

11/2019  
Metodika

# VLIV ODBĚRU VZORKŮ A ZPŮSOB JEJICH FIXACE NA MĚŘENÍ VELIKOSTI GENOMU

Ing. Karel Halačka, CSc.

Ing. Lukáš Vetešník, Ph.D.

PaedDr. Jakub Fedorčák, Ph.D.

prof. PaedDr. Ján Koščo, Ph.D.



ÚSTAV BIOLOGIE  
OBRATLOVCŮ  
AKADEMIE VĚD ČR





Metodika 11/2019

# VLIV ODBĚRU VZORKŮ A ZPŮSOB JEJICH FIXACE NA MĚŘENÍ VELIKOSTI GENOMU

Ing. Karel Halačka, CSc.

Ing. Lukáš Vetešník, Ph.D.

PaedDr. Jakub Fedorčák, Ph.D.

prof. PaedDr. Ján Koščo, Ph.D.

Brno, 2019

Metodika vznikla za finanční podpory projektu TAČR TG03010048  
Komerzializace výsledků zoologického výzkumu – aplikace využitelné  
v praktické ochraně

**Podíl autorů:**

Ing. Karel Halačka, CSc.<sup>(1)</sup> 80 %

Ing. Lukáš Vetešník, Ph.D.<sup>(1)</sup> 10 %

PaedDr. Jakub Fedorčák, Ph.D.<sup>(2)</sup> 5 %

prof. PaedDr. Ján Koščo, Ph.D.<sup>(2)</sup> 5 %

**Adresa autora:**

<sup>(1)</sup> Ústav biologie obratlovců Akademie věd ČR, v. v. i.,  
Květná 8, Brno 603 65

<sup>(2)</sup> Fakulta humanitných a prírodných vied - Katedra ekológie  
Prešovská univerzita  
Ul. 17. novembra č. 15, 080 01 Prešov, Slovakia

# Obsah

1. Cíl metodiky .....	4
2. Vlastní popis metodiky .....	4
2.1. Polyploidie .....	4
2.2. Průtoková cytometrie .....	5
2.3. Odběr vzorků a měření velikosti genomu .....	5
3. Výsledky .....	7
3.1. DAPI .....	7
3.2. PI (propidium jodid) .....	8
4. Metodická doporučení .....	9
5. Novost metodiky .....	9
6. Popis uplatnění .....	10
7. Ekonomické aspekty .....	10
8. Seznam použité literatury .....	10

## 1. Cíl metodiky

K důležitým informacím při studiu ryb, ať již se jedná například o evoluční aspekty, polyploidní komplexy či hybridizaci patří velikost genomu. Velmi rozšířenou metodou k jeho měření je průtoková cytometrie při níž se využívá vazby a fotoaktivity vhodné látky (obvykle DAPI nebo propidiumjodid /PI/) na úseky DNA.

K měření se velmi často využívá krve, resp. erytrocytů, které u ryb obsahují jádro. Výhodou použití krve je odběr vzorku není vázán na usmrcení jedince, odpadá nutnost homogenizace tkáně a současně ji lze využít i pro další hematologické analýzy. Nevýhodou je rychlé srážení, což vede k potřebě použití antikoagulantů, obvykle heparinu. Pokud jsou heparinizovány přímo pomůcky na odběr, tj. injekční jehla/stříkačka, je heparin obsažen v celém krevním vzorku.

Zejména z důvodu udávané fotoaktivity heparinu vyvstává otázka, zde nedochází k ovlivnění výsledků měření velikosti genomu pomocí průtokového cytometru. V této práci byl proto sledován možný vliv na výslednou hodnotu naměřeného množství DNA pomocí průtokové cytometrie s použitím DAPI a PI při odběru krve s využitím heparinu u vybraných druhů ryb.

## 2. Vlastní popis metodiky

### 2.1. Polyploidie

Polyploidie (znásobení chromozomových sad) je neobvykle důležitým evolučním mechanismem přispívajícím k obrovské diverzitě současných ryb. Její studium má význam například při výzkumu diploidně-polyloidních druhů/komplexů nebo evoluční polyploidie (jeseteří (*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. 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 úrovně 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, v běžné praxi se však moc nevyužívá. 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 atd. podle konkrétní situace – tj. minimálně cca 30–50 Kč).

