

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2012

Klára Nevimová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů**
z řádu brodiví u čápa simbila
(*Ciconia abdimii*)

Bakalářská práce

Klára Nevimová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne _____

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho cenné rady, čas a trpělivost, se kterou vedl moji bakalářskou práci. Dále bych ráda poděkovala za poskytnutí materiálů, které jsem využila při zpracování svojí bakalářské práce.

Souhrn

Náplní mojí bakalářské práce byla *cross-species* amplifikace polymorfních mikrosatelitů z řádu brodiví u čápa simbila. V teoretické části jsem se zabývala charakteristikou čápa simbila (*Ciconia abdimii*) a taxonů, do kterých se zařazuje. Dále jsem se zabývala problematikou mikrosatelitů a metodami, které jsem použila v experimentální části. Náplní experimentální části mojí práce bylo hledání polymorfních mikrosatelitních lokusů. Touto metodou jsem testovala 187 párů primerů. Pro testování polymorfních mikrosatelitových lokusů jsem použila všechny publikované primery z řádu brodivých, potápek a potáplic. Dále jsem testovala několik vybraných mikrosatelitových primerů z řádu dlouhokřídlých a tučňáků. Za účelem ověření fylogenetické nepříbuznosti jsem použila i několik mikrosatelitových primerů z řádu vrubozobých. Pro detekci polymorfních lokusů jsem použila metodu *cross-species* PCR amplifikace u 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila. Následně byly PCR produkty separovány v polyakrylamidovém gelu. Postupným testováním bylo nalezeno 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů. U těchto lokusů byla zoptimalizována teplota annealingu a čas elektroforetické separace. Počet nalezených alel se pohyboval v rozmezí 2-6 alel na lokus. U jednoho mikrosatelitového lokusu byla nalezena nulová alela. Nejvíce polymorfních lokusů poskytly mikrosatelitové primery odvozené od nesyta lesního (*Mycteria americana*) a čápa bílého (*Ciconia ciconia*).

Summary

This thesis deals with a cross-species amplification polymorphic microsatellites from Ciconiiformes in Abdim's Stork (*Ciconia abdimii*). The main focus of the theoretical part is a description of Abdim's Stork and taxons to which it belongs. Further more it gives an account of issues that are connected to microsatellites and methods which were used in the experimental part of this thesis. The content of the experimental part was finding of polymorphic microsatellite loci. A number of one hundred and eighty seven primer pairs were tested by this method. For testing of these polymorphic microsatellite loci were used all published primers of Ciconiiformes, Grebe and Loon. On top of that a selection of microsatellite primers of Charadriiformes and Penguin. In order to prove the phylogenetic unrelated link some microsatellite primers of Anseriformes were also used. Following the detection of polymorphic loci was used the cross-species PCR amplification on six unrelated individuals of Abdim's Stork. By the gradual testing were found twenty six polymorphous microsatellite loci for which were optimized both the temperature of annealing and the time of electrophoretic separation. The number of founded alleles was in within the range of two to six alleles per locus. In one sample of microsatellite loci was founded zero allel. The highest number of polymorphous loci was provided by microsatellite primer derived from wood stork (*Mycteria americana*) and white Stork (*Ciconia ciconia*).

Obsah

1 Úvod.....	7
2 Cíl práce.....	8
3 Literární přehled.....	9
3.1 Řád brodiví.....	9
3.1.1 Čápovití.....	11
3.1.1.1 Čáp simbil.....	12
3.2 Výběr partnera u ptáků.....	13
3.3 Věrnost partnerů a mimopárová kopulace u ptáků.....	13
3.4 Repetitivní sekvence DNA.....	14
3.4.1 Tandemová repetitivní DNA.....	14
3.5 Mikrosatelity.....	15
3.5.1 Mutace mikrosatelitů.....	16
3.5.2 Výskyt mikrosatelitů v genomu.....	16
3.5.3 Využití mikrosatelitů.....	17
3.6 Princip hledání nových mikrosatelitů.....	17
3.6.1 <i>Cross-species</i> PCR amplifikace.....	18
3.6.1.1 Polymorfismus.....	18
3.7 Analýza mikrosatelitových lokusů.....	19
3.7.1 Polymerázová řetězová reakce.....	19
3.7.2 Problémy hodnocení PCR produktů.....	20
3.7.2.1 Nulové alely.....	20
3.7.2.2 Stutter bandy.....	21
3.7.3 Elektroforetická separace PCR produktu.....	21
3.9 Přehled polymorfních mikrosatelitů u brodivých.....	21
4 Materiál a metodika.....	24
4.1 Biologický materiál.....	24
4.2 Polymerázová řetězová reakce.....	24
4.3 Zpracování PCR produktu.....	25
4.4 Použité chemikálie a roztoky.....	29
4.5 Vybavení laboratoře.....	31
5 Výsledky.....	33
6 Diskuze.....	51
7 Závěr.....	57
8 Seznam použitých zkratk.....	58
9 Seznam použité literatury.....	59

1 Úvod

Mikrosatelity jsou v současnosti jedním z nejpoužívanějších genetických markerů. Patří mezi krátké tandemové repetitivní sekvence, které se skládají z jednoduchých mononukleotidových až hexanukleotidových jednotek. Jsou roztroušeny rovnoměrně po celém genomu.

Ve své bakalářské práci se budu zabývat hledáním polymorfních mikrosatelitových lokusů u čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Pro testování polymorfních mikrosatelitových lokusů použiji všechny publikované primery z řádu brodivých, potápek a potáplic. Dále budu testovat vybrané mikrosatelitové primery z řádu dlouhokřídlých a tučňáků. Za účelem ověření fylogenetické nepříbuznosti použiji i několik mikrosatelitových primerů z řádu vrubozobých. Pro detekci polymorfních lokusů použiji metodu *cross-species* PCR amplifikace a poté elektroforézu v polyakrylamidovém gelu.

2 Cíl práce

- Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
- Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
- PCR amplifikace DNA čápa simbila s využitím *cross-species* primerů pro mikrosatelity, které jsou známé v řádu brodivých.

3 Literární přehled

3.1 Řád brodiví

Nejzajímavějšími ptáky sladkovodních stanovišť jsou čápi a volavky. Molekulární metody dokázaly jejich příbuznost s kondory, které ornitologové řadí do řádu dravců (Burnie *et al.*, 2007).

Brodiví jsou většinou velcí ptáci, kteří mají mohutný a výrazný zobák, dlouhý krk a dlouhé nohy, které jsou přizpůsobeny k získávání potravy z vody nebo bažinatých biotopů. Jejich nohy jsou brodivé s nízko nasazeným palcem (Gaisler *et Zima*, 2007). Někteří brodiví mají mezi prsty plovací blány, které slouží k rozložení jejich váhy, když stojí na bahnitě dně (Burnie *et al.*, 2007). Vole jim obvykle chybí, jejich žaludek je třídílný a samci mohou mít rudimentární penis (Gaisler *et Zima*, 2007). Čápi jsou největšími ptáky v rámci řádu brodivých, nejmenší jsou bukáčci, kteří jsou vysokí pouhých 25 cm. Největší čápi měří od hlavy k ocasu asi 1,5 m. Bez ohledu na velikost je společným znakem brodivých tvar zobáku.

Většina brodivých výborně létá, velké druhy při letu pomalu mávají křídly a překonávají velké vzdálenosti pomocí krouživého letu a plachtěním (Burnie *et al.*, 2007). Při plachtění využívají vzdušné proudy, které vznikají při oteplování vzduchu nad pevninou (statické plachtění) (Gaisler *et Zima*, 2007). Při letu se mohou rozpoznat volavky a čápi podle polohy krku. Volavky drží krk v esovitěm zakřivení, zatímco čápi látají s krkem nataženým (Burnie *et al.*, 2007).

