinalis* varianta A (diagnostický fragment 305 bp)

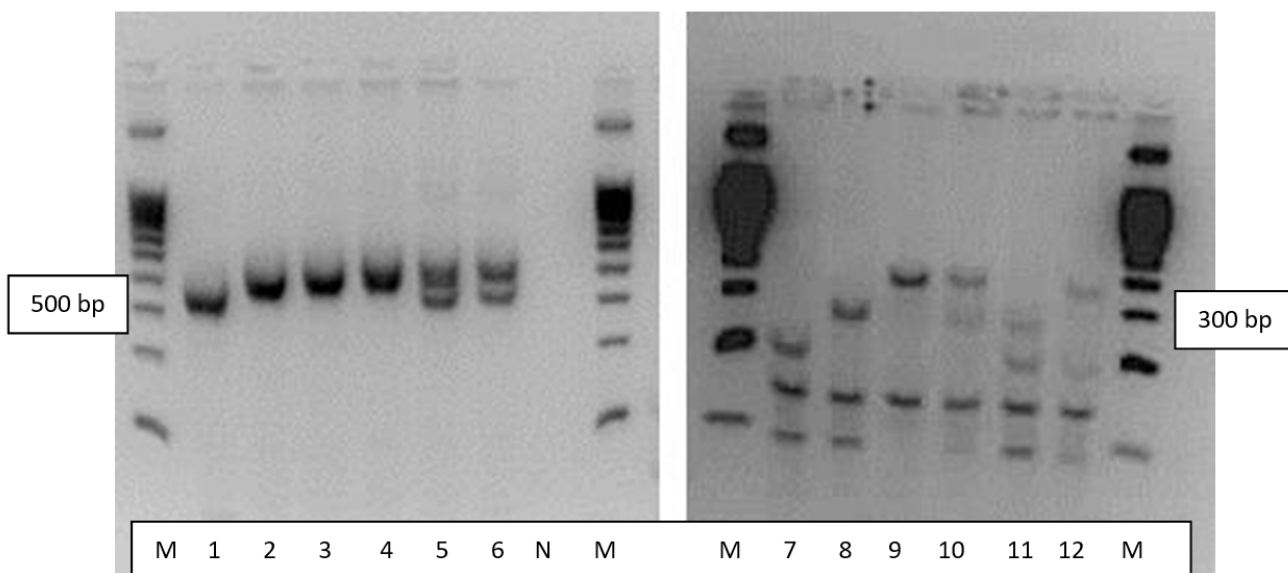
9 = *S. fontinalis* varianta B (diagnostický fragment 394 bp)

10 = heterozygot *S. fontinalis* A/B (diagnostický vzor 305/394 bp)

11 = hybrid *S. alpinus* × *S. fontinalis* varianta A (diagnostický vzor 243/305 bp)

12 = hybrid *S. alpinus* × *S. fontinalis* varianta B (diagnostický vzor 243/394 bp)

M = DNA Marker (155–970 bp)



Obr. 5. Testy PCR-RFLP: *TasI* a *PaeI* stanovení s restrikcími vzory u jednotlivých druhů sivenů (invertovaná verze vizualizace gelu)

Test PCR-RFLP 1 - *TasI*

L = FastGene 50bp DNA Ladder

- 1 = *S. namaycush* (diagnostické fragmenty 243, 175 bp)
- 2 = *S. alpinus* (diagnostické fragmenty 243, 175 bp)
- 3 = *S. umbla* (diagnostické fragmenty 243, 179 bp)
- 4 = *S. fontinalis* varianta A (diagnostický fragment 305 bp)
- 5 = *S. fontinalis* varianta B (diagnostický fragment 394 bp)

Test PCR-RFLP 2 - *PaeI*

L = FastGene 50bp DNA Ladder

- 6 = *S. namaycush* (diagnostické fragmenty 488, 36 bp)
- 7 = *S. alpinus* (unikátní délka JGM oblasti 524bp)
- 8 = *S. umbla* (unikátní délka JGM oblasti 528 bp)
- 9 = *S. fontinalis* varianta A (unikátní délka JGM oblasti 583 bp)
- 10 = *S. fontinalis* varianta B (unikátní délka JGM oblasti 589 bp)

