



Aleš Knoll, Petra Bartoňová, Lucie Langová,
Antonín Přidal, Tomáš Urban

METODIKA HODNOCENÍ DIVERZITY VČELY MEDONOSNÉ POMOCÍ MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ

CERTIFIKOVANÁ METODIKA
č. QK22020324_CM1



Mendelova univerzita v Brně

**Aleš Knoll, Petra Bartoňová, Lucie Langová, Antonín Přidal,
Tomáš Urban**

Metodika hodnocení diverzity včely medonosné pomocí mikrosatelitových markerů

CERTIFIKOVANÁ METODIKA
č. QK22020324_CM1

2024



Autorský tým (podíly na realizaci):

Aleš Knoll^{1*} (60 %);  <https://orcid.org/0000-0002-4230-8535>

Petra Bartoňová¹ (15 %)

Lucie Langová¹ (5 %)

Antonín Přidal¹ (10 %)

Tomáš Urban¹ (10 %)

¹ Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

* Korespondenční autor: prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4230-8535>; email: knoll@mendelu.cz

Oponent

Prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.¹

¹ Katedra genetiky a biotechnologií, FZT Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice
Kontakt: citek@fzt.jcu.cz

Certifikace

Č.j. MZE-66680/2024-16232

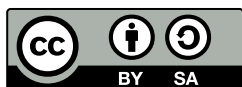
Financování

Tato certifikovaná metodika „Metodika hodnocení diverzity včely medonosné pomocí mikrosatelitových markerů“ je řešena za podpory projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) č. QK22020324 – Hodnocení geonomické diverzity včely medonosné ve vztahu ke zdravotnímu stavu jejich populací v ČR.

© Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

ISBN 978-80-7701-015-3 (online ; pdf)

<https://doi.org/10.11118/978-80-7701-015-3>



Open Access: Publikace *Metodika hodnocení diverzity včely medonosné pomocí mikrosatelitových markerů* podléhá licenci CC BY-SA 4.0
(<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.cs>)

Abstrakt

Certifikovaná metodika je detailní popis laboratorní analýzy založené na molekulárně-genetickém přístupu využívající panel mikrosatelitů pro hodnocení genetické variability včely medonosné v České republice. Byl sestaven panel 10 validních, vysoce polymorfních lokusů vhodných pro rutinní testování metodou fluorescenční multiplexní polymerázové řetězové reakce (PCR).

Klíčová slova

Metodika, diverzita, mikrosatelit, včela medonosná

Abstract

The certified methodology is a detailed description of a laboratory analysis based on a molecular genetic approach using a panel of microsatellites to assess the genetic variability of honey bees in the Czech Republic. A panel of 10 valid, highly polymorphic loci suitable for routine testing by fluorescence multiplex polymerase chain reaction (PCR) was assembled.

Keywords

Methodology, diversity, microsatellite, honey bee

1 Cíl

Cílem předkládané metodiky je detailní popis laboratorní analýzy založené na molekulárně-genetickém přístupu využívajícím panel mikrosatelitů pro hodnocení genetické variability včely medonosné v České republice. Bude sestaven panel 10 validních, vysoce polymorfních lokusů vhodných pro rutinní testování metodou fluorescenční multiplexní polymerázové řetězové reakce (PCR).

2 Úvod

2.1 Včela medonosná

Včela medonosná (*Apis mellifera*) patří k řádu blanokřídlých (*Hymenoptera*). Je to nejdokonalejší druh čeledi včelovitých (*Apidae*) i rodu včela (*Apis*). V současné době je rozšířena po celém světě. Jednotlivé poddruhy včel se mezi sebou geneticky liší. Tento rozdíl je způsoben zejména rozdílnými přírodními podmínkami (nadmořskou výškou, vzdáleností od vodních ploch, případně i výskytem pouští). Rozmanitost je patrná zejména u včel žijících na ostrovech, kde díky izolaci populace dochází ke zrychlení genetické diferenciace a rychlejšímu průběhu evolučních změn.

V roce 2006 byl přečten genom včely medonosné. Tento genom je rozdělen na dvě hlavní části. Jaderná DNA nese genetickou informaci, je uspořádána do chromozomů (32 chromozomů u dělnic, 16 chromozomů u trubců). Mitochondriální genom je lokalizován mimo buněčné jádro a jeho studium napomáhá porozumění evoluci včely medonosné.

Navzdory určitému lidskému účinku na chov včel jsou včely stále ve stádiu polodomestikace a jsou schopny samostatně existovat ve svém přirozeném prostředí.

2.2 Mikrosatelity (MS)

Rozdíl mezi jedinci, skupinami nebo populacemi na úrovni DNA, rozdíl v sekvenci jejich DNA, se označuje jako genetický polymorfismus. Ten vzniká díky mutacím. Jedním typem těchto mutací jsou opakující se sekvence označované jako mikrosatelity (MS) = short tandem repeats (STR). Mikrosatelity jsou krátké sekvence DNA o délce 2-6 bp. Tyto sekvence se tandemově opakují. Nejčastěji se v genomech vyskytují dvounukleotidové a třínukleotidové repetice. Mikrosatelity jsou vysoce polymorfní. Vyskytují se v několika alelických variantách, které se mezi sebou liší právě v počtu repetic. Mikrosatelity se dnes již běžně používají k identifikaci jedinců a ověřování rodičovství/otcovství. Jejich další využití spočívá v hodnocení genetické variability různých živočišných druhů.

Mikrosatelity jsou vybírány na základě několika kritérií. Nejdůležitějším kritériem je počet alel daného MS. Čím více alelických variant daný MS má, tím je vhodnější pro studium variability. Vhodné je také MS navrhovat tak, aby byly co nejvíce rozprostřeny po celém genomu studovaného živočišného druhu, měly co nejméně nulových alel, vysoký polymorfní informační obsah (PIC) a byly vhodné pro multiplex PCR.

Ve světě bylo popsáno velké množství mikrosatelitních lokusů, nicméně pro rutinní použití je třeba, aby bylo možno co nejjednodušeji a nejlevněji otestovat ty z nich, které jsou v rámci populace včely medonosné v České republice.

2.3 Mikrosatelity u včely medonosné

Mikrosatelitní markery vybrané pro genetickou analýzu evropské včely medonosné (*Apis mellifera*) byly z části lokalizovány na genomové DNA poddruhu *Apis mellifera mellifera* a z části v genomové knihovně bakteriálního umělého chromozomu (BAC). Celkem bylo detekováno 552 polymorfních míst (MS) pro včelu medonosnou. Tyto mikrosatelity jsou zveřejněny v databázi Molecular Ecology Notes.

Studiem variability mikrosatelitních markerů se zabývalo velké množství autorů. Jejich studie se liší lokalitami, kde biodiverzitu včely medonosné studovali. Pro naši analýzu bylo vybráno 22 mikrosatelitních markerů rozdělených do čtyř multiplexů. V Tab. 1 jsou uvedeny názvy jednotlivých MS, jejich prvoautor a další autoři, kteří se studiem těchto MS zabývali.

Tab. 1 Přehled použitých MS různými autory

Lokus	První autor primerů	Solignac et al., 2003	Sušnik et al., 2004	(Muñoz et al., 2009)	Alburaki et al., 2013	Péntek- Zakar et al., 2015	Eimanifar et al., 2020	Kükrer et al., 2021	Muñoz, De la Rúa, 2021
MP1									
Ap218	Solignac <i>et al.</i> 2003	ano	x	x	x	x	x	ano	x
A113	Estoup <i>et al.</i> 1995	ano	x	ano	ano	ano	x	ano	ano
A024	Estoup <i>et al.</i> 1995	ano	ano	x	ano	ano	ano	ano	x
Ap249	Solignac <i>et al.</i> 2003	ano	x	x	x	x	x	ano	ano
A088	Estoup <i>et al.</i> 1995	ano	ano	x	ano	ano	ano	ano	ano
Ap043	Garnery et al. 1998	ano	x	ano	ano	x	ano	ano	ano
MP2									
A079	Estoup <i>et al.</i> 1994	ano	x	x	x	x	ano	ano	ano
Ac306	Solignac <i>et al.</i> 2003	ano	x	x	x	x	x	ano	x
Ap226	Solignac <i>et al.</i> 2003	ano	x	x	x	x	x	ano	x
A007	Estoup <i>et al.</i> 1994	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
HB-C16-01	Shaibi et al. 2008	x	x	x	x	x	x	ano	x
Ap068	Solignac <i>et al.</i> 2003	ano	x	x	x	x	x	ano	x
A014	Estoup <i>et al.</i> 1994	x	x	x	x	ano	ano	ano	x
Ap223	Solignac <i>et al.</i> 2003	ano	x	x	x	x	x	ano	x
MP3									
Ap019	Tunca 2009	x	x	x	x	x	x	ano	
B124	Estoup <i>et al.</i> 1994	ano	x	ano	ano	x	ano	ano	ano
Ap273	Solignac <i>et al.</i> 2003	ano	x	x	x	x	x	ano	x
Ap289	Solignac <i>et al.</i> 2003	ano	x	x	x	x	x	ano	x
HB-C16-05	Shaibi et al. 2008	x	x	x	x	x	ano	ano	x
MP4									
Ap049	Solignac <i>et al.</i> 2003	ano	x	x	x	x	x	ano	x
A043	Estoup <i>et al.</i> 1994	ano	ano	x	ano	ano	x	ano	x
Ap288	Solignac <i>et al.</i> 2003	ano	x	x	x	x	x	ano	x

3 Vývoj metodiky

3.1 Získání dat pro výběr MS

Původní sada zahrnovala 22 mikrosatelitů amplifikovaných v celkem 4 multiplexech. V Tab. 2 – Tab. 5 je uvedeno složení jednotlivých multiplexů, sekvence primerů pro dané MS, jejich velikost, rozsah, fluorescenční značka, opakující se motiv a první autor.

Tab. 2 Primery pro multiplex PCR 1 (Zdroj: Kükreer et al., 2021, upraveno)

Primer	Sekvence	Velikost (nt)	Rozsah (bp)	Fluorescentní značka	Motiv	První autor
Ap218-F	AGGGATGGAATTCTTCGATT	20	122-138	6-FAM	(CA) ₆	Solignac et al., 2003
Ap218-R	TTGTCACAATTCCGCTTGA	19				
A113-F	CTCGAATCGTGGCGTCC	17	195-237	6-FAM	(TC) ₂ C(TC) ₂ TT(TC) ₅ TT (TC) ₈ TT(TC) ₅	Estoup et al. 1995
A113-R	CCTGTATTTTGCAACCTCGC	20				
A024-F	CACAAGTTCCAACAATGC	18	92-104	VIC	(CT) ₁₁	Estoup et al. 1995
A024-R	CACATTGAGGATGAGCG	17				
Ap249-F	CGCGCGACGACGAAATGT	18	207-220	VIC	(GA) ₆ (GA) ₈	Solignac et al., 2003
Ap249-R	CAGTCCTTTGATTCGCGCTACC	22				
A088-F	CGAATTAACCGATTGTGTCG	19	131-152	NED	(CT) ₁₀ TC(CCTT) ₂ (CTTT) ₃ (GGA) ₇	Estoup et al. 1995
A088-R	GATCGCAATTATTGAAGGAG	20				
Ap043-F	GGCGTGCACAGCTTATTC	19	134-162	PET	(TA) ₆ GATA(GA) ₁₀	Gamery et al. 1998
Ap043-R	CGAAGGTGGTTTCAGGCC	18				

Tab. 3 Primery pro multiplex PCR 2 (Zdroj: Kükreer et al., 2021, upraveno)

Primer	Sekvence	Velikost (nt)	Rozsah (bp)	Fluorescentní značka	Motiv	První autor
A079-F	CGAAGGTTGCGGAGTCCTC	19	89-124	6-FAM	(CT) ₁₄	Estoup et al. 1994
A079-R	GTCGTCGGACCGATGCG	17				
Ac306-F	GAATATGCCGCTGCCACC	18	161-187	6-FAM	(CT) ₁₁	Solignac et al., 2003
Ac306-R	TTTCGTTGCATCCGAGCG	18				
Ap226-F	AACGGTGTTCGCGAAACG	18	228-248	6-FAM	(CT) ₈	Solignac et al., 2003
Ap226-R	AGCCAACCTCGTGC GG TCA	18				
A007-F	CCCTTCCTCTTTCATCTTCC	20	94-136	VIC	(CT) ₃ (T) ₇ CTTCG(CT) ₂₄	Estoup et al. 1994
A007-R	GTTAGTGCCCTCCTCTTGC	19				
HB-C16-01-F	AAAATGCGATTCTAATCTGG	20	249-309	VIC	(GA) ₃₅	Shaibi et al. 2008
HB-C16-01-R	TTGCCTAAAATGCTTGCTAT	20				
Ap068-F	TGTCTGCCCTCTCTCTGTT	20	147-169	NED	(CT) ₁₂ (TA) ₈	Solignac et al., 2003
Ap068-R	CACATCGAGCGAGAAGGC	18				
A014-F	GTGTCGCAATCGACGTAACC	20	214-247	NED	(CT) ₁₃ (GGT) ₉	Estoup et al. 1994
A014-R	GTCGATTACCGATCGTGACG	20				
Ap223-F	TCGTACAACGTCGCGCAA	18	147-182	PET	(T) ₅ (C) ₄ A(T) ₆ (C) ₅	Solignac et al., 2003
Ap223-R	GCCGCTCGCCTGTATCTG	18				

Tab. 4 Primery pro multiplex PCR 3 (Zdroj: Kükreer et al., 2021, upraveno)

Primer	Sekvence	Velikost (nt)	Rozsah (bp)	Fluorescentní značka	Motiv	První autor
Ap019-F	CTCGTTTCTTCCATTGCG	18	133-144	6-FAM	(TC) ₁₁	Tunca 2009
Ap019-R	CGGTACGCGGTAGAAAGA	18				
B124-F	GCAACAGGTCGGGTTAGAG	19	210-244	6-FAM	(CT) ₈ (CT) ₁₄ CCTC (GC) ₃ (GGCT) ₈	Estoup et al. 1994
B124-R	CAGGATAGGGTAGGTAAGCAG	21				
Ap273-F	GATCTTGTGTAAACAGCCG	20	102-108	NED	(CT) ₈	Solignac et al., 2003
Ap273-R	GATCTCTGGCAGACGAAGAG	20				
Ap289-F	AGCTAGGTCTTTCTAAGAGTGTG	24	173-217	NED	(GA) ₅	Solignac et al., 2003
Ap289-R	TTCGACCGCAATAACATTC	19				
HB-C16-05-F	ATTTTATGVGVGTTTCGTA	19	70-110	PET	(TC) ₂₃	Shaibi et al. 2008
HB-C16-05-R	CATGGCTCCTCCATTAAATC	20				

Tab. 5 Primery pro multiplex PCR 4 (Zdroj: Kükreer et al., 2021, upraveno)

Primer	Sekvence	Velikost (nt)	Rozsah (bp)	Fluorescentní značka	Motiv	První autor
Ap049-F	GGGCTTCGTACGTCCACC	18	121-151	6-FAM	(AGG) ₇	Solignac et al., 2003
Ap049-R	GGGCTTCGTACGTCCACC	18				
A043-F	CCGCTCATTAAGATATCCG	19	123-143	VIC	(CT) ₁₃	Estoup et al. 1994
A043-R	CCGCTCATTAAGATATCCG	19				
Ap288-F	GTTAGTTCGTCGTCGACCG	19	125-135	NED	(TAA) ₈	Solignac et al., 2003
Ap288-R	TCTTAGCTTTATAACGAGCACG	22				

3.2 Výběr sady 10 mikrosatelitů

Na základě množství alel, heterozygotnosti a spolehlivosti při testování bylo vybráno 10 mikrosatelitů, a to A113, A079, AP019, Ap249, HB-C16-01-F, A088, A014, Ap223, Ap226, HB-C16-05-F, viz Tab. 6.

Bylo optimalizováno množství jednotlivých primerů v multiplexní reakci (Tab. 6) a ověřeno, že vybrané mikrosatelity jsou vzájemně kompatibilní pro multiplex.

4 Vlastní popis metodiky

4.1 Sběr a uchování vzorků

Po samotném odběru mohou být včely krátkodobě skladovány v lednici a v co nejkratší době doručeny do laboratoře ke zpracování. Pro dlouhodobější skladování je vhodné včelu uchovat v etanolu při teplotě -20 °C, popřípadě jen při teplotě -20 °C. Důležité je se vyvarovat uchování vzorků v prostředí s vyšší vlhkostí a teplotou.

4.2 Izolace DNA

4.2.1 Vzorky včel

Tělo včely medonosné je složeno z hlavy, hrudi, jednoho páru křídel, tří párů nohou a zadečku. Pro izolaci DNA byla použita hrud', končetiny a křídla. Hlava a zadeček byly z důvodu potenciální kontaminace včelí potravou odděleny a pro izolaci DNA nepoužity. Vybrané části těla včely byly vloženy do 1,5ml mikrozkušavky a použity pro analýzy DNA.

Pro získání DNA nejvyšší kvality a kvantity byla vyzkoušena řada izolačních technik, z nichž nejlepších výsledků dosahovala izolace DNA pomocí Genomic DNA mini kit (Tissue) od firmy Geneaid.

4.2.2 Izolace DNA pomocí chelexu

Extrakce DNA pomocí chelexu je velmi populární metodou ve forenzní genetice, kde se používá k izolaci DNA ze zaschlých krevních vzorků tkání, vlasů a kostí. Tato metoda je velmi rychlá a poměrně levná. Velkou výhodou je minimální riziko kontaminace vzorků, díky tomu, že celý proces probíhá pouze v jedné zkumavce.

Chelex je pryskyřice složená ze styren divinylbenzen kopolymeru (makromolekulární látka, její molekuly jsou tvořeny nejméně ze dvou různých monomerů) s párovými iminodiacetátovými ionty. Tyto ionty působí jako chelátory, které vážou polyvalentní kovové ionty. Za alkalických podmínek zvyšuje chelex afinitu ke kationtům těžkých kovů (Ca^{2+} , Mn^{2+} a Mg^{2+}), což má při extrakci velký význam, protože tyto dvojmocné ionty mohou při vysoké teplotě (95-100 °C) způsobit poškození DNA. Kromě toho chelatační Mg^{2+} ionty způsobují inaktivaci nukleázy (např. DNázy degradujících DNA), což je při izolaci DNA nezbytné, protože jsou Mg^{2+} ionty nezbytné pro jejich enzymatickou aktivitu. Principem izolace je fyzická homogenizace a následná destrukce a degradace buněčných membrán, proteinů a denaturace DNA za alkalických podmínek a vysoké teploty (95-100 °C). Dále se suspenze centrifuguje, tak aby se oddělila pryskyřice a zbytky buněčných komponent od supernatantu obsahujícího DNA. DNA se může přímo používat pro PCR amplifikaci, avšak je potřeba zamezit kontaktu pryskyřice s PCR reakcí, protože samotný chelex je inhibitorem PCR.