Všichni zástupci tohoto řádu jsou masožraví, většinou loví ryby, žáby nebo jiné obojživelníky. Loví i hmyz, který se pohybuje kolem vody. Některé druhy mohou lovit i menší ptáky a drobné savce, plazy, korýše a měkkýše. Volavky a bukači vyhledávají kořist zrakem, setrvávají i několik hodin na místě bez hnutí a čekají, dokud se kořist nepřiblíží na dosah. Některé druhy volavek využívají hmyz jako návnadu pro lov ryb. Hmyz drží v zobáku nad vodou a čekají na svoji kořist. Většina brodivých loví ve dne, ale kvakoš noční je aktivní pouze v noci. Má ostrý zrak a kořist zpozoruje. Ibisi a kolpíci mají neobyčejně citlivý zobák a kořist loví v bahnitě vodě. Velké druhy, např. marabu, mají rozmanité potravní zvyky. Dalo by se říct, že marabu se spíše chová jako sup. Krouží vysoko na obloze a z výšky pátrá po tělech uhynulých

zvířat (Burnie *et al.*, 2007). Mláďata brodivých jsou nidikolní a starají se o ně oba rodiče (Gaisler *et Zima*, 2007).

Přestože brodiví loví samotářsky, většina druhů hnízdí ve skupinách a některé druhy si zakládají hnízda těsně vedle sebe. Většina těchto koloniálních druhů hnízdí na stromech. Čápi a volavky obvykle kladou 4 až 6 vajec do velkého hnízda vytvořeného z klacíků. Mláďata po vylíhnutí z vajec zůstávají v hnízdě až několik týdnů a krmí je oba rodiče. Bukači a bukáčci hnízdí v bažinách. Jejich hnízda jsou vytvořená z rákosu a jiných rostlin a jsou výborně maskovaná. Když skončí hnízdění sezóna, většina druhů táhne zimovat do teplých krajín. Volavky opouštějí vnitrozemské vody a míří na mořská pobřeží (Burnie *et al.*, 2007).

Do řádu brodivých jsou zahrnovány čeledi čápovití (Ciconiidae), ibisovití (Threskiornithidae) a volavkovití (Ardeidae).

Čeď volavkovitých se vyznačuje dlouhým krkem a nohama stejně jako zbytek řádu brodivých. Volavky mají dlouhý, dýkovitý zobák, který jim slouží k harpunovitému lovu kořisti. Některé druhy volavek loví kořist při brodění ve vodě, další druhy loví kořist při letu. Volavky se dorozumívají zvuky nízkých frekvencí, které jsou slyšet na velké vzdálenosti. Zvuky nízkých frekvencí používají samci k přilákání samic a zároveň si tak ohraničují své teritorium. Většina druhů volavek migruje. Migrují především v noci v lineárních formacích. Volavky se vyskytují v mokřadech, otevřených bažinách a mělké vodě. Některé druhy volavkovitých jsou přizpůsobeny k životu v rákosí. Samci jsou větší než samice. Volavky mají dlouhou dobu námluv. Po výběru partnera si společně začnou stavět hnízdo. Hnízdo může stavět samec i samice. Většinou samec přináší materiál ke stavbě hnízda samici, a ta jej umístí na vhodné místo. Volavky si staví hnízda z větví. Hnízda často staví v křovinách, v korunách stromů nebo v rákosí. Všechny druhy obvykle hnízdí v blízkosti vod. Hnízda si staví v různých výškách nad zemí (od nízké úrovně – v rákosí až po vysokou úroveň – 20 až 30 m nad zemí v korunách stromů). Inkubace vajec se pohybuje v rozmezí od 18 do 30 dní. U některých menších druhů je doba inkubace vajec o něco kratší, pouze 14 dní. Mláďata jsou krmena regurgitací, což znamená, že volavky vyvrhují potravu mláďatům přímo do zobáku (Bouglouan, 2010).

Mezi ibisovité patří ibisi a kolpíci. Ibisovití jsou středně velcí ptáci, kteří hnízdí v koloniích (Gaisler *et Zima*, 2007). Mají husté opeření. Prachové peří jim vyrůstá po celém těle (Hudec *et Černý*, 1972). Ibisi mají tenký zakřivený zobák a kolpíci mají

zobák plochý, který je na konci rozšířený. Ibisovití létají s nataženým krkem. Loví hlavně v bahně červy a měkkýše nebo procezuji plankton. Patří sem asi 32 druhů, které u nás hnízdí zcela výjimečně (Gaisler *et Zima*, 2007).

Člunozobci a kladivouši jsou jen některými autory řazeni do samostatných čeledí. Zařazení člunozobců je velmi nejasné. V některých znacích se přibližují volavkám, v jiných čápům, podle analýzy DNA jsou příbuzní s pelikány. Člunozobci mají dlouhé nohy, s dlouhými prsty, jejich krk je ale kratší. Jejich nejvýraznějším znakem je extrémně silný zobák, dlouhý jako hlava (19 cm). Při letu jsou podobní volavkám. Mají esovitě stočený krk. Kladivouši svým vzhledem připomínají malého čápa s kratšíma nohama a silným, ze stran stlačeným zobákem. Kladivovitý vzhled hlavy umocňuje výrazná chocholka na hlavě. Přední prsty jsou, podobně jako u volavek, spojeny neširokým kožním lemem (Šťastný *et al.*, 1998).

3.1.1 Čápovití

Čápovití (Ciconiidae) jsou téměř největší létající ptáci (del Hoyo *et al.*, 1992). Mají klínovitý zobák jako volavky, ale při letu (kromě čápa marabu) mají krk natažený. Jejich hlasové ústrojí je zakrnělé, akusticky se projevují klapáním zobáku (Gaisler *et Zima*, 2007).

Dostupnost potravy je pro čápy limitujícím faktorem. Čápi preferují mělké vody s vysokou koncentrací ryb. Čápi obvykle hledají potravu na zemi. Procházejí trávou nebo bažinou a chytají drobné živočichy, které zrovna vyrušili.

Jsou to koloniální ptáci a jsou velice společenští. Jsou to denní živočichové, kteří se v noci zdržují na hnízdě. Čápi hnízdí vysoko v korunách stromů. Většinou preferují stanoviště blízko vody. Čápovití jsou kosmopolitně rozšíření, vyskytují se na šesti kontinentech. Druhy, které se vyskytují u nás, táhnou na zimu do teplých krajín. Migrují do Afriky nebo do Asie (del Hoyo *et al.*, 1992). Čáp bílý (*Ciconia ciconia*) je dokonale přizpůsoben k plachtění na své tahové cesty. Jelikož teplé vzdušné proudy existují nad pevninou, čápi nelétají do svých afrických zimovišť přes Středozevní moře, ale východní populace táhnou přes Bospor, západní populace táhnou přes Gibraltar (Veselovský, 2001).

Čápi jsou velice přizpůsobiví, což se týká jejich zvyků. Preferují hnízdění blízko vody, ale mnoho druhů preferuje nížiny, kde jsou časté srážky. Typickými

místa výskytu čápů jsou mokřady a močály, zaplavené louky, travnaté pláně a malé rybníky, které jsou oblíbeným stanovištěm pro mnoho druhů, které se zde soustřeďují (del Hoyo *et al.*, 1992). Mezi čápoité patří několik rodů: zejzob (*Anastomus*), čáp (*Ciconia a Ephippiorhynchus*), jabiru (*Jabiru*), marabu (*Leptoptilos*), nesyt (*Mycteria*) a vymřelý rod *Leguatia* (Kovalik *et al.*, 2011). Mezi čápoité se řadí 19 druhů a z toho 2 žijí v České republice (Gaisler *et Zima*, 2007).

3.1.1.1 Čáp simbil

Čáp simbil (*Ciconia abdimii*) je velký 75-81 cm. Jeho rozpětí křídel je 140 cm a jeho hmotnost je 1-3 kg. Je menší než čáp černý (*Ciconia nigra*), ale jsou si velice podobní. Dospělý čáp má lesklou horní část těla včetně hlavy, která má purpurový až zelený nádech. Náprsenka včetně ocasní části má barvu bílou. Čáp simbil má rovný robustní zobák, který má šedozelenou barvu. Jeho oči jsou tmavě hnědé. Dalším výrazným rysem jsou jeho dlouhé nohy, které mají šedé zbarvení a narůžovělá chodidla. Obě pohlaví čápa simbila jsou si velice podobná, ale samice jsou obvykle trochu menší než samci. Čáp simbil stejně jako ostatní čápi vydává zvuky pouhým klapáním zobáku (Bouglouan, 2010). Vyskytuje se v jižní Africe a jihozápadní Arábii (del Hoyo *et al.*, 1992).

Běžným místem výskytu tohoto druhu čápa jsou otevřené travnaté pláně. Obvykle se vyskytuje blízko vody, ale byl pozorován i na velmi suchých místech, včetně polopouští. Hnízdí na vysokých stromech nebo srázích, výjimečně hnízdí v blízkosti mokřadů a jezírek. Hnízda si staví občas i ve vesnicích, kde jsou chráněna před povětrnostními podmínkami.