Tato metoda je založena na obarvení jaderné DNA, resp. určitých úseků, specifickým, obvykle fluorescenčním barvivem. K nejčastěji používaným patří DAPI (4',6 – diamidin – 2 - fenylyndol), resp. propidium jodid (C27H34I2N4). Velikost genomu sledovaných buněk/jader, projevující se intenzitou fluorescence, je následně stanovena pomocí vhodného průtokového cytometru. Výsledky jsou na přístrojích 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 (nejčtenější hodnoty), průměru a variačního koeficientu (CV%).

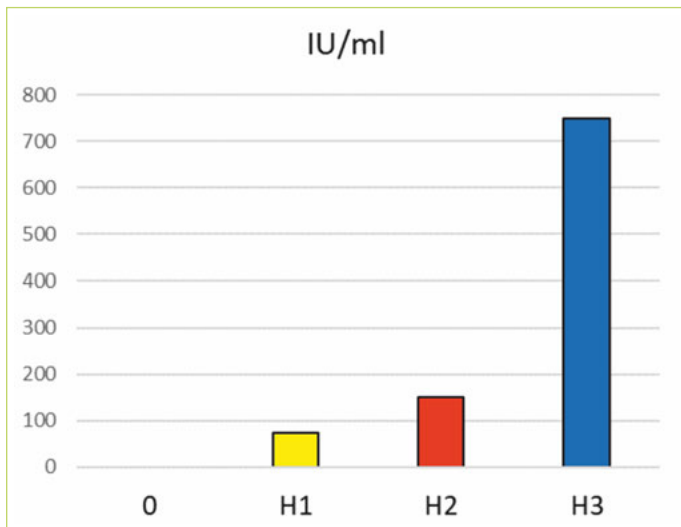
## 2.3. Odběr vzorků a měření velikosti genomu

V našem případě bylo použito jak barvení jader erytrocytů pomocí DAPI, tak PI. Následné měření bylo realizováno na přístroji PARTEC PA (Ploidy Analyser; Partec GmbH), resp. Partec CyFlow ML (Partec GmbH, Münster, Germany).

Měřeno bylo vždy minimálně několik tisíc částic (jader). Výsledky měření (modus/mean) byly následně zprůměrovány a přepočteny na procentickou hodnotu (kontrolní měření, tj. krev bez přítomnosti heparinu = 100 %)

		DAPI	PI
Bolen dravý	<i>Aspius aspius</i>	12	-
Kapr obecný	<i>Cyprinus carpio</i>	15	-
Sekavec	<i>Cobitis sp.</i>	12	-
Keříčkovec červenolemý	<i>Clarias gariepinus</i>	10	-
Karas stříbřitý	<i>Carassius gibelio</i>	9	3
Perlín ostrobříhý	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	-	3

Odběr byl realizován za pomoci inzulínové stříkačky (standardní inzulínová stříkačka – OMNICAN50-50I.U./0,5ML 30GX12 inzulín; B BRAUN – s integrovanou jehlou) z podčasné žíly. Každá ryba byla odebrána čtyřikrát (u sekavců vzhledem k jejich malé velikosti byly realizovány pouze tři odběry /0, H2, H3/):



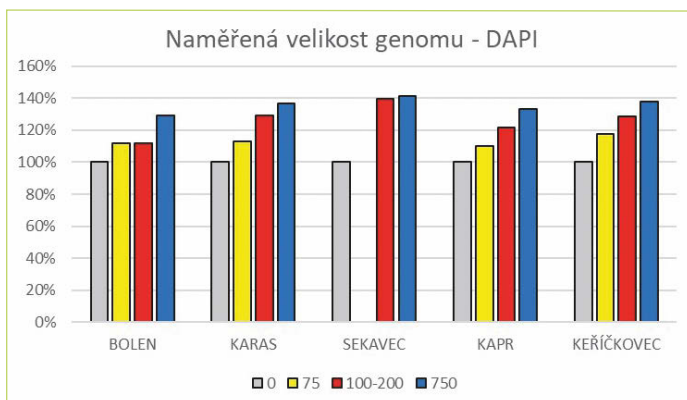
Při prvním kontrolním odběru (0) byla použita čistá injekční stříkačka. U odběru H1 byla použita injekční stříkačka, do které byl 30 minut před odběrem nasán heparin (Heparinum natricum, 5000 UI/1ml), vystříknut a poté opakovaným rychlým pohybem pístu odstraněno maximum zbylé tekutiny (simulace stavu, kdy je k odběru použito „předheparinizovaných“ odběrových pomůcek). Při odběru H2 a H3 byl do stříkačky natažen heparin těsně před odběrem, poté opatrně vystříknut tak, aby zůstal v jehle a na dně stříkačky. V odběrech 0, H1 a H3 bylo odebráno minimální množství krve, které je postačující pro měření ploidie na průtokovém cytometru (objevení se krve v horní části jehly na dně inzulínové stříkačky, tj. cca < 0,001 ml (simulace situace, kdy je heparin aplikován až těsně před odběrem ryby). U odběru H2 bylo odebráno 0,1 ml krve, ta byla ve stříkačce promíchána. Výsledná koncentrace heparinu tak byla v jednotlivých odběrech následující: 0 – 0; H1 – 75 UI/ml; H2 – 100-200 UI/ml;



