



## CERTIFIKOVANÁ METODIKA

---

**Screeningová metoda založená na identifikaci  
změn proteomu vnitřních orgánů prasat pro určení  
potenciálně pozitivních zvířat po podávání  
zakázaných anabolických steroidních hormonů**

**Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.  
Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.**



## Uplatněná certifikovaná metodika

### č. CM 145/2022

Screeningová metoda založená na identifikaci změn proteomu vnitřních orgánů prasat pro určení potenciálně pozitivních zvířat po podávání zakázaných anabolických steroidních hormonů

**Autor:**

**Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.**

**Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.**

Uvedená certifikovaná metodika je výstupem projektu č. **QK1910311** (Metabolomika steroidních hormonů s výrazným anabolickým účinkem jako základ pro nové analytické kontrolní metodiky určené pro prokazování praktik zneužívání zakázaných substancí ve výkrmu hospodářských zvířat.) programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství ČR na období 2017-2025.

**Brno 2022**

**ISBN 978-80-7672-032-9**

Brno, 10. 11. 2022

v y d á v á

## OSVĚDČENÍ

SVS/2022/150157-G

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

Název metodiky: **Screeningová metoda založená na identifikaci změn proteomu vnitřních orgánů prasat pro určení potenciálně pozitivních zvířat po podávání zakázaných anabolických steroidních hormonů**

Autor / autoři: **Mgr. Jan Gebauer, Ph.D., Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.**

Název organizace/cí: **VÚVeL v.v.i., Hudcova 296/70, 621 00 Brno**

Místo vydání: **Brno**

Rok vydání: **2022**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu/podpory na rozvoj výzkumné organizace č. **QK 1910311**

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:



Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

V Praze

dne 21. 11. 2022

**MVDr. Zbyněk Semerád**

**ústřední ředitel**



Státní veterinární správa

Podpis/elektronický podpis zástupce  
odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe:

V ..... dne .....

**Ing. Alžběta Randusová**

Digitální podpis:

30.12.2022 13:16

Podpis/elektronický podpis  
ředitele/ředitelky Odboru precizního  
zemědělství, výzkumu a vzdělávání



## Uplatněná certifikovaná metodika

Screeningová metoda založená na identifikaci změn proteomu vnitřních orgánů prasat pro určení potenciálně pozitivních zvířat po podávání zakázaných anabolických steroidních hormonů

### Obsah:

Předmluva	.... 2
I. Cíl metodiky	.... 3
II. Vlastní popis metodiky	.... 3
1. Část informativní	.... 3
2. Pracovní postup metodiky	.... 5
III. Srovnání „novosti postupů“	.... 15
IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky	.... 15
V. Ekonomické aspekty	.... 15
VI. Seznam použité literatury	.... 17
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice	.... 18
Přílohy	.... 20

### Oponentní posudky zpracovali:

1. Mgr. Martina Rejtharová – Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Brno
2. MVDr. Jiří Drápal, Ph.D. – Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy, Praha

Certifikovanou metodu vypracovali: Mgr. Jan Gebauer, Ph.D: .....

Ing. Kamil Šťastný, Ph.D .....



## Předmluva

Vzhledem k rostoucí velikosti světové populace a stoupající tržní síle obyvatel dochází k výraznému nárůstu poptávky po masu jako jedné ze základních složek ve výživě člověka. Celosvětově se nejvíce produkuje maso vepřové, následuje maso drůbeží, a až na třetím místě je maso hovězí. Celková produkce masa ve světě vzrostla podle údajů Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) z roku 2010 s 289,1 mil. tun na 324,5 mil. tun v roce 2019, tj. o 12,3 % (35,4 mil. tun) (1). Největším producentem masa na světě je dnes Čína, následují USA, Indie, Brazílie a EU (Německo, Francie, Nizozemí a Dánsko). Současně je průměrná spotřeba masa na jednoho obyvatele Země asi 32,5 kg za rok, tato spotřeba je však úměrně závislá na stupni rozvoje jednotlivých zemí (2). V České republice spotřeba masa od roku 1990 postupně klesá a například v roce 2019 činila spotřeba masa v průměru 83,2 kg/rok na jednoho obyvatele. Spotřeba vepřového masa tvoří přibližně 51,7 % (43,0 kg) podíl z této celkové spotřeby masa v ČR podle statistiky Českého statistického úřadu (3). Podle údajů FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) se předpokládá, že v průběhu následujících 40 let bude nutné globální produkci masa zdvojnásobit tak, aby bylo možné udržet krok s nárůstem počtu obyvatelstva na planetě (4). Tento trend zvyšování spotřeby masa se týká z globálního hlediska především asijských států, ale i rozvojových zemí, kde se s rostoucí ekonomikou zvyšuje také kupní síla obyvatelstva. Situace v jednotlivých ekonomicky vyspělých státech Evropské unie (EU) je zásadně odlišná. Produkce a spotřeba masa je již řadu let stabilizovaná a producenti masa se dnes prioritně zaměřují na ekonomickou efektivitu průmyslové výroby masa, a s tím spojené snižování finančních nákladů a jejich konkurenceschopností spíše než na zásadní navýšování objemů produkce masa. Z pohledu spotřebitele se odpovědné kontrolní a regulační orgány na úrovni EU a návazně v jednotlivých členských zemích unie prioritně zaměřují na kvalitu a bezpečnost vyráběných potravin, ale i potravin, včetně masa, dovážených ze zemí mimo jednotný trh EU. Jedním z velmi efektivních a lákavých prostředků zvyšování výroby masa je obecně použití různých stimulatorů růstu (např. hormonů) ve fázi výkrmu potravinových zvířat. Řada významných světových producentů tuto možnost intenzivně využívá, především v zemích mimo EU, kde nejsou tyto látky zakázány. Druhým významným faktorem je, že tyto syntetické stimulatory růstu v posledních letech významně zlevnily a díky tomu se jejich využití v zemědělské produkci masa stalo ekonomicky výhodné. Díky rozšíření výroby především v Číně, Indii a Jihoafrické republice se staly i více dostupné. Této situace využívají výrobci v řadě zemí na celém světě, kde tyto prostředky nejsou zakázány, ani nijak regulovány, jedná se především o USA, Kanadu, Austrálii, Japonsko, Čínu, Brazílii a Argentinu. Tyto syntetické stimulatory růstu jsou v zemích EU ve výkrmu hospodářských zvířat již více než 25 let zakázány. Tomuto zákazu podléhají i dovozy masa „ze třetích“ zemí mimo EU, kde byly při výkrmu tyto zakázané přípravky použity. Národní referenční laboratoře, které v jednotlivých zemích unie provádějí monitoring a konfirmační stanovení reziduí farmakologicky účinných látek a kontaminantů tzv. „cizorodých látek“, dnes převážně pracují s analytickými přístupy a metodami založenými na plynové chromatografii (GC) nebo kapalinové chromatografii (LC) a tyto vysoce účinné separační metody jsou spojeny s hmotnostními detektory s jedním nebo převážně dvěma (tandem) hmotnostními analyzátoři (MS/MS), které jsou již řadu let stále považovány za nejmodernější a nejcitlivější analytické nástroje pro kontrolu a detekci zakázaných látek.



Hlavním přístupem v prokazování užití zakázaných anabolických steroidních hormonů je jejich přímá detekce nebo detekce jejich metabolitů výše zmíněnými technikami. V posledních letech se však zvýšila sofistikovanost zneužití těchto látek ve smyslu zamezení odhalení dohledovými orgány. Nově vzniklé deriváty známých hormonů mající podobný anabolický účinek, avšak díky změnách ve struktuře molekuly nejsou detekovány zavedenými postupy. Jiným využívaným principem je použití několika molekul současně – hormonálních koktejlů majících po podání synergický efekt, avšak koncentrace jednotlivých látek je pod limitem detekce přístrojů a technik pro jejich zachycení. Tyto praktiky je tak nutné sledovat z jiné perspektivy než jen přímým průkazem zakázaných doplňků. Přítomnost těchto látek v organismu se primárně projevuje ve zvýšené nebo naopak snížené expresi proteinů účastnících se jejich metabolismu. Sekundárně pak i dalších bílkovin, které jsou následně těmito metabolickými drahami také ovlivněny. Cílem tohoto přístupu je tedy odhalit změny v expresi tzv. markerových proteinů indikujících zvýšené množství externě podaných anabolik.

Tento přístup tak může sloužit jako screeningová či komplementární technika k dnes používaným metabolickým přístupům, mající za cíl vytipovat potenciálně pozitivní vzorky, které budou následně podrobeny analýze konformačními technikami.

## I. Cíl metodiky

Cílem uplatněné metodiky je identifikace a relativní kvantifikace sady proteinů, jejichž zvýšená nebo naopak snížená exprese indikuje přítomnost nadlimitní koncentrace anabolických steroidních hormonů, konkrétně nandrolonu a stanazololu. Vyšetřovanými vzorky jsou tkáně a vnitřní orgány prasete, konkrétně srdce, ledvina, játra a svalovina. Vyvinutá analytická metodika je založena na identifikaci proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie spojené s kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS) a je orientována na prasata chované pro produkci masa a masných výrobků a slouží především pro potřeby kontrolních orgánů státní správy pro ověřování zneužití steroidních hormonů ve výkrmu.