Čáp simbil se živí velkým hmyzem. Např. sarančaty a kobylkami. Zřídka uloví nějakou myš a menší vodní živočichy. Scházejí se ve velkých hejnech. Chodí okolo břehu a čekají na kořist, na kterou rychle zaútočí (del Hoyo *et al.*, 1992).

Čáp simbil je trans-rovníkový migrant. Obvykle migruje ve velkých hejnech po 10 000 jedincích. Během migrace nelétá v regulérních formacích. Potravu si při dlouhé cestě shání každý den v době přestávek, kromě přeletu nad pouští. Ochlazování těla provádí pomocí defekačního reflexu. Pokálí si nohy (Bouglouan, 2010), což přispívá k ochlazení jeho těla, a to díky odpařování vody z tekutého trusu. Druhým způsobem ochlazení je koupání se ptáků nebo alespoň stání ve vodě. Stojí

s roztaženými křídly proti větru, a tím umožňují přístup chladného vzduchu k břišním a podpažním nažinám (Veselovský, 2001).

Hnízdní sezóna obvykle začíná v období dešťů, v květnu (del Hoyo *et al.*, 1992). Shromažďující se kolonie mají několik tisíc jedinců. Čáp simbil si staví hnízdo z větviček. Samci k hnízdu přilétají jako první a čekají na samice, které přilétají později. Samice obvykle naklade 1-3 vejce (Bouglouan, 2010). Inkubační doba vajec trvá 30-31 dní (del Hoyo *et al.*, 1992). Mláďata se opeří 2 měsíce po vylíhnutí. Čáp pohlavně dospívá ve 3-4 letech. Dožívá se až 21 let (Bouglouan, 2010).

3.2 Výběr partnera u ptáků

Samice ptáků preferují nejzdatnějšího samce, u kterého nemusejí dlouho váhat s výběrem a který je zárukou zdatného potomstva. Taktikou výběru partnera je protahování námluv, kdy samice bedlivě pozorují tokající samce, aby se co nejvíce dozvěděly o vybíraném partnerovi. Toto pozorování je také důležité proto, aby se zabránilo mezidruhovému křížení.

Samice investuje mnohem větší podíl energie do rozmnožování, jelikož má oproti samci k dispozici menší počet pohlavních buněk a tím i omezené množství potomků. Samci mají velké množství pohlavních buněk a jsou schopni oplodnit i další samice (Veselovský, 2001).

3.3 Věrnost partnerů a mimopárová kopulace u ptáků

Dříve se myslelo, že uzavřené páry pěvců, jsou skutečným symbolem věrnosti. Až nové molekulární metody určování paternity mláďat pomocí DNA dokázaly, že ne všechna mláďata v hnízdě byla zplozena jedním samcem. Dlouhodobým pozorováním ptáků označených barevnými kroužky se zjistilo, že u mnoha druhů, které žijí v párech, dochází k soutěžení samčích pohlavních buněk při mimopárové kopulaci.

Z pohledu kvalitního samce jsou mimopárové kopulace možností, jak zvýšit svou zdatnost a rozmnožovací úspěšnost. Zplodí tak mnohem více potomků, a jelikož jsou rozmístěni v různých hnízdech, snižuje to možnost jejich úhynu nebo usmrcení predátorem. Dominantní samci obsadí nejlepší místa v kolonii a hlídají intenzivně své

samice. Tím jsou ale tělesně vyčerpáni a zhubnou, to má za následek, že jsou postupně nahrazeni samci, kteří hnízdí na periferii kolonie.

Mimopárová kopulace snižuje riziko neoplozených vajec, které spočívá v neplodnosti vlastního samce. Další výhodou je, že samice získá dalšího mladého samce, který jí bude pomáhat při péči o mláďata. Starší samci jsou zdatnější a mají více zkušeností, které uplatňují při námluvách partnerek. Mladí samci nemají tolik zkušeností a při kopulaci nemají tak velké šance jako zkušenější samci. Mimopárová kopulace má i své nevýhody. Při častých mimopárových kopulacích může dojít ke ztrátě vlastního partnera (Veselovský, 2001). Studium mimopárové kopulace se provádí pomocí analýzy mikrosatelitové DNA, která je jednou z typů DNA patřící mezi repetitivní sekvence.

3.4 Repetitivní sekvence DNA

V genomu se vyskytují sekvence DNA, které se mnohonásobně opakují v haploidní sadě chromozomů. Tyto sekvence se nazývají repetitivní DNA (Snustad *et* Simmons, 2009). Repetitivní DNA se dělí na tandemové repetice a rozptýlené repetice, mezi které jsou řazeny transpozony (Bennett, 2000).

3.4.1 Tandemová repetitivní DNA

Počet kopií každé sekvence přítomné na chromozomu v určitém organismu je vysoce variabilní. Tato místa, zvaná VNTRs (tandemové repetice variabilního počtu), jsou tedy vysoce polymorfní. VNTRs mají rozdílný počet kopií repetitivních sekvencí (Snustad *et* Simmons, 2009). Na základě celkové délky repetitivní jednotky sekvence se tandemová repetitivní DNA dělí do tří podskupin. Tyto tři podskupiny zahrnují satelity, minisatelity a mikrosatelity. Jejich původ je pravděpodobně odlišný od rozptýlených repetitivních elementů.

Satelitní DNA byla objevena jako první z tandemových repetitivních DNA. Vyskytuje se široce rozptýlená po celém genomu a je často polymorfní. Velikost repetitivní jednotky se pohybuje od 5 až po několik set párů bází. Satelity jsou lokalizovány v heterochromatinu a jsou uloženy v centromere. Jejich biologická

funkce není dodnes známa. Lidská satelitní DNA není transkribována, jelikož je složena z heterochromatinu, ve kterém chybí exprimované geny.

Další tandemovou repetitivní DNA jsou minisatelity. Skládají se z desítek tandemových repetic. Minisatelity se mohou dělit na dva základní typy. Prvním typem jsou telomerické minisatelity a druhým typem hypervariabilní minisatelity. Podle Bennetta (2000) se telomerická DNA skládá z 10 – 15 kb hexanukleotidových repetic (především TTAGGG). Jsou lokalizovány na telomerách všech chromozomů, jejich biologickou funkcí je chránit konce chromozomů před degradací a mohou hrát roli při párování a orientaci chromozomů při buněčném dělení. Druhým typem minisatelitních sekvencí jsou hypervariabilní minisatelity. Velikost repetitivních jednotek se může pohybovat od 6 do 50 bp. Vyskytují se po celém genomu, nejvíce v telomerických oblastech. Analýza minisatelitů se provádí pomocí DNA fingerprintingu. Tato technika odstartovala revoluci v oblastech forenzní vědy a testů otcovství (Bennett, 2000).

3.5 Mikrosatelity

Mikrosatelity (STRs – short tandem repeats) patří ke krátkým tandemovým repetitivním sekvencím. Skládají se z jednoduchých mononukleotidových až hexanukleotidových tandemových jednotek v repeticích (Field *et* Wills, 1996; Tóth *et al.*, 2000, Oliveira *et al.*, 2006). Nejčastější jsou dinukleotidové repetice, kde převažuje typ (CA)_n (Weber *et* May, 1989). Jaderné mikrosatelity jsou v současnosti jedním z nejpoužívanějších genetických markerů (Field *et* Wills, 1996, Barbara *et al.*, 2007). Mikrosatelity jsou kodominantní (Oliveira *et al.*, 2006), hypervariabilní a vyskytují se rovnoměrně po celém genomu. Jsou to nejvariabilnější typy DNA (Field *et* Wills, 1996), které jsou polymorfní a velice často mutují. Polymorfismus vychází z různého počtu opakování repetitivní jednotky, tedy z celkové délky repetitivního lokusu (Ellegren, 2004). Mikrosatelity byly nalezeny u prokaryot i eukaryot, včetně lidského genomu, kde jsou roztroušeny náhodně. Role mikrosatelitů u eukaryot je méně známá. Některé hypotézy tvrdí, že mikrosatelity mohou ovlivnit regulaci genové exprese (Bennett, 2000).