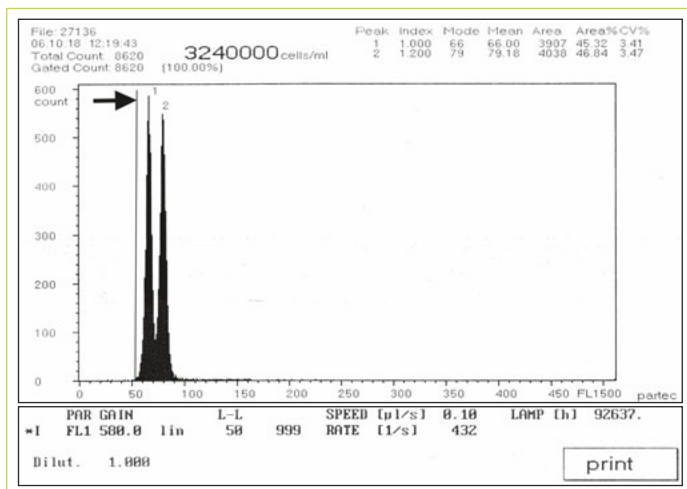
### 3. Výsledky

#### 3.1. DAPI

Naměřená velikost genomu ukázala průkazné rozdíly v závislosti na použití heparinu, resp. jeho koncentraci při odběru vzorku krve. Aplikace heparinu zvýšila hodnoty až o 40 % oproti vzorku krve získanému bez heparinizovaného odběrového vybavení.



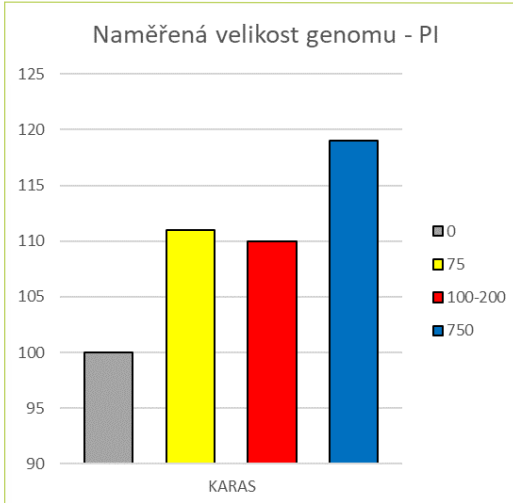
Na rozdíl od naměřených hodnot kvalita měření, projevující se rozptylem hodnot jednotlivých měřených objektů (buněčných jader), zůstala stejná.



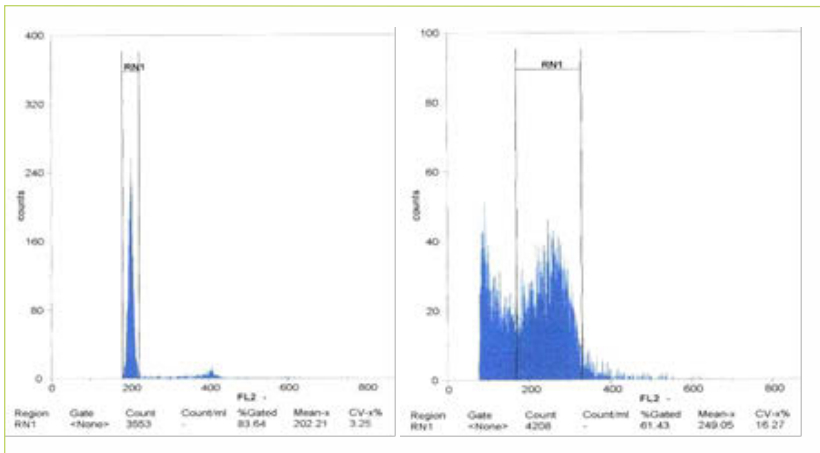


### 3.2. PI (propidium jodid)

Tak jak v případě barvení pomocí DAPI i zde byl pozorováno zvýšení hodnot, i když v nižší (přibližně poloviční) hodnotě.