Použité přístroje a vybavení:

- sada automatických pipet, jednorázové špičky, 1,5ml mikrozkušavky, pinzeta, nůžky, vortex, centrifuga, termální bloky, mikropestle (plastový homogenizátor)

Chemikálie:

- 10 % roztok chelexu
- ddH₂O
- Proteináza K (c = 20 mg/ml)
- EtOH 96%

Pracovní postup:

- nahřátí termálních bloků na 56 °C a 95 °C
- do 1,5ml mikrozkušavky napipetovat 50μl 10% roztoku chelexu (použijeme špičku s ustřiženým koncem, kterou chelex před odpipetováním pomocí pipety promícháme) a přidat 50μl ddH₂O (výsledná koncentrace chelexu je tak 5 %)
- k připravenému 5 % roztoku chelexu přidat hrud' včely medonosné s křídly a končetinami a pomocí mikropestle zhomogenizovat
- ke zhomogenizovanému materiálu přidat 3μl Proteinázy K a zvortexovat
- inkubovat 30 min. při 56 °C, každých 10 min protřepat
- po inkubaci vzorek 10–15 s vortexovat
- poté inkubovat 10 min. při 95 °C
- vortexovat 10–15 s
- vzorky centrifugovat 5 min na maximální rychlost centrifugy
- vzniklý supernatant přepipetovat do čisté 1,5ml mikrozkušavky
- skladovat v -20 °C

4.2.3 Izolace DNA pomocí NucleoSpin® Tissue od firmy Macherey-Nagel

K izolaci DNA byla vyvinuta řada metodik v různých modifikacích, např. proteinázová metoda, fenol-chloroformová extrakce, nebo tzv. kolonková metoda. Podstatou této metody je adsorpce DNA na silikátovou membránu, její promytí a následné uvolnění do zkumavky. Prvním krokem je příprava biologického materiálu, ze kterého bude DNA izolována, a jeho případná homogenizace. Dále za pomoci lyzačního pufru a proteinázy K dojde k vytvoření lyzátu, ve kterém je DNA uvolněna z buněčného jádra. Vzniklý lyzát je přepipetován na kolonu se silikátovou maticí. Při následné centrifugaci dojde k zachycení, navázání DNA na silikát. V dalších dvou krocích je DNA promývána a v posledním kroku je ze silikátové matrice uvolněna za pomoci elučního pufru. Takto izolovanou DNA použijeme pro další analýzy.

Použité přístroje a vybavení:

- sada automatických pipet, jednorázové špičky, 1,5ml mikrozkušavky, pinzeta, nůžky, skalpel, vortex, centrifuga, termální bloky nebo termostaty, mikropestle (plastový homogenizátor)

Chemikálie:

- souprava NucleoSpin® Tissue od firmy Macherey-Nagel – T1 lyzační pufr, B3 lyzační pufr, BW promývací pufr, B5 promývací pufr, BE eluční pufr, sběrné zkumavky, NucleoSpin® Filter zelené filtrační kolony, proteináza K, PB pufr k naředění proteinázy K
- 96 % ethanol

Pracovní postup:

- nahřátí termálních bloků na 56 °C a 70 °C

Příprava vzorku a lýze buněk

- do 1,5ml mikrozkušavky tělo včely bez hlavy a zadečku
- přidat 180 µl T1 pufru, pomocí homogenizační tyčinky rozmělnit
- ke zhomogenizovanému materiálu přidat 25µl Proteinázy K a zvortexovat
- inkubovat 2 h při 56 °C, každých 10-15 min protřepat
- přidat 200 µl B3 pufru, zvortexovat
- inkubovat 10 min při 70 °C
- přidat 210 µl 96 % ethanolu, zvortexovat

Navázání DNA na membránu

- přemístit lyzát na NucleoSpin® Filter vložené do sběrné zkumavky
- centrifugovat 1 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě

Promývání silikátové membrány

- umístit kolonu s navázanou DNA do čisté sběrné zkumavky
- přidat 500 µl BW pufru
- centrifugovat 1 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě a vyprázdnit sběrnou zkumavku
- přidat 600 µl B5 pufru
- centrifugovat 1 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě a vyprázdnit sběrnou zkumavku

Sušení silikátové membrány

- centrifugovat 1 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě

Eluce

- kolonu přenést do čisté 1,5ml mikrozkušavky
- přidat 100 µl BE pufru předehřátého na 70 °C
- inkubovat 1 min při laboratorní teplotě
- centrifugovat 1 min/ 11 000 otáček při laboratorní teplotě
- kolonu odstranit
- izolát skladovat v -20 °C

4.2.4 Izolace DNA pomocí Genomic DNA mini kit (Tissue) od firmy Geneaid

K izolaci DNA byla vyvinuta řada metodik v různých modifikacích, např. proteinázová metoda, fenol-chloroformová extrakce, nebo tzv. kolonková metoda. Podstatou této metody je adsorpce DNA na silikátovou membránu, její promytí a následné uvolnění do zkumavky. Prvním krokem je příprava biologického materiálu, ze kterého bude DNA izolována, a jeho případná homogenizace. Dále za pomoci lyzačního pufru a proteinázy K dojde k vytvoření lyzátu, ve kterém je DNA uvolněna z buněčného jádra. Vzniklý lyzát je přepipetován na kolonu se silikátovou maticí. Při následné centrifugaci dojde k zachycení, navázání DNA na silikát. V dalších dvou krocích je DNA promývána a

v posledním kroku je ze silikátové matrice uvolněna za pomoci elučního pufru. Takto izolovanou DNA použijeme pro další analýzy.

Použité přístroje a vybavení:

- sada automatických pipet, jednorázové špičky, 1,5ml mikrozkušavky, pinzeta, nůžky, skalpel, vortex, centrifuga, termální blok nebo termostat, mikropestle (plastový homogenizátor)

Chemikálie:

- souprava Genomic DNA mini kit (Tissue) od firmy Geneaid – GT lyzační pufr, GBT lyzační pufr, W1 promývací pufr, WASH promývací pufr, eluční pufr, sběrné zkumavky, GS Columns filtrační kolony, proteináza K
- 96 % ethanol
- ddH₂O

Pracovní postup:

- nahřátí termálního bloku na 60 °C

Příprava vzorku a lýze buněk

- do 1,5ml mikrozkušavky tělo včely bez hlavy a zadečku
- přidat 200 µl GT pufru, pomocí homogenizační tyčinky rozmělnit
- ke zhomogenizovanému materiálu přidat 20µl Proteinázy K a zvortexovat
- inkubovat 2 h při 60 °C, každých 10-15 min protřepat
- přidat 200 µl GBT pufru, zvortexovat
- inkubovat 20 min při 60 °C
- přidat 200 µl 96 % ethanolu, zvortexovat

Navázání DNA na membránu

- přemístit lyzát na GS Columns filtrační kolonu vloženou do sběrné zkumavky
- centrifugovat 2 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě

Promývání silikátové membrány

- umístit kolonu s navázanou DNA do čisté sběrné zkumavky
- přidat 400 µl W1 pufru
- centrifugovat 1 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě a vyprázdnit sběrnou zkumavku
- přidat 600 µl WASH pufru
- centrifugovat 1 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě a vyprázdnit sběrnou zkumavku

Sušení silikátové membrány

- centrifugovat 3 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě

Eluce

- kolonu přenést do čisté 1,5ml mikrozkušavky
- přidat 100 µl elučního pufru předehřátého na 60 °C

- inkubovat 5 min při laboratorní teplotě
- centrifugovat 1 min/ 13 000 otáček při laboratorní teplotě
- kolonu odstranit
- izolát skladovat v -20 ° C

4.3 Ověření kvality izolované DNA pomocí agarózové gelové elektroforézy

Gelová elektroforéza stále patří mezi nejpoužívanější techniky pro vizualizaci a kontrolu kvantity izolované DNA. Její princip spočívá v elektroforetické separaci nabitých molekul v elektrickém poli. Molekuly DNA (záporný náboj) putují v elektrickém poli k anodě (kladně nabitému pólu) a tím se rozdělují podle velikosti. Matricí pro gelovou elektroforézu je gel, prostorová síť polymerových vláken, která funguje jako molekulární síto. Při průchodu gelem dochází mezi molekulami nukleové kyseliny a sítí polymeru ke tření. Větší molekuly se pohybují gelem pomaleji, jelikož jejich tření je větší. Menší molekuly tedy putují rychleji. Takto se molekuly nejen separují, třídí, ale i vizualizují.

Vizualizace nukleových kyselin je možná díky přidanému vizualizačnímu barvivu, které se vmezeří (interkaluje) mezi sousední páry bází v DNA. Tím dojde k vytvoření komplexu, který po osvětlení UV zářením fluoreskuje.

Gel pro agarózovou gelovou elektroforézu je tvořen agarózou, přečištěným polysacharidem z mořských řas rodů *Gelidium* nebo *Gracilaria*. Tento gel je vhodný pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti 100 bp až 50 kb. Jedná se o horizontální typ elektroforézy.

Použité přístroje a vybavení:

- sada pipet + špičky
- vanička na gel + hřebínek (nejlépe na 14 jamek)
- Erlenmeyerova kádinka
- elektroforetická vana s anodou, katodou
- externí zdroj stejnosměrného napětí
- laboratorní váhy
- odměrný válec
- mikrovlnná trouba

Chemikálie:

- izolovaná DNA
- hmotnostní standard
- agaróza
- 1x TBE pufr
- vizualizační barvivo Good View II
- nanášecí pufr: 40% sacharóza, 0,25 % bromfenolová modř

- velikostní standard, zde např. 1kb Ladder (500-10,000 bp), Thermo Fischer Sc., k.č. SM0311

Pracovní postup:

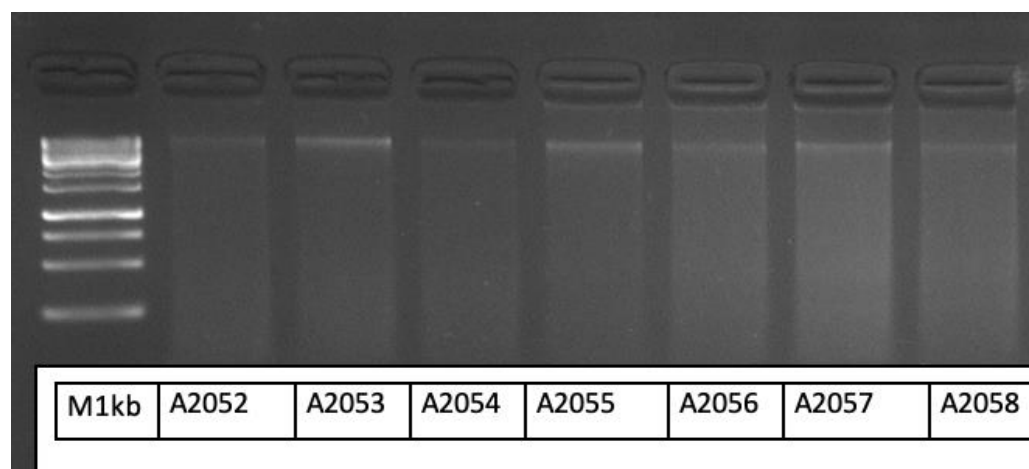
- připravit 1,5 % agarózový gel:
 - do Erlemeyerovy baňky navážit 1,5 g agarózy
 - přidat 100ml 1x TBE pufru
 - vše rozvařit v mikrovlnné troubě, dokud není roztok čirý
 - přidat 2,8 µl vizualizačního barviva Good View II, řádně promíchat
 - nalít do připravené vaničky s hřebínkem
 - odstranit případné vzduchové bubliny
 - nechat ztuhnout při laboratorní teplotě
- vložit agarózový gel do elektroforetické vany naplněné 1x TBE pufrem
- do vzniklých jamek nanést 5 µl z každého izolátu DNA smíchaného s 1µl nanášecího pufru
- do první a poslední jamky napipetovat hmotnostní standart
- k elektroforetické vaně připojit zdroj elektrického napětí
- na zdroji nastavit napětí 130 V a dobu 30 min
- vyfotografovat gel pod UV světlem v dokumentačním zařízení

Při přípravě agarózového gelu s TBE pufrem je vhodné pracovat v digestoři a používat ochranné rukavice.

4.3.1 Výsledný elektroforetogram izolované DNA

Kvalita a kvantita DNA izolované pomocí Genomic DNA mini kit (Tissue) od firmy Geneaid byla ověřena pomocí agarózové gelové elektroforézy (Obr. 1).

Obr. 1 Výsledný elektroforetogram izolované DNA (2% gel; 130 V; 25 minut)



4.4 Multiplex PCR

Základní metodou molekulární biologie je PCR, polymerázová řetězová reakce, polymerase chain reaction. Je to reakce, při níž pomocí cyklicky se opakujících kroků dochází k enzymatické amplifikaci dané zkoumané sekvence. Amplifikovanou sekvenci ohraničují specificky navržené oligonukleotidy, primery. Metoda PCR zahrnuje tři kroky, které se cyklicky opakují. Prvním z nich je denaturace, kdy je genomová DNA zahřáta na 96 °C a tím je dvoušroubovice rozpletena. V dalším kroku, annealingu, dochází k nasedání (hybridizaci) specifických oligonukleotidů, primerů, při snížení teploty na 50-60°C. Následuje elongace při 70-72 °C, kdy enzym DNA-polymeráza syntetizuje nové řetězce. Nově vzniklé řetězce DNA slouží jako templát v následujících cyklech, reakce je exponenciální. PCR probíhá *in vitro* v termocykleru.

Metoda PCR má široké využití a mnoho variant. Jednou z nich je mnohonásobná (multiplex) PCR. Tato varianta umožňuje amplifikovat několik úseků DNA současně během jedné reakce. Počet výsledných amplikonů závisí na počtu párů primerů přidanych do reakční směsi. Výhodou této varianty je zejména úspora času a nákladů na reakci.

Pro analýzu genetické variability bylo vybráno 10 MS (viz. Tab. 6), u kterých byla prokázána největší variabilita.

Tab. 6 Základní charakteristika 10 vybraných mikrosatelitů pro multiplex certifikované metodiky

Lokus	Primer	Sekvence	Délka	fluorescenční barva	Rozsah
A113	F	CTCGAATCGTGCGGTCC	17	6-FAM	195-237
	R	CCTGTATTTTGCAACCTCGC	20		
A079	F	CGAAGGTTGCGGAGTCCCTC	19	6-FAM	89-124
	R	GTCGTCGGACCGATGCG	17		
AP019	F	CTCGTTTCTTCCATTGCG	18	6-FAM	133-146
	R	CGGTACGCGGTAGAAAGA	18		
Ap249	F	CGCGCGACGACGAAATGT	18	VIC	207-229
	R	CAGTCCTTTGATTCGCGCTACC	22		
HB-C16-01	F	AAAATGCGATTCTAATCTGG	20	VIC	247-309
	R	TTGCCTAAAATGCTTGCTAT	20		
A088	F	CGAATTAACCGATTTGTCTG	19	NED	130-152
	R	GATCGCAATTATTGAAGGAG	20		
A014	F	GTGTCGCAATCGACGTAACC	20	NED	214-248
	R	GTCGATTACCGATCGTGACG	20		
Ap223	F	TCGTACAACGTCGCGCAA	18	PET	164-182
	R	GCCGCTCGCCTGTATCTG	18		
Ap226	F	AACGGTGTTTCGCGAAACG	18	PET	228-246
	R	AGCCAACCTCGTGCGGTCA	18		
HB-C16-05	F	ATTTTATGCGCGTTTCGTA	19	PET	70-113
	R	CATGGCTCCTCCATTAAATC	20		

4.4.1 Materiál a přístroje

Chemikálie:

- izolovaná DNA
- PCR Ultra H₂O (Top-Bio s.r.o., Praha)
- Combi PPP Mix; obsahuje 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02 % Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, monoklonální protilátka anti-Taq (38 nM), barvivo, stabilizátory a aditiva (Top-Bio s.r.o., Praha)
- Primery (Applied Biosystems UK), k.č. 450056, naředěné na koncentraci 10 pmol/μl
- Generuller 100 bp (Tehrmo Fischer Sc., k.č. SM0241)

Použité přístroje a vybavení:

- sada pipet + špičky
- PCR zkumavky
- termální cykler Applied Biosystem Veriti Dx 96 – Well
- vortex
- centrifuga

4.4.2 Pracovní postup

Jednotlivé komponenty reakční směsi byly napipetovány podle tabulky a vloženy do předeřátého termálního cyklu. Směs se připravuje jako master mix na příslušné množství vzorků, objem reagentů na jeden vzorek uvádí Tab. 7.

Tab. 7 Složení PCR směsi multiplexu

Reagencie	1x (μl)
ddH ₂ O	1,6
Combi PPP Mix	5,0
A113-F	0,1
A113-R	0,1
A079-F	0,1
A079-R	0,1
AP019-F	0,1
AP019-R	0,1
Ap249-F	0,1
Ap249-R	0,1
HB-C16-01-F	0,3
HB-C16-01-R	0,3
A088-F	0,15
A088-R	0,15
A014-F	0,2
A014-R	0,2
Ap223-F	0,1
Ap223-R	0,1
Ap226-F	0,2
Ap226-R	0,2
HB-C16-05-F	0,2
HB-C16-05-R	0,2
Celkem	9,5
DNA	0,5

4.4.3 Teplotní profil reakce

V následující tabulce (Tab. 8) jsou uvedeny jednotlivé kroky PCR reakce, jejich teplota a doba trvání.

Tab. 8 Teplotní profil PCR

Název kroku	Teplota	Čas
Úvodní denaturace DNA	95 °C	2 min
Denaturace	95 °C	20 s
Cyklování 30x Annealing	57 °C	20 s
Elongace	72 °C	30 s
Závěrečná elongace	72 °C	60 min
Chlazení	4 °C	∞

4.4.4 Ověření multiplex PCR pomocí horizontální agarózové gelové elektroforézy

Po ukončení reakce byla kvalita získaných amplikonů ověřena pomocí horizontální agarózové gelové elektroforézy (Obr. 2). Na gel bylo nanášeno 3 µl PCR produktu.

Obr. 2 Výsledný elektroforetogram multiplexní PCR (3% gel; 130 V; 30 minut, velikostní standard GeneRuler 100 bp)



4.5 Fragmentační analýza

Fragmentační analýza je založena na kapilární elektroforéze a následné fluorescenční detekci jednotlivých amplifikovaných fragmentů. Jejím cílem je zjistit délku fragmentu DNA, která je vymezena dvěma primery (jeden primer je fluorescenčně značený, druhý značený není). Výhoda použití této metody spočívá v tom, že lze analyzovat více fragmentů současně. Fragmenty se musí lišit délkou nebo být označeny fluorescenční barvou. Ke každému vzorku je nutné přidat tzv. size standard.

4.5.1 Materiál a přístroje

Materiál:

- Formamid (Hi-Di™ Formamide 3500 Dx Series, Applied Biosystems); k.č. 4404307
- Hmotnostní standard – GeneScan™ – 600 LIZ™ Size Standard v2.0, Applied Biosystems; k.č. 4408399
- Analyzační plato – MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems; k.č. N8010560
- PCR produkt (naředěný 30x)

Přístroje:

- Kapilární elektroforéza a sekvenátor Applied biosystems GA 3500
- PCR cykler
- Vortex
- Laboratorní mikrocetrifuga

4.5.2 Příprava vzorku na fragmentační analýzu

Jelikož je koncentrace amplifikované DNA obvykle vysoká, je potřeba PCR produkt před fragmentační analýzou naředit. Ředění probíhá v biohazard boxu. PCR produkt je ředěn 30x, a to v poměru 14,5 μ l H₂O + 0,5 μ l PCR produktu. Poté je připravena reakční směs na fragmentační analýzu podle Tab. 9.