Přítomnost odchylek v trinukleotidových repeticích může mít závažné důsledky a má spojitost s nemocemi, které byly identifikovány pouze u lidí. Většina

trinukleotidových repetice asociuje nemoci ovlivňující neurologickou funkci. Nejznámějším onemocněním je Huntingtonova chorea. Je to neurologické onemocnění, které propukne až v dospělosti. Projevuje se jako demence s poruchou motoriky. Alela způsobující Huntingtonovu choreu, obsahuje vůči nepatologické alele zmnožení repetitivních sekvencí (Bennett, 2000).

3.5.1 Mutace mikrosatelitů

Mikrosatelity jsou postihovány vyšším výskytem mutací, jejich mutační rychlost je vyšší než v jiných částech genomu (Oliveira *et al.*, 2006). Polymorfní mikrosatelity mohou vzniknout několika způsoby. Může dojít k chybě při rekombinaci, k nerovnoměrnému crossing-overu nebo ke sklouznutí DNA polymerázy. Při nerovnoměrném crossing-overu může dojít k drastickým změnám, jako je navýšení nebo snížení počtu repetice (Oliveira *et al.*, 2006; Bhargava *et Fuentes*, 2010).

Během replikace DNA nebo reparace může dojít k sesmeknutí DNA polymerázy (Oliveira *et al.*, 2006). Sklouznutí nastává v komplexu proteinů, kde je zprostředkována DNA replikace (Bennett, 2000). Díky repetitivním sekvencím se řetězce DNA mohou spárovat nepřesně. Na komplementárním řetězci pak může vzniknout klička. Tento proces vede k prodloužení repetice. Klička může vzniknout i na templátovém řetězci DNA. Následuje ztráta repetitivní jednotky. Čím delší je mikrosatelit, tím vyšší je pravděpodobnost sklouznutí DNA polymerázy (Ellegren, 2004; Oliveira *et al.*, 2006).

Existují další faktory, které ovlivňují mutační rychlost a navýšení nebo snížení počtu repetice. Mezi ně patří počet repetice, umístění v genomu a jejich sekvence. Většina sklouznutí je opravena reparačním systémem buňky (Bennett, 2000).

3.5.2 Výskyt mikrosatelitů v genomu

Mikrosatelity tvoří 3 % lidského genomu. Nejrozšířenější v genomu jsou dinukleotidové sekvence CA, dále následují AT sekvence, GA a GC sekvence.

Frekvence genomových mikrosatelitů se liší v závislosti na druhu. V rostlinách je odhadovaná frekvence 0,85 % u *Arabidopsis*, zatímco u ryb je frekvence 3,21 %. U *Homo sapiens* je mikrosatelitní frekvence na 22. chromozomu 1,07 % (Oliveira *et al.*, 2006).

Ptačí genom obsahuje asi 10 x méně mikrosatelitů než genom lidský (Galbusera *et al.*, 2000). Obecně platí, že větší množství mikrosatelitů se vyskytuje ve větších genomech (Oliveira *et al.*, 2006).

3.5.3 Využití mikrosatelitů

Mikrosatelity se staly nejpoužívanějšími molekulárními markery, zároveň se vyvíjely nové analytické metody, díky kterým se usnadnilo jejich hodnocení. Využití mikrosatelitů se uplatňuje v mnoha oblastech genetických studií a medicíny. Např. populační genetiky, forenzních analýz, testování otcovství, při sestavování genetických map některých organismů a genotypizaci. V současné době jsou mikrosatelitní markery běžně využívány pro analýzy genetické struktury populací rostlin, které se volně vyskytují v přírodě.

Mikrosatelity původně sloužily k výzkumu variability člověka, ale s objevem polymorfismu se začaly používat i k výzkumu dalších organismů (Oliveira *et al.*, 2006). Např. při studiu příbuznosti ptáků v populacích chovaných v zajetí, aby se zabránilo příbuzenskému křížení. Při imbridingu dochází k přenosu vzácných alel, které jsou škodlivé v homozygotním stavu a vyvolávají choroby, které oslabují fitness jedince a zároveň celé populace.

3.6 Princip hledání nových mikrosatelitů

K získání nových mikrosatelitů se používá izolace mikrosatelitů *de novo*. Izolace nových druhově specifických mikrosatelitů *de novo* je časově náročná a poměrně drahá. Proto se často využívá technika *cross-species* PCR amplifikace (Galbusera *et al.*, 2000). Navržení mikrosatelitů *de novo* může trvat několik týdnů, ale i několik měsíců (Dawson, 2010).

K izolaci mikrosatelitů *de novo* se používá postup, který zahrnuje několik kroků. Nejprve se musí vyizolovat genomická DNA z druhu, ze kterého je třeba

izolovat nový mikrosatelit. Získaná genomická DNA se štěpí pomocí restričních enzymů nebo ultrazvuku. Při použití více restričních enzymů dojde k vzniku většího množství kratších fragmentů. Ideální velikost fragmentů pro úspěšné klonování je 200-1000 bp. S naštěpenými fragmenty se provede elektroforéza v agarózovém gelu. Pomocí elektroforézy jsou fragmenty DNA rozděleny podle velikosti. Fragmenty požadované velikosti jsou extrahovány z gelu a jsou přečištěny. V dalším kroku se fragmenty musí zaklonovat do plazmidu, poté dojde k vyselektování částí, které obsahují repetice. Dále je provedena tzv. selektivní hybridizace a izolace repetitivních sekvencí. Tyto sekvence se musí osekvenovat a poté se navrhnou primery (Zane *et al.*, 2002).

3.6.1 *Cross-species* PCR amplifikace

Jelikož je izolace mikrosatelitů *de novo* finančně a časově náročná, používá se *cross-species* PCR amplifikace (Galbusera *et al.*, 2000). Tato metoda spočívá v použití již navržených primerů od co nejpříbuznějších druhů (Primer *et al.*, 1996).

Mikrosatelity jsou obklopeny jedinečnými sekvencemi, podle nichž se navrhuje primery, které slouží k amplifikaci mikrosatelitů. Jelikož v genomech dochází k mutacím, primery se nemohou používat univerzálně (Primer *et al.*, 2005). Experimentálně bylo dokázáno, že mikrosatelity amplifikují mikrosatelitové lokusy u blízce příbuzných druhů. U příbuzných druhů je vysoká pravděpodobnost, že mají alespoň část sekvencí komplementárních k primerům, tudíž dojde k amplifikaci. S rostoucí fylogenetickou vzdáleností se snižuje pravděpodobnost úspěšné amplifikace mikrosatelitového lokusu. Úspěšná *cross-species* amplifikace vyžaduje vysoký stupeň homologie v cílových sekvencích primerů. Amplifikace může být ovlivněna snížením annealingové teploty (Primer *et al.*, 2005).

3.6.1.1 *Polymorfismus*

Veškerá genetická proměnlivost vzniká mutacemi. Frekvence alel zkoumaného genu v dané populaci je ovlivněna mutační rychlostí, selekcí, migrací, driftem, sociální strukturou a způsobem rozmnožování. Dříve byla proměnlivost v populacích sledována pouze pomocí odlišných viditelných morfologických forem znaku (různé

varianty zbarvení, onemocnění, atd.). S nástupem molekulárních technik přibližně od 50. let 20. století se objevila vysoká úroveň polymorfizmu.

Úroveň polymorfizmu se zjišťuje zkoumáním proměnlivosti většího počtu genů. Variabilita se vyjadřuje jako podíl polymorfních lokusů z celkového počtu zkoumaných. Polymorfní lokus je takový, který obsahuje více než jednu alelu. U monomorfního lokusu je přítomna pouze jedna alela. Jako polymorfní lokus se označuje takový, u kterého frekvence nejpočetnější alely dosahuje maximálně 95 % nebo 99 % (Relichová, 2001). V populacích se vyskytují i tzv. vzácné alely ve frekvenci nižší než je 0,05 % respektive 0,01% (Zima *et al.*, 2004).

3.7 Analýza mikrosatelitových lokusů

Analýza mikrosatelitových lokusů se provádí pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Při studiu *cross-species* amplifikace se používá k vizualizaci PCR produktu elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.

3.7.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je technika, která umožňuje vznik mnoha kopií určitého úseku DNA pomocí enzymatické amplifikace tohoto úseku.

