

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Bakalářská práce

Olomouc 2011

Barbora Manišová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů
pro determinaci paternity
u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*)**

Barbora Manišová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

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 1.8.2011

.....

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce RNDr. Petru Nádvoříkovi, Ph.D. za věnovaný čas a trpělivost v průběhu psaní bakalářské práce, za důležité připomínky a odbornou pomoc.

SOUHRN

Má bakalářská práce se skládala ze dvou částí. První částí bylo v podmínkách Laboratoře populační genetiky, Katedry buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci ověřit a zoptimalizovat PCR amplifikaci 37 mikrosatelitových lokusů, navržených pro plameňáka růžového Geracim *et al.* (2010), na 6 jedincích, pocházejících ze ZOO Liberec a ZOO Dvůr Králové nad Labem. U 36 mikrosatelitů byl potvrzen polymorfismus. Jeden mikrosatelitový lokus byl monomorfní. Průměrný počet alel na mikrosatelitový lokus byl 4,3 a počet alel se pohyboval od 2 do 8.

V druhé části jsem hledala nové mikrosatelitové lokusy, které by bylo možno použít pro analýzu paternity u plameňáka růžového. Aleš Drobek (2010) se ve své práci též zabýval hledáním primerů, které by amplifikovaly polymorfní mikrosatelitové lokusy u plameňáka růžového. Zjistil, že *cross-species* PCR amplifikace byla úspěšná u řádů brodiví (Ciconiiformes) a veslonozí (Pelecaniformes). V mé bakalářské práci jsem na něj navázala a testovala primery, které byly publikovány až po dokončení jeho práce.

Z celkového počtu 47 primerů jsem našla 5, které amplifikovaly polymorfní mikrosatelitové lokusy. Ty jsem dále optimalizovala změnou teploty *annealingu* u PCR a délky elektroforetické separace. Průměrný počet alel na mikrosatelitový lokus byl 3,6 a počet alel od 2 do 7.

SUMMARY

My bachelor thesis consisted of two parts. The first part was in term of Population Genetics Laboratory, Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky Univerzity in Olomouc, verify and optimize the PCR amplification of 37 microsatellite loci designed for Greater Flamingo by Geraci *et al.* (2010), to 6 individuals, originating from ZOO Liberec and ZOO Dvůr Králové nad Labem. For 36 microsatellites polymorphism was confirmed. One microsatellite locus was monomorphic. The average number of alleles per microsatellite locus was 4.3 and number of alleles ranged 2 to 8.

In the second part, I was looking for new microsatellite loci, which could be used for paternity analysis for Greater Flamingo. Aleš Drobek (2010) in his thesis also dealt with the search of primers, which should amplified polymorphic microsatellite loci for Greater Flamingo. He found, that *cross-species* amplification was successful in Ciconiiformes and Pelecaniformes. In my bachelor thesis I was followed and tested the primers, which were published after the completion of his study.

Of the 47 primers, I found 5 amplifying polymorphic microsatellite loci. Those I further optimized by changing the *annealing* temperature for PCR and electrophoretic separation length. The average number of alleles per microsatellite locus was 3.6 and number of alleles ranged 2 to 7.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. CÍLE PRÁCE	8
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
3.1. Řád plameňáci (Phoenicopteriformes)	9
3.1.1. Plameňák růžový (<i>Phoenicopterus roseus</i>)	10
3.1.2. Zařazení plameňáka růžového do systému	11
3.2. Repetitivní DNA	12
3.2.1. Minisatelity	14
3.2.2. Mikrosatelity	14
3.2.3. Analýza mikrosatelitů pomocí PCR	16
3.2.3.1. Primery pro PCR	17
3.2.3.2. Elektroforetická separace produktů PCR	18
3.2.3.3. Problémy při analýze produktů PCR	18
3.2.3.3.1. <i>Stutter</i> bandy	18
3.2.3.3.2. Nulové alely	19
3.2.3.3.3. Homoplazie alel	20
3.2.4. Mikrosatelity v ornitologii	20
4. MATERIÁL A METODY	23
4.1. Biologický materiál	23
4.2. Hledání vhodných mikrosatelitových markerů pro plameňáka růžového..	23
4.3. PCR amplifikace DNA	25
4.4. Analýza PCR produktů	26
4.5. Použité chemikálie	28
4.6. Použité roztoky	29
4.7. Použité laboratorní přístroje	31
5. VÝSLEDKY	32
6. DISKUZE	37
7. ZÁVĚR	44
8. SEZNAM ZKRATEK	45
9. POUŽITÁ LITERATURA	46