Tab. 9 Složení reakční směsi pro fragmentační analýzu

Reagencie	1 x (μ l)
Hi-Di™ Formamide	11,3
LIZ® 600	0,1
Celkem	11,4
PCR produkt	0,5

Pro fragmentační analýzu byla využita kapilární elektroforéza (Applied Biosystems 3500/3500xL), metoda Fragment_Analysis_Assay, protokol Fragment Analysis 50_POP7_G5.

4.5.3 Denaturace

Pro fragmentační analýzu je nutná denaturovaná jednořetězcová DNA. Denaturace probíhá na PCR cykleru – 95 °C po dobu 5 minut. Po denuraci je nutné vzorek ihned zchladit na ledu.

4.5.4 Umístění vzorků

Nejprve je třeba sestavit držák plata pro umístění vzorků do genetického analyzátoru (Obr. 3, Obr.4). Sestavené plato je vloženo do genetického analyzátoru dle manuálu výrobce.

Obr. 3 Rozložený držák plata



Obr. 4 Složený držák plata



4.5.5 Definování plata vzorků

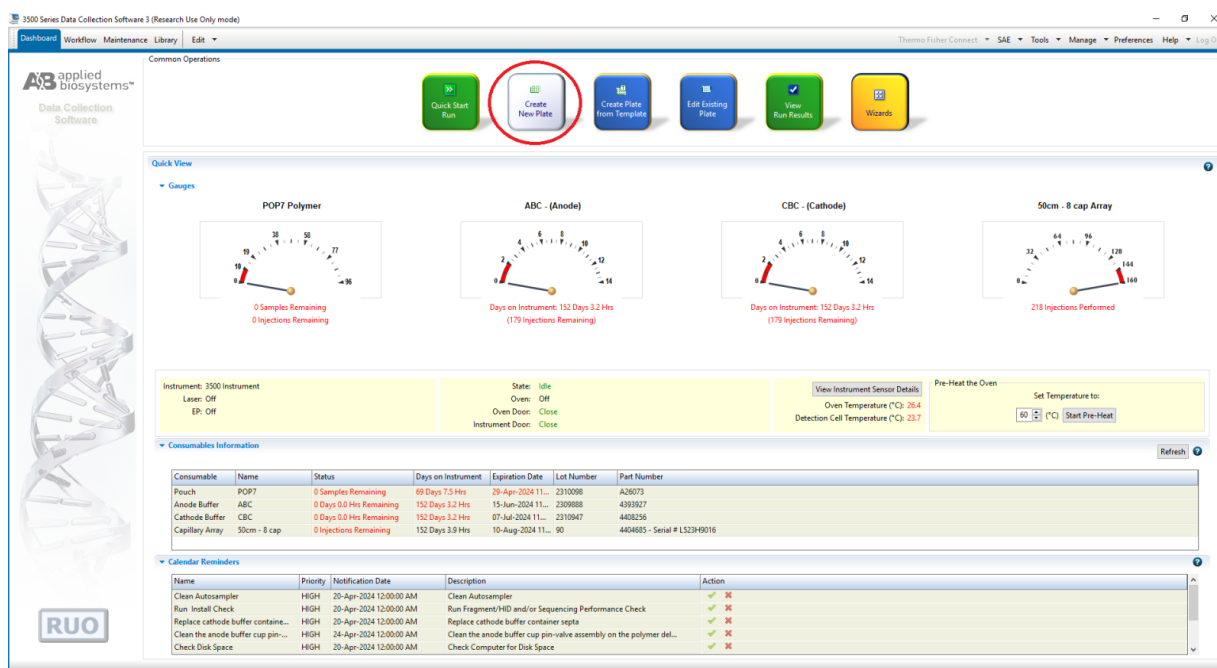
Pro plato určené na FA je nutné nadefinovat parametry – metoda, protokol a adresář pro uložení výsledků analýzy. Uvedené příklady vycházejí ze software pro genetický analyzátor ABI PRISM 3500 a software 3500 Series Data Collection Software 3. Uživatelé jiných typů analyzátoru zvolí analogický software a nastavení dle svých uživatelských zkušeností.

a) Nejprve spusťte ovládací software genetického analyzátoru



b) Hlavní menu.

Pro vytvoření nového plata zvolte *Create new plate*. Pro definování již existujícího plata zvolte *Edit existing plate*, nebo klikněte na *Library*.



c) Při definování nového plata zadejte název plata, typ plata (fragmentační), délku kapiláry (50 cm) a typ polymeru (POP7), poté přejděte na definování obsahu plata.

3500 Series Data Collection Software 3 (Research Use Only mode)

Dashboard Workflow Maintenance Library Edit

Thermo Fisher Connect SAE Tools Manage Preferences Help Log Out

Plate Name: applied biosystems™

Advanced Setup

Define Plate Properties

Assign Plate Contents

Run Instrument

Load Plates for Run

Preview Run

Monitor Run

Review Results

View Sequencing Results

View FragmentHD Results

Plate Details

* Name: PL804

* Number of Wells: 96 96-Well 384

* Plate Type: Fragment

* Capillary Length: 50 cm

* Polymer: POP7

Owner:

Barcode:

Description:

Secondary Analysis

Assign Plate Contents

d) Vložte název jednotlivých vzorků do příslušných pozic na platě. Vzorky do plata můžete vepsat manuálně, nebo můžete importovat vyplněnou šablonu ve formátu .xls

3500 Series Data Collection Software 3 (Research Use Only mode)

Dashboard Workflow Maintenance Library Edit

Thermo Fisher Connect SAE Tools Manage Preferences Help Log Out

Plate Name: PL804

Advanced Setup

Define Plate Properties

Assign Plate Contents

Run Instrument

Load Plates for Run

Preview Run

Monitor Run

Review Results

View Sequencing Results

View FragmentHD Results

Plate View

Table View

Show In Wells Select Wells Array Selection Row Column Zoom In Zoom Out Fit

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Fragment

Name: PL804

Barcode:

Assays

Add from Library

Create New Assay

File Name Conventions

Add from Library

Create New File Name Convention

Results Groups

Add from Library

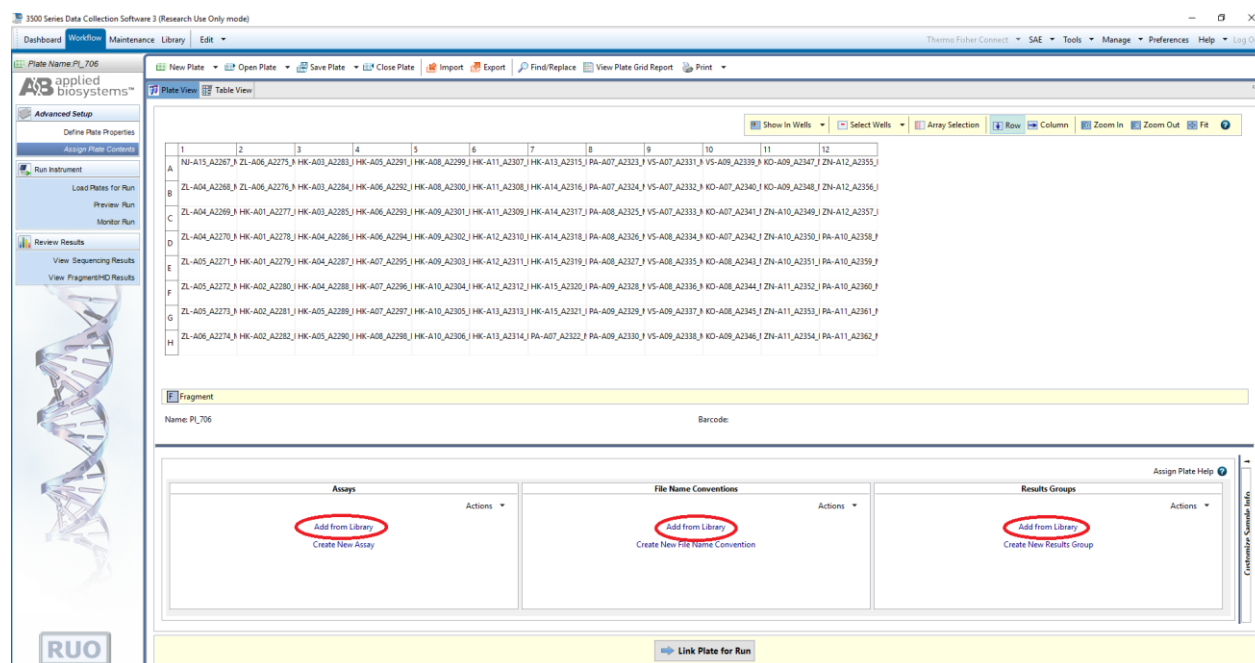
Create New Results Group

Assign Plate Help

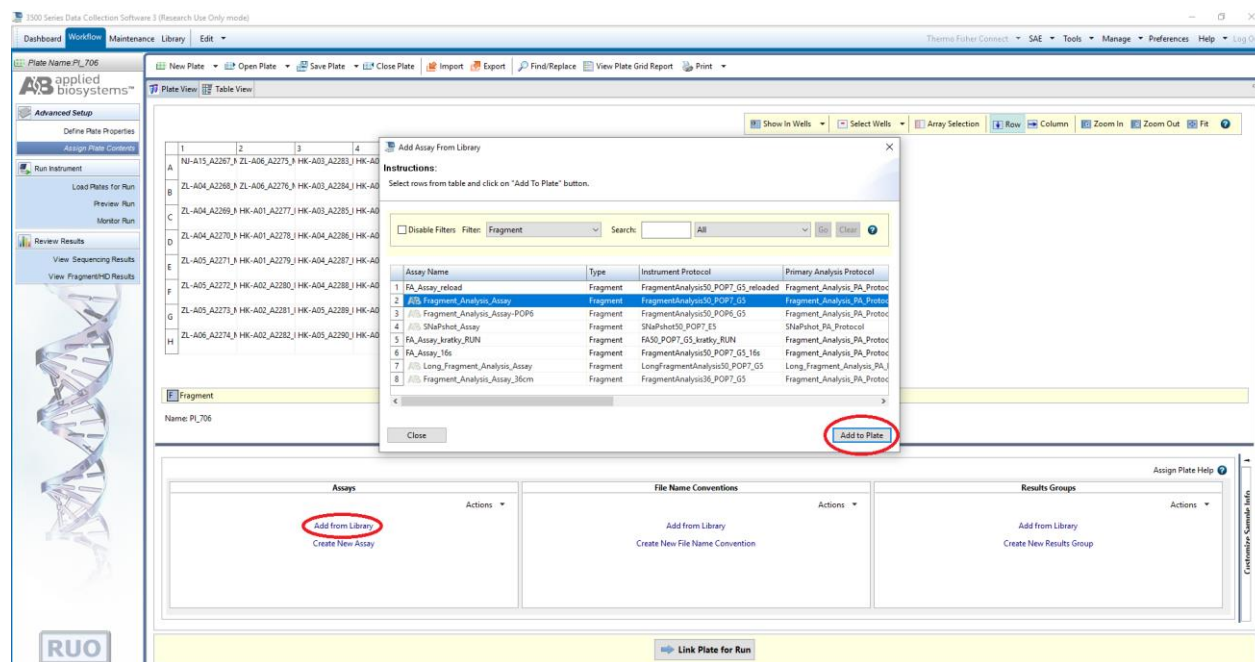
Link Plate for Run

4.5.6 Konfigurace parametrů analýzy

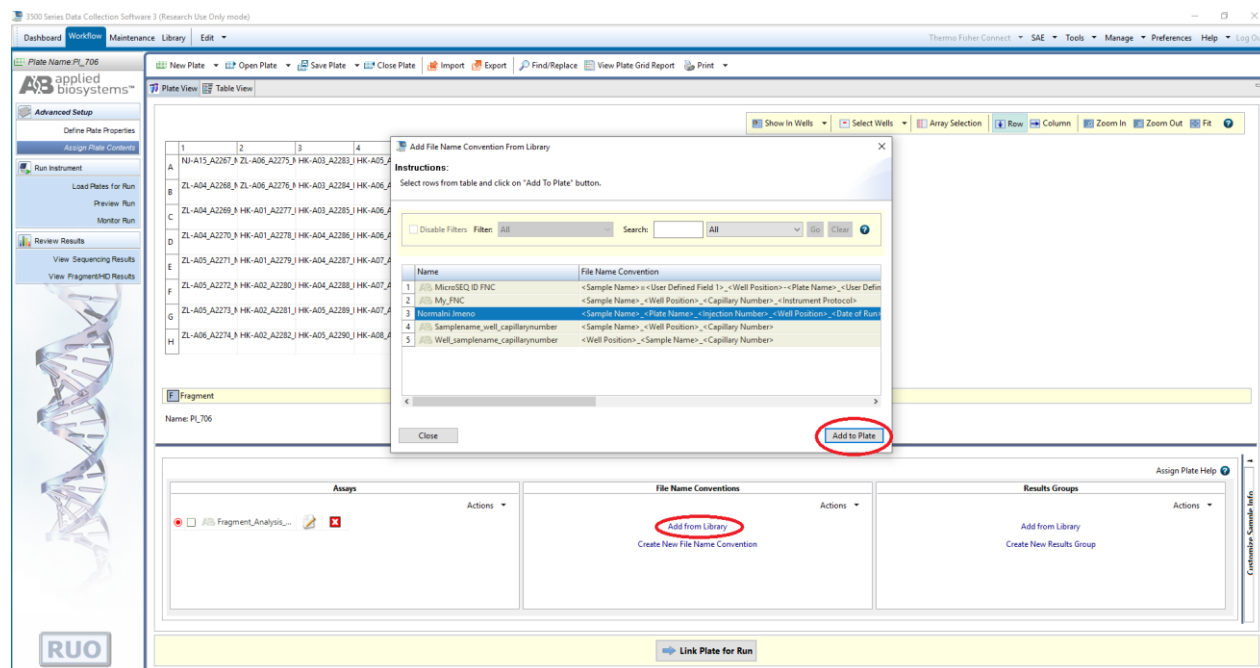
a) Po nadefinování vzorků zvolte příslušný protokol, způsob pojmenování výsledných souborů a jejich umístění.



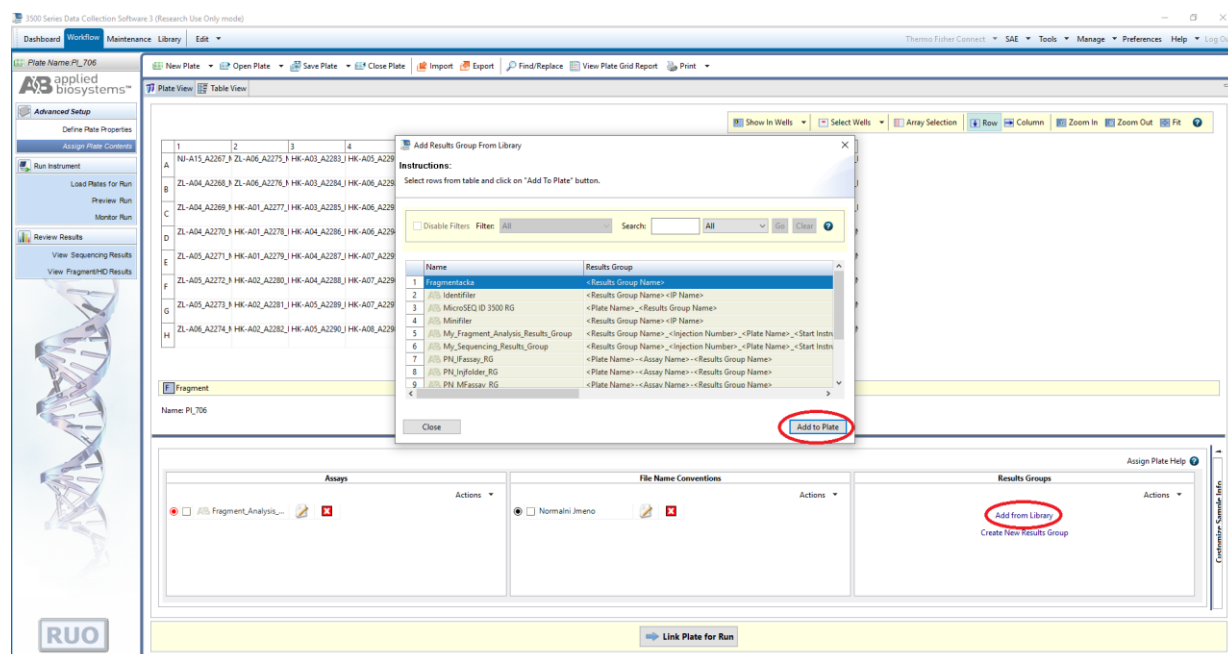
b) Vyberte protokol pro příslušný polymer a podle případných dalších parametrů (délka fragmentů, doba inkubace). Ve většině případů je dostatečné použít defaultní protokol.



c) Zvolte způsob pojmenování výsledných souborů, lze uživatelsky modifikovat dle vlastních požadavků.

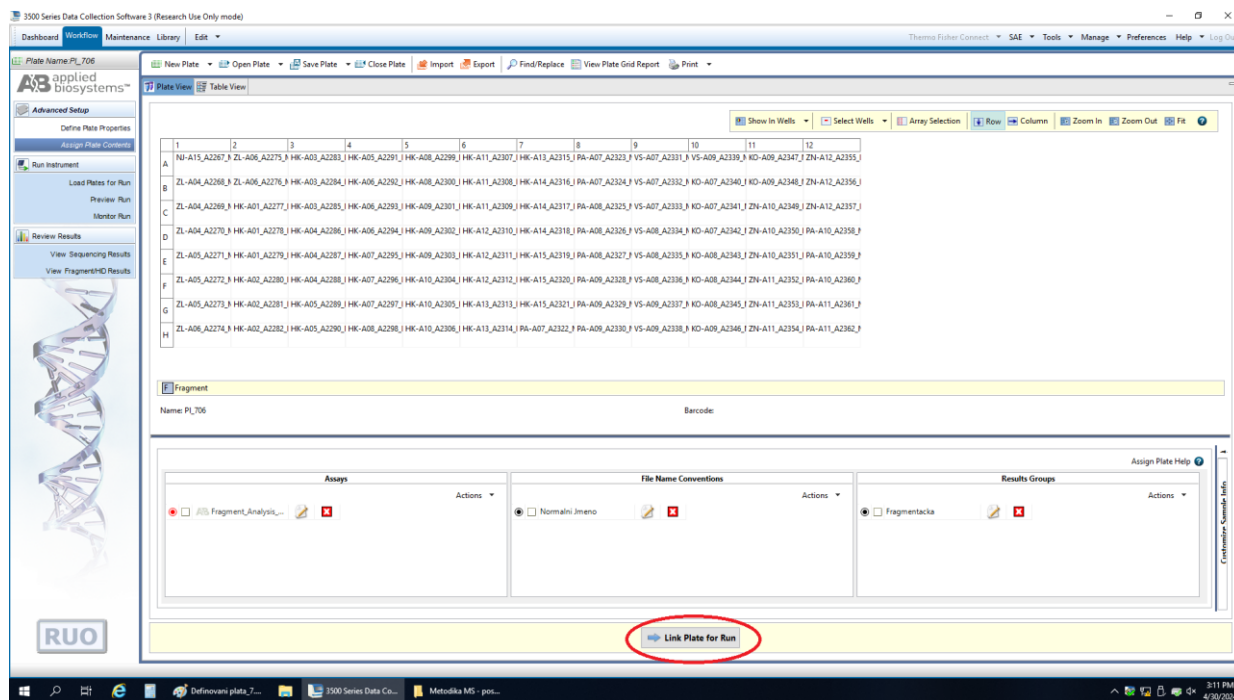


d) Vyberte umístění pro výsledné soubory na paměťovém disku (uživatelsky nastavíte).