PCR vede k selektivní amplifikaci vybraných oblastí DNA molekuly. Jednou z podmínek je hybridizace dvou krátkých oligonukleotidů s molekulou DNA (každý s jedním vláknem dvoušroubovice DNA). Oligonukleotidy, které mají funkci primerů, ohraničují úsek DNA, který má být amplifikován. Amplifikaci provádí enzym DNA polymeráza (Brown, 2007). Typickou vlastností DNA polymerázy je rozpoznávat jednořetězcovou DNA (ssDNA) jako templát a současně se vázat na deoxyribonukleozidtrifosfáty. Jestliže se na ssDNA naváže krátký oligonukleotid, polymeráza se naváže těsně za tento segment a za využití energie vázané v trifosfátech katalyzuje syntézu komplementárního nukleotidového řetězce (Zima *et al.*, 2004).

Zahřátím dvouřetězcové DNA na vysokou teplotu (nad 90 °C) dojde k její denaturaci. Jestliže jsou v reakční směsi obsaženy oba primery ve správné koncentraci, budou po snížení teploty reasociovat s DNA. Díky tomu, že jsou primery krátké a v nadbytku, nasednou na jednořetězcové vlákno DNA rychleji než komplementární

vlákno. V posledním kroku (při teplotě 72 °C), což je optimální teplota pro *Taq* DNA polymerázu, jsou podle sekvence templátu syntetizovány nové řetězce.

Princip PCR spočívá v kopírování sekvence templátu v několika po sobě jdoucích cyklech. V každém cyklu je počet kopií zdvojnásoben, protože fragmenty, které byly nasyntetizovány v předchozích cyklech slouží jako matrice v dalších cyklech (Zima *et al.*, 2004).

Během každého cyklu PCR se teplota reakční směsi třikrát změní.

- denaturace - obvykle probíhá při 94 °C, při denuraci probíhá rozpad vodíkových vazeb mezi páry bazí a dojde k uvolnění se jednotlivých vláken DNA.
- annealing - primery se připojují k templátům.
- extenze - probíhá syntéza DNA (Brown, 2007).

3.7.2 Problémy hodnocení PCR produktů

Při vizualizaci polyakrylamidového gelu s produkty PCR reakce může nastat problém s hodnocením v podobě tzv. „stutter“ bandů a nulových alel.

3.7.2.1 Nulové alely

Nulové alely se vyznačují tím, že se neamplifikují během polymerázové řetězové reakce. Možnou příčinou vzniku těchto alel může být např. vysoká annealingová teplota. Různě dlouhé alely mají odlišnou úroveň amplifikace. Krátké alely se během PCR reakce amplifikují efektivněji než alely delší. Přítomnost nulové alely se může prokázat zvýšením koncentrace templátové DNA ve vzorku.

Další možností vzniku nulové alely je tedy nízká koncentrace templátové DNA při PCR amplifikaci. Vzorky obsahující malé množství templátové DNA mají spíše homozygotní nulové alely. Nulové alely zdánlivě snižují množství heterozygotů v populaci. Populace pak není v souladu s Hardy-Weinbergovým zákonem. Zvýšení podílu homozygotů v populaci může být způsobeno driftem nebo imbridingem (Dakin *et Avise*, 2004).

3.7.2.2 Stutter bandy

Vznik *stutter* bandů je považován za důsledek sklouznutí DNA polymerázy. Sklouznutí DNA polymerázy probíhá v živých organizmech, ale i v podmínkách *in vitro*. Problémem při hodnocení PCR produktů jsou tzv. sekundární bandy neboli *stutter* bandy, kterým se také říká *shadow* bandy. *Stutter* bandy vznikají během PCR amplifikace. Častěji se vyskytují u dinukleotidových repetitivních než u tri- nebo tetranukleotidových.

Stutter bandy mohou být omezeny nebo odstraněny pomocí optimalizace PCR podmínek nebo použitím odlišných primerů (Miller *et al.*, 1997).

3.7.3 Elektroforetická separace PCR produktu

Elektroforetické gely se používají k separaci nukleových kyselin. Nejčastěji se používají polyakrylamidové gely, které vytvářejí složitou síťovitou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru (Šmarda *et al.*, 2005).

Elektroforéza k separaci jednotlivých molekul využívá jejich náboj a velikost (Zima *et al.*, 2004). Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul trojrozměrným molekulárním sítem, který je způsobený stejnosměrným elektrickým polem. Rychlost pohybu těchto molekul je označovaná jako elektroforetická pohyblivost. Polyakrylamidový gel se používá k separaci menších molekul DNA (10 až 1000 bp) (Šmarda *et al.*, 2005). Polyakrylamidové gely vznikají radikálovou kopolymerací dvou monomerů (akrylamidu a N,N'-methylenbisakrylamidu) (Zima *et al.*, 2004). K vizualizaci molekul DNA separovaných v polyakrylamidových gelech se používá barvení stříbrem (Šmarda *et al.*, 2005). Nevýhodou použití elektroforézy v polyakrylamidovém gelu je vysoká toxicita akrylamidu (Zima *et al.*, 2004).

3.9 Přehled polymorfních mikrosatelitů u brodivých

V rámci brodivých byly *de novo* nalezeny mikrosatelity u čápů, volavek a ibisů. Již v minulosti byly provedeny experimentální práce, které se zabývaly

hledáním a izolací nových polymorfních mikrosatelitních lokusů. Ve většině prací jsou mikrosatelitní lokusy hledány *de novo*, v některých se ale uvádí použití techniky *cross-species* PCR amplifikace.

V čeledi čápovitých, u nesyta lesního (*Mycteria americana*) byly detekovány 4 polymorfní mikrosatelitové lokusy. Analýza se prováděla na 136 jedincích z 9 kolonií (Van Den Bussche *et al.*, 1999). U tohoto druhu bylo dále detekováno 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Počet alel se pohyboval v rozmezí od 2 do 4 (Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003). U čápa bílého (*Ciconia ciconia*) bylo detekováno 7 nových polymorfních mikrosatelitních lokusů. Tyto mikrosatelity byly kombinovány se 6 páry primerů od nesyta lesního (*Mycteria americana*) (Stephard *et al.*, 2009). Dalším druhem patřícím mezi čápovité je čáp východní (*Ciconia boyciana*). U tohoto druhu bylo nalezeno 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Počet alel na lokus se pohyboval v rozmezí od 2 do 8 (Wang *et al.*, 2011).

Další čeledí v rámci řádu brodivých jsou ibisovití. Mezi ibisovití se řadí ibis japonský (*Nipponia nippon*), který je kriticky ohroženým druhem. Z tohoto druhu bylo detekováno 8 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Lokusy měly nízký počet alel, který se pohyboval v rozmezí od 2 do 3 (Ji *et al.*, 2004). U tohoto druhu bylo dále nalezeno 11 mikrosatelitních lokusů. Nové mikrosatelitní lokusy byly použity k určení úrovně genetické rozmanitosti ve volné přírodě nebo v populacích chovaných v zajetí. Počet alel na lokus se pohyboval v rozmezí od 2 do 5 (He *et al.*, 2005). U ibise rudého (*Eudocimus ruber*) bylo publikováno 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů. Analýza 45 jedinců ukázala, že se počty alel mikrosatelitních lokusů pohybují v rozmezí od 3 do 17 (Santos *et al.*, 2005). Dalším druhem patřícím mezi ibisovití je kolpík růžový (*Ajaia ajaja*). U tohoto druhu bylo vyizolováno 6 mikrosatelitních lokusů. Analýza byla provedena na 61 jedincích ze zoologické zahrady (Sawyer *et al.*, 2006). U kolpíka malého (*Platalea minor*) bylo publikováno 23 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Počet alel se pohyboval od 2 do 19 (Yeung *et al.*, 2008).

Třetí čeledí, která je zahrnována do řádu brodivých jsou volavkovití. Do čeledi volavkovitých se řadí volavka velká (*Ardea herodias*), u které bylo navrženo 17 primerů. Pouze 15 mikrosatelitových lokusů bylo polymorfních. *Cross-species* PCR amplifikace byla provedena u dalších 3 blízce příbuzných druhů (*A. alba*, *A. cinerea*, *A. cocoi*) (McGuire *et Noor*, 2002). U volavky žlutozobé (*Egretta eulophotes*) bylo detekováno 18 polymorfních mikrosatelitních lokusů. K analýze bylo použito 20

jedinců. Počet alel na lokus se pohyboval v rozmezí od 2 do 9 (Huang *et al.*, 2009). 11 polymorfních mikrosatelitových lokusů bylo také izolováno z kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*). Průměrný počet alel na lokus je 7,5 alel. Těchto 11 mikrosatelitových lokusů bylo dále použito při *cross-species* PCR amplifikaci u 11 druhů volavek (Chang *et al.*, 2009). U volavky červenavé (*Egretta rufescens*) bylo nalezeno 12 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Analýza byla prováděna u 31 jedinců z chovné kolonie v Texasu. Počet alel se pohyboval v rozmezí od 2 do 10 (Hill *et Green*, 2011).