Tato analytická metodika, která byla vyvinutá v rámci projektu č. QK1910311, je primárně určena pro prvotní screening při bourání a zpracování masných produktů a jejím úkolem je vytipování potenciálně pozitivních vzorků, které jsou následně podrobeny analýze konfirmačními technikami.

## II. Vlastní popis metodiky

### 1. Část informativní

#### 1.1 Název metody

Screeningová metoda založená na identifikaci změn proteomu vnitřních orgánů prasat pro určení potenciálně pozitivních zvířat po podávání zakázaných anabolických steroidních hormonů



## 1.2 Princip metody

Princip použité metody je založen na analytické separaci enzymaticky naštěpených proteinů na peptidy na chromatografické koloně pomocí kapalné mobilní fáze (kapalinová chromatografie, LC) a následné identifikaci a kvantifikaci jednotlivých peptidů pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS). Tato fyzikálně-chemická metoda slouží pro určování přesných hmot molekul a jejich fragmentů, jež je třeba k tomu účelu převést na kladné ionty a následně tyto ionty rozlišit podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a záznamu relativních intenzit těchto iontů. MS je mimořádně citlivá, destruktivní analytická metoda, která je při minimální spotřebě vzorku schopna za použití následných bioinformatických nástrojů určit aminokyselinovou sekvenci měřeného peptidu a poté je za pomoci proteinových databází přiřadit ke konkrétnímu proteinu daného organismu. Výstupem je pak seznam přítomných proteinů ve vzorku včetně informace o jejich kvantitě.

## 1.3 Analyty

Pro každý orgán (srdce, játra, ledvina, svalovina) je sestavena sada sledovaných proteinů, která se porovnává s interní databází testovaných pozitivních a negativních vzorků. Shlukovou analýzou dat se vyhodnotí měřený vzorek. Ve druhém kroku se poté provede relativní kvantifikace 5 specifických proteinů pro každý orgán a určí se potenciálně pozitivní vzorky, které jsou indikovány ke konfirmačnímu měření jinými metodami. Jednotlivé sady proteinů pro shlukovou analýzu jsou součástí přílohy dokumentu, specifické proteiny pro druhý krok analýzy jsou uvedeny v tabulce:

**Tabulka 1:** Specifické proteiny pro každý orgán sledované ve druhém kroku analýzy

	Accession number	Protein
<b>Srdce</b>	A0A4X1TZM9	Myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle
	A0A287AB58	ISG15 ubiquitin like modifier
	A0A480Y8T9	Alpha-1-antichymotrypsin (Fragment)
	A0A4X1VPB7	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
	A0A4X1SK88	Fibrillin-1
<b>Játra</b>	I3LC60	UDP-glucuronosyltransferase
	Q75NG8	Troponin T, fast skeletal muscle
	A0A286ZMX6	Metallothionein
	A0A287AB58	ISG15 ubiquitin like modifier
	A0A481BA72	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1
<b>Ledvina</b>	A0A4X1UTR8	Uncharacterized protein (Myosin light chain 1)
	Q5XLD3	Creatine kinase M-type
	A0A480JX12	Integrin beta
	A0A287AB58	ISG15 ubiquitin like modifier
	A0A480QI63	Uromodulin
<b>Svalovina</b>	A0A4X1T203	Glycogenin-1
	F1SHX0	Nebulin
	A0A480W6C8	Collagen alpha-2(VI) chain isoform 2C2
	A0A480M2V3	Collagen alpha-3(VI) chain isoform 4
	Q9TV61	Myosin-1



#### 1.4 Rozsah a použitelnost metodiky

Metodika je použitelná pro identifikaci proteinů ze vzorků tkání a vnitřních orgánů prasete – srdce, ledvina, játra a svalovina v minimálním množství 50 mg tkáně. Metodika je schopna spolehlivě zachytit množství 2 mg/1kg živé hmotnosti nandrolonu nebo 1 mg/1kg živé hmotnosti stanozolu aplikované intramuskulárně (jednorázově i opakovaně) nebo ve formě podkožního implantátu. Má však potenciál zachytit i nižší koncentrace anabolik ze stejné metabolické skupiny nebo jejich koktejly.

#### 1.5 Analyticko-statistická charakteristika metody

Správná identifikace proteinů ve vzorku je založena na měření přesných hmot (mass accuracy) odpovídajících kladných iontů v toleranci 10 ppm pro prekurzorové ionty a 0,02 Da pro fragmentové ionty. Dále jsou za správně identifikované proteiny považované pouze proteiny s False Discovery Rate (FDR) 0,01 s alespoň dvěma unikátními peptidy. Kvantifikace proteinu je založena na tzv. label-free kvantifikaci a je provedena výpočtem plochy píků (AUC – Area Under Curve) tří nejabundantnějších peptidů daného proteinu. Do této kvantifikace se nezahrnují modifikované peptidy, používané pouze pro identifikaci (viz kapitola 2.5.3).

#### 1.6 Interference metody

Interference metody ve smyslu chybného přiřazení identifikovaného peptidu ke konkrétnímu proteinu je řešena algoritmem vyhodnocujícího softwaru. Pro zabránění chybné kvantifikace se do této kvantifikace nezahrnují peptidy sdílené více proteiny.

#### 1.7 Interní kontrola metody

Pro identifikaci proteinů ve vzorku není použito interních standardů. Metoda využívá technického standardu správnosti a přesnosti měřených hmot pomocí iontu dodecamethylcyclohexasiloxanu o hmotnosti 445,12003 Da, jako přirozeného pozadí generovaného křemennými kapilárami. Pomocí tohoto standardu přístroj kalibruje přesné hmoty iontů při každém měření.

#### 1.8 Externí kontrola metody

Plánovaná účast v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách.

## 2. Pracovní postup metodiky

### 2.1 Chemikálie, standardy

Kalibrační roztoky pro mass accuracy – Pierce ESI Positive Ion Calibration Solution a enzym Trypsin (MS grade) byl dodán firmou Thermo-Fisher Scientific CZ. TriReagent a bromanizol byl zakoupen od firmy MRC, USA. Chemikálie metanol (LC grade), kyselina mravenčí, aceton, ethanol, dithiothreitol (DTT), iodacetamid (IAA) a triethylammonium bicarbonate (TEAB) (vše MS grade) byly nakoupeny u dodavatele Sigma-Aldrich CZ. SDS a Triton X-100 byly pořízeny od firmy Serva Německo. Acetonitril (LC-MS grade), ultra čistá voda (MS grade) a močovina (LC-MS grade) byla pořízena od firmy VWR CZ. Kapalný dusík v kvalitě 5.0 byl dodán firmou Messer CZ.





## 2.2 Analytické zařízení

Všechny výsledky byly naměřeny na analytickém zařízení UHPLC-MS. Instrumentální analytické zařízení bylo složeno ze dvou hlavních částí, z části chromatografické separace vybavené kapalinovým chromatografem pracujícím s velmi vysokými tlaky Ultimate 3000 - RSLC Nano a části hmotnostní spektrometrie vybavené hybridním tandemovým hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením na bázi orbitrapu označeném QExactive s Easy-Spray ionizačním zdrojem. Analytické instrumentální zařízení LC-MS/MS bylo vyrobené a dodané firmou Thermo Fisher Scientific, USA, jako řídicí software byl použit Excalibur ve verzi 3.10 a jako vyhodnocovací software pro identifikaci a kvantifikaci proteinů byl použit expertní software Proteome Discoverer v 2.4 (oba Thermo Fischer Scientific). Měření bylo provedeno v analytické laboratoři vybavené přesnou klimatizací udržující teplotu v rozmezí 21 ± 0,5 °C.

## 2.3 Vzorkování

Vzorky tkání a orgánů (cca 100 mg) jsou odebrány po porážce zvířat a ihned zamrazeny pomocí tekutého dusíku, poté uloženy a uchovány při -20°C.