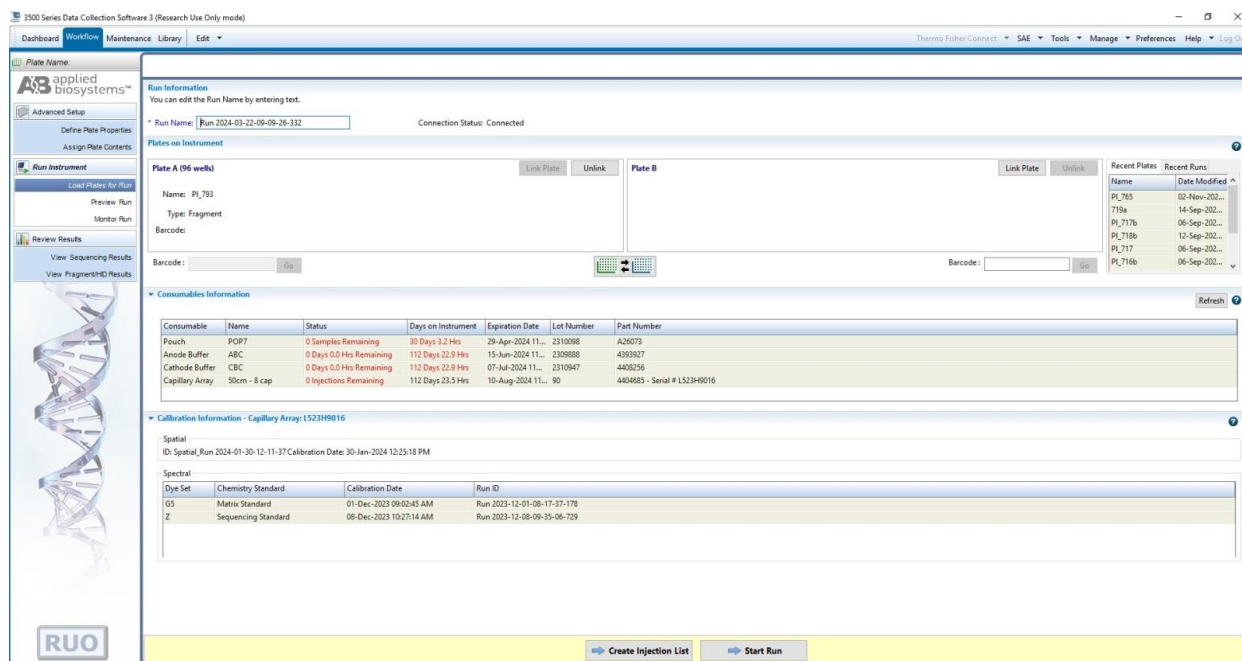


4.5.7 Spuštění analýzy

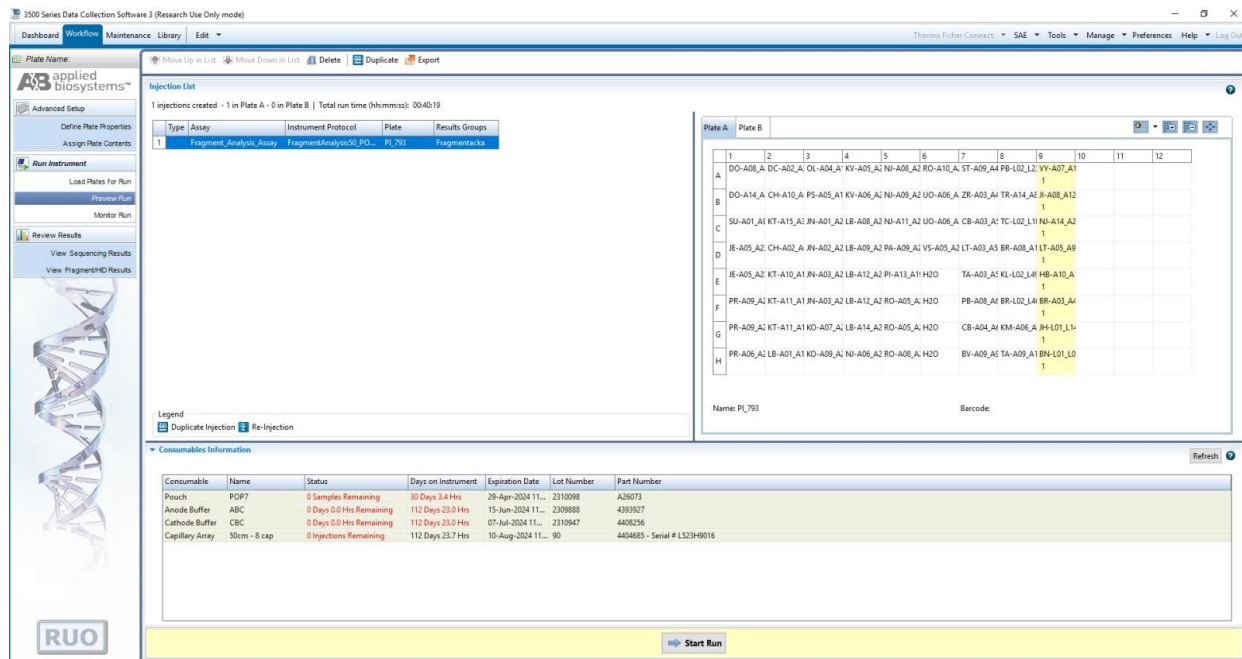
a) Po zadání a uložení parametrů a po vložení plata se vzorky do sekvenátoru zadejte v programu *Link Plate for Run*.



b) Zkontrolujte, zda je plato ve správné pozici a že má přístroj dostatek reagensií. Poté zvolte *Create Injection List*.



c) Ověřte si, zda jsou na seznamu všechny vzorky, které chcete analyzovat. Zde také můžete měnit pořadí, ve kterém se budou jednotlivé sloupce na platu analyzovat. Spusťte analýzu příkazem *Start run*.



3500 Series Data Collection Software 3 (Research Use Only mode)

Dashboard Workflow Maintenance Library Edit

Thermo Fisher Connect SAE Tools Manage Preferences Help Log Out

Plate Name: applied biosystems™

Advanced Setup Define Plate Properties Assign Plate Contents

Run Instrument Load Plates for Run Preview Run Monitor Run

Review Results View Sequencing Results View FragmentHD Results

Injection List

1 injections created - 1 in Plate A - 0 in Plate B | Total run time (hh:mm:ss): 00:40:19

Type	Assay	Instrument Protocol	Plate	Results Groups
1	Fragment_Analysis_Assay	FragmentAnalysis50_PIO...	PI_793	Fragmentacka

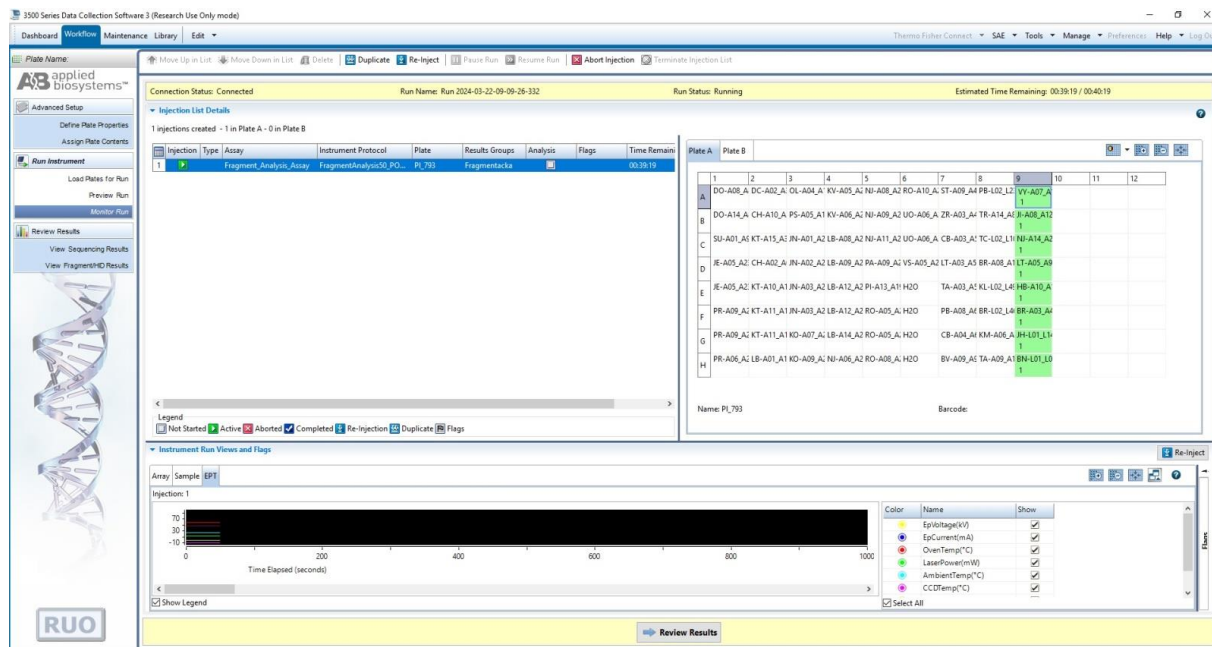
Legend Duplicate Injection Re-Injection

Consumables Information

Consumable	Name	Status	Days on Instrument	Expiration Date	Lot Number	Part Number
Pouch	POR7	0 Samples Remaining	30 Days 3.4 Hrs	29-Apr-2024 11...	2310098	A26073
Anode Buffer	ABC	0 Days 0.0 Hrs Remaining	112 Days 23.0 Hrs	15-Jun-2024 11...	2309688	4393927
Cathode Buffer	CBC	0 Days 0.0 Hrs Remaining	112 Days 23.0 Hrs	07-Jul-2024 11...	2310947	4406256
Capillary Array	50cm - 8 cap	0 Injections Remaining	112 Days 23.7 Hrs	10-Aug-2024 11...	90	4404685 - Serial # L52H9016

Start Run

d) Kontrola probíhající analýzy



3500 Series Data Collection Software 3 (Research Use Only mode)

Dashboard Workflow Maintenance Library Edit

Thermo Fisher Connect SAE Tools Manage Preferences Help Log Out

Plate Name: applied biosystems™

Advanced Setup Define Plate Properties Assign Plate Contents

Run Instrument Load Plates for Run Preview Run Monitor Run

Review Results View Sequencing Results View FragmentHD Results

Injection List

1 injections created - 1 in Plate A - 0 in Plate B

Injection	Type	Assay	Instrument Protocol	Plate	Results Groups	Analysis	Flags	Time Remain
1	Fragment_Analysis_Assay	FragmentAnalysis50_PIO...	PI_793	Fragmentacka				00:39:19

Legend Not Started Active Aborted Completed Re-Injection Duplicate Flags

Instrument Run Views and Flags

Injection 1

Time Elapsed (seconds)

Color Name Show

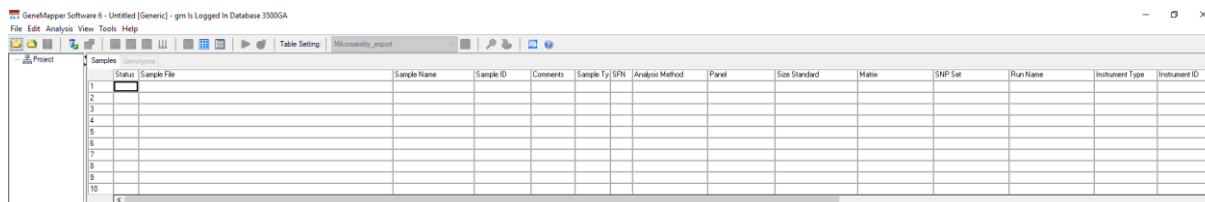
- Epifluorescence (V)
- Epifluorescence (mV)
- OvenTemp (°C)
- LaserPower (mW)
- AmbientTemp (°C)
- CCTemp (°C)

Review Results

4.6 Vyhodnocení

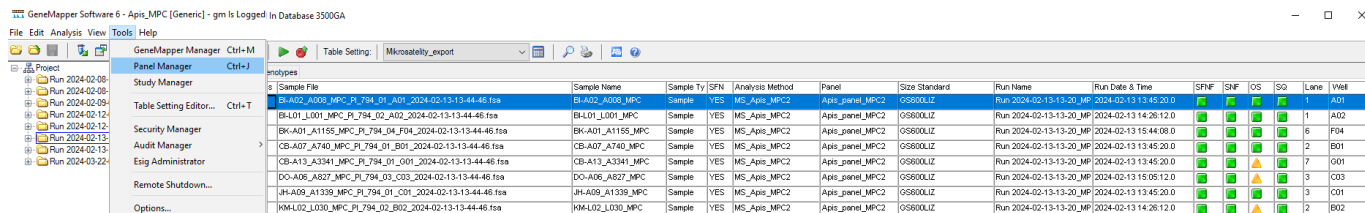
Vyhodnocení výsledků FA probíhá v programu GeneMapper 6.

Po spuštění programu se nejprve otevře výchozí obrazovka programu.



4.6.1 Definování Panelu

Po spuštění softwaru GeneMapper 6 otevřete *Tools/Panel manager*, definujte nový binset a panel podle manuálu software výrobce s využitím údajů níže.



a) Binsset:				110	109.89	0.4	0.57	242	242.64	0.4	0.4
Marker Name	Ap113			112	111.82	0.4	0.44	214	214.25	0.4	0.4
223	222.61	0.4	0.4	114	114.37	0.4	0.53	246	247.36	0.4	0.4
242	241.93	0.4	0.4	116	116.23	0.4	0.4	219L	219.74	0.4	0.4
221	220.35	0.4	0.76	120	119.61	0.4	0.4	220	220.57	0.4	0.4
235	234.45	0.4	0.4	122	121.5	0.4	0.4	226	226.65	0.4	0.4
195	195.15	0.4	0.4	124	123.63	0.4	0.4	228	228.78	0.4	0.4
207	206.83	0.4	0.4	Marker Name	Ap226			244	245.22	0.4	0.4
211	210.84	0.6	0.4	230n	231.6	0.4	0.4	233L	234.04	0.4	0.4
217	216.39	0.4	0.64	232n	234.13	0.4	0.4	234	235.02	0.4	0.4
219	218.53	0.4	0.52	234n	236.16	0.4	0.4	238	239.02	0.4	0.4
225	224.66	0.4	0.4	242n	244.15	0.52	0.29	243L	243.55	0.4	0.4
233	232.55	0.4	0.4	244n	245.87	0.4	0.4	248	249.3	0.4	0.4
199	199.26	0.4	0.4	246n	248.03	0.4	0.4	211L	211.17	0.4	0.4
229	228.32	0.4	0.4	236n	238.13	0.4	0.4	Marker Name	Ap223		
237	236.33	0.4	0.4	238	240.34	0.4	0.4	182	183.03	0.4	0.4
213	212.81	0.4	0.4	240n	242.46	0.4	0.4	174	174.81	0.4	0.4
231	230.57	0.4	0.4	Marker Name	HB-C16			168	168.95	0.64	0.4
205	204.93	0.4	0.4	262L	262.04	0.4	0.4	178	178.8	0.4	0.4
227	226.61	0.4	0.4	293	292.77	0.4	0.4	176	176.86	0.4	0.4
215	214.84	0.4	0.4	271	271.16	0.4	0.4	180	180.92	0.4	0.4
Marker Name	Ap249			279	279.06	0.4	0.4	Marker Name	AP019		
212	211.96	0.4	0.4	281	280.85	0.4	0.4	133	133.48	0.55	0.4
220L	220.06	0.4	0.4	289	288.84	0.4	0.4	137	137.43	0.49	0.34
207	207.45	0.4	0.4	291	290.64	0.4	0.4	141	141.11	0.4	0.4
214L	213.99	0.4	0.4	249	249.34	0.4	0.4	139	139.38	0.4	0.4
215	214.99	0.4	0.61	255	255.62	0.4	0.4	143	143.13	0.4	0.4
217	217.29	0.4	0.4	257	257.41	0.4	0.4	135	135.53	0.4	0.4
209	209.48	0.4	0.4	275	274.99	0.4	0.4	145	145.44	0.4	0.4
222	221.78	0.4	0.4	283	282.85	0.4	0.4	142L	142.27	0.4	0.24
219	219.14	0.4	0.4	285	284.76	0.4	0.4	144L	144.19	0.4	0.4
208L	208.52	0.4	0.4	295	294.5	0.4	0.4	Marker Name	HB-C16-05		
Marker Name	A088			273	273.02	0.4	0.4	78	78.09	0.4	0.4
142	142.21	0.4	0.4	277	277.05	0.4	0.4	108	109.14	0.4	0.4
138	138.27	0.4	0.4	287	287.06	0.4	0.4	104	105.01	0.4	0.4
140	140.27	0.4	0.4	297	296.71	0.4	0.4	76	76.0	0.4	0.4
143L	143.15	0.4	0.4	299	298.71	0.4	0.4	84	84.17	0.4	0.4
149L	149.24	0.4	0.4	303	302.62	0.4	0.4	98	98.71	0.4	0.4
146	146.21	0.4	0.4	307	306.44	0.4	0.4	100	100.71	0.4	0.4
148	148.1	0.59	0.4	309	308.48	0.4	0.4	102	102.89	0.4	0.4
130	130.53	0.4	0.4	253	253.7	0.4	0.4	80	80.19	0.4	0.4
144	144.08	0.4	0.4	247	247.64	0.4	0.4	92	92.62	0.4	0.4
141L	141.28	0.4	0.4	Marker Name	A014			94	94.7	0.4	0.4
145L	145.11	0.4	0.4	225L	225.72	0.4	0.4	96	96.54	0.4	0.4
152	152.0	0.4	0.4	235L	236.02	0.4	0.4	106	106.96	0.4	0.4
135L	135.27	0.4	0.4	223L	223.73	0.4	0.4	110	111.27	0.4	0.4
Marker Name	A079			236	236.97	0.4	0.4	70	69.78	0.4	0.4
90	90.26	0.4	0.4	232	232.9	0.4	0.4	82	82.26	0.4	0.4
96	96.22	0.4	0.4	240	240.86	0.4	0.4	86	86.32	0.4	0.4
98	97.58	0.4	0.4	216	216.45	0.4	0.4	103	103.86	0.4	0.4
100	99.73	0.4	0.4	217L	217.61	0.4	0.4	74	73.89	0.4	0.4
102	102.04	0.4	0.4	222	222.46	0.4	0.4	112	113.29	0.4	0.4
104	104.06	0.47	0.4	224	224.7	0.51	0.4				
106	106.07	0.4	0.4	229L	229.77	0.4	0.4				
108	107.95	0.4	0.4	231L	231.82	0.4	0.4				

b) Panel:

Nadefinujte panel dle obrázku a údajů níže.