Cross-species PCR amplifikace byla provedena u kvakoše nočního (*Nycticorax nycticorax*). Autoři publikovali využití 8 mikrosatelitových lokusů od volavky velké (*Ardea herodias*). Počty alel se pohybovaly v rozmezí od 2 do 18 (Chang *et al.*, 2005). Úspěšná *cross-species* PCR amplifikace byla provedena u ibise japonského (*Nipponia nippon*). Autoři použili 40 párů primerů. Nalezené počty alel se pohybovaly v rozmezí od 2 do 7. Mezi mikrosatelitovými lokusy, které byly úspěšně amplifikovány, byl mikrosatelitový lokus HEL1 se 7 alelami (Chu-Zhao *et al.*, 2005). Další *cross-species* PCR amplifikace byla použita u ibise posvátného (*Threskiornis aethiopicus*). Wilson *et al.* (2008) uvedl 5 mikrosatelitových lokusů, u kterých byla provedena *cross-species* amplifikace. Počet alel se pohyboval od 4 do 12. *Cross-species* PCR amplifikace byla provedena i u čápa východního (*Ciconia boyciana*), u kterého bylo použito 36 párů primerů. 7 párů primerů pocházelo z čápa bílého (*Ciconia ciconia*), 12 párů primerů z ibise japonského (*Nipponia nippon*) a dalších 17 párů primerů z volavky velké (*Ardea herodias*). Z těchto mikrosatelitů bylo detekováno 11 polymorfních (Huang *et Zhou*, 2009).

4 Materiál a metodika

4.1 Biologický materiál

DNA byla získána z krve 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Krev byla odebrána z tarzální žíly těchto zvířat pracovníky zoologické zahrady ve Dvoře Králové nad Labem. Všichni tito čápi pocházeli z chovu této zoologické zahrady. Izolace proběhla fenol-chloroformovou metodou. Vyizolovaná DNA byla naředěná na koncentraci 10 µg/ml.

4.2 Polymerázová řetězová reakce

Složky PCR mixu musíme rozmrazit a poté je zvortexujeme a zcentrifugujeme. Poté pipetujeme určené objemy (viz tabulka č. 2) pro přípravu PCR mixu. PCR mix po napipetování všech jeho složek zvortexujeme a zcentrifugujeme. Do každé mikrozkušavky napipetujeme 9 µl PCR mixu a 1 µl vzorku DNA.

Byl použit následující PCR program.

5 min.....	94 °C
35 x.....30 s.....	94 °C
30 s.....	teplota annealingu
30 s.....	72 °C
7 min.....	72 °C

Základní teplota annealingu pro PCR reakci je 50 °C, v případě, že PCR reakce neposkytne žádný produkt, snížíme teplotu na 48 °C. Monomorfní vzorky jsou z dalšího testování vyloučeny. Vzorky, které vykazují polymorfismus, jsou dále amplifikovány, většinou za zvýšené teploty annealingu (viz kapitola Výsledky).

Tabulka 1: Složení PCR reakční směsi pro 6 vzorků.

Složky reakční směsi	Koncentrace pracovního roztoku	Objem roztoku [μ l]
Deionizovaná voda		43,9; 45,9**
Pufř	10x	6,7
MgCl ₂	25 nmol/l	4,1; 2,1*
dNTPs	20 μ mol/l	0,8
Primer R	10 μ mol/l	3,3
Primer F	10 μ mol/l	3,3
a <i>Taq</i> DNA polymeráza	1 U/ μ l	1,5

* použití poloviční koncentrace MgCl₂

** při použití poloviční koncentrace MgCl₂ dojde k navýšení objemu přidané deionizované vody

4.3 Zpracování PCR produktu

Pro analýzu PCR produktu použijeme elektroforézu v polyakrylamidovém gelu. Pracujeme s vyhřívanou sekvenační elektroforetickou komůrkou S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm. K přípravě polyakrylamidového gelu většinou používáme látky, které jsou jedovaté a karcinogenní, proto je důležité používání ochranných rukavic a přípravu gelu provádíme v digestoři.

Příprava skel

1. Obě skla důkladně omyjeme vodou se saponátem a vydrhneme kartáči, které jsou speciálně určeny pro každé sklo. Poté skla opláchneme deionizovanou vodou, plochu nepřiléhající ke gelu setřeme stěrkou a osušíme je papírovým ručníkem. Vždy ošetřujeme plochu skla, která se bude dotýkat gelu. Skla ošetříme 96% ethanolem a opět osušíme.
2. Velké sklo ošetříme přípravkem pro odpuzování vody z automobilových skel. Přípravek (Clear Vue Rain Repellent, Turtle Wax) rozetřeme po velkém skle a

necháme ho působit asi 5 minut. Poté ho opláchneme deionizovanou vodou a sklo osušíme papírovým ručníkem.

3. Připravíme si molekulární lepidlo a rozlijeme ho po malém skle. Rozetřeme jej papírovým ručníkem a necháme působit zhruba 5 minut. Po tomto kroku si musíme vyměnit rukavice, aby nedošlo k přenosu lepidla na velké sklo. Po uplynutí 5 minut sklo čtyřikrát opláchneme 96% ethanolem a vždy osušíme papírovým ručníkem.
4. Po stranách velkého skla umístíme 0,4 mm silné spacers a na ně položíme malé sklo (ošetřenou stranou dolů). Spacers musíme uložit až na okraj skel a gumu spaceru těsně přitlačit k hraně skla, aby nedošlo k protékání elektroforetického pufru. V místě, kde jsou umístěny spacers skla sepneme dvěma svorkami (přibližně ve stejných vzdálenostech od sebe).

Příprava polyakrylamidového gelu

1. Polyakrylamidový gel si připravíme v kádince smícháním 60 ml 6% roztoku akrylamidu : N,N'-metylenbisakrylamid 19 : 1, 400 μ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného a 40 μ l N,N,N',N'-tetramethylethyldiaminu. Roztok kroužením kádinky promícháme a opatrně vlijeme mezi skla. Druhou rukou poklepáváme na sklo, aby se čelo gelu rychleji a rovnoměrně pohybovalo a předcházeli jsme vzniku bublin v gelu.
2. Až vyplníme prostor gelem, mezi přilehlá skla opatrně vsuneme hřebínek opačnou stranou asi 0,7 mm až 1 cm hluboko. V místě vloženého hřebínku skla sepneme čtyřmi velkými svorkami. Gel necháme polymerizovat zhruba jednu hodinu.

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu a nanášení vzorků

1. Když gel ztuhne a chceme jej začít používat, odstraníme všechny svorky a skla důkladně omyjeme od všech zbytků polyakrylamidu. Sklo osušíme papírovým ručníkem ze strany, která se dotýká hliníkové desky elektroforetické komůrky. Poté sklo umístíme pomocí šroubovacích úchytů do elektroforetické komůrky.