Aplikace heparinu se zde však výrazně projevila sníženou kvalitou měření, tj. vyšším rozptylem hodnot velikosti genomu jednotlivých jader.



#### 4. Metodická doporučení

Jak ukázalo naše sledování, využití heparinu při odběru krve, jako látky s udávanou schopností fluorescence opravdu výsledné měření výrazně ovlivnilo. Tyto změny byly patrné i při použití minimálního množství heparinu a byly úměrné jeho koncentraci.

To bohužel znamená, že hodnoty obsahu DNA stanovené tímto způsobem mohou být zatíženy chybou. Ta bude kolísat na skutečném poměru heparinu k množství odebrané krve a nebude snadné ji upravit například stanovením opravného koeficientu.

Přitom se ke stanovení obsahu DNA buněk se ryb velmi často využívají krevní buňky (v databázi „genomesize“ bylo erytrocytů použito v 1742 ks ze 1823, fcm 400 ryb). V naprosté většině se autoři zmiňují o použití heparinu při získání vzorku krve. Je tak možné, že udávané kolísání naměřeného obsahu DNA v rámci jednoho druhu může částečně souviset i s ovlivněním hodnot kontaminací vzorku heparinem.

V případě potřeby stanovení pouze stupně ploidie (obvykle rozlišení di- a tri-ploidních jedinců, kdy se jedná o rozdíly v mnoha desítkách procent), nemusí být toto zásadní, v případě studií zaměřených na porovnání obsahu DNA (či studiu tetra- a více ploidních jedinců) může představovat problém.

Je třeba připomenout, že hodnota získaná pomocí průtokového cytometru je relativní a pro získání hodnot absolutních je třeba použít srovnávacího standardu. Pokud i tímto standardem je opět krevní vzorek (což není neobvyklé), chyba způsobená použitím heparinu se může dále zvyšovat.

Při stanovení obsahu DNA z krevního vzorku je proto třeba doporučit použití, je-li to nezbytné, co nejmenší množství heparinu, resp. zvýšit objem odebrané krve, nejlépe ovšem, je-li to možné, heparin při odběru krve pro průtokovou cytometrii nepoužívat.

#### 5. 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 fixací (formaldehyd, alkohol, zmrazení).



## 6. Popis uplatnění

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. Uplatnění tak může najít jak například u producentů ryb, organizacemi zabývajícími se výzkumem nebo výukou, veterinární praxí nebo i v rámci ochrany ryb.

## 7. Ekonomické aspekty

K ekonomickým přínosům využití metodiky patří zejména zamezení ztrát způsobených nesprávnou interpretací výsledků, a to jak v produkční sféře (významné zejména při výběru generačních ryb či kontrole potomstva) tak v oblasti výzkumu. Dojde tak k omezení nákladů a času na potřebné kontrolní analýzy 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 (speciální jednorázové zkumavky, sítko, barvicí a čistící roztoky, obsluha přístroje). U skupiny několika desítek analyzovaných vzorků to tak znamená ztrátu v řádu stovek až tisíc korun. Celkový ekonomický přínos pro jednotlivé uživatele metodiky lze odhadnout podle počtu analyzovaných vzorků a náročnosti na jejich získávání a laboratorní zpracování na několik desítek tisíc korun ročně.

## 8. Seznam použité literatury

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

Benfey T.J., Sutterlin A.M., Thompson R.J., 1984: Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. Sci. 41: 980–984.

Doolittle R.F., Surgenor D.M., 1962: Blood coagulation in fish. *American Journal of Physiology - Legacy Content*, 203 (5): 964–970.

Flajšhans M., Rodina M., Halačka K., Vetešník L., Gela D., Lusková V., Lusk S., 2008: Characteristics of sperm of polyploid Prussian carp *Carassius gibelio*. *Journal of Fish Biology*, 73: 323–328.

Gold J.R., Ragland C.J., Birkner M.C., Garrett G.P., 1991: A simple procedure for long-term storage and preparation of fish cells for DNA content analysis using flow cytometry. *Progressive Fish-Culturist* 53: 108–110.