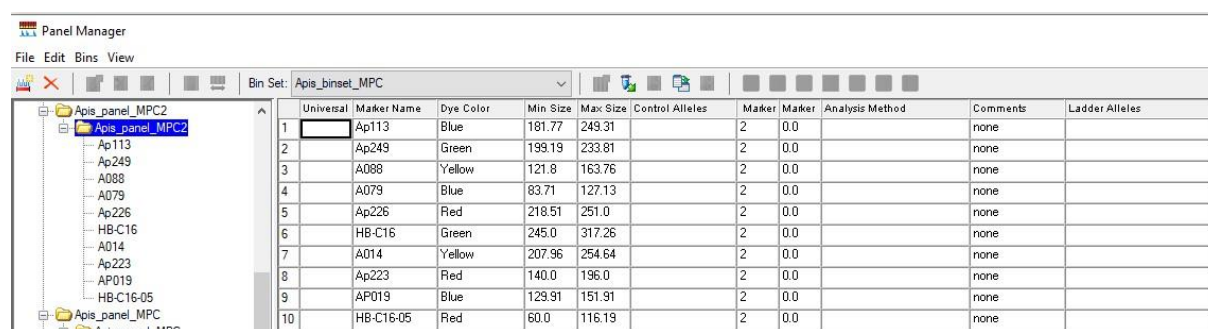
Version GM v 4.1

Kit type: MICROSATELLITE

Chemistry Kit Apis_panel_MPC2 none

Panel Apis_panel_MPC2 none

Ap113	blue	181.77	249.31	-	2
Ap249	Green	199.19	233.81	-	2
A088	Yellow	121.80	163.75	-	2
A079	blue	83.70	127.13	-	2
Ap226 R	ed	218.51	250.99	-	2
HB-C16	Green	245.00	317.26	-	2
A014	Yellow	207.96	254.63	-	2
Ap223	Red	140.0	196.00	-	2
AP019	blue	129.91	151.91	-	2
HB-C16-05	Red	60.0	116.19	-	2



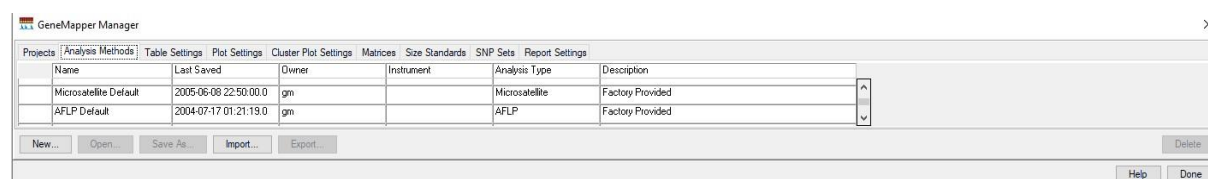
The screenshot shows the 'Panel Manager' window with a tree view on the left and a table on the right. The tree view shows a folder 'Apis_panel_MPC2' containing markers: Ap113, Ap249, A088, A079, Ap226, HB-C16, A014, Ap223, AP019, and HB-C16-05. The table on the right lists these markers with columns: Universal, Marker Name, Dye Color, Min Size, Max Size, Control Alleles, Marker, Marker, Analysis Method, Comments, and Ladder Alleles.

Universal	Marker Name	Dye Color	Min Size	Max Size	Control Alleles	Marker	Marker	Analysis Method	Comments	Ladder Alleles
1	Ap113	Blue	181.77	249.31		2	0.0		none	
2	Ap249	Green	199.19	233.81		2	0.0		none	
3	A088	Yellow	121.8	163.75		2	0.0		none	
4	A079	Blue	83.71	127.13		2	0.0		none	
5	Ap226	Red	218.51	251.0		2	0.0		none	
6	HB-C16	Green	245.0	317.26		2	0.0		none	
7	A014	Yellow	207.96	254.64		2	0.0		none	
8	Ap223	Red	140.0	196.0		2	0.0		none	
9	AP019	Blue	129.91	151.91		2	0.0		none	
10	HB-C16-05	Red	60.0	116.19		2	0.0		none	

V případě, že Váš konkrétní přístroj má (obvykle drobnou) odchylku v separaci, je třeba jednotlivé biny uživatelsky upravit (posunout, obvykle vše jedním směrem). V případě, že potřebujete mít data srovnatelná s jinými laboratořemi, požádejte je nebo autory této metodiky o zaslání DNA kalibračních vzorků. Kalibraci je možné provést i po provedení analýz.

4.6.2 Definování Metody analýzy

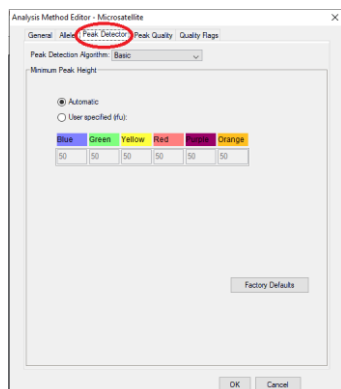
a) Otevřete *GeneMapper Manager*, okno *Analysis Method*, vytvořte novou metodu analýzy a poté zvolte *Microsatellite*.



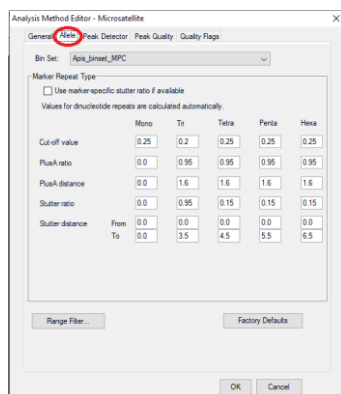
The screenshot shows the 'GeneMapper Manager' window with the 'Analysis Methods' tab selected. It displays a table with columns: Name, Last Saved, Owner, Instrument, Analysis Type, and Description. There are two entries: 'Microsatellite Default' and 'AFLP Default'. The 'Microsatellite Default' entry has 'gm' as the owner and 'Microsatellite' as the analysis type. The 'AFLP Default' entry has 'gm' as the owner and 'AFLP' as the analysis type.

Name	Last Saved	Owner	Instrument	Analysis Type	Description
Microsatellite Default	2005-06-08 22:50:00.0	gm		Microsatellite	Factory Provided
AFLP Default	2004-07-17 01:21:19.0	gm		AFLP	Factory Provided

b) Zkontrolujte parametry detekce peaku (*Peak Detection*). Pokud není třeba parametry měnit, ponechejte automatické nastavení

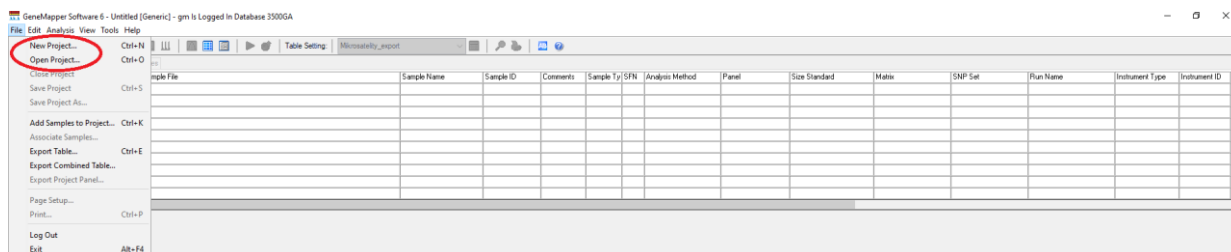


c) Vyberte binset pro Vaši analýzu (Apis_Binset_MPC)

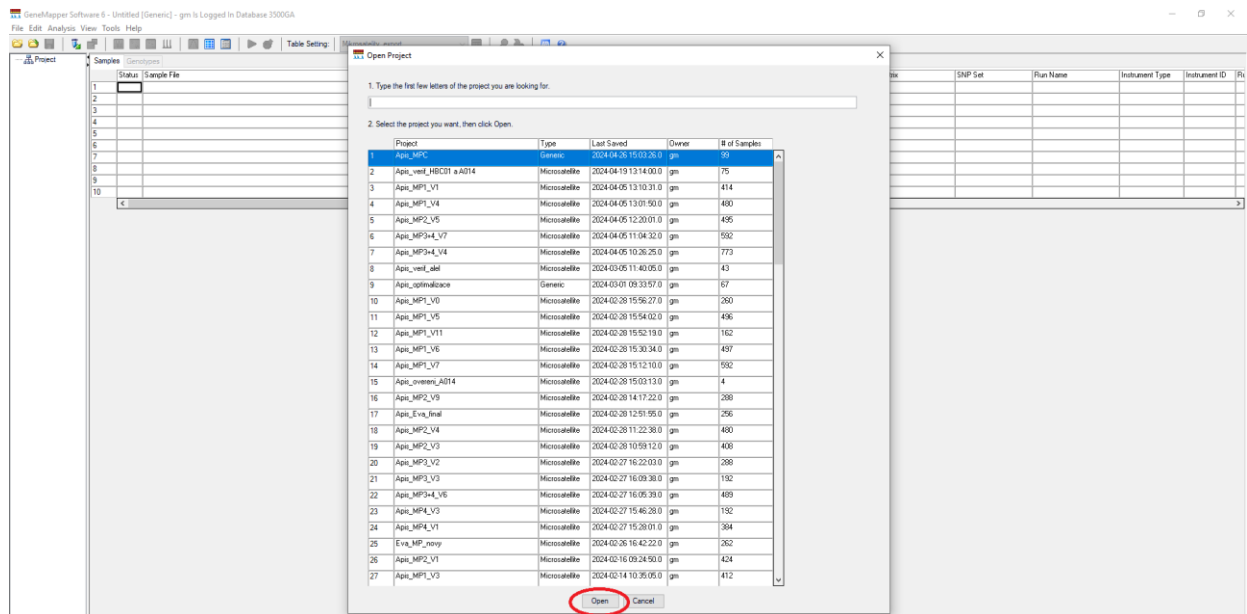


4.6.2 Analýza vzorků

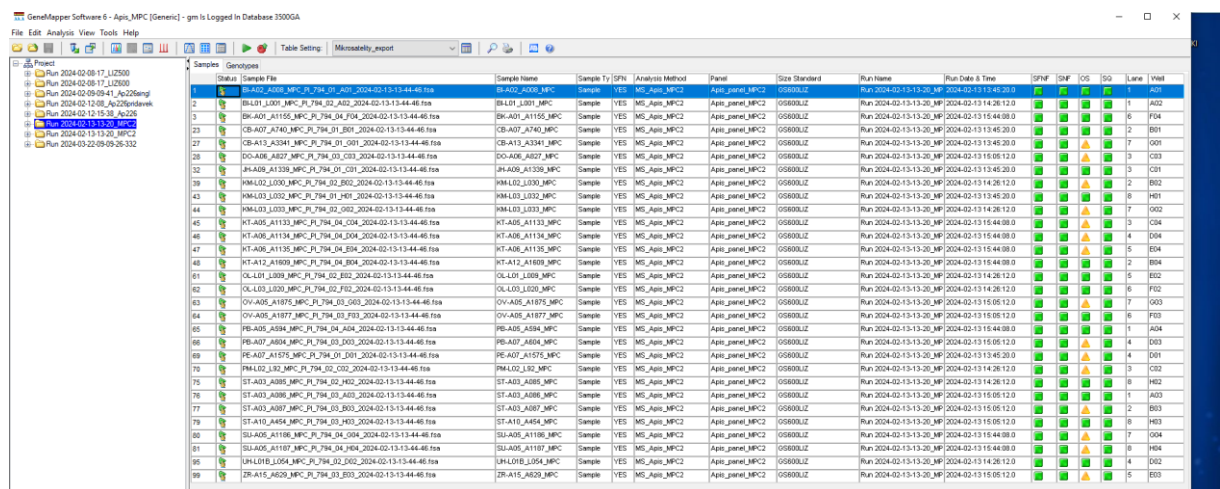
a) Vytvořte si nový projekt nebo otevřete stávající.



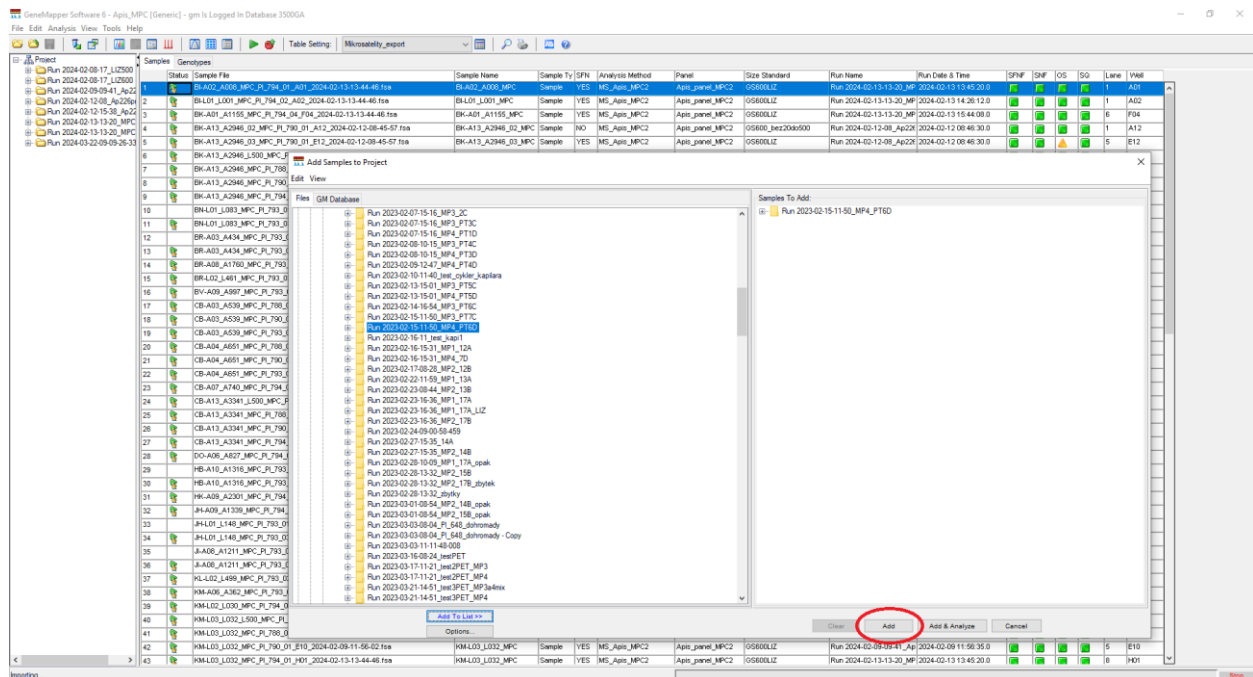
Zvolte projekt a otevřete ho (*Open*).



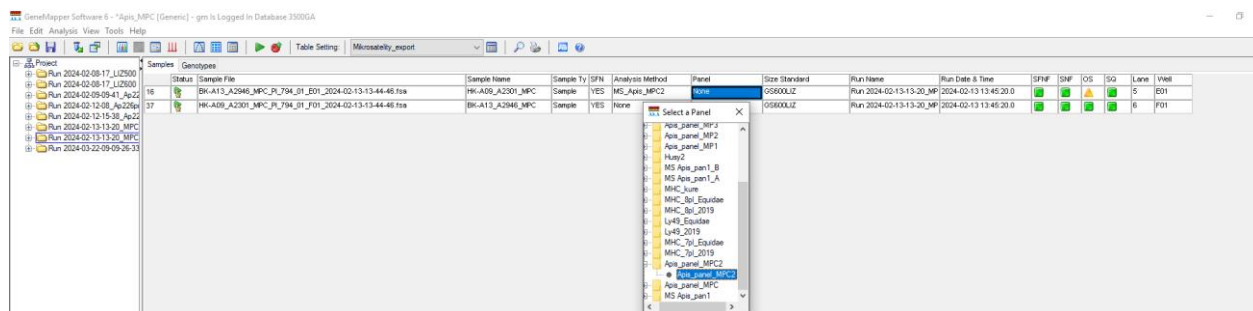
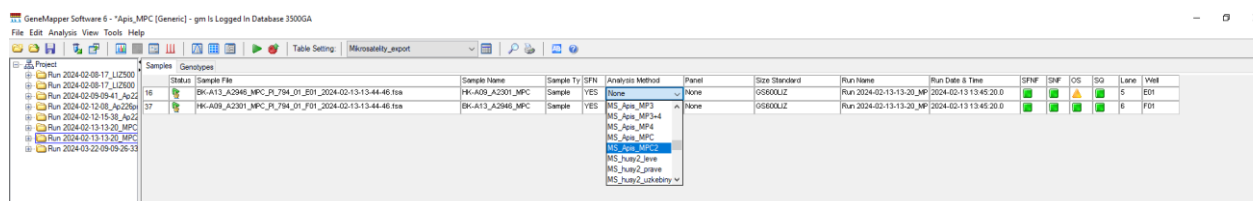
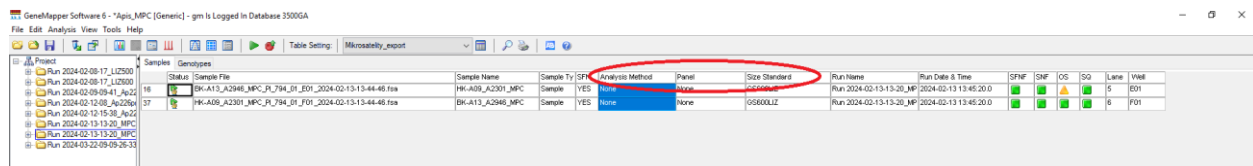
b) Po otevření projektu se zobrazí všechny vložené a analyzované vzorky. Pro přidání nových vzorků zadejte *Add samples to Project*.



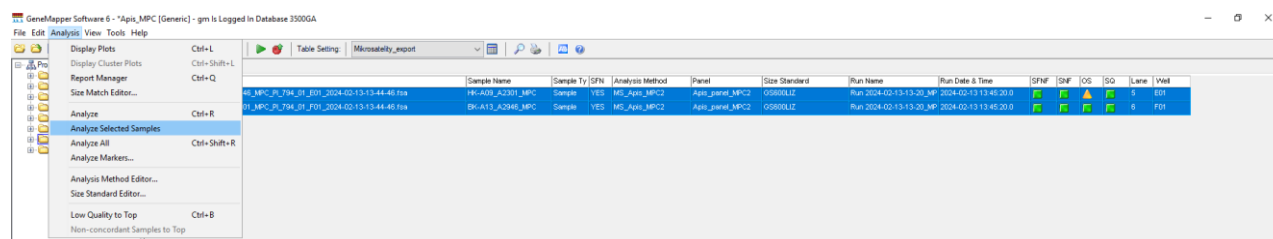
c) Vyberte cílový adresář se vzorky, které chcete přidat. Zvolte *Add to the list* a poté *Add*.



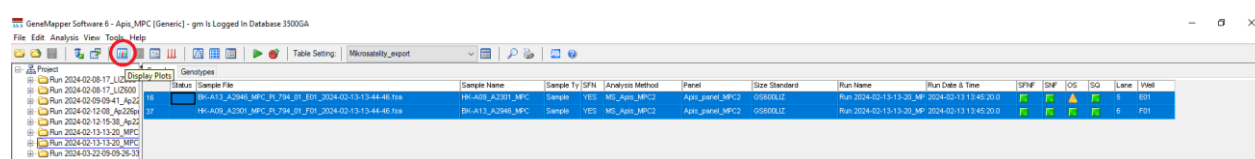
d) Po vložení vzorků zadejte parametry analýzy – analyzační metodu, panel a velikostní standard.



e) Označte vzorky a zadejte *Analyze Selected Samples* (pro případnou úpravu parametrů analýzy otevřete Analysis Method editor).



f) Po proběhnutí analýzy otevřete *Display Plots* pro grafické znázornění výsledků.