## 2.4 Pracovní postup přípravy vzorků

1. Vzorek tkáně se vloží do zkumavky s 1 ml TriReagentu a homogenizuje se např. pomocí kuličkového homogenizátoru
2. K homogenizátu se přidá 100 µl bromanizolu, nechá se 5 min inkubovat při laboratorní teplotě (LT) a poté se centrifuguje při 12000 x g, při 4°C, 10 min
3. Odebere se spodní vodná fáze s proteiny, přidá se 5 objemů vychlazeného acetonu a nechá se inkubovat 30 min při -20°C
4. Vzorek se centrifuguje při 12000 x g, při 4°C, 10 min a vysrážená peleta proteinů se 2x promyje roztokem GnHCl/EtOH/glycerol (2,5 %/95 %/2,5 % v/v)
5. Peleta proteinů se poté resuspenduje v 300 µl roztoku 8 M močovina/0,1 % SDS/0,2 % Triton X-100/25 mM TEAB a za stálého třepání se inkubuje 1 hod při LT
6. Vzorek se centrifuguje při 20000 x g, při 20°C, 10 min, supernatant se odebere a změří se koncentrace proteinů např. pomocí kitu Pierce BCA Protein Assay Kit (po 5 násobném ředění vzorku)
7. 50 µg proteinu se vloží do centrifugačních zkumavek s 10000 MWCO filtrem (např. Vivacon 500, Sartorius) a vzorek se přidavky 200 µl 8 M močoviny 8x promyje s centrifugací 14000 x g, při 20°C, 30 min mezi jednotlivými cykly
8. Ke stočenému vzorku na kolonce se přidá 100 µl 10 mM DTT v 25 mM TEAB, poté se stočí 15 min při 14000 x g, při 20°C
9. Ke stočenému vzorku se přidá 100 µl 50 mM IAA v 25 mM TEAB, poté se stočí 15 min při 14000 x g, při 20°C
10. Vzorek se 1x promyje v roztoku 6 M močoviny/25 mM TEAB, poté 2 x ve 25 mM TEAB
11. Ke stočenému vzorku se přidá 1 µg Trypsinu v 25 mM TEAB (100 µl), za stálého třepání se nechá inkubovat při 40°C 1-2 hodiny, poté se teplota sníží na 25°C a inkubuje se přes noc
12. Vzorek se ve stejné zkumavce centrifuguje při 14000 x g, při 20°C 30 min a eluát z kolonky obsahující naštěpené peptidy se odebere



13. Eluát se nechá odpařit po dobu několika hodin na vakuové odparce do úplného odpaření
14. Vysušená peleta peptidů se resuspenduje ve 40  $\mu$ l mobilní fáze pro kapalinovou chromatografii (0,1 % mravenčí kyselina) a vloží do vialek kompatibilních se samplerem přístroje

## 2.5 Analytická metoda měření

### 2.5.1 Chromatografická separace pro kvantifikaci

Vzorky připravené pro proteomickou analýzu byly přímo nastříknuty do chromatografického systému s hmotnostním spektrometrem. Chromatografická separace probíhala na 25 cm analytické koloně Acclaim PepMap RSLC C18 s velikostí částic 2  $\mu$ m (Thermo Fisher Scientific) a 2 cm předkolonou Pepmap100 C18. Analytická kolona byla temperovaná na 45°C a průtok kolonou byl konstantně nastaven na 300 nl/min. Nastřikovaný objem vzorku je 1  $\mu$ l. Mobilní fáze byla složena z 0,1 % roztoku kyseliny mravenčí ve vodě (mobilní fáze A) a 0,1 % roztoku kyseliny mravenčí v acetonitrilu (mobilní fáze B). Použitý gradient mobilní fáze je uveden v tabulce 2, doba analýza vzorku je 120 minut.

**Tabulka. 2** - Gradient mobilní fáze:

Číslo	Čas (min)	Průtok (nl/min)	A (%)	B (%)
1	0	300	96	4
2	4.0	300	96	4
3	98.0	300	55	45
4	98.5	300	10	90
5	112.0	300	10	90
6	112.5	300	96	4
7	120.0	300	96	4

### 2.5.2 Hmotnostní spektrometrie pro identifikaci a kvantifikaci

Tandemový hybridní hmotnostní spektrometr typu orbitrap QExactive měří v pozitivním módu s vyhřívaným ionizačním zdrojem typu elektrosprej (ESI+). Pro tzv. shotgun analýzu detektor pracuje v nastaveném módu Full MS – ddMS2, rozlišovací schopnost (Resolving power, RP) = 70.000 pro MS1 a 17.500 pro MS2. Nastavení hmotnostního spektrometru je následující: Sheath gas flow rate 14 (unit), Aux gas flow rate 1 (unit), Spray voltage 2.2 (kV), Capillary temp. 250 (°C), Heater temp. 200 (°C), S-lens RF level 50, AGC target  $3 \cdot 10^6$  a Maximal inject time 100 (ms). Skenovací měření (MS1) probíhá v rozsahu 390-1700 m/z k identifikaci protonovaných iontů s nábojem alespoň 2, které jsou automaticky vybrány pro data-dependentní analýzu (MS/MS neboli MS2) a fragmentovány pomocí HCD disociace. 10 fragmentových spekter (MS2) bylo zaznamenáno mezi každým skenovacím měřením (MS1). Analyzované fragmentové ionty byly automaticky zaznamenány do seznamu (tzv. exclusion list) a po následujících 30 vteřin nebyly vybrány pro MS2.



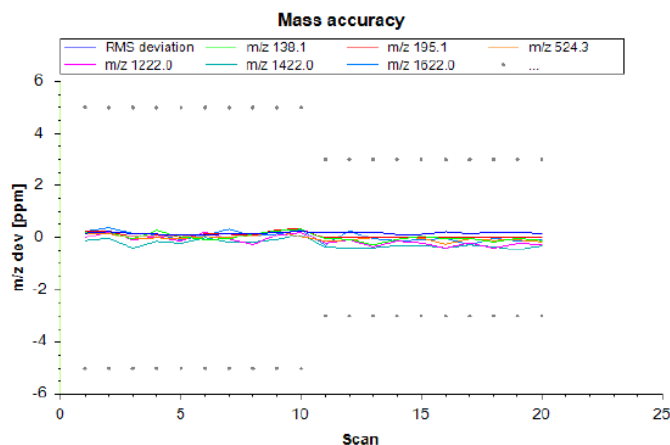
Celý LC-MS systém je řízen a naměřená data jsou ukládána a procesována pomocí softwaru Excalibur 3.10, data pro identifikaci jsou vyhodnocována pomocí expertního softwaru Proteome Discoverer v2.4.

### 2.5.3 Bioinformatická analýza

Pro analýzu naměřených dat v softwaru Proteome Discoverer byl použit Sequest HT prohledávací algoritmus. Jako štěpící enzym byl zadán trypsin s potenciálními 2 přeskočenými místy. Jako statická modifikace byla zadána karbamidomethylace cysteinu, jako dynamické modifikace byly nastaveny oxidace methioninu, deamidace asparaginu a glutaminu, acetylace N-koncové aminokyseliny, ztráta N-koncového methioninu a ztráta N-koncového methioninu současně s acylací první aminokyseliny. Hmotnostní tolerance byly nastaveny na 10 ppm pro prekurzorové a 0,02 Da pro fragmentové ionty. Jako srovnávaná proteinová databáze byla vložena Uniprot neanotovaná databáze druhu *Sus scrofa*, z důvodů zabránění nesprávně identifikovaných kontaminujících proteinů byla do analýzy přidána i databáze nejčastějších MS proteinových kontaminant (PD\_contaminants\_2015).

### 2.6 Kalibrace hmotnostního spektrometru na přesnou hmotu (mass accuracy)

Kalibrace MS spektrometru na přesnou hmotu byla prováděna vždy před zahájením měření externě na základě kalibračních roztoků Positive Ion Calibration Solution (dodavatel Thermo Scientific). Výsledek externí kalibrace je uveden na následujícím obrázku (Obr. 1). Povolená chyba měření (správnost) je  $\leq 3$  ppm pro použitý hmotnostní spektrometr QExactive.



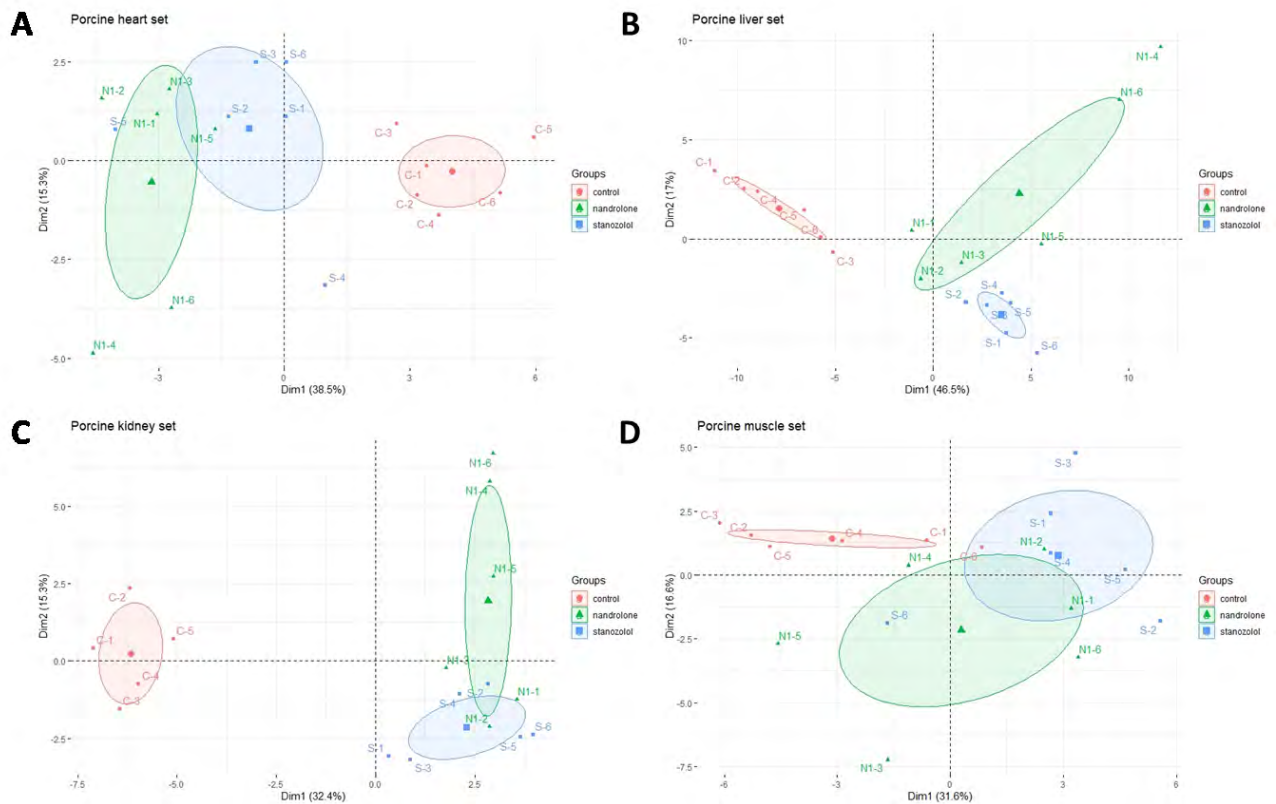
Obrázek 1 Pozitivní externí kalibrace (Procedure result: rms = 0,20/0,19 ppm)