1. ÚVOD

Mikrosatelity jsou krátké úseky DNA s velikostí motivu 1 – 6 párů bází. Po genomu jsou rovnoměrně rozšířeny. Jsou charakteristické vysokou mutační rychlostí. Typický je pro ně vysoký stupeň délkového polymorfizmu. Mikrosatelity se účastní regulace genové exprese. V současné době se hojně používají v laboratorní praxi, jelikož jsou vysoce účinnými genetickými markery. Využívají se v populačních studiích, při studiu fylogenetické příbuznosti či určování paternity. Pro získání nových mikrosatelitových lokusů se využívají dvě metody. Buď izolace mikrosatelitů *de novo* s využitím genomických knihoven nebo *cross-species* PCR amplifikace s využitím primerů primárně navržených pro příbuzné druhy.

Pro druh plameňák růžový (*Phoenicopterus roseus*) bylo navrženo 37 párů primerů, jež amplifikovaly polymorfní mikrosatelitový lokus.

Ve své bakalářské práci se zabývám optimalizací podmínek PCR a elektroforetické separace 37 párů primerů u 6 jedinců ze ZOO Liberec a ZOO Dvůr Králové nad Labem. Dále hledáním vhodných primerů, jež by amplifikovaly polymorfní mikrosatelitové lokusy u plameňáka růžového, pocházejících od fylogeneticky příbuzných druhů z řádů brodiví (Ciconiiformes) a veslonozí (Pelecaniformes).

2. CÍLE PRÁCE

1. Shromáždit dostupné literární zdroje a vypracovat literární rešerši na téma bakalářské práce.
2. Ověřit polymorfismus 37 mikrosatelitů, publikovaných pro druh plameňák růžový (*Phoenicopterus roseus*), na šesti jedincích tohoto druhu.
3. Provést PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů s využitím *cross-species* primerů, které jsou známe od taxonomicky příbuzných druhů ptáků, za účelem zjištění jejich polymorfizmu u plameňáka růžového.
4. U zjištěných polymorfních mikrosatelitů provést optimalizaci parametrů PCR amplifikace a času separace PCR produktů v denaturujícím 6% polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Řád plameňáci

Řád plameňáci (Phoenicopteriformes) je velmi starobylý s fosilními pozůstatky pocházejícími z oligocénu přibližně před 34 až 23 miliony let. Dříve byly považovány za nejbližší příbuzné řady brodiví a vrubozobí (del Hoyo *et al.*, 1992), avšak nejnovější výzkumy DNA dokázaly nejbližší příbuznost s řádem potápky (Tuinen *et al.*, 2001; Mayr, 2004).

Řád plameňáci zahrnuje pouze jednu čeleď plameňákovití (Phoenicopteridae). Do čeledi se řadí 3 rody *Phoeniconaias*, *Phoenicoparrus* a *Phoenicopterus*. Do rodu *Phoeniconaias* je řazen plameňák malý (*Phoeniconainas minor*), do rodu *Phoenicoparrus* druhy plameňák andský (*Phoenicoparrus andinus*) a plameňák jamesův (*Phoenicoparrus jamesi*), do rodu *Phoenicopterus* druhy plameňák růžový (*Phoenicopterus roseus*), plameňák karibský (*Phoenicopteru ruber*) a plameňák chilský (*Phoenicopterus chilensis*) (Anonymous, 2003).

V rámci jednotlivých autorů se ale toto zařazení do systému liší. V některých systémech jsou druhy *P. ruber* a *P. chilensis* spojeny do 1 druhu s *P. roseus*, popř. považovány za jeho poddruhy (Anonymous, 2007a).