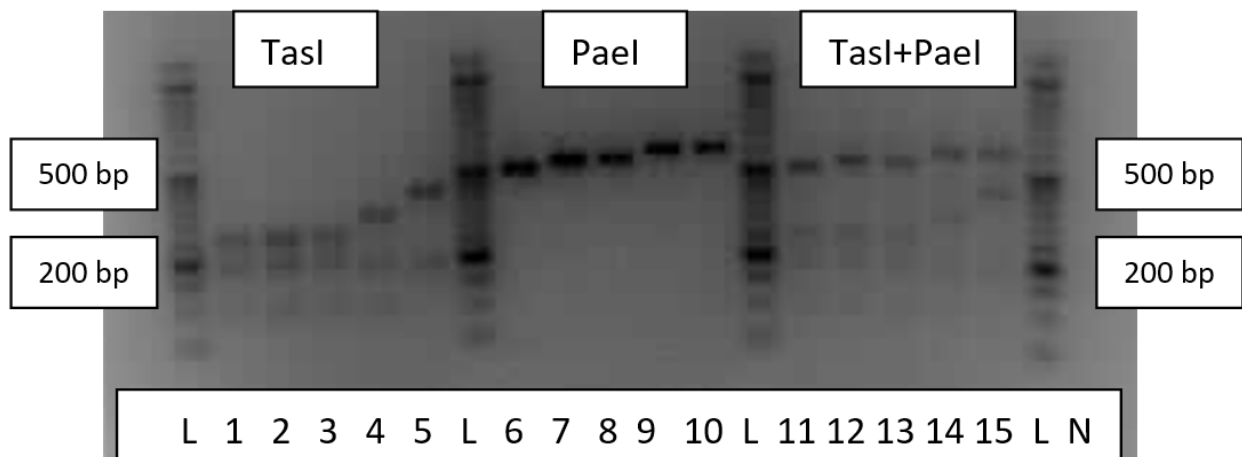
Test PCR-RFLP 1 a PCR-RFLP 2 společně

L = FastGene 50bp DNA Ladder

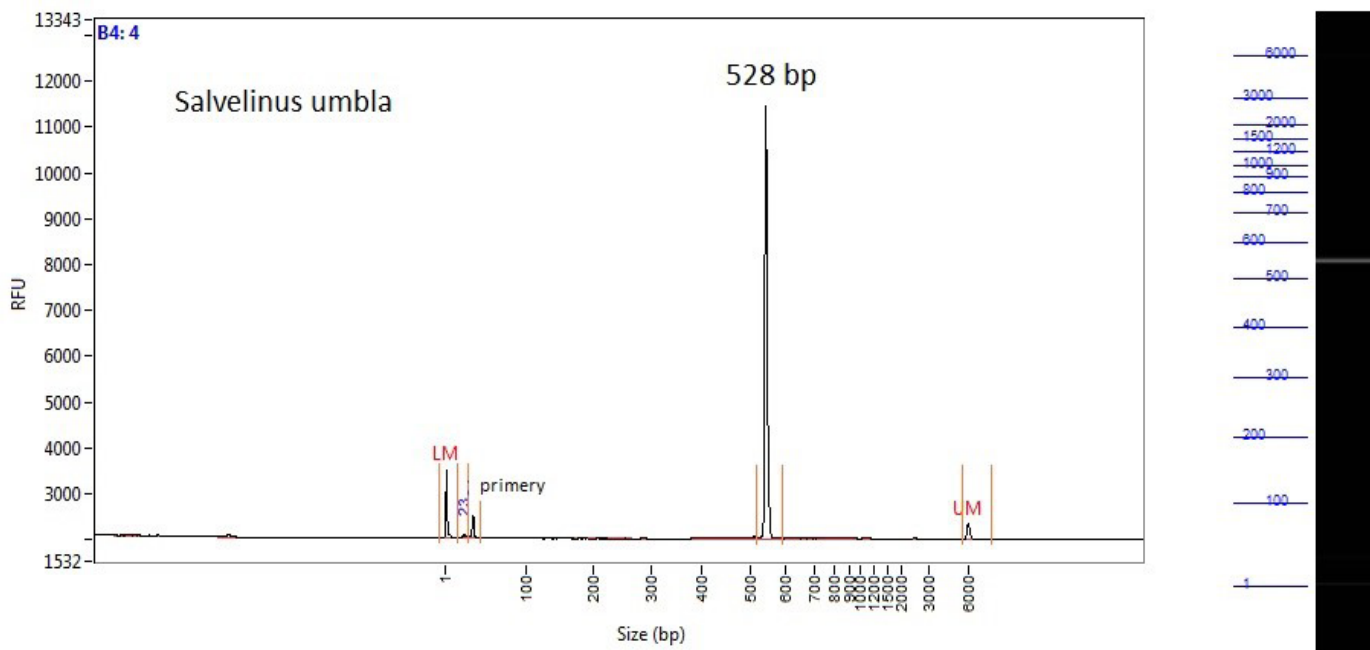
- 11 = *S. namaycush* (diagnostický kombinovaný vzor 243, 175/488 bp)
- 12 = *S. alpinus* (diagnostický kombinovaný vzor 243, 175/524 bp)
- 13 = *S. umbla* (diagnostický kombinovaný vzor 243, 179/528 bp)
- 14 = *S. fontinalis* varianta A (diagnostický kombinovaný vzor 305/583 bp)
- 15 = *S. fontinalis* varianta B (diagnostický kombinovaný vzor 394/589 bp)

L = FastGene 50bp DNA Ladder

N = negativní kontrola



Obr. 6. Ukázka zpracování dat u homozygota pomocí DNF-474 kitu a přístroje Fragment Analyzer™ s analytickým softwarem PROSize™ 2.0



Obr. 7. Ukázka zpracování dat u mezidruhového hybrida na přístroji Fragment Analyzer™ pomocí DNF-474 kitu a analytického softwaru PROSize™ 2.0