### 2.7 Vyhodnocení výsledků měření

Po naměření MS spekter separovaných peptidů v analyzovaném vzorku se výsledný .raw soubor analyzuje společně s .raw soubory interních standardních pozitivních a negativních vzorků. Následná bioinformatická analýza vedoucí k identifikaci a kvantifikaci jednotlivých proteinů se provádí společně. V prvním kroku se vybere sada proteinů specifických pro každý orgán (srdce 29 proteinů, játra 94, ledvina 55 a svalovina 43 proteinů) a provede se shluková analýza (PCA –

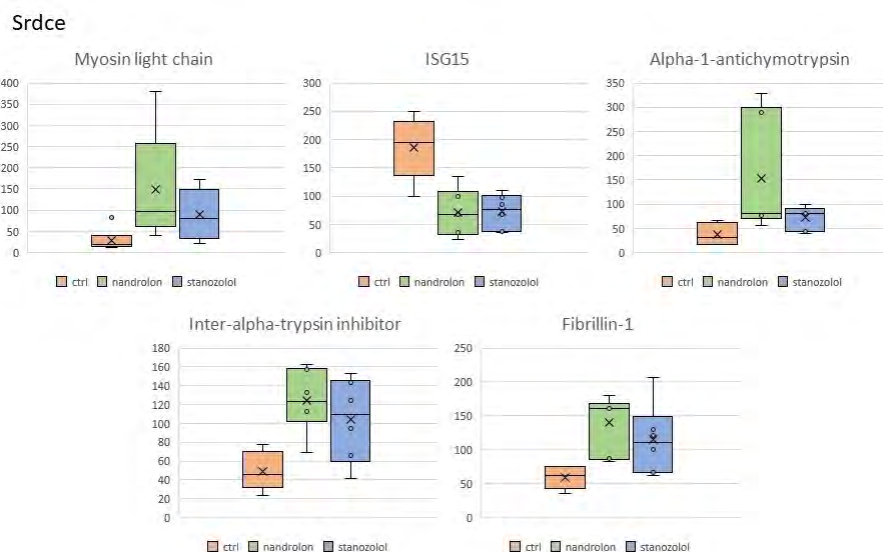


analýza hlavních komponent). PCA analýzy sady interních pozitivních a negativních vzorků jsou zobrazeny na Obr. 2



**Obrázek 2** PCA shluková analýza interních standardních negativních (control - oranžová) a pozitivních (nandrolon - zelená a stanozolol - modrá) vzorků

Ve druhém kroku se provede analýza kvantity specifických 5 proteinů pro každý orgán (podle tabulky 1). Následující grafy zobrazují normalizovanou škálovanou (medián kvantity všech identifikovaných proteinů je roven hodnotě 100) kvantitu interních standardních negativních a

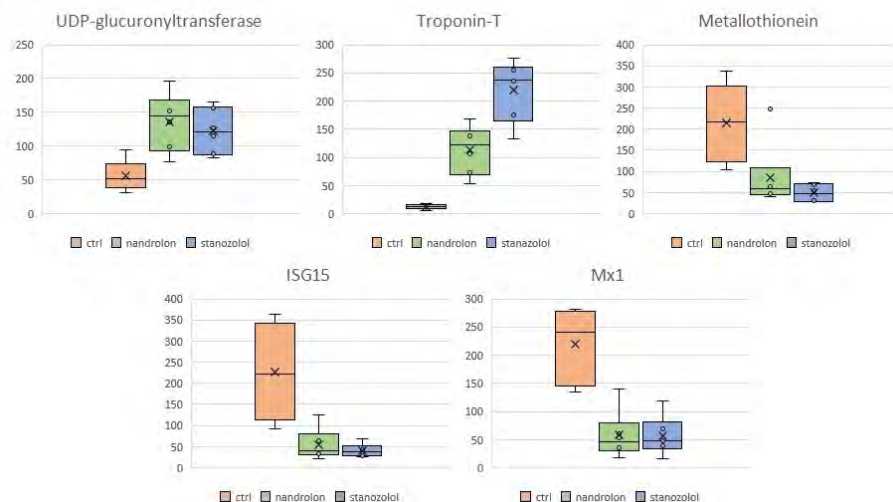


**Obrázek 3** Krabicové grafy znázorňující normalizovanou, škálovanou kvantitu specifických proteinů interních standardních negativních (ctrl – modrá) a pozitivních (nandrolon – zelená, stanozolol – modrá) vzorků srdce



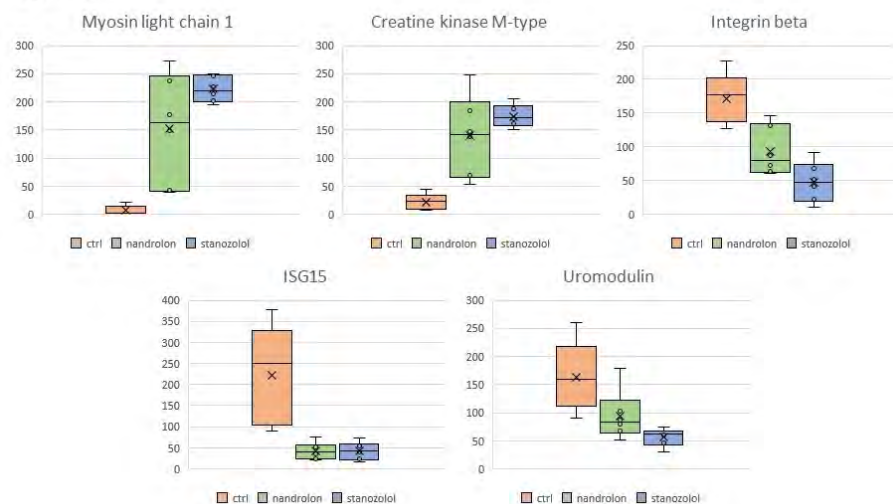
pozitivních vzorků.

## Játra



**Obrázek 4** Krabicové grafy znázorňující normalizovanou, škálovanou kvantitu specifických proteinů interních standardních negativních (ctrl – modrá) a pozitivních (nandrolon – zelená, stanazolol – modrá) vzorků jater

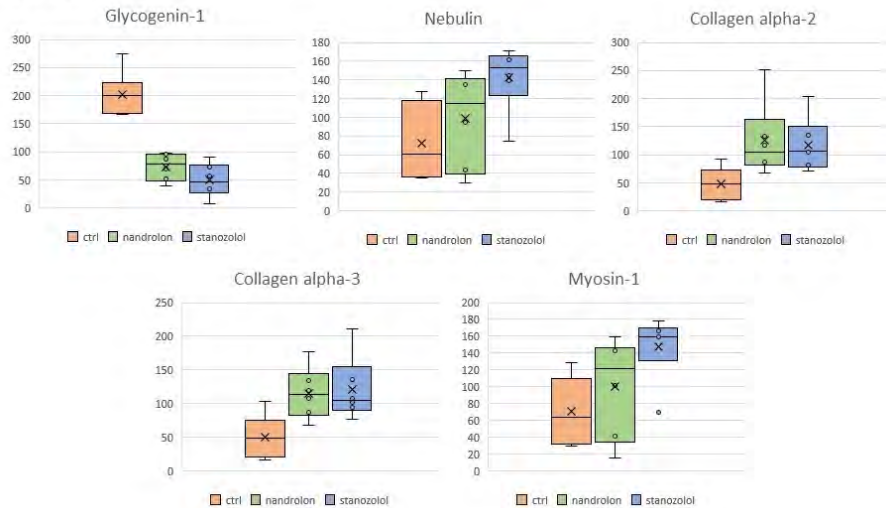
## Ledvina



**Obrázek 5** Krabicové grafy znázorňující normalizovanou, škálovanou kvantitu specifických proteinů interních standardních negativních (ctrl – modrá) a pozitivních (nandrolon – zelená, stanazolol – modrá) vzorků ledviny



## Svalovina



**Obrázek 6** Krabicové grafy znázorňující normalizovanou, škálovanou kvantitu specifických proteinů interních standardních negativních (ctrl – modrá) a pozitivních (nandrolon – zelená, stanazolol – modrá) vzorků svaloviny

## 2.8 Normalizace dat

Hodnoty kvantity jednotlivých proteinů se normalizují podle mediánové hodnoty log<sub>10</sub> kvantit všech proteinů každého vzorku v analýze. Tato normalizace se automaticky provádí ve vyhodnocovacím softwaru Proteome Discoverer.