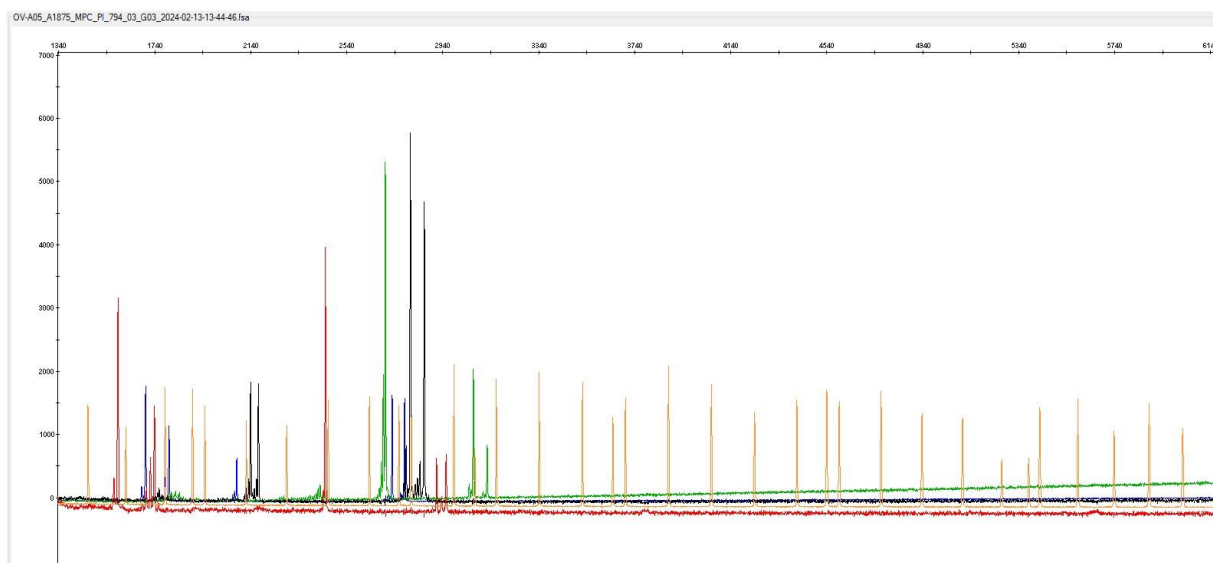


g) Elektroforetogram znázorňující výsledky FA.

Ke každému mikrosatelitu jsou přiřazeny biny (alely). Peak označuje přítomnost dané alely ve vzorku. Je možné měnit zobrazení, aby se zobrazovaly pouze mikrosatelity označené danou fluorescenční barvou (Obr. 7-10). Prvotní informaci o kvalitě analýzy zjistíme pomocí elektroforetogramu surových dat (Obr. 5).

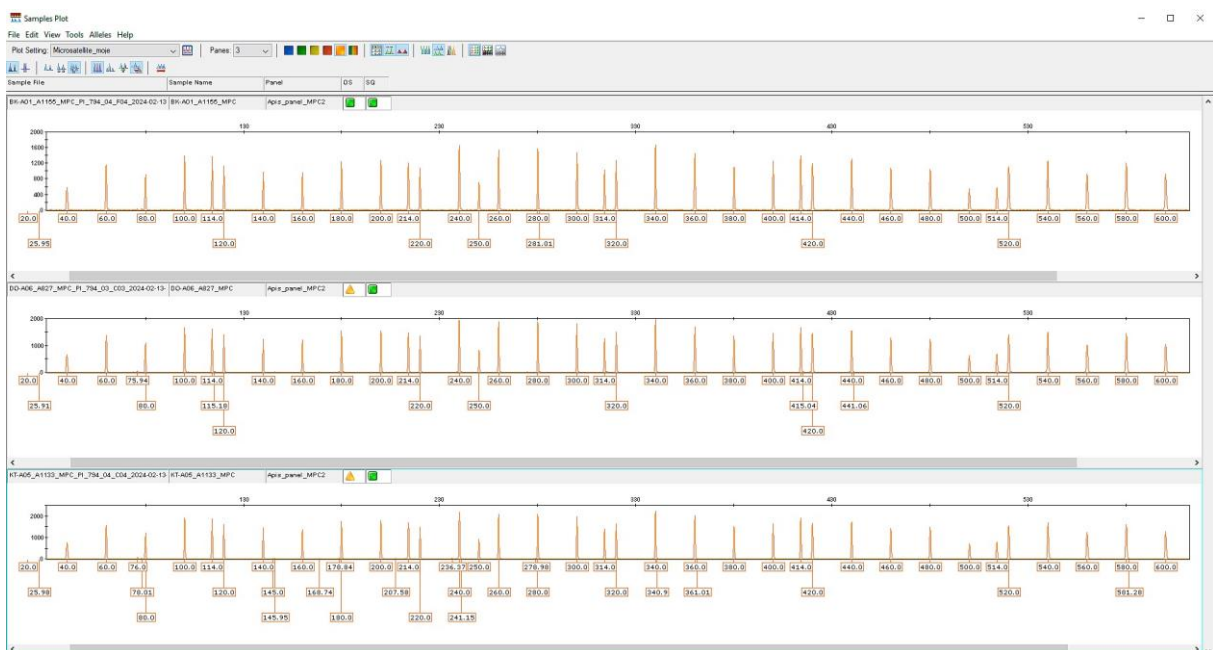


Obr. 5 Elektroforetogram surových dat

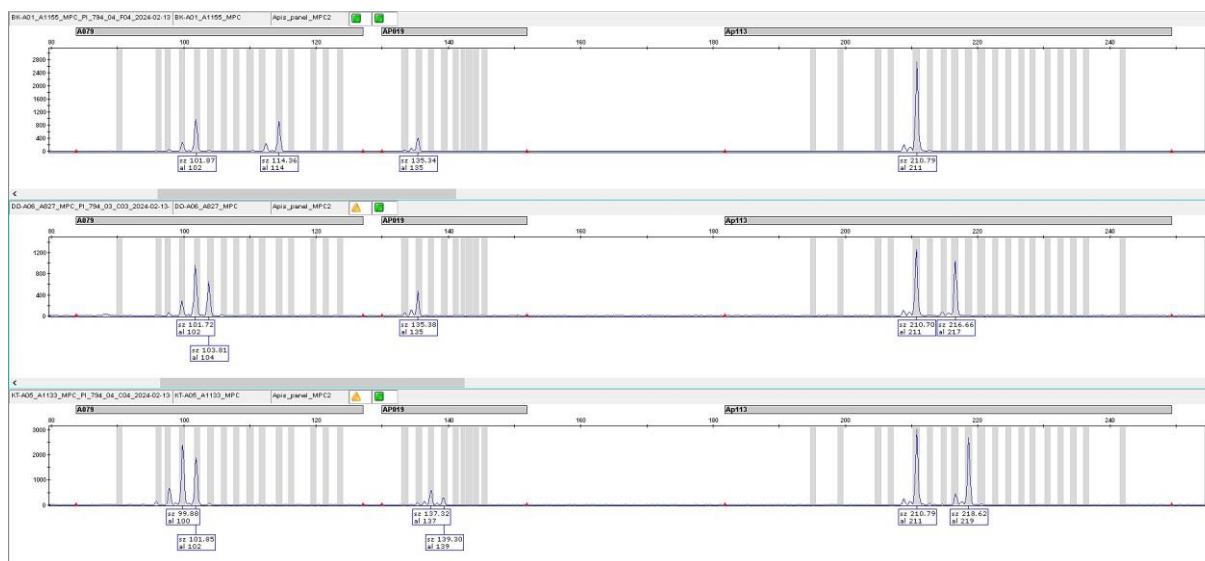


Kvalitu separace lze ověřit pomocí velikostního standardu značeného LIZ (oranžový), viz Obr. 6.

Obr. 6 Elektroforetogram velikostního standardu

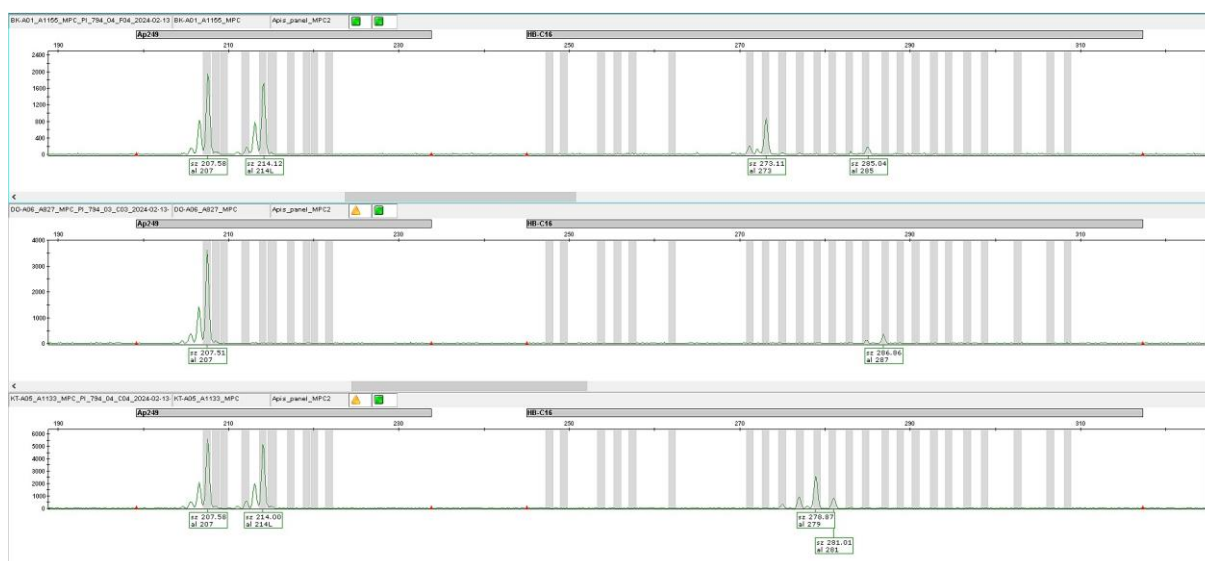


Obr. 7 Elektroforetogram mikrosatelitů značených 6-FAM (modrá)

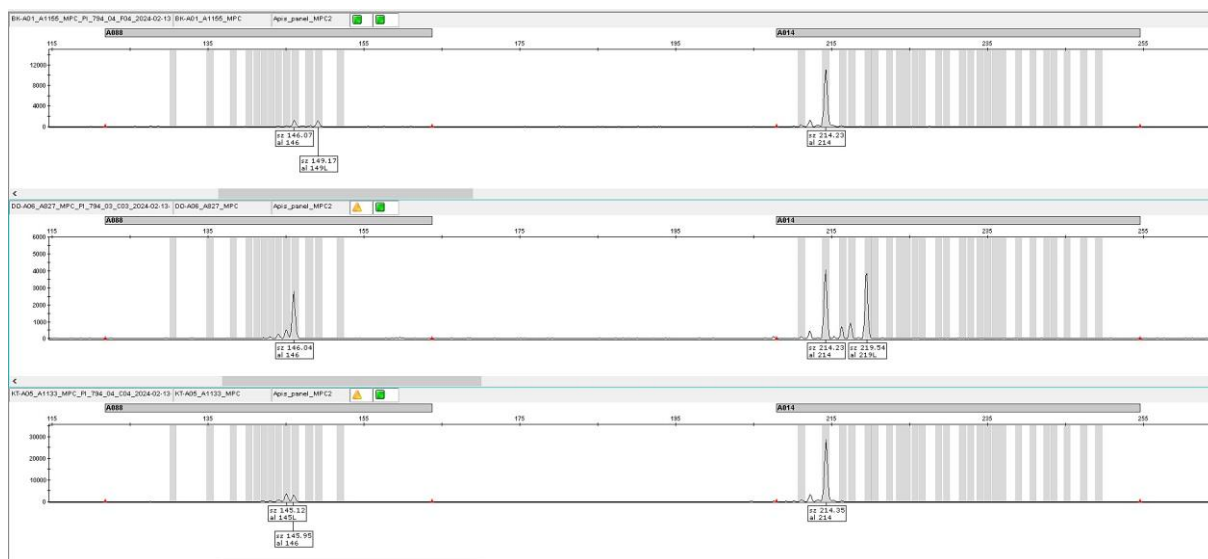


Vysv. Obr.7-10: Horní lišta - označení rozsahu alel daného mikrosatelitu (např. A079), sz – velikost alely; al – označení alely

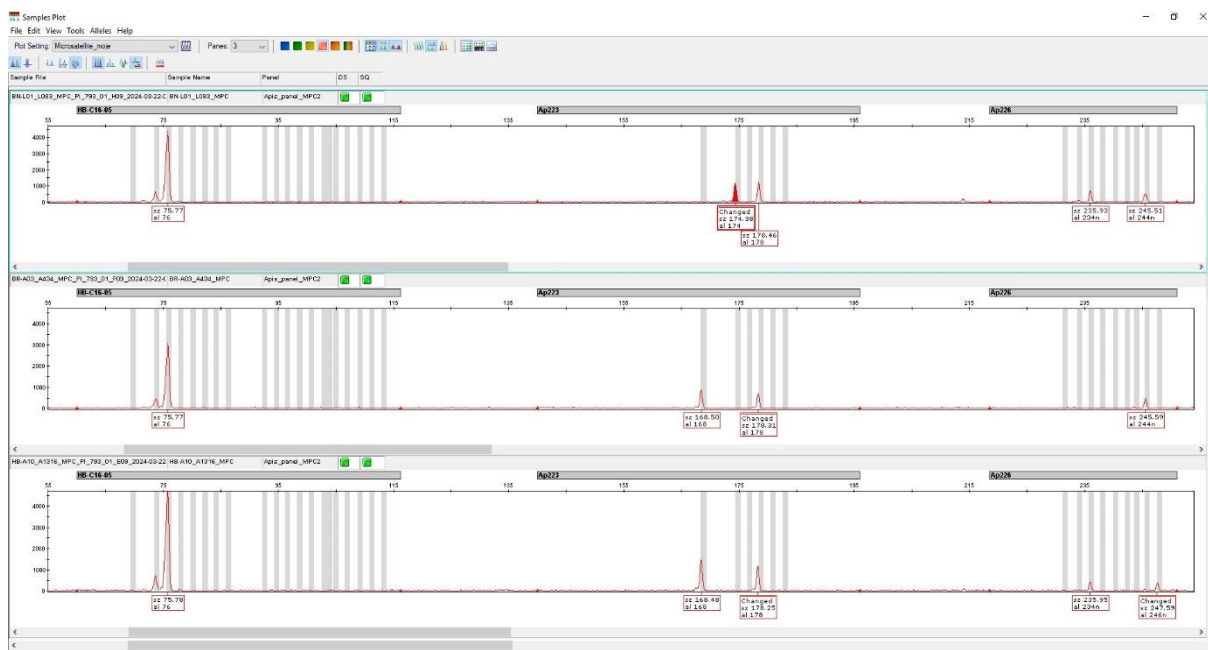
Obr. 8 Elektroforetogram mikrosatelitů značených VIC (zelená)



Obr. 9 Elektroforetogram mikrosatelitů značených NED (černá)



Obr. 10 Elektroforetogram mikrosatelitů značených PET (červená)



h) Pro zobrazení genotypů zvolte záložku *Genotypes*.

Sample ID	Sample Name	Marker	Dye	Allele 1	Allele 2	Size 1	Size 2	Genotype
1	BI-A02_A008_MP	BI-A02_A008_MP	A	102	220	214.3	220.11	✓
2	BI-A02_A008_MP	BI-A02_A008_MP	A	144	146	143.93	145.96	✓
3	BI-A02_A008_MP	BI-A02_A008_MP	B	133	135	133.07	135.38	✓
4	BI-A02_A008_MP	BI-A02_A008_MP	B	211		210.54		✓
5	BI-A02_A008_MP	BI-A02_A008_MP	R	168	178	168.49	176.47	✓
6	BI-A02_A008_MP	BI-A02_A008_MP	R	2200	2260	221.62	226.09	✓
7	BI-A02_A008_MP	BI-A02_A008_MP	D	207		207.3		✓
8	BI-A02_A008_MP	BI-A02_A008_MP	D	279		278.72		✓
9	BI-A02_A008_MP	BI-A02_A008_MP	B	76	96	75.87	96.66	✓
10	BI-L01_L001_MP	BI-L01_L001_MP	A	214		214.11		✓
11	BI-L01_L001_MP	BI-L01_L001_MP	B	106	114	105.79	114.23	✓
12	BI-L01_L001_MP	BI-L01_L001_MP	A	146		146.05	146.02	✓
13	BI-L01_L001_MP	BI-L01_L001_MP	B	135		135.34		✓
14	BI-L01_L001_MP	BI-L01_L001_MP	R	217	219	216.0	216.64	✓
15	BI-L01_L001_MP	BI-L01_L001_MP	R	168	178	168.55	176.64	✓
16	BI-L01_L001_MP	BI-L01_L001_MP	R	2240	2440	226.22	245.93	✓
17	BI-L01_L001_MP	BI-L01_L001_MP	D	207		207.39		✓
18	BI-L01_L001_MP	BI-L01_L001_MP	D	265		264.58		✓
19	BI-L01_L001_MP	BI-L01_L001_MP	B	76		75.95		✓
20	BI-L01_L001_MP	BI-L01_L001_MP	A	214		214.23		✓
21	BK-A01_A1155_J	BK-A01_A1155_J	A	102	114	101.87	114.36	✓
22	BK-A01_A1155_J	BK-A01_A1155_J	B	146	148	146.07	149.17	✓
23	BK-A01_A1155_J	BK-A01_A1155_J	B	158		155.54		✓
24	BK-A01_A1155_J	BK-A01_A1155_J	B	211		210.78		✓
25	BK-A01_A1155_J	BK-A01_A1155_J	R	178		178.61		✓
26	BK-A01_A1155_J	BK-A01_A1155_J	R	2240		226.36		✓
27	BK-A01_A1155_J	BK-A01_A1155_J	R	207	216	207.59	214.12	✓
28	BK-A01_A1155_J	BK-A01_A1155_J	D	273	285	273.11	285.04	✓
29	BK-A01_A1155_J	BK-A01_A1155_J	D	76		75.96		✓
30	BK-A13_A294L_J	BK-A13_A294L_J	A	214		213.89		✓
31	BK-A13_A294L_J	BK-A13_A294L_J	B	90	100	89.94	99.55	✓
32	BK-A13_A294L_J	BK-A13_A294L_J	B	144	148	143.96	145.94	✓
33	BK-A13_A294L_J	BK-A13_A294L_J	A	135		135.35		✓
34	BK-A13_A294L_J	BK-A13_A294L_J	B	156	211	155.07	210.42	✓

4.6.3 Export výsledků

a) Označte vzorky, které chcete exportovat a zadejte *File-Export Combined Table*.