Řád plameňáci zahrnuje velké brodivé ptáky, kteří se vyskytují v mělkých, slaných vodách, popřípadě mohou obývat i vody brakické (Svensson *et Grant*, 2004). Výrazným prvkem těla je dlouhý krk, který je v poměru k tělu nejdelším v rámci třídy Aves. Krk se skládá ze 17 obratlů a je zakončen malou hlavou se zobákem, zahnutým téměř do pravého úhlu. Tvarovaný zobák je na obou částech pokryt tenkými, rohovitými lamelami, jimiž je opatřen také jazyk (Gaisler *et Zima*, 2007). Tento tvar vznikl důsledkem specifického způsobu života a přijímání potravy. Na rozdíl od ostatních zástupců Aves se jejich zobák pohybuje opačně. Zatímco u ostatních je vrchní část zobáku víceméně pevná a spodní se pohybuje, u plameňáků je tomu obráceně (Bouchner, 1972).

Při přijímání potravy stojí ve vodě s hlavou skloněnou a horní strana zobáku směřuje dolů. Nasávají vodu s bahnem a procezuji potravu (řasy, koryše, atd.) (Gaisler *et Zima*, 2007). Zajímavostí také je, že mláďata mají při narození zobák rovný a k charakteristickému zakřivení dochází až v prvních měsících života. Velikost jejich

těla se pohybuje v rozmezí 1-1,5 metru s hmotností 1,5 - 4,1 kilogramů. Mají velká slepá střeva a rudimentární penis (Gaisler *et* Zima, 2007). Plameňáci jsou schopni urazit za potravou velké vzdálenosti a to až 500 kilometrů.

Plameňáci se vyznačují dlouhými končetinami, které mají 3 prsty, spojené plovací blánou, palec je redukován (Gaisler *et* Zima, 2007). Křídla bývají dlouhá a špičatá, s rozpětím až 1,6 metru.

Plameňáci se žíví hlavně korýši, jenž v těle obsahují karotenoidy. Ty jsou příčinou různě intenzivního růžového či oranžového zbarvení jedinců (Burnie *et al.*, 2008).

Plameňáci se samostatně vyskytují velmi málo. Většinou vytvářejí kolonie o několika stech až tisících jedincích. Některé druhy jsou tažné, např. plameňák růžový. Jsou monogamní a páry spolu vydrží celý život. Pohlavní dospělosti dosahují plameňáci ve věku 4 - 6 let.

Hnízda si stavějí v mělkých vodách či na plochých březích. Stavebním materiálem je zejména bahno s vodními rostlinami, které nechají ztuhnout. Hnízdo je asi 30-40 centimetrů vysoké. Samice klade jedno vejce (dvě jsou vzácností), ze kterého se mládě líhne po 30 až 32 dnech. O mládě se starají oba rodiče, kdy jej krmí tekutým výměškem z volete. Přibližně po jednom týdnu mláďata hnízdo opouštějí a sdružují se do „školek“. Rodiče své potomky rozeznávají dle hlasu. Mláďata se sama žíví přibližně po osmi až jedenácti týdnech po narození.

Plameňáci obývají oblasti v Evropě, Asii i Africe. Volně v přírodě se nevyskytují ve východní Asii a Austrálii.

Volně v přírodě žijící plameňáci se dožívají kolem 20 let, v zajetí může toto číslo stoupnout až na 50 let.

3.1.1. Plameňák růžový (*Phoenicopterus roseus*)

Plameňák růžový (obr. 1 a 2), je největším zástupcem čeledi Phoenicopteridae. Jeho zbarvení je nezaměnitelné od ostatních. Jak samice, tak i samec mají tělo růžově zbarvené s červenými křídelními krovkami, ohraničené černými letkami. Zbarvení je patrné jak za letu, tak i při odpočinku. Zobák bývá z velké části zbarvený červeně a charakteristická černá barva se objevuje jen na jeho špičce (Svensson *et* Grant, 2004). Dlouhé nohy mají celé růžové, bez červených kloubů. Samice dosahuje menšího vzrůstu

než samec. V juvenilním stadiu jsou špinavě bílí s křídly zbarvenými do šedohnědé barvy. Zobák je šedý stejně jako nohy.

Plameňák růžový se dožívá vysokého věku. Nejstarší doložený zástupce se ve volné přírodě dožil 33 let, v zajetí dokonce 44 let (Burnie *et al.*, 2008).