## 2.9 Management kvality výsledků měření

Mezi každým měřeným vzorkem jsou zařazeny kontrolní vzorky čisté mobilní fáze A, aby se zamezilo přenosu peptidů do dalšího vzorku (tzv. carryover), což by mohlo ovlivnit kvantitativní stanovení proteinů dalšího vzorku.

## 2.10 Kvantifikace

Kvantifikace proteinu je založena na tzv. label-free kvantifikaci a je provedena výpočtem plochy píků (AUC – Area Under Curve) tří nejabundantnějších peptidů daného proteinu. Do této kvantifikace se nezahrnují modifikované peptidy, používané pouze pro identifikaci. Výsledná hodnota abundance proteinu je přeškálována podle mediánu abundance všech proteinů (hodnota 100).



### 2.11 Uvádění výsledků měření

Určení potenciální positivity vzorku ve smyslu použití zakázaných anabolických steroidních hormonů je založeno na dvou-krokové analýze kvantity proteinů. V prvním kroku je to shluková PCA analýza sady vybraných proteinů pro každý sledovaný orgán a určení podobnosti měřeného vzorku s negativní nebo pozitivní skupinou interních standardních vzorků. Ve druhém kroku je to pak relativní kvantifikace 5 vybraných specifických proteinů pro každý orgán vůči sadě negativních interních standardních vzorků. Pro určení potenciální positivity vzorku je dostačující pozitivita v prvním nebo druhém kroku, a to pro každý jednotlivý orgán zvlášť. V druhém kroku je pak dostačující korelace s pozitivními interními standardními vzorky ve dvou z pěti sledovaných proteinů.

## 3. Validace metodiky

### 3.1. Popis provedení validace

Necílená analytická metoda založená na principech proteomického profilování byla validována v rozsahu zamýšleného použití jako screeningová kvalitativní metoda. Validace metodiky byla provedena v rozsahu parametrů definovaných v Prováděcím nařízení komise (EU) 2021/808 (CIR (EU)2021/808). Byly validovány následující parametry: detekční schopnost pro screening (CC $\beta$ ), selektivita/specifita, stabilita a robustnost.

Detekční schopnost (CC $\beta$ ) kvalitativní screeningové metody byla stanovena „nepřímým“ odhadem z experimentálního dávkování, které již navozuje anabolický biologický efekt zakázaných látek nandrolonu a stanozololu u prasat v hospodářském výkrmu.

Všechny použité vzorky „pozitivních“ a kontrolních „negativních“ tkání použitých pro účely této validace metody pocházely z vlastních experimentů provedených na prasatech v experimentálních stájích VÚVeL Brno v rámci výzkumného projektu QK1910311 (NAZV) v období roků 2020 až 2021.

#### **Použité i.m. dávkování nandrolonu (19-nortestosteronu) a stanozololu bylo následující:**

- Pro nandrolon byly ověřovány dvě hladiny dávkování: 2 mg a 5 mg nandrolonu na 1kg živé hmotnosti prasete,
- Pro stanozolol bylo dávkování: 1mg a 3 mg na 1kg živé hmotnosti.

### 3.2. Validační parametry

#### **a) Detekční schopnost pro screeningovou metodu CC $\beta$ (Detection capability)**

Detekční schopnost metody pro tkáň svalů, jater, ledvin a srdce je pro i.m. dávkování:



CC $\beta$  = 1 mg stanozololu /1kg živé váhy prasete

CC $\beta$  = 2 mg nandrolonu /1kg živé váhy prasete

Experimentálně byly prasatům v jednotlivých skupinách aplikovány následující dávky: 2 mg a 5 mg nandrolonu na 1kg živé hmotnosti a 1mg a 3 mg stanozololu na 1kg živé hmotnosti. Výsledky proteomické analýzy tkání (svalovina, játra, ledvina a srdce) byly porovnány s výsledky proteomických analýz kontrolní skupiny prasat (bez aplikace anabolik). Pro porovnání výsledků byly použity statistické multivariantní metody PCA a PLS. Pro všechny použité dávky vždy PCA a PLS 100% diferencovala výsledky skupin všech tkání stanozololu a nandrolonu od skupiny kontrolních tkání. Na základě těchto výsledků byly stanoveny detekční schopnosti (CC $\beta$ ) proteomické metody vztahované k užití dávce nandrolonu a stanozololu.

Schopnost a účinnost použitých matematicko-statistických modelů PCA a PLS diferencovat výsledky měření do jednotlivých skupin byla ověřena „cross-validací“. Na začátku byla první část dat (20%) z původních dat „zaslepena“ a označena jako validační. Druhá část naměřených dat (80%) byla označena jako data trénovací a s těmito daty byly vypočteny parametry modelu PCA a PLS. Následně byly do vypočteného modelu opět dosazeny data validační (20%) a došlo k 100% správné diferenciaci těchto 20% výsledků na základě získaných parametrů z trénovacích dat.

## b) Selektivita/specifita

Použitá analytická metoda měření LC-MS/MS(HR) s vysokým rozlišením v módu full-scan je vysoce selektivní a nevznikají žádné interference mezi identifikovanými proteiny a použitými maticemi prasečích tkání sval, játra, ledvina a srdce.

Správná identifikace proteinů v měřených vzorcích je založena na měření přesných hmot (mass accuracy - MA) odpovídajících kladných iontů v toleranci 10 ppm pro prekurzorové ionty a 0,02 Da pro fragmentové ionty. A za správně identifikované proteiny jsou považovány pouze proteiny s parametrem False Discovery Rate (FDR) 0,01 s alespoň dvěma identifikovanými unikátními peptidy.

Interference metody ve smyslu chybného přiřazení identifikovaného peptidu ke konkrétnímu proteinu je řešena algoritmem vyhodnocujícího softwaru Proteome Discoverer (verze 2.4). Pro zabránění chybné „semi“- kvantifikace se do této kvantifikace nezahrnují peptidy sdílené více proteiny.

## c) Stabilita

Stabilita pro roztoky k přípravě vzorků: - je dána uvedenou dobou použitelnosti (expirace) výrobcem při předepsaných podmínkách skladování.

Stabilita připravené vzorky k analýze: - maximálně 3 dny při -20°C.

Stabilita složek matrice – proteinů ve vzorku, během uchovávání vzorků tkání před proteomickou analýzou: - minimálně 3 měsíce při -20°C,

- Minimálně 6 měsíců při -80°C.





#### d) Robustnost

Funkčnost proteomické metody byla testována na různých úrovních i.m. dávkování při zachování stejných experimentálních podmínek, které zahrnují zejména: stejné plemeno prasete, stejné podmínky chovu a stejné podmínky výkrmu a krmiva.

Vyšší aplikační dávky nandrolonu a stanazolou na výsledky screeningové metody neměly žádný statisticky významný vliv na diferenciální analýzu PCA a PLS.

#### 3.3. Závěr validace

Validace metody „Screeningová metoda založená na identifikaci změn proteomu vnitřních orgánů prasat pro určení potenciálně pozitivních zvířat po podávání zakázaných anabolických steroidních hormonů“ potvrdila, že všechny dosažené validační parametry vyhovují aplikačním dávkám nálezům v reálných vzorcích experimentů provedených na prasatech.

Tato proteomická metodika může být použita pro screeningové testování vzorků vnitřních tkání prasat po aplikaci nandrolonu nebo stanazolou při prokazování zneužívání ve výkrmu prasat nebo dovozu těchto vepřového masa ze třetích zemí.



### III. Srovnání „novosti postupů“

Byla vyvinutá nová sada metod pro identifikaci a relativní kvantifikaci proteinů orgánů prasat, jejichž exprese vykazuje změny u zvířat po aplikaci zakázaných steroidních hormonů stanozololu a nandrolonu. Tyto metody jsou založeny na širokospektré analýze celého proteomu orgánu nebo tkáně pomocí techniky tandemové hmotnostní spektrometrie se separací kapalinovou chromatografií. Toto řešení umožňuje vytipovat potenciálně pozitivní vzorky zvířat a je tak řazeno do kategorie screeningových metod. Samotný proteomický přístup pro detekci zneužití anabolických steroidů při výkrmu prasat (s možností rozšíření na další hospodářská zvířata) je naprosto nové a podle znalostí autorů nebylo dosud zavedeno v praxi a ani publikováno ve vědecké literatuře.

### IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky

Certifikovaná metodika je určena pro orgány statní správy, zejména SVS ČR, ale i pro soukromé uživatele z řad zemědělců, chovatelů prasat a zpracovatelů vepřového masa na jatkách. Metodika však vyžaduje vysoce sofistikovanou instrumentaci včetně zkušené obsluhy jak na přípravu vzorků, tak poté i na vyhodnocení výsledků. Je dále primárně určena jako screeningová metoda a její unikátnost se projeví hlavně v situacích, kdy je podezření na možné zneužití zakázaných látek, ale jejich přímá detekce je znemožněna použitím modifikovaných steroidů či hormonálních koktejlů. Metodika ale může být v případě zájmu využívána i rutinně, například soukromými subjekty pro prokazování jakosti výrobků a zvýšení např. prestiže, deklarace dodržování jakosti výrobků, konkurenční výhody atd.

### V. Ekonomické aspekty

#### 1. Náklady na zavedení metodiky do laboratoře

Náklady na zavedení metodiky do laboratoře je možné rozdělit do dvou kategorií. V první kategorii jsou náklady nezbytné na pořízení spotřebního materiálu a chemikálií na provedení přípravy vzorků a měření na LC-MS/MS. Další náklady souvisí s nákupem drobného hmotného majetku, který je nutný pro provádění metody (pipety, centrifuga, vortexy, odparky apod.). Náklady na analytické zařízení LC-MS/MS nejsou uváděny, neboť se předpokládá, že laboratoř využívající metodiku LC-MS je již tímto zařízením vybavena.

Náklady na vyšetření jednoho vzorku a vybavení specializované laboratoře jsou uvedeny v následujících tabulkách. Všechny ceny jsou aktuální k datu vydání metodiky a zahrnují DPH.



Náklady na pořízení drobného hmotného majetku nezbytného k provádění uvedené metodiky.

Položka	Obvyklá cena
Pipety 3 ks	15 000 Kč
Centrifuga	200 000 Kč
Vakuová odparka	200 000 Kč
Vortex	10 000 Kč
Kuličkový homogenizátor	150 000 Kč
<b>Celkem</b>	<b>560 000 Kč</b>

Náklady na materiál na vyšetření jednoho vzorku podle uvedené metodiky. Kalkulace nezahrnuje náklady na mzdy odborných pracovníků (středoškolský a vysokoškolský pracovník) a náklady na amortizaci použitého analytického zařízení. Tyto náklady mohou být rozhodující pro celkové stanovení ceny za provedení analýzy jednoho vzorku.

Položka	Obvyklá cena
Extrakce vzorku	350 Kč
Příprava vzorku pro MS	450 Kč
Spotřební materiál (špičky, zkumavky, rukavice a desinfekce)	120Kč
<b>Celkem</b>	<b>920 Kč</b>

## 2. Ekonomický přínos pro uživatele

Ekonomické přínosy pro uživatele lze rovněž rozdělit do dvou kategorií: přínosy pro uživatele vyvinuté metodiky z pohledu laboratoře, která bude tuto metodiku provádět, a pak přínosy z pohledu uživatele, tedy vlastního zákazníka v roli objednavatele (např. ÚKZÚZ, SVS ČR, soukromí chovatelé prasat, zpracovatelé potravin atd.).

Ekonomické přínosy pro laboratoř:

- při běžné ceně 4.000,- až 5.500,- Kč za jednu analýzu biologických vzorků pomocí systémů LC-MS/MS (vysoké náklady na analytické zařízení, odpisy a mzdy vysoce kvalifikovaných pracovníků) se přínosy dají vyčíslit jednoduchým vynásobením počtem vzorků zpracovaných v laboratoři za určité časové období, například za 100 analyzovaných vzorků za rok by to byl přínos 400 tis. Kč,
- obecně ale platí, že ceny se tvoří dohodou a v tomto případě platí, že cena za jednu analýzu se významně sníží, pokud bude objednávka smluvená na více vzorků, například cena pro významného zákazníka může být stanovena na 2.500,- Kč při zakázce 100 vzorků ročně, pak ekonomický přínos bude 250 tisíc za rok.



#### Budoucí ekonomické přínosy pro objednavatele:

- V tomto případě se nedají ekonomické přínosy přesněji vyčíslit, protože proteomická metodika byla vyvinutá prioritně jako screeningová, kdy bude vždy následně požadováno exaktní potvrzení a rozhodnutí konfirmační metodou.
- Bude-li tato metodika použita pro screening při monitoringu jako doplňující metoda, dají se ekonomické přínosy opět složitě odhadnout, ale v případě negativních výsledků budou ekonomické přínosy v plusových hodnotách jak pro farmáře, tak i pro zpracovatele a v konečném důsledku i pro konečné spotřebitele.
- Lze dovodit řadu nepříznivých situací, které by mohly nastat a mohou mít řadu významných ekonomických dopadů. Například, konfiskace zpracovávaného vepřového masa na jatkách z dovozu ze třetích zemí, a z toho plynoucí následné kroky pro případné udělení peněžní pokuty a z toho plynoucí možné soudní spory by mohly dosáhnout řádově až na milion Kč. Předkládaná proteomická metodika by takovým situacím měla předcházet a bránit.

#### VI. Seznam použité literatury

1. OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029. Available online:  
[https://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?datasetcode=HIGH\\_AGLINK\\_2020&lang=en#](https://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?datasetcode=HIGH_AGLINK_2020&lang=en#)
2. KAMENÍK, J. Prognóza vývoje světové produkce vepřového masa. *Maso* 2018;27(8):2018.
3. Český statistický úřad. Spotřeba potravin – 2020, Graf 2: Spotřeba masa v hodnotě na kosti, dostupné na: <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2020>.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Food and Nutrition in Numbers. 2014, Rome.
5. CRL Guidance Paper (7 December 2007) - CRLs' View on State of the Art Analytical Methods for National Residue Control Plans.
6. 2002/657/EC Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C (2002) 3044). *Offic J Europ Communit* 2002;221(8):17
7. Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products, amending Regulations (EC) No 999/2001, (EC) No 396/2005, (EC) No 1069/2009, (EC) No 1107/2009, (EU) No 1151/2012, (EU) No 652/2014, (EU) 2016/429 and (EU) 2016/2031 of the European Parliament and of the Council, Council Regulations (EC) No 1/2005 and (EC) No 1099/2009 and Council Directives 98/58/EC, 1999/74/EC, 2007/43/EC, 2008/119/EC and 2008/120/EC, and repealing



Regulations (EC) No 854/2004 and (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, Council Directives 89/608/EEC, 89/662/EEC, 90/425/EEC, 91/496/EEC, 96/23/EC, 96/93/EC and 97/78/EC and Council Decision 92/438/EEC (Official Controls Regulation).

8. Commission Delegated Regulation (EU) 2019/625 of 4 March 2019 supplementing Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council with regard to requirements for the entry into the Union of consignments of certain animals and goods intended for human consumption.

9. Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC.

## VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Celá proteomická metodika bude v rámci řešení projektu č. QJ1910311 publikována v impaktovaném časopise v tomto nebo následujícím roce řešení projektu (2022 - 2023).

Stastny Kamil et al., Profiling of Metabolomic Changes in Plasma and Urine of Pigs Caused by Illegal Administration of Testosterone Esters, *Metabolites* (2020).

Kamil Šťastný et al., Metabolomika – nové analytické přístupy k prokazování zneužití anabolických steroidů ve výkrmech hospodářských zvířat, *Veterinářství* (2019).

Elisabetta Chiaradia, Ingrid Miller, In slow pace towards the proteome of equine body fluids, *Journal of Proteomics* 225 (2020) 103880.

Roberto Stella et al., Proteomics for the detection of indirect markers of steroids treatment in bovine muscle, *Proteomics* 2015, 15, 2332–2341.

McGrath TF et al., Effect-based proteomic detection of growth promoter abuse. *Anal Bioanal Chem.* 2013 Feb;405(4)

Barton C et al., Multiplexed LC-MS/MS analysis of horse plasma proteins to study doping in sport. *Proteomics.* 2009 Jun;9(11):3058-65

Benedetto A et al. Omics applications in the fight against abuse of anabolic substances in cattle: challenges, perspectives and opportunities. *Current Opinion in Food Science* 2021, 40:112–120

VU<sup>Ve</sup>L



VÝZKUMNÝ ÚSTAV  
VETERINÁRNÍHO  
LÉKAŘSTVÍ, v. v. i.