Status	Sample File	Sample Name	Sample Ty	S/N	Analysis Method	Panel	Size Standard	Run Name	Run Date & Time	S/NF	S/NF	OS	Lane	View
1	BI-A02_A008_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-A02_A008_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 13:45:20	✓	✓	✓	1	A01
2	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	1	A02
3	BK-A01_A1155_J_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BK-A01_A1155_J	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 15:44:08	✓	✓	✓	6	P04
4	BK-A13_A294L_J_P_794_01_2024-02-12-08-45-57.fsa	BK-A13_A294L_J	Sample	NO	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-12-08-45-57_MP	2024-02-12 08:46:30	✓	✓	✓	1	A12
5	BK-A13_A294L_J_P_794_01_2024-02-12-08-45-57.fsa	BK-A13_A294L_J	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-12-08-45-57_MP	2024-02-12 08:46:30	✓	✓	✓	5	S12
6	BK-A13_A294L_J_P_794_01_2024-02-08-18-13-54.fsa	BK-A13_A294L_J	Sample	NO	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-08-17-1229	2024-02-08 20:13:07	✓	✓	✓	6	F11
7	BK-A13_A294L_J_P_794_01_2024-02-08-18-13-54.fsa	BK-A13_A294L_J	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-08-17-1229	2024-02-08 19:34:17	✓	✓	✓	3	C10
8	BK-A13_A294L_J_P_794_01_2024-02-09-11-56-02.fsa	BK-A13_A294L_J	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-09-09-41_Ap	2024-02-09 11:56:35	✓	✓	✓	3	C10
9	BK-A13_A294L_J_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-A02_A008_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 13:45:20	✓	✓	✓	5	B01
10	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
11	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
12	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
13	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
14	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
15	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
16	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
17	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
18	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
19	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
20	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
21	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
22	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
23	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
24	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
25	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
26	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
27	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
28	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
29	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
30	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
31	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
32	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
33	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
34	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
35	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
36	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
37	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
38	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
39	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
40	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
41	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
42	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01
43	BI-L01_L001_MP_P_794_01_2024-02-13-13-44-46.fsa	BI-L01_L001_MP	Sample	YES	MS_Apis_MPC2	Apis_jpanel_MPC2	G5000LJZ	Run 2024-02-13-13-20_MP	2024-02-13 14:26:12	✓	✓	✓	6	H01

b) Zadejte cílový adresář, poté zaklikněte *One line per sample* a zvolte *Export*.

The screenshot shows the GeneMapper Software 6 interface. The main window displays a list of samples with columns for Status, Sample File, Sample Name, Sample TV/SFN, Analysis Method, Panel, Size Standard, Run Name, Run Date & Time, SNF, SNF, OS, SQ, Lane, and Vial. An 'Export Combined Table' dialog box is open, showing the 'Look in' dropdown set to 'GeneMapper'. The 'Export File As' dropdown is set to 'Tab-delimited text (.txt)'. Under the 'Merge' section, the 'One line per sample' radio button is selected. The 'Export' button is highlighted with a red circle.

c) Data ze vzniklého textového souboru je možné převést do MS Excel nebo podobného programu pro další úpravu a analýzu dat.

The screenshot shows a Windows File Explorer window. The address bar indicates the path is 'This PC > AB SWB&DATA (D:) > AppliedBiosystems > GeneMapper > New Folder (2)'. The file list shows a file named 'Apis_MPC.txt' with a size of 53 KB, which is highlighted with a red circle.

d) Ukázka vyexportovaného výsledku. Lze upravit do požadovaného formátu.

Sample File	Sample Name	Analysis		Size		Run Date & Time	Lane	Well	Marker	Dye	Allele 1	Allele 2	Size 1	Size 2	
		Method	Panel	Standard	Run Name										
BI-A03_A678_MP3_PI_629_23_H11_2023-02-14-17-03-29.fsa	BI-A03_A678_MP3	MS_Apis_MPC2	Apis_panel_MPC2	GS600LIZ	Run	2023-02-15-11-50_MP3_PT7C	15.02.2023 7:10	8	H11	A(B)124	B	213		213.17	
BI-A03_A679_MP3_PI_631_18_E06_2023-02-15-11-52-31.fsa	BI-A03_A679_MP3	MS_Apis_MPC2	Apis_panel_MPC2	GS600LIZ	Run	2023-02-15-11-50_MP3_PT7C	15.02.2023 22:58	5	E06	A(B)124	B	213	215	213.28	215.32
BI-A04_A683_MP3_PI_629_22_B10_2023-02-14-17-03-29.fsa	BI-A04_A683_MP3	MS_Apis_MPC2	Apis_panel_MPC2	GS600LIZ	Run	2023-02-15-11-50_MP3_PT7C	15.02.2023 22:58	2	B10	A(B)124	B	213	220	213.29	219.52

4.7 Statistické zpracování výsledků

4.7.1 Statistický software

Pro vyhodnocení dat lze použít libovolný software, který je uživatel zvyklý používat. V rámci této metodiky doporučujeme GenAlEx, volně dostupný a jednoduchý na obsluhu, který ale poskytuje dostatečnou informativnost.

GenAlEx - *Genetic Analysis in Excel* (Peakall and Smouse 2006, 2012) je navržen jako uživatelsky přívětivý balík s intuitivním a konzistentním rozhraním, který uživatelům umožňuje analyzovat širokou škálu analýz populačních genetických dat v softwarovém prostředí MS Excel.

Software a podpůrná dokumentace jsou volně k dispozici na stránkách The Australian National University, Canberra, Austrálie na adrese URL <https://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx>. Na této adrese je k dispozici i podrobný manuál.

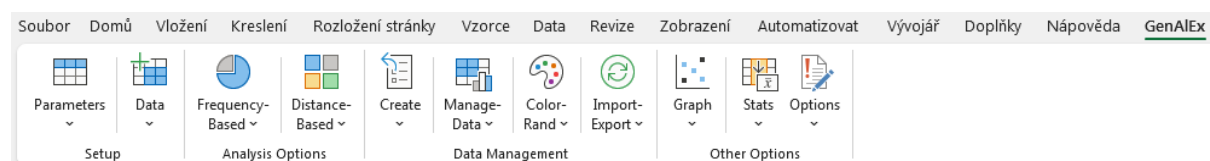
Ke stažení: <https://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Download.html>

4.7.2 Vstupní formát dat

Vstupní formát dat je GenePop (genotyp MS je ve dvou sloupcích). Soubor je textový (*.txt).

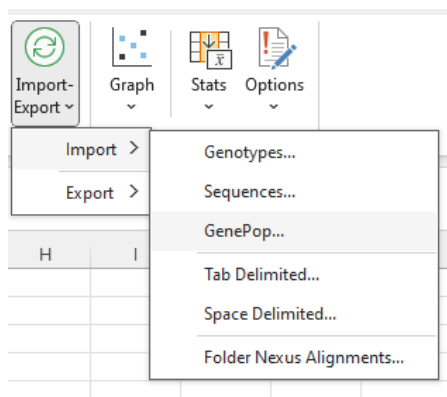
Title	line:"Bee"			
A(B)024				
A088				
AP043				
...				
POP				
Global ,	100100	144146	142144	...
Global ,	100102	146146	136142	...
Global ,	100102	138144	136136	...

4.7.3 Programové rozhraní v MS Excel



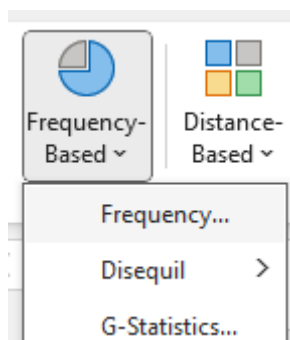
4.7.4 Import dat

V záložce **Import-Export** si vybereme **Import** a pak **GenePop...** a vybereme umístění souboru vstupních data. Dojde k importu dat do programu GenAlEx.



4.7.5 Použité ukazatele genetické diverzity

Postupujte v souladu s manuálem k software, zvolte požadovanou funkci, např. funkce dle Tab.10. V Tab. 11 je uveden příklad vyhodnocení diverzity.



Tab. 10 Vysvětlení parametrů diverzity (GenAlEx 6.5)

Symbol	Význam	Funkce program	Výpočet
N	počet	No.	
Na	počet různých alel	No. of Different Alleles	
Ne	počet efektivních alel	No. of Effective Alleles	$N_e = \frac{1}{1 - H_E}$
I		Shannon's Information Index	$I = \sum p_i \ln p_i$
Ho	zjištěná heterozygotnost	Observed Heterozygosity	No. of Hets / N
He	očekávaná heterozygotnost	Expected Heterozygosity	$H_E = 1 - \sum p_i^2$
uHe	nestranná očekávaná heterozygotnost	Unbiased Expected Heterozygosity	$(2N / (2N-1)) * H_e$
F	fixační index	Fixation Index	$F = \frac{H_E - H_o}{H_E}$

kde p_i je frekvence i-té alely v populaci

Jako doplňkový parametr lze spočítat polymorfní informační obsah (PIC), a to podle následujícího vzorce:

$$PIC = H - 2 \sum_{i=1}^{n-1} p_i^2 \sum_{j=i+1}^n p_j^2$$

kde H = heterozygotnost, p_i = četnost i-té alely, p_j = četnost j-té alely, n = počet alel

4.8 Diverzita zjištěná v modelové populaci včel

V Tab. 11 jsou uvedeny alely detekované u jednotlivých mikrosatelitních markerů a jejich četnost, frekvence. U všech testovaných mikrosatelitních markerů byla prokázán polymorfismus. Nejvyšší variabilitu vykazuje mikrosatelit HB-C16-01, u kterého bylo stanoveno celkem 21 různých alelických variant. Nejmenší, ale stále dostačující variabilitu, mají mikrosatelity Ap249 a Ap223 (oba po čtyřech alelách).

Tab. 11 Zjištěné alely a jejich absolutní frekvence

A088	Ap113	Ap249	A014	A079	Ap223	Ap226n	HB-C16-01	AP019	HB-C16-05
135 3	195 1	207 88	214 69	90 16	168 28	230 24	247 1	133 32	76 88
136 1	211 84	214 22	216 5	96 3	174 3	232 3	249 11	135 58	78 18
138 14	213 1	215 9	217 2	100 15	178 80	234 34	253 1	137 14	86 1
141 2	217 26	217 1	219 5	102 22	182 9	236 42	255 12	139 14	92 1
142 2	219 3		220 13	104 27		238 2	257 1	141 1	94 1
143 3	221 2		222 2	106 16		240 1	271 1	142 1	96 1
144 12	225 2		224 2	108 10		242 1	273 5		102 1
146 73	235 1		225 1	110 8		244 12	275 7		104 6
148 9			226 1	114 3		246 1	277 4		106 1
149 1			229 7				279 14		112 1
			231 6				281 7		113 1
			233 1				283 19		
			234 2				285 12		
			235 2				287 9		
			243 1				289 2		
			246 1				293 1		
							295 6		
							297 2		
							301 1		
							303 1		
							309 1		

Tab. 12 Příklad vyhodnocení – výsledky diverzity souboru validace

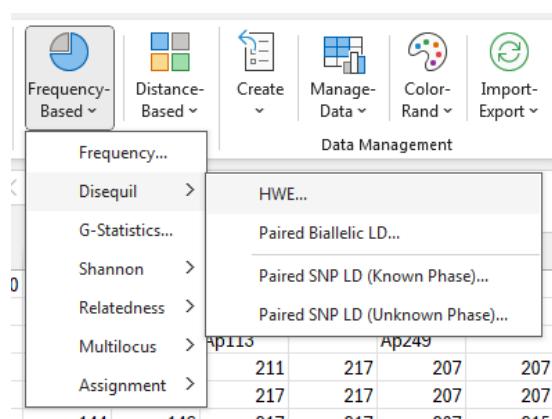
Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F	PIC
A088	60	10,000	2,492	1,378	0,583	0,599	0,604	0,026	0,575
Ap113	60	8,000	1,858	0,929	0,433	0,462	0,466	0,061	0,414
Ap249	60	4,000	1,733	0,773	0,417	0,423	0,426	0,015	0,380
A014	60	16,000	2,829	1,680	0,600	0,647	0,652	0,072	0,631
A079	60	9,000	6,754	2,016	0,833	0,852	0,859	0,022	0,835
Ap223	60	4,000	1,980	0,896	0,567	0,495	0,499	-0,145	0,440
Ap226n	60	9,000	3,939	1,557	0,767	0,746	0,752	-0,028	0,705
HB-C16-01	59	21,000	11,247	2,626	0,763	0,911	0,919	0,163	0,904
AP019	60	6,000	3,011	1,285	0,700	0,668	0,674	-0,048	0,618
HB-C16-05	60	11,000	1,775	0,981	0,433	0,437	0,440	0,008	0,409
Mean	59,900	9,800	3,762	1,412	0,610	0,624	0,629	0,015	
SE	0,100	1,672	0,960	0,184	0,048	0,055	0,055	0,026	

Heterozygotnost je ukazatel hodnotící stav, kdy jedinec má dvě odlišné alely v daném lokuse umístěné na homologních chromozomech. Genetická rozmanitost v populaci se vyznačuje vyšší heterozygotností, nižší míra heterozygotnosti může signalizovat genetickou uniformitu.

Hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_e) se v našem souboru pro validaci pohybovaly v rozmezí 0,4265 až 0,9189. Zjištěná heterozygotnost (H_o) nabývala hodnot od 0,4167 do 0,8333.

Míru variability alel na jednom konkrétním lokusu v populaci ukazuje tzv. hodnota PIC (polymorfní informační obsah). Hodnota PIC je rozdělena do tří kategorií. První kategorie nabývá hodnot PIC menších než 0,25. Tyto hodnoty vykazují nízký polymorfismus a z důvodu nízkého počtu alel v daném lokusu velmi těžko rozliší mezi sebou jedince či populace. Střední hodnoty PIC se pohybují v rozmezí 0,25 až 0,5 a vyšší hodnoty PIC jsou nad hodnotu 0,5. Podle získaných výsledků má nejnižší hodnotu PIC mikrosatelit Ap249 (0,3803), který vyazuje i nejnižší hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_e) a zjištěná heterozygotnosti (H_o). Nejvyšší váhu informovanosti má marker HB-C16-01 (0,9044), který dosahoval vysokých hodnot i v případě H_e a H_o .

Výpočet **Hardyho-Weinbergovy genetické rovnováhy (HWE)** lze provádět různými metodami a softwary. Doporučujeme využití software GenAlEx, kdy použijte volbu dle níže uvedeného obrázku.



Tab. 13 Příklad – vypočtené hodnoty pro soubor validace

Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
A088	45	135,889	0,000	***
Ap113	28	3,967	1,000	ns
Ap249	6	2,019	0,918	ns
A014	120	115,916	0,588	ns
A079	36	32,584	0,632	ns
Ap223	6	3,324	0,767	ns
Ap226n	36	22,407	0,963	ns
HB-C16-01	210	186,061	0,882	ns
AP019	15	17,762	0,275	ns
HB-C16-05	55	32,193	0,994	ns

Vysvětlivky: DF = stupně volnosti (degrees of freedom), ns= neprůkazné rozdíly (not significant), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Pozn. S výjimkou mikrosatelitu A088 jsou všechny v genetické rovnováze. Je třeba vzít k úvahu, že v případě malého množství vzorků a zároveň velkého množství alel je běžné, že takový soubor v rovnováze není.

5 Validace metodiky

5.1 Popis

Metodika byla vyvinuta na základě dat získaných z analýzy variability populace včel v České republice, která sestává z 22 mikrosatelitových lokusů analyzovaných celkem ve 4 různých multiplexech. Výsledky z této rozsáhlé analýzy byly srovnány s výsledky získanými novým multiplexem sestaveným pro tuto certifikovanou metodiku složeným z 10 vybraných mikrosatelitových lokusů. Pro validaci byl použit náhodný výběr 60 vzorků, a to ve 3 nezávislých analýzách (reakcích) po 20 vzorcích.

5.2 Výsledky validace

Výsledky srovnání genotypů u vybraných 60 vzorků včel v České republice jsou uvedeny v Tab.14. Vyhodnocení frekvencí alel je uvedeno v Tab. 11. Základní charakteristiky diverzity jsou uvedeny v Tab. 12.

Tab. 14 Srovnání genotypů získaných pomocí metodiky 4 multiplexů (sloupec vlevo) a multiplexu pro certifikovanou metodiku (sloupec vpravo)

Vzorek	A088	A088	Ap113	Ap113	Ap249	Ap249	A014	A014	A079	A079	Ap223	Ap223	Ap226	Ap226n	HB-C16-01	HB-C16-01	AP019	AP019	HB-C16-05	HB-C16-05
A450	146	146	211	211	207	207	229	229	104	104	178	178	234	234	249	249	135	135	76	76
	146	146	217	217	207	207	231	231	106	106	182	182	236	236	275	275	135	135	113	113
A479	138	138	217	217	207	207	214	214	102	102	178	178	236	236	279	279	133	133	76	76
	144	144	217	217	207	207	214	214	102	102	178	178	236	236	285	285	135	135	78	78
A539	144	144	217	217	207	207	220	220	100	100	178	178	234	234	277	277	135	135	76	76
	146	146	217	217	215	215	220	220	106	106	178	178	244	244	277	277	137	137	76	76
A554	138	138	211	211	207	207	216	216	108	108	168	168	236	236	255	255	133	133	76	76
	146	146	219	219	214	214	220	220	114	114	178	178	244	244	295	295	133	133	76	76
A568	146	146	211	211	215	215	214	214	90	90	178	178	230	230	285	285	135	135	76	76
	148	148	211	211	215	215	231	231	104	104	182	182	236	236	285	285	135	135	76	76
A611	146	146	217	217	207	207	220	220	102	102	178	178	230	230	277	277	135	135	76	76
	146	146	221	221	214	214	231	231	104	104	182	182	234	234	277	285	139	139	76	76
A651	146	146	211	211	207	207	220	220	102	102	178	178	236	236	283	283	137	137	76	76
	146	146	235	235	207	207	222	222	104	104	178	178	244	244	285	285	139	139	76	76
A997	146	146	211	211	207	207	214	214	104	104	168	168	234	234	249	249	135	135	76	76
	146	146	219	219	214	214	220	220	108	108	178	178	234	234	283	283	135	135	76	76
L83	146	146	211	211	207	207	214	214	104	104	174	174	234	234	287	287	133	133	76	76
	148	148	211	211	214	214	214	214	108	108	178	178	244	244	295	295	135	135	76	76
L148	146	146	211	211	207	207	214	214	104	104	178	178	232	232	0	283	133	133	76	76
	146	146	211	211	215	215	217	217	106	106	182	182	236	236	0	287	135	135	76	76
L499	144	144	211	211	207	207	214	214	104	104	168	168	230	230	287	287	135	135	76	76
	146	146	217	217	214	214	224	224	106	106	178	178	238	238	295	295	137	137	76	76
A1760	146	146	217	217	207	207	214	214	102	102	168	168	234	234	281	281	133	133	76	76
	146	146	217	217	207	207	214	214	110	110	178	178	236	236	281	281	137	137	78	78
L461	141	141	211	211	207	207	214	214	102	102	178	178	230	230	249	249	133	133	76	76
	146	146	211	211	215	215	233	233	108	108	178	178	236	236	279	279	135	135	76	76
A362	146	146	211	211	207	207	214	214	104	104	178	178	232	232	271	271	135	135	76	76
	146	146	217	217	214	214	214	214	104	104	182	182	236	236	283	283	139	139	76	76
A1079	138	138	211	211	207	207	214	214	102	102	168	168	232	232	0	283	135	135	76	76
	146	146	211	211	207	207	214	214	106	106	178	178	234	234	0	285	137	137	78	78
A1360	146	146	211	211	207	207	214	214	100	100	178	178	234	234	283	283	133	133	76	76
	146	146	211	211	207	207	214	214	106	106	178	178	238	238	283	283	135	135	78	78
1211	146	146	211	211	207	207	219	219	90	90	178	178	234	234	255	255	133	133	76	76
	146	146	211	211	214	214	220	220	100	100	178	178	240	240	285	255	135	135	76	76
A2263	146	146	211	211	207	207	214	214	90	90	168	168	236	236	279	279	135	135	76	76
	148	148	217	217	215	215	214	214	106	106	178	178	242	242	285	285	137	137	76	76
A1316	146	146	211	211	207	207	214	214	102	102	168	168	234	234	279	279	133	133	76	76