2. Katodový a anodový prostor elektroforézy zalijeme 0,5 x TBE pufrem, opatrně vytáhneme hřebínek, který očistíme a umyjeme. Po vytažení hřebínku vznikne mezi skly mezera, kterou musíme vyčistit proudem pufru nabraným do injekční stříkačky. Elektroforetickou komůrku uzavřeme, nasadíme elektrody a na zdroji nastavíme výkon 90 W (3000 V, 150 mA). Gel necháme předeřhát zhruba 30 minut před nanášením vzorků.
3. Vzorky z PCR zvortexujeme a zcentrifugujeme. Ke každému vzorku přidáme 5 μ l nanášecího pufru a vložíme je na 3 minuty do termocykléru do denaturačních podmínek. Po uplynutí času denaturace vzorky ihned vložíme do ledu, který si předem připravíme. Led zabrání zpětné renaturaci DNA.
4. Během denaturace vypneme zdroj stejnosměrného elektrického proudu a odpojíme katodu. Po otevření katodového prostoru opět vyčistíme mezeru pro hřebínek proudem vody z injekční stříkačky. Proudem vody odplavíme usazenou močovinu z hrany skla a mezeru musíme ještě mechanicky vyčistit od zbytků polyakrylamidového gelu. Do mezery mezi skly vsuneme opatrně hřebínek asi 1 mm hluboko do gelu. Musíme být opatrní, aby nedošlo k ulomení některého zoubku. Hřebínek je uzpůsoben k nanášení vzorků osmikanálovou pipetou.
5. Vzorky nanášíme po 2 μ l pomocí osmikanálové pipety do mezer mezi zoubky hřebínku. Na nanášení vzorků používáme stejné špičky, které mezi nanášením rozdílných vzorků proplachujeme 0,5 x TBE pufrem. Po napipetování všech vzorků uzavřeme katodový prostor, zapojíme elektrodu a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu nastavíme hodnotu 70 W.
6. Časy separace jsou rozdílné. Záleží na molekulárních hmotnostech PCR produktů. Orientačně se můžeme řídit i pohybem barviva nanášecího pufru. Nanášecí pufr obsahuje bromfenolovou modř a xylenovou modř. Obě dvě barvy putují gelem a opouštějí gel v rozdílných časových intervalech. Bromfenolová modř opouští gel přibližně po hodině a pohybuje se stejně rychle jako řetězce DNA, které jsou dlouhé přibližně 60 bp. Xylenová modř opouští gel zhruba po 2 hodinách elektroforetické separace a pohybuje se stejně rychle jako 200 bp. Separace trvá 1 – 3 hodiny.

Vizualizace gelu

1. Po uplynutí doby potřebné k rozdělení PCR produktu vypneme zdroj stejnosměrného proudu a odpojíme elektrody od elektroforetické komůrky. Pufř z katodové části musíme vypustit. Pufř přeteče do sběrného prostoru, poté povolíme šrouby úchytů skel a gel se skly vyjmeme a položíme ho na polystyrenovou podložku malým sklem vzhůru. Opatrně vytáhneme spacersy z prostoru mezi skly a jemným tahem čepele nože vzhůru skla od sebe odlepíme.
2. Dále pracujeme s malým sklem, na kterém je přilepený gel. Sklo vložíme do fotomisky, misku umístíme na třepačku a zalijeme ji fix/stop roztokem. Fix/stop roztok necháme na gel působit zhruba 20 minut. Orientačně se můžeme řídit vymytím modrého pruhu z polyakrylamidového gelu do roztoku.
3. Po 20 minutách působení fix/stop roztok slijeme do baňky. Sklo s gelem je důležité promýt 3 x po sobě deionizovanou vodou. Jedno promývání trvá zhruba 2 minuty. Poté gel vložíme na 5 minut do 1% roztoku HNO_3 , poté roztok vylijeme a sklo s gelem promyjeme 4 krát deionizovanou vodou.
4. Do 0,1% roztoku AgNO_3 připipetujeme 1,2 ml formaldehydu. Tento připravený roztok necháme na gel působit přibližně 30 minut. Fotomisku umístíme na třepačku.
5. Fotomisku s gelem v roztoku 0,1% AgNO_3 sundáme ze třepačky a roztok slijeme zpět do zásobní lahve. Sklo s gelem vyjmeme a ponoříme ho do připravené fotomisky s deionizovanou vodou na 5 vteřin. Poté gel umístíme do druhé fotomisky a zalijeme vývojkou. Fotomisku vložíme na třepačku. Sledujeme vyvíjení hnědočerných bandů, které jsou obarveny stříbrem.
6. Když jsou bandy dostatečně viditelné a začíná vystupovat tmavé pozadí, gel zalijeme fix/stop roztokem (použili jsme slitý fix/stop roztok z kroku číslo 3). Necháme ho působit do té doby, až proběhne masivní unikání CO_2 v podobě bublinek.
7. Po skončení reakce sklo ponoříme asi na 2 minuty do deionizované vody. Po vyjmutí gelu z vody jej vložíme do sušárny po dobu 30 min při 80 °C. Vysušené sklo vyhodnotíme na negatoskopu. K uchování záznamu na polyakrylamidovém gelu slouží naskenování gelu do počítače.

8. K likvidaci polyakrylamidového gelu se používá roztok NaOH o koncentraci 1 mol/l. Gel by se měl celý odlepit. Pokud se gel neodlepi, strhne se pomocí škrabky. Sklo se poté umyje a znovu se používá.

4.4 Použité chemikálie a roztoky

- Akrylamid (AppliChem)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/ μ l), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- dNTPs (100 mmol/l), U1240 (Promega)
- Deionizovaná voda
- Dušičnan stříbrný (Lachema)
- Ethanol - 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Diethylenaminotetraoctan sodný (Na_2EDTA) (Lachema)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachema)
- Kyselina octová - ledová (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachema)
- N,N'-methylenbisakrylamin (AppliChem)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Přípravek na odpuzování vody ze skel automobilů Clear Vue (Turtle WAX)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

6% akrylamid

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizované vody
- 50 ml 10 x TBE
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamidu s N,N'-bis AA 19:1

6% polyakrylamidový gel:

- 60 ml 6% akrylamidu
- 400 μ l 10% peroxidisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- 40 μ l N,N,N,N'-tetramethylethyldiaminu

Fix/stop roztok:

- 80 ml ledové kyseliny octové
- doplnění objemu do 800 ml deionizované vody

1% roztok kyseliny dusičné (HNO_3):

- 12 ml 65% HNO_3
- doplnění objemu do 800 ml deionizované vody

0,1% roztok dusičnanu stříbrného AgNO_3 :

- 0,8 g AgNO_3
- doplnění objemu do 800 ml deionizované vody
- před použitím do roztoku připipetujeme 1,2 ml formaldehydu

Vývojka:

- 24 g uhličitanu sodného Na_2CO_3
- doplnění objemu do 800 ml deionizované vody
- před použitím do roztoku připipetujeme 1,2 ml formaldehydu a 160 μ l 1% roztoku thiosíranu sodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu:

- 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% etanolu
- 3 μ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

10% roztok peroxidisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$:

- 1 g peroxidisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- rozpuštění v 10 ml deionizované vody

Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu:

- 0,125 g bromfenolové modři
- 0,125 g xylenové modři
- 100 ml formamidu
- 25 ml deionizované vody

4.5 Vybavení laboratoře

- Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)
- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy MARK S 622 (BEL Engineering)
- Mikropipety FinnpiPETTE 0,5 až 10 μ l (osmikanálová) a 0,3 μ l až 1 ml (Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna se sterilizátorem CAT 8050 (Contherm Scientific Ltd)
- Temperovaný blok Dry-block DB-2D (Labnet International)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocyklér XP Thermal Cycler (BIOER Technology)
- Termocyklér GenePro (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)

- Výrobek deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobek ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

5 Výsledky

6 Diskuze

7 Závěr

Pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace bylo otestováno 187 párů mikrosatelitových primerů na vzorcích DNA pocházejících z 6 nepříbuzných jedinců čápa simbila (*Ciconia abdimii*). Testované mikrosatelitové lokusy pocházely převážně z řádu brodivých, dále z řádu potápek, potáplic, dlouhokřídlých, vrubozobých a tučňáků. Pomocí *cross-species* PCR amplifikace bylo detekováno 26 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Z celkového počtu polymorfních mikrosatelitových lokusů pocházelo 25 mikrosatelitů z řádu brodivých a pouze 1 z řádu dlouhokřídlých. 1 mikrosatelitový lokus z 26 byl nehodnotitelný a o dalších 2 víme, že jsou totožné. Celkově jsem získala 24 polymorfních mikrosatelitových lokusů, jejich bližší charakteristiku by měla odhalit další experimentální práce.

8 Seznam použitých zkratek

A	adenin
bp	pár bází
C	cytosin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
G	guanin
PAA	polyakrylamid
PCR	polymerázová řetězová reakce
ssDNA	jednořetězcová DNA
STRs	krátké tandemové repetice (short tandem repeats)
Ta	teplota annealingu
T	thymin
VNTRs	tandemová repetice variabilního počtu

9 Seznam použité literatury

BARBARA, T., PALMA-SILVA, C., PAGGI, G., BERED, F., FAY, M.F., LEXER, CH. (2007): Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* 16: 3759-3767.