Výzkumný ústav  
veterinárního lékařství, v. v. i.,  
Veterinary Research Institute  
Hudcova 296/70  
621 00 Brno

[vri@vri.cz](mailto:vri@vri.cz)

Sekretariát:  
**+420 5 3333 2501**

Operátor:  
**+420 5 3333 1111**

[www.vri.cz](http://www.vri.cz)

Reichel Ch. OMICS-strategies and methods in the fight against doping. Forensic Science International (2011), 213:20–34



## Přílohová část

Sady vybraných proteinů pro shlukovou analýzu a porovnání s interními standardními negativními a pozitivními vzorky:

**Tabulka 3** Sada specifických proteinů srdce

Accession	Description
A0A4X1T2M9	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MYLPF PE=4 SV=1
Q8SPS7	Haptoglobin OS=Sus scrofa OX=9823 GN=HP PE=1 SV=1
A0A287AB58	ISG15 ubiquitin like modifier OS=Sus scrofa OX=9823 GN=ISG15 PE=1 SV=1
P80310	Protein S100-A12 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=S100A12 PE=1 SV=2
A0A287AGW0	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC106504547 PE=1 SV=1
A0A287AJT7	60S ribosomal protein L28 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=RPL28 PE=1 SV=1
K7GR72	Anion exchange protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=SLC4A1 PE=1 SV=1
A0A5G2R293	60S ribosomal protein L7a OS=Sus scrofa OX=9823 GN=RPL7A PE=3 SV=1
A0A480Y8T9	Alpha-1-antichymotrypsin (Fragment) OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A4X1VPB7	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=ITI4 PE=3 SV=1
I3LSD3	60S ribosomal protein L13 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=RPL13 PE=1 SV=1
A0A5G2QK57	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=JPT2 PE=1 SV=1
F1SCC6	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100156325 PE=1 SV=3
F1SCC7	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC396684 PE=3 SV=3
A0A480KT94	Glycoprotein IIIb OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A4X1VVA3	60S ribosomal protein L3 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=RPL3 PE=3 SV=1
A0A4X1SK88	Fibrillin-1 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=FBN1 PE=3 SV=1
A0A4X1VHH2	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=ADIRF PE=4 SV=1
Q29361	60S ribosomal protein L35 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=RPL35 PE=1 SV=3
A1XQU5	60S ribosomal protein L27 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=RPL27 PE=1 SV=1
A0A4X1VIS8	Gluconolactonase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=RGN PE=3 SV=1
A0A480TV63	Myosin light chain 4 isoform X1 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
L8B0U8	IgG heavy chain OS=Sus scrofa OX=9823 GN=IGHG PE=2 SV=1
A0A556HMA0	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta OS=Sus scrofa OX=9823 GN=ATP1B1 PE=1 SV=1
A0A480TPI7	Carboxylic ester hydrolase OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A4X1T5G4	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
A0A287BH21	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100156325 PE=1 SV=1
A0A4X1SW13	FAD-binding PCMH-type domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LDHD PE=3 SV=1
A0A4X1UII8	PKS_ER domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100512795 PE=3 SV=1

**Tabulka 4** Sada specifických proteinů jater

Accession	Description
Q75NG8	Troponin T, fast skeletal muscle OS=Sus scrofa OX=9823 GN=tnnt3 PE=2 SV=1
A0A287AB58	ISG15 ubiquitin like modifier OS=Sus scrofa OX=9823 GN=ISG15 PE=1 SV=1
F1SC62	Cytochrome P450 2C42 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CYP2C42 PE=1 SV=3
P49068	Metallothionein-1A OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MT1A PE=3 SV=1
P79380	Metallothionein-2B OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MT2B PE=3 SV=2
A0A286ZMX6	Metallothionein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MT1D PE=3 SV=1
A0A287A7R1	N-acetyltransferase domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=NAT8 PE=1 SV=1
Q8SQ68	Cytochrome P450 2A19 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CYP2A19 PE=1 SV=1
P02189	Myoglobin OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MB PE=1 SV=2
B5KJG2	Phosphoglycerate mutase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=PGAM2 PE=1 SV=1
A0A481BA72	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
F1SBY8	Carnitine O-octanoyltransferase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CROT PE=3 SV=2
A0A4X1UML9	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1



A0A4X1SMC0	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC102165015 PE=3 SV=1
Q6LEL6	Cytochrome P-450 OS=Sus scrofa domesticus OX=9825 PE=2 SV=1
F1SCC6	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100156325 PE=1 SV=3
A0A5S616E9	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] OS=Sus scrofa OX=9823 GN=FMO1 PE=1 SV=1
A7KZR2	Cytochrome P450 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CYP3A46 PE=2 SV=2
Q5S8C4	Cytochrome P450 2C34 (Fragment) OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CYP2C34 PE=2 SV=1
Q8SPK0	Cytochrome P450 4A25 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CYP4A25 PE=2 SV=1
A0A287B8I3	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=FAM107B PE=4 SV=2
A0A4X1VK24	C-type lectin domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100625180 PE=4 SV=1
A6N8P5	Multiprotein bridging factor 1 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MBF1 PE=4 SV=1
A0A5G2RLP2	Galectin-3-binding protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LGALS3BP PE=4 SV=1
A5GFQ6	Glycine N-methyltransferase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=GNMT PE=3 SV=1
A0A480NH74	Mitogen-activated protein kinase OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
Q9BDJ5	Pantetheinase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=VNN1 PE=1 SV=1
A0A4X1VP71	C-type lectin domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
Q8SQ65	Cytochrome P450 2C18 isoform 1 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CYP2C49 PE=2 SV=1
A0A287B146	Cytochrome P450 2C42 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CYP2C42 PE=1 SV=2
A0A5G2QV50	Kynurenine 3-monooxygenase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=KMO PE=3 SV=1
A0A287AGW0	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC106504547 PE=1 SV=1
A0A4X1U126	Tryptophan 2,3-dioxygenase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=TDO2 PE=3 SV=1
A0A4X1VD08	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=UQCR10 PE=3 SV=1
I3LPH5	G3BP stress granule assembly factor 2 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=G3BP2 PE=1 SV=2
A0A480ZX47	Multidrug resistance-associated protein 6 isoform X3 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
A0A5G2QKQ5	Elastin microfibril interfacier 1 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=EMILIN1 PE=1 SV=1
A0A287BIB3	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100737897 PE=1 SV=2
A0A5G2QCP7	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CDIPT PE=1 SV=1
A0A480Y8T9	Alpha-1-antichymotrypsin (Fragment) OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A5G2R4T8	ABC-type glutathione-S-conjugate transporter OS=Sus scrofa OX=9823 GN=ABCC2 PE=1 SV=1
A0A480VJX3	Cytochrome P450 3A4 isoform 1 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A4X1W1F9	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A5G2RLL2	Bax inhibitor 1 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=TMBIM6 PE=3 SV=1
A0A4X1UP91	Solute carrier organic anion transporter family member OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
I3LC60	UDP-glucuronosyltransferase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100515394 PE=1 SV=3
A0A480QSG2	ATP-binding cassette sub-family A member 6 isoform X1 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
A0A4X1VVV3	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CD5L PE=4 SV=1
A0A480M195	L-fucose kinase OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
A0A4X1TE15	PlsC domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LCLAT1 PE=3 SV=1
A0A480JX12	Integrin beta OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
P49930	Antibacterial peptide PMAP-23 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=PMAP23 PE=2 SV=1
A0A5G2Q7G7	Dipeptidyl peptidase 4 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=DPP4 PE=3 SV=1
A0A4X1TH57	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=HACD3 PE=3 SV=1
A0A287AJB1	Homogentisate 1,2-dioxygenase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=HGD PE=1 SV=1
A0A5G2RG89	Cytidine/uridine monophosphate kinase 2 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CMPK2 PE=1 SV=1
A0A4X1W7B2	Glutaminase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=GLS2 PE=3 SV=1
I3LEF9	C-type lectin domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC110259262 PE=1 SV=2
A0A287BRL8	Myristoylated alanine rich protein kinase C substrate OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MARCKS PE=1 SV=1
F1RYX1	Solute carrier family 22 member 18 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=SLC22A18 PE=4 SV=2
Q8SQ66	Cytochrome P450 2C33v4 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CYP2C33v4 PE=2 SV=1
F1RSV0	Parahox neighbor OS=Sus scrofa OX=9823 GN=URAD PE=3 SV=2
A0A4X1U5G1	Protein S100 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A5G2QUZ8	ATP binding cassette subfamily B member 7 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=ABCB7 PE=1 SV=1
A0A4X1SSA3	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=SLC27A2 PE=3 SV=1
A0A4X1VPB7	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=ITIH4 PE=3 SV=1
A0A4X1VQK7	Glycine N-acyltransferase-like protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100518644 PE=3 SV=1
A0A287BB42	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 2 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=HSD17B2 PE=1 SV=1
O19063	Serum amyloid P-component OS=Sus scrofa OX=9823 GN=APCS PE=2 SV=1





A0A4X1SSU6	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=PEMT PE=3 SV=1
A0A287A7E8	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=ENTPD5 PE=1 SV=1
A0A4X1SGB0	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100156325 PE=3 SV=1
A0A481AL49	Mitochondrial 2-oxodicarboxylate carrier isoform 2 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A480PCQ6	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A480LA85	Mitochondrial amidoxime-reducing component 1 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
A0A5G2QFX9	Mannose-binding protein C OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MBL2 PE=4 SV=1
A0A4X1VGA6	VWFA domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
A0A5G2QKU1	Pitriylisin metalloproteinase 1 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=PITRM1 PE=1 SV=1
A0A4X1TXT9	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=TRIP12 PE=3 SV=1
A0A4X1TDF5	Pyruvate carboxylase OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
A0A5G2QJX6	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100515185 PE=3 SV=1
F1SGX4	Carbonyl reductase 3 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CBR3 PE=1 SV=1
A0A4X1V3P4	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100738724 PE=3 SV=1
P46410	Glutamine synthetase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=GLUL PE=2 SV=3
A0A4X1SG15	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A1S6L959	Carboxylic ester hydrolase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=PLE-G2 PE=3 SV=1
A0A4X1SZJ9	Peptidylprolyl isomerase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=FKBP5 PE=4 SV=1
A0A287AT48	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100156325 PE=1 SV=1
A0A287B8S2	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=ENPP1 PE=1 SV=2
A0A286ZID9	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC110256483 PE=1 SV=1
Q8SPS7	Haptoglobin OS=Sus scrofa OX=9823 GN=HP PE=1 SV=1
A0A480U9E7	Phosphatidylinositol 3-kinase 85 kDa regulatory subunit alpha OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A4X1UM84	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP] OS=Sus scrofa OX=9823 GN=PCK1 PE=1 SV=2
Q95JF8	Cytochrome P450 4A OS=Sus scrofa OX=9823 GN=Cyp4A PE=2 SV=1