	146 146	211 211	207 207	214 214	104 104	178 178	246 246	279 297	135 135	76 76
A434	138 138	211 211	214 214	219 219	104 104	168 168	244 244	249 249	135 135	76 76
	148 148	217 217	214 214	229 229	112 104	178 178	244 244	249 249	139 139	76 76
A008	144 144	211 211	207 207	214 214	102 102	168 168	230 230	279 279	133 133	76 76
	146 146	211 211	207 207	220 220	102 102	178 178	236 236	279 279	135 135	96 96
A740	138 138	211 211	207 207	219 219	100 100	168 168	230 230	279 279	133 133	76 76
	146 146	217 217	207 207	220 220	100 100	178 178	236 236	289 289	137 137	104 104
A1339	146 146	211 211	207 207	214 214	90 90	168 168	230 230	275 275	133 133	76 76
	146 146	211 211	207 207	214 214	100 100	178 178	236 236	275 275	135 135	76 76
A1575	146 146	211 211	207 207	214 214	108 108	178 178	230 230	277 277	133 133	76 76
	146 146	213 213	207 207	214 214	110 110	178 178	234 234	279 279	133 133	76 76
A2301	144 144	211 211	207 207	214 214	90 90	168 168	230 230	255 255	133 133	76 76
	146 146	217 217	207 207	214 214	90 90	182 182	234 234	283 283	137 137	104 104
A2946	144 144	195 195	207 207	214 214	90 90	168 168	230 230	283 283	135 135	76 76
	146 146	211 211	207 207	214 214	100 100	178 178	234 234	283 283	135 135	76 76
A3341	144 144	211 211	207 207	214 214	90 90	178 178	230 230	255 255	135 135	78 78
	146 146	211 211	215 215	216 216	114 114	178 178	234 234	287 287	137 137	102 102
L032	148 148	211 211	207 207	214 214	100 100	178 178	229 230	281 281	135 135	76 76
	148 148	211 211	207 207	214 214	104 104	178 178	234 234	281 281	139 139	76 76
L001	146 146	217 217	207 207	214 214	106 106	168 168	234 234	0 295	135 135	76 76
	148 148	219 219	207 207	214 214	114 114	178 178	244 244	0 295	135 135	76 76
L030	138 138	211 211	207 207	214 214	102 102	174 174	229 230	285 285	133 133	76 76
	146 146	211 211	207 207	231 231	110 110	178 178	244 244	295 295	135 135	78 78
L92	138 138	211 211	207 207	214 214	102 102	178 178	236 236	273 273	135 135	76 76
	146 146	211 211	214 214	220 220	106 106	182 182	244 244	0 285	139 139	78 78
L054	146 146	211 211	207 207	214 214	104 104	178 178	234 234	283 283	133 133	76 76
	146 146	217 217	214 214	214 214	104 104	178 178	244 244	287 287	135 135	78 78
L009	144 144	211 211	207 207	214 214	90 90	178 178	229 230	279 279	135 135	76 76
	144 144	211 211	214 214	220 220	106 106	178 178	236 236	289 289	135 135	76 76
L020	138 138	211 211	207 207	224 224	90 90	178 178	234 234	275 275	139 139	76 76
	144 144	217 217	214 214	229 229	100 100	178 178	236 236	0 281	141 141	76 76
L033	146 146	217 211	207 207	214 214	104 104	178 178	236 236	279 279	135 135	76 76
	146 146	217 217	207 207	231 231	104 104	178 178	236 236	283 283	135 135	76 76
A085	143 143	211 211	207 207	214 214	104 104	168 168	236 236	255 255	135 135	76 76
	146 146	225 225	217 217	216 216	106 106	178 178	236 236	285 285	137 137	76 76
A086	143 143	211 211	207 207	220 220	100 100	168 168	236 236	255 255	133 133	76 76
	146 146	225 225	207 207	231 231	108 108	178 178	236 236	279 279	139 139	78 78
A087	143 143	217 217	207 207	216 216	100 100	168 168	236 236	273 273	133 133	76 76
	146 146	217 217	215 215	246 246	110 110	178 178	236 236	273 273	139 139	78 78
A629	141 141	211 211	207 207	214 214	102 102	168 168	236 236	249 249	135 135	76 76
	146 146	211 211	214 214	214 214	108 108	182 182	236 236	0 287	139 139	76 76
A1877	142 142	211 211	207 207	214 214	102 102	178 178	234 234	283 283	133 133	76 76
	146 146	211 211	207 207	226 226	104 104	178 178	236 236	287 287	135 135	86 86
A1875	142 142	211 211	207 207	219 219	90 90	178 178	230 230	249 249	135 135	76 76

	146 146	217 217	207 207	225 225	102 102	178 178	234 234	255 255	135 135	94 94
A454	135 135	211 211	207 207	214 214	90 90	178 178	234 234	249 249	133 133	76 76
	146 146	217 217	207 207	214 214	106 106	182 182	236 236	0 283	139 139	76 76
A594	135 135	211 211	207 207	214 214	90 90	178 178	230 230	279 279	135 135	76 76
	144 144	211 211	207 207	220 220	104 104	178 178	236 236	287 287	135 135	76 76
A1609	136 136	211 211	214 214	214 214	110 110	178 178	236 236	255 255	137 137	76 76
	149 149	217 217	215 215	229 229	110 110	178 178	236 236	273 273	142 142	104 104
A1134	138 138	211 211	207 207	214 214	102 102	168 168	236 236	0 281	133 133	76 76
	146 146	217 217	207 207	229 229	104 104	168 168	236 236	0 285	133 133	76 76
A1135	138 138	211 211	214 214	214 214	102 102	168 168	234 234	249 249	133 133	76 76
	144 144	211 211	214 214	222 222	104 104	178 178	244 244	0 279	133 133	78 78
A1187	135 135	211 211	207 207	214 214	104 104	174 174	236 236	275 275	135 135	76 76
	148 148	211 211	207 207	214 214	110 110	178 178	236 236	283 283	135 135	76 76
A1017	138 138	211 211	207 207	214 214	90 90	178 178	234 234	285 285	135 135	76 76
	146 146	211 211	207 207	219 219	102 102	178 178	234 234	293 293	135 135	76 76
A1052	146 146	211 211	207 207	214 214	90 90	168 168	236 236	257 257	137 137	76 76
	146 146	211 211	207 207	243 243	106 106	178 178	236 236	279 279	139 139	78 78
A1118	146 146	211 211	207 207	214 214	100 100	178 178	234 234	253 253	133 135	76 76
	146 146	211 211	214 214	214 214	106 106	178 178	234 234	283 283	135 135	92 92
A2513	146 146	211 211	207 207	214 214	90 90	168 168	230 230	283 283	133 133	76 76
	146 146	211 211	214 214	214 214	108 108	178 178	236 236	303 303	135 135	104 104
A2542	138 138	211 211	207 207	214 214	100 100	178 178	230 230	249 249	135 135	78 78
	146 146	211 211	214 214	214 214	104 104	178 178	234 234	301 301	135 135	104 104
A2685	146 146	211 211	207 207	214 214	0 100	167 168	230 230	291 0	135 135	76 76
	146 146	217 217	207 207	214 214	0 108	178 178	236 236	299 0	135 135	76 76
A3288	138 138	211 211	207 207	214 214	96 96	178 178	230 230	283 283	133 133	76 76
	148 148	211 211	207 207	229 229	110 110	178 178	234 234	309 309	137 137	76 76
A756	146 146	211 211	207 207	214 214	96 96	168 168	234 234	281 281	133 133	78 78
	146 146	211 211	214 214	214 214	102 102	168 168	236 236	297 297	135 135	106 106
A787	138 138	211 211	207 207	214 214	96 96	168 168	234 234	247 247	133 133	78 78
	146 146	211 211	207 207	229 229	106 106	178 178	236 236	273 273	135 135	78 78
A1431	146 146	211 211	207 207	216 216	102 102	178 178	230 230	249 249	133 133	104 104
	146 146	221 221	207 207	235 235	102 102	178 178	244 244	287 287	135 135	112 112
A2683	146 146	211 211	207 207	217 217	0 104	178 178	230 230	275 275	135 135	76 76
	146 146	211 211	207 207	235 235	0 108	178 178	234 234	275 275	139 139	78 78
A3407	146 146	211 211	207 207	214 214	102 102	178 178	230 230	255 255	133 133	76 76
	146 146	217 217	207 207	234 234	104 104	178 178	234 234	283 283	137 137	78 78
A842	146 146	211 211	207 207	214 214	100 100	168 168	230 230	255 255	135 135	76 76
	146 146	211 211	214 214	234 234	106 106	178 178	234 234	255 255	139 139	76 76

Chybějící (nulové) alely označeny žlutě.

5.3 Závěr

Z celkového počtu 600 genotypů byl zjištěn nesoulad u 5 (0,83 %), vždy pouze u mikrosatelitu HB-C16-01, přičemž genotypy pro certifikovanou metodiku byly určeny správně, chyběla jedna z alel u heterozygota v případě metodiky 4 multiplexů. „Ztráta“ alely je jev, který je u mikrosatelitů známý a relativně běžný. 5 genotypů nebylo vůbec určeno u původní sady 4 multiplexů (z toho 4 u HB-C16-01), přičemž u multiplexu pro certifikovanou metodiku příslušné genotypy získány byly. Naopak u metodiky pro certifikaci nebyl získán genotyp pouze v jenom případě, a to opět u mikrosatelitu HB-C16-01.

Celkově se jedná o dobrý soulad výsledků soulad mezi genotyp zjištěnými v základních multiplexech a lze konstatovat, že předložená metodikou pro certifikaci tak má vysokou spolehlivost.

6 Novost postupu

Metodika pro hodnocení genetické variability včely medonosné specializovaná na populaci včel chovaných v České republice doposud není k dispozici. Použití metodik publikovaných v zahraničí (např. Kükreer et al. 2021), není vhodné vzhledem k finanční a časové náročnosti uvedené metodiky i tomu, že ne všechny zde uvedené lokusy jsou v populaci včel v ČR informativní (validní). Totéž platí i pro další zahraniční práce, neboť všechny ve světě používané metodiky byly vyvíjeny pro účely vědeckého výzkumu, nikoliv pro aplikované využití.

7 Uplatnění metodiky

Metodika bude nabízena k použití včelařským svazům a šlechtitelům pro efektivní hodnocení variability ve šlechtěných populacích a sledování genetické variability ve včelstvech u běžných chovatelů, kteří mají být cílem šlechtitelské činnosti. Zároveň si variabilitu mohou nechat otestovat i jednotliví chovatelé včel. Metodika sice není optimalizována pro ověřování původu (maternity) včel, nicméně z podstaty této analýzy orientační závěry umožňuje. Vlastní provedení musí být realizováno v laboratořích ovládajících základní technologie práce s DNA, tzn. izolaci DNA, amplifikaci DNA a fluorescenční fragmentační analýzu.

8 Ekonomické aspekty

Odhad nákladů (v tis. Kč) na zavedení postupů uvedených v metodice:

Předpokladem pro realizaci metodiky uživatelem je příslušné přístrojové vybavení uvedené v kapitole 4.5.1 této metodiky. Dále je třeba pořízení sady 10 fluorescenčních a 10 standardních primerů v ceně 38 tis Kč vč. DPH. Vlastní provádění metodiky již vyžaduje pouze pokročilé odborné znalosti a zkušenosti personálu a dále náklady na laboratorní materiál. Ty zahrnují cenu DNA izolačního kitu, PCR polymerázový mix, zkumavky a plasty, polymer POP-7, elektroforetické pufrů, velikostní

standard. Celkové materiální náklady na analýzu jednoho vzorku jsou cca 300 Kč. Náklady lze snížit cca o 10-20 % v případě analýzy většího množství vzorků, v maximálním procentu při analýze celého platu (96 vzorků).

Vyvinutím multiplexu pro testování 10 nejvíce informativních MS umožnilo snížit náklady, a to přibližně 3x oproti původnímu systému zahrnujícím 22 mikrosatelitů a 4 multiplexy.

Odhad ekonomického přínosu pro uživatele a přínos z hlediska určení a případné ochrany diverzity je z hlediska finančního problematicky vyčíslitelný. Nicméně z hlediska biologického, ekologického a ekonomického je přínos vědecky podložen. Uchování genetické diverzity u včel je totiž významné pro potenciální šlechtění a pro adaptaci podmínky prostředí obecně, obzvláště pak v době probíhající globální klimatické změny. Naše metodika umožňuje diverzitu hodnotit a sledovat. Neexistovala doposud žádná jednoduchá a relativně levná metodika pro hodnocení diverzity u včel v ČR.

9 Seznam použité související literatury

- Alburaki, M.; Bertrand B.; Legout H.; Moulin S.; Alburaki A.; Sheppard W. S.; Garnery L. (2013) A fifth major genetic group among honeybees revealed in Syria. *BMC Genetics*. 14(1). ISSN 1471-2156. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-117>
- Eimanifar, A.; Pieplow J.T.; Asem A.; Ellis J.D. (2020) Genetic diversity and population structure of two subspecies of western honey bees (*Apis mellifera* L.) in the Republic of South Africa as revealed by microsatellite genotyping. *PeerJ*. 8(8). ISSN 2167-8359. <https://doi.org/10.7717/peerj.8280>
- Estoup, A.; Solignac, M.; Cornuet, J-M. (1994) Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 258(1351), 1-7. ISSN 0962-8452. <https://doi.org/10.1098/rspb.1994.0133>
- Estoup, A.; Garnery L.; Solignac M.; Cornuet J.M. (1995) Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*. 140(2), 679-695. ISSN 1943-2631. <https://doi.org/10.1093/genetics/140.2.679>
- Garnery, L.; Mosshine E.H.; Oldroyd B.P.; Cornuet J.M. (1995) Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Molecular Ecology*. 4(4), 465-472. ISSN 0962-1083. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00240.x>
- Kükrer, M.; Kence, M.; Kence, A. (2021) Honey Bee Diversity Is Swayed by Migratory Beekeeping and Trade Despite Conservation Practices: Genetic Evidence for the Impact of Anthropogenic Factors on Population Structure. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 9, 1-15. ISSN 2296-701X. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.556816>
- Muñoz, I.; Dall'Olio R.; Lodesani M.; De la Rúa P. (2009) Population genetic structure of coastal Croatian honeybees (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie*. 40(6), 617-626. ISSN 0044-8435. <https://doi.org/10.1051/apido/2009041>
- Muñoz, I.; De la Rúa P. (2021) Wide genetic diversity in Old World honey bees threaten by introgression. *Apidologie*. 52(1), 200-217. ISSN 0044-8435. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00810-0>
- Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Peakall, R. and Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288-295.

- Péntek-Zakar, E.; Oleksa A.; Borowik T.; Kusza S. (2015) Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies. *Ecology and Evolution*. 5(23), 5456-5467. ISSN 2045-7758. <https://doi.org/10.1002/ece3.1781>
- Shaibi, T; Lattorff, H.M.G.; Moritz, R.F.A. (2008) A microsatellite DNA toolkit for studying population structure in *Apis mellifera*. *Molecular Ecology Resources*. 8(5), 1034-1036. ISSN 1755-098X. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02146.x>
- Solignac, M.; Vautrin D., Loiseau A.; Mougél F.; Baudry E.; Estoup A.; Garnery L.; Habert M; Cornuet J-M. (2003) Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Molecular Ecology Notes*. 3(2), 307-311. ISSN 1471-8278. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00436.x>
- Sušnik, S.; Kozmus P.; Poklutar J.; Meglič V. (2004) Molecular characterisation of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia. *Apidologie*. 35(6), 623-636. ISSN 0044-8435. <https://doi.org/10.1051/apido:2004061>
- Tunca R. D. (2009) Determination and comparison of genetic variation in Honeybee (*Apis mellifera* L.) populations of Turkey by random amplified polymorphic DNA and microsatellite analyses. Dissertation. Turkey: Middle east university turkey.

10 Seznam publikací, které předcházely metodice

Publikace popisující variabilitu v široké populaci včely medonosné chované v České republice je v přípravě.

Obsah

1 Cíl.....	3
2 Úvod.....	3
2.1 Včela medonosná.....	3
2.2 Mikrosatelity (MS).....	3
2.3 Mikrosatelity u včely medonosné.....	4
3 Vývoj metodiky.....	6
3.1 Získání dat pro výběr MS.....	6
3.2 Výběr sady 10 mikrosatelitů.....	7
4 Vlastní popis metodiky.....	7
4.1 Sběr a uchování vzorků	7
4.2 Izolace DNA.....	8
4.2.1 Vzorky včel	8
4.2.2 Izolace DNA pomocí chelexu.....	8
4.2.3 Izolace DNA pomocí NucleoSpin® Tissue od firmy Macherey-Nagel	9
4.2.4 Izolace DNA pomocí Genomic DNA mini kit (Tissue) od firmy Geneaid.....	10
4.3 Ověření kvality izolované DNA pomocí agarózové gelové elektroforézy	12
4.3.1 Výsledný elektroforetogram izolované DNA	13
4.4 Multiplex PCR.....	14
4.4.1 Materiál a přístroje	15
4.4.2 Pracovní postup	15
4.4.3 Teplotní profil reakce.....	16
4.4.4 Ověření multiplex PCR pomocí horizontální agarózové gelové elektroforézy	17
4.5 Fragmentační analýza.....	17
4.5.1 Materiál a přístroje	17
4.5.2 Příprava vzorku na fragmentační analýzu	18
4.5.3 Denaturace.....	18
4.5.4 Umístění vzorků	18
4.5.5 Definování plata vzorků	19
4.5.6 Konfigurace parametrů analýzy	21
4.5.7 Spuštění analýzy.....	23
4.6 Vyhodnocení.....	25
4.6.1 Definování Panelu	25
4.6.2 Definování Metody analýzy	27
4.6.2 Analýza vzorků.....	28
4.6.3 Export výsledků.....	35

4.7 Statistické zpracování výsledků	38
4.7.1 Statistický software	38
4.7.2 Vstupní formát dat	38
4.7.3 Programové rozhraní v MS Excel	38
4.7.4 Import dat	39
4.7.5 Použité ukazatele genetické diverzity	39
4.8 Diverzita zjištěná v modelové populaci včel	41
5 Validace metodiky	43
5.1 Popis	43
5.2 Výsledky validace	43
5.3 Závěr	47
6 Novost postupu	47
7 Uplatnění metodiky	47
8 Ekonomické aspekty	47
9 Seznam použité související literatury	49
10 Seznam publikací, které předcházely metodice	50
Obsah	51

Název: Metodika hodnocení diverzity včely medonosné pomocí mikrosatelitových markerů

Autoři: Aleš Knoll, Petra Bartoňová, Lucie Langová, Antonín Přidal, Tomáš Urban

Vydala: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Vydání: první, 2024

ISBN 978-80-7701-015-3 (online ; pdf)

<https://doi.org/10.11118/978-80-7701-015-3>