BENNETT, P. (2000) Demystified... microsatellites. *Molecular Pathology* 53: 177-183.

BHARGAVA, A., FUENTES, F.F. (2010): Mutational dynamics of microsatellites. *Molecular Biotechnology* 44: 250-266.

BOUGLOUAN, N. (2010): Abdim's Stork. Dostupný z <http://www.oiseaux-birds.com/card-abdim-stork.html>. Navštíveno: 18.3.2012.

BROWN, T.A. (2007): Klonování genů a analýza DNA. Úvod. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

BURIANOVÁ, E. (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce, Dep. in Knihovna biologického centra Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

BURNIE D. (2002): Zvíře. Obrazová encyklopedie živočichů všech kontinentů. Knižní klub, Praha. ISBN 8024208628.

CAHLÍKOVÁ R. (2011): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u čápa černého (*Ciconia nigra*). Diplomová práce, Dep. in Knihovna biologického centra Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

DAKIN, E.E., AVISE, J.C. (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504-509.

DAWSON, D.A., BURKE, T., HANSSON, B., PANDHAL, J., HALE, M.C., HINTEN, G.N., SLATE, J. (2006): A predicted microsatellite map of the passerine genome based on chicken-passerine sequence homology. *Molecular Ecology* 15: 1299-132.

DAWSON, D.A., HUNTER, F.M., PANDHAL, J., BUCKLAND, R., PARHAMP, A., JONES, I.L., BRADSHAW, M., JEHLE, R., BURKE, T. (2005): Assessment of 17 new whiskered auklet (*Aethia pygmaea*) microsatellite loci in 42 seabirds identifies 5-15 polymorphic markers for each of nine Alcinae species. *Molecular Ecology Notes* 5: 289-297.

DEL HOYO, J., ELLIOT, A., SARGATAL, J. (1992): Handbook of the Birds of the World. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Barcelona, Lynx Editions.

ELLEGREN, H. (1992): Polymerase-Chain reaction (PCR) analysis of microsatellites – a new approach to studies of genetic relationships in birds. *The Auk* 109: 886-895.

FIELD, D. & WILLS, C. (1996): Long, polymorphic microsatellite in simple organisms. *Proceedings of the Royal Society Series B* 263: 209-215.

GAISLER, J., ZIMA, J. (2007): Zoologie obratlovců. Academia, Praha.

GALBUSERA, P., VAN DONGEN, S., MATTHYSEN, E. (2004): Genetic equilibrium despite habitat fragmentation in an Afrotropical bird. *Molecular Ecology* 13: 1409-1421.

HE, L.-P., WAN, Q.-H., FANG, S.-G., XI, Y.-M. (2006): Development of novel microsatellite loci and assessment of genetic diversity in the endangered Crested Ibis, *Nipponia nippon*. *Conservation Genetics* 7: 157-160.

HILL, A., GREEN, M.C. (2010): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetics Resources* 3: 13-15.

HUANG, X., ZHOU, X., CHEN, M., FANG, W., CHEN, X. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservative Genetics* 11: 1211-1214.

HUDEC, K., ČERNÝ, W. (1973): Fauna ČSSR, svazek 19, Ptáci-Aves. Academia, Praha.

CHANG, Q., XIE, Z. (2009): Microsatellite loci developer for black-crowned night-heron (*Nycticorax nycticorax*) and their cross-amplifications in Ardeidae. *Conservative Genetics* 10: 1537-1539.

CHU-ZHAO L., GUANG-LI F., YONG-DE Z., RONG-BIN Q., HONG CH. (2005): Genetic polymorphism in a cultured population of the crested ibis *Nipponia nippon*. *Acta Zoologica Sinica* 51: 650-656.

JI, Y.-J., LIU, Y.-D., DING, C.-Q., ZHANG, D.-X. (2004): Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes* 4: 615-617.

KOVALIK, P., PAČENOVSKÝ, S., ČAPEK, M., TOPERCEN, J. (2010): Slovenské mená vtákov sveta. SOS/BirdLife Slovensko, Bratislava.

MCGUIRE, H.L., NOOR, M.A.F. (2002): Microsatellite loci for great white herons and great blue herons (Aves, Ardeidae, *Ardea herodias*). *Molecular Ecology Notes* 2: 170-172.

MILLER, M.J., YUAN, B.-Z. (1997): Semiautomated Resolution of Overlapping Stutter Patterns in Genomic Microsatellite Analysis. *Analytical Biochemistry* 251: 50-56.

NAVRÁTILOVÁ, J. (2009): Polymorfni DNA mikrosatelity u čápa černého (*Ciconia nigra*). Bakalářská práce, Dep. in Knihovna biologického centra Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

- OLIVEIRA, E. J., PÁDUA, J. G., ZUCCHI, M. I., VENCOVSKY, R. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294-307.
- PRIMMER, C.R., MOLLER, A.P., ELLEGREN, H. (1996): A wide survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5: 365-378.
- PRIMMER, C.R., PAINTER, J.N., KOSKINEN, M.T., PALO, J.U., MERILA, J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* 36: 348-360.
- QUING CH., FA-HUA C., LI-FENG Z., BAO-WEI Z., KAI-YA Z. (2005): Microsatellite variation and genetic diversity in the black-crowned night heron *Nycticorax nycticorax* in the lower reaches of Yangtze River. *Acta Zoologica Sinica* 51: 657-663.
- RELICHOVÁ J. (2001): Genetika populací. Masarykova Univerzita, Brno.
- SANTOS, M.S., GONÇALVES, E.C., BARBOSA, M.S.R., SILVA, A., SCHNEIDER, M.P.C. (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* - Threskiornithidae - Aves). *Molecular Ecology Notes* 6: 307-309.
- SAWYER, G.M., BENJAMIN, R.C. (2006): Isolation and characterization of microsatellite loci for parentage assessment in captive populations of roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*). *Molecular Ecology Notes* 6: 677-679.
- SLIKAS, B. (1997) Phylogeny of the avian family Ciconiidae (Storks) based on cytochrome b sequences and DNA-DNA hybridization distances. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8, 257-300.
- SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J. (2009): Genetika. Masarykova univerzita, Brno.

SHEPHARD, J.M., GALBUSERA, P., HELLEMANS, B., JUSIC, A., AKHANDAF, Y. (2009): Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European White Stork, *Ciconia ciconia*. *Conservation Genetics* 10: 1525-1528.

ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTUČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V. (2005): *Metody molekulární biologie*. Vydavatelství MU, Brno.

ŠŤASTNÝ, K., BEJČEK, V., HUDEC, K. (1998): *Svět zvířat IV. Ptáci (1)*. Albatros, Praha.

TOMASULO-SECCOMANDI, A.M., SCHABLE, N.A., BRYAN, A.L. JR., BRISBIN, I.L. JR., DEL LAMA, S.N., GLENN, T.C. (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes* 3: 563-566.

TÓTH, G., GÁSPÁRI, Z., JURKA, J. (2000): Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research* 10: 967-981.

VAN DEN BUSSCHE, R.A., HARMON, S.A., BAKER, R.J., BRYAN, A.L. JR., RODGERS, J.A. JR., HARRIS, M.J., BRISBIN, I.L. (1999): Low levels of genetic variability in North American populations of the Wood Stork (*Mycteria Americana*). *The Auk* 116: 1083-1092.

VESELOVSKÝ, Z. (2001): *Obecná ornitologie*. Academia, Praha

WANG, H., LOU, X., ZHU, Q., HUANG, Y., ZHOU, L., ZHANG, B. (2011): Isolation and Characterization of Microsatellite DNA Markers for the Oriental White Stork, *Ciconia boyciana*. *Zoological Science* 28: 606-608.

WEBER, J.L., MAY, P.E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *The American Journal of Human Genetics* 44: 388-396.

WILSON R., LAMBERT D., POKORNY V., WILSON A. (2008): Sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*) – Modern samples. Summer Studentship 2007/2008. Published online (awcmee.massey.ac.nz).

YEUNG, C.K.L, HSU, Y.-C., YAO, C.-T., LI, S.-H. (2009): Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) and amplification in other Ciconiiformes waterbirds. *Conservation Genetics* 10: 1081-1084.

ZANE, L., BARGELLONI, L., PATERNELLO, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.

ZIMA, J., MACHOLÁN, M., MUNCLINGER, P., PIÁLEK, P. (2004): Genetické metody v zoologii. Nakladatelství Karolinum, Praha.