**Tabulka 5** Sada specifických proteinů ledviny

Accession	Description
A0A4X1UTR8	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
Q6LEL6	Cytochrome P-450 OS=Sus scrofa domesticus OX=9825 PE=2 SV=1
Q3S3F7	Sulfotransferase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=SULT2A1 PE=1 SV=1
A0A480W2D6	Aldo-keto reductase family 1 member C1 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A4X1TZM9	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MYLPF PE=4 SV=1
Q5XLD3	Creatine kinase M-type OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CKM PE=2 SV=1
I3LPR3	Tetraspanin OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CD9 PE=1 SV=1
I3LHQ6	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=HSD17B6 PE=1 SV=1
F1SC63	Cytochrome P450 2C42 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CYP2C42 PE=1 SV=4
A0A481B2V6	UDP-glucuronosyltransferase OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
Q28974	Cytochrome P450 2C33v3 (Fragment) OS=Sus scrofa OX=9823 PE=2 SV=1
A0A287AXR4	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=AADAC PE=1 SV=1
A0A4X1W3H4	Hydrolase_4 domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=ABHD17B PE=4 SV=1
F1S8P6	Major facilitator superfamily domain containing 10 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MFSD10 PE=1 SV=4
F1SSB1	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC110255172 PE=1 SV=2
A0A0H4J4B0	Cytochrome P450 4A21 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CYP4A21 PE=2 SV=1
A0A4X1VW07	Mitochondrial pyruvate carrier OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MPC1 PE=3 SV=1
A0A5G2QPP4	Solute carrier family 27 member 2 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=SLC27A2 PE=1 SV=1
F1SCC7	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC396684 PE=3 SV=3
F1RIZ5	Aminoacidate aminotransferase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=AADAT PE=1 SV=3
A0A480IL91	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform 1 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
F1SM28	UDP-glucuronosyltransferase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=UGT1A6 PE=1 SV=3
F1SCC6	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100156325 PE=1 SV=3
L8B0U8	IgG heavy chain OS=Sus scrofa OX=9823 GN=IGHG PE=2 SV=1
F1S3X1	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100737897 PE=1 SV=4
A0A481B9I4	Carbamoyl-phosphate synthase ammonia, mitochondrial OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A5G2QVGO	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100515185 PE=3 SV=1



L8B0V2	IgG heavy chain OS=Sus scrofa OX=9823 GN=IGHG PE=2 SV=1
A0A287A7E8	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=ENTPD5 PE=1 SV=1
A0A4X1VQK7	Glycine N-acyltransferase-like protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100518644 PE=3 SV=1
A0A287BH90	Complement component C9 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=C9 PE=1 SV=1
F1SME1	Complement C5a anaphylatoxin OS=Sus scrofa OX=9823 GN=C5 PE=1 SV=3
A0A480Y8T9	Alpha-1-antichymotrypsin (Fragment) OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A4X1U2L7	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
A0A4X1VRM4	LRRCT domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LRG1 PE=4 SV=1
A0A4X1SG15	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A287AT48	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100156325 PE=1 SV=1
P81608	Salivary lipocalin OS=Sus scrofa OX=9823 GN=SAL1 PE=1 SV=1
L8B0V6	IgG heavy chain OS=Sus scrofa OX=9823 GN=IGHG PE=2 SV=1
A0A4X1UII8	PKS_ER domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100512795 PE=3 SV=1
L8AXM5	IgG heavy chain OS=Sus scrofa OX=9823 GN=IGHG PE=2 SV=1
L8B0R9	IgG heavy chain OS=Sus scrofa OX=9823 GN=IGHG PE=2 SV=1
A0A287BH21	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC100156325 PE=1 SV=1
A0A286ZID9	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC110256483 PE=1 SV=1
A0A480QMR6	IgM OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
A0A5G2QV50	Kynurenine 3-monooxygenase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=KMO PE=3 SV=1
A0A287AGW0	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC106504547 PE=1 SV=1
Q865A4	Double stranded RNA-dependent protein kinase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=PKR PE=2 SV=1
F1SRB9	TPR_REGION domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=ST13 PE=1 SV=2
Q8SQ68	Cytochrome P450 2A19 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CYP2A19 PE=1 SV=1
A0A480QI63	Uromodulin OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
A0A480JX12	Integrin beta OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A5G2RIP2	Galectin-3-binding protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LGALS3BP PE=4 SV=1
A0A481BA72	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
B2LUG8	Interferon stimulated gene 15 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=2 SV=1

**Tabulka 6** Sada specifických proteinů svaloviny

Accession	Description
A0A4X1W3D4	BRICHOS domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A480Y8T9	Alpha-1-antichymotrypsin (Fragment) OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A286ZYZ5	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LOC106504547 PE=1 SV=2
A0A4X1SH92	SERPIN domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A4X1SK88	Fibrillin-1 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=FBN1 PE=3 SV=1
A0A4X1T203	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=GYG1 PE=4 SV=1
A0A5G2Q7R0	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=COL6A1 PE=1 SV=1
A0A4X1T5G0	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
I3LIH2	Inositol-1-monophosphatase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=IMPA2 PE=3 SV=3
A0A480W6C8	Collagen alpha-2(VI) chain isoform 2C2 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
A0A480M2V3	Collagen alpha-3(VI) chain isoform 4 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
A0A5G2QEV5	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=ITIH2 PE=3 SV=1
A0A4X1UFT3	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
A0A480HJT1	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
A0A286ZPA9	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I OS=Sus scrofa OX=9823 GN=PSP-I PE=3 SV=1
L8B0V2	IgG heavy chain OS=Sus scrofa OX=9823 GN=IGHG PE=2 SV=1
A0A480Y2J3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform 1 (Fragment) OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
A0A5G2QH97	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=VDAC3 PE=1 SV=1
Q29014	Alpha-1 acid glycoprotein (Fragment) OS=Sus scrofa OX=9823 PE=2 SV=1
R4H1Z8	Adipocyte-type fatty acid-binding protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=A-FABP PE=2 SV=1
A0A480N366	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-4 beta chain isoform X2 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
F1SS66	Myosin heavy chain 13 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MYH13 PE=3 SV=4
A0A287B1X5	TPD52 like 2 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=TPD52L2 PE=1 SV=2
A0A287B163	Collagen type VI alpha 3 chain OS=Sus scrofa OX=9823 GN=COL6A3 PE=1 SV=1



Q5JZM5	Myelin protein-zero (Fragment) OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MPZ PE=4 SV=1
A0A4X1TXJ8	60S ribosomal protein L30 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=RPL30 PE=1 SV=1
A7ISM5	MHC class II antigen OS=Sus scrofa OX=9823 GN=SLA-DQA PE=2 SV=1
A0A287AAL6	Four and a half LIM domains 1 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=FHL1 PE=1 SV=1
Q9TV62	Myosin-4 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MYH4 PE=2 SV=1
A0A4X1VPM2	40S ribosomal protein S9 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=RPS9 PE=3 SV=1
Q9TV61	Myosin-1 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MYH1 PE=2 SV=1
A0A4X1U110	Myelin basic protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A4X1U902	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
A0A4X1VK69	Apolipoprotein A-II OS=Sus scrofa OX=9823 GN=APOA2 PE=3 SV=1
A0A480SN35	Titin isoform X6 OS=Sus scrofa OX=9823 PE=3 SV=1
P79293	Myosin-7 OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MYH7 PE=1 SV=2
A0A287BPU2	Nebulin OS=Sus scrofa OX=9823 GN=NEB PE=1 SV=2
A0A5G2QM05	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1
F1SHX0	Nebulin OS=Sus scrofa OX=9823 GN=NEB PE=1 SV=4
L8B0W9	IgG heavy chain OS=Sus scrofa OX=9823 GN=IGHG PE=2 SV=1
A0A4X1SHV3	Alpha-carbonic anhydrase domain-containing protein OS=Sus scrofa OX=9823 GN=CA14 PE=3 SV=1
F1S6B4	Prolargin OS=Sus scrofa OX=9823 GN=PRELP PE=1 SV=3
A0A4X1W2N5	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa OX=9823 PE=4 SV=1

VU<sup>Ve</sup>L 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.  
Hudcova 296/70  
621 00 Brno  
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; [www.vri.cz](http://www.vri.cz); e-mail: [vri@vri.cz](mailto:vri@vri.cz)