Gregory T.R., 2019: Animal Genome Size Database. Available from <http://www.genomesize.com>.

Gregory T.R., Witt J.D.S., 2008: Population size and genome size in fishes: a closer look. *Genome*, 51(4): 309–313.

Grossgebauer K., Küpper D., Grossgebauer K., Küpper D., 1981: Interactions between DNA-binding fluorochromes and mucopolysaccharides in agarose-diffusion test. *Klinische Wochenschrift* 59, 18: 1065–1066.

Gu X., Zhang G., Zhang D., 2012: A new ratiometric fluorescence detection of heparin based on the combination of the aggregation – induced fluorescence quenching and enhancement phenomena. *Analyst*, 137: 365–369.

Jakobsen A., 1983: The Use of Trout Erythrocytes and Human Lymphocytes for Standardization in Flow Cytometry. *Cytometry* 4:161–165.

Svobodova Z., Pravda D., Palackova J., 1991: Unified Methods of Haematological Examination of Fish. Methods No 20. Vodňany, Czech Republic: Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology.

Šimková A., Hyršl P., Halačka K., Vetešník L., 2015: Physiological and condition – related traits in the gynogenetic – sexual *Carassius auratus* complex: different investments promoting the coexistence of two reproductive forms? *BMC Evolutionary Biology* 15:154.

Vetešník L., Halačka K., Lusková V., Lusk S., 2006: Erythrocyte profile of diploid and triploid silver crucian carp (*Carassius auratus*). *Acta veterinaria Brno*, 75: 203–207.

Walencik J., Witeska M., 2007: The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus scarpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 146: 331–335.

Witeska M., Biardzka J., Kniaz J., 2017: The effects of heparin concentration, storage time, and temperature on the values of hematological parameters in *Cyprinus carpio*. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science* 41: 351–356.

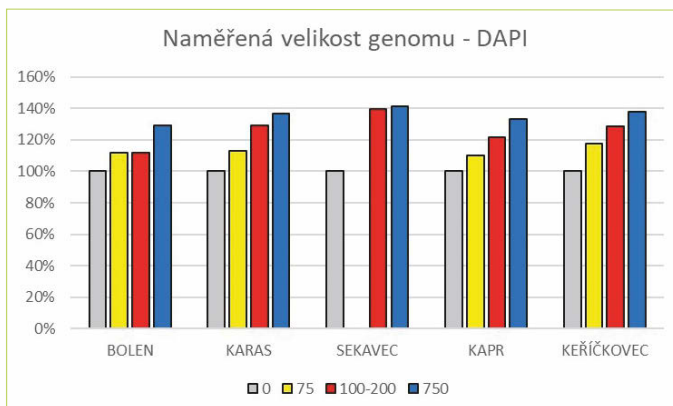
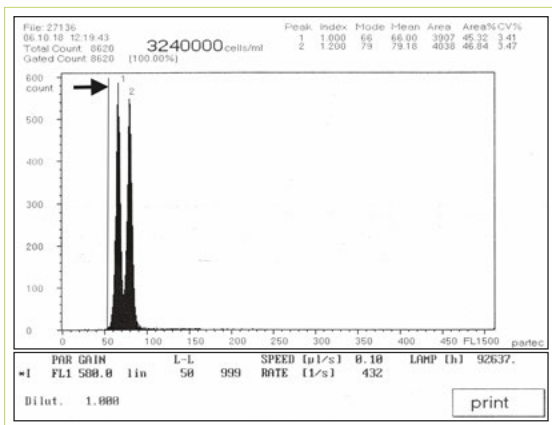
Vliv odběru vzorků a způsob jejich fixace na měření velikosti genomu  
Metodika 11/2019

Ing. Karel Halačka, CSc.  
Ing. Lukáš Vetešník, Ph.D.  
PaedDr. Jakub Fedorčák, Ph.D.  
prof. PaedDr. Ján Koščo, Ph.D.

---

Vydavatel: Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., Květná 170/8, 603 65 Brno  
Grafická úprava a zalomení: Ján Otradovec  
Tisk: Computer MCL Brno spol. s. r. o.  
Vydání: první, 2019  
Počet stran: 12  
ISBN 978-80-87189-28-3





Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i.  
Květná 8, Brno 603 65  
Tel.: +420 543 422 540  
E-mail: ubo@ivb.cz

www.ivb.cz