Plameňák růžový je charakteristický skřehotavými zvuky, troubivými tóny i hlubším bručením. Za letu drží tělo ve zcela natažené poloze, kdy jsou nohy, trup i krk v jedné linii (Svensson *et Grant*, 2004).

Plameňák růžový se v zoologických zahradách v České republice vyskytuje zcela běžně, např. v zoologické zahradě v Lešné u Zlína bylo v roce 2009 22 samců a 24 samic. V roce 2009 bylo odchováno 6 mláďat (Anonymous, 2009).

3.1.2. Zařazení plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) do systému:

➤ Říše	Animalia
➤ Podříše	Eumetazoa
➤ Oddělení	Bilateria
➤ Pododdělení	Deuterostomia
➤ Kmen	Chordata
➤ Podkmen	Vertebrata
➤ Nadtřída	Tetrapoda
➤ Třída	Aves
➤ Podtřída	Ornithurae
➤ Nadřád	Neognathae
➤ Řád	Phoenicopteriformes
➤ Čeleď	Phoenicopteridae
➤ Rod	<i>Phoenicopterus</i>
➤ Druh	<i>Phoenicopterus roseus</i>

Zdroj: Anonymous (2007b)

Obr.1, 2: Zástupci druhu plameňák růžový ze ZOO v Lešné u Zlína.



3.2. Repetitivní DNA

Chromozomy eukaryot obsahují mnohokrát se opakující sekvence DNA, které se v haploidní sadě chromozomů mohou někdy i milionkrát opakovat. DNA, obsahující takové opakované sekvence, se nazývá repetitivní a představuje hlavní součást (15 – 80 %) eukaryotických genomů (Snustad *et* Simmons, 2009). Většina z této repetitivní DNA nekóduje proteiny a lze ji rozdělit do dvou typů na tandemové (satelity) a rozptýlené repetic (mobilní genetické elementy).

Převážnou část repetitivní DNA tvoří sekvence, které nejsou uspořádány tandemově, ale jsou rozšířeny po celém genomu (Alberts *et al.*, 1998). Mluvíme o transponovatelných genetických elementech, které se mohou v rámci genomu přemísťovat z jednoho místa na jiné (Snustad *et* Simmons, 2009). Délka úseku se pohybuje v rozmezí sto až sto tisíc párů bází. Kopie nejsou identické, nicméně jsou si velmi podobné. Většinu rozptýlených repetic tvoří transpozony. Transpozony se nikdy nevyskytují samostatně a jejich pohyb se uskutečňuje pomocí transpozice, kdy je úsek DNA vyštěpen a vložen do jiného místa v genomu. Díky transpozici se mohou určité geny rozptýlit po celém genomu a dostat se tak do míst, kde se předtím geny tohoto typu nevyskytovaly. Transpozony mohou ovlivňovat i genovou expresi snížením či zvýšením produkce určitého proteinu (Campbell *et* Reece, 2006).

Přibližně jednu třetinu repetitivní DNA tvoří vysoce repetitivní krátké sekvence, které vytvářejí série oblastí repeticí DNA, známé jako satelitní DNA (Alberts *et al.*,

1998). Tyto vysoce repetitivní sekvence nepodléhají transkripci (Snustad *et* Simmons, 2009). Jejich funkce není zatím objasněna. Shlukují se převážně v oblasti centromer a na koncích chromozomů. V rámci stejného druhu se jednotliví členové od sebe v přesném uspořádání satelitních DNA velmi liší (Alberts *et al.*, 1998).

Tandemové repetice tvoří po sobě jdoucí identické nebo téměř identické jednotky. Jelikož se ovšem tyto repetice velmi rozrůžňují v délce jednotky či celé repetice, je velmi obtížné je klasifikovat. Největší repetice, které se skládají z relativně dlouhých jednotek, nazýváme satelity (Liška *et al.*, 2006). Nukleotidové složení tandemově repetitivní DNA bývá dostatečně odlišné od zbytku buněčné DNA, čímž získá odlišnou hustotu, což umožňuje její izolaci diferenční ultracentrifugací. Pokud je genomová DNA naštěpena před centrifugací, rozdělí se pak jednotlivé úseky o podobné délce do různých částí centrifugační zkumavky (Campbell *et* Reece, 2006). Většina DNA vytvoří jednotný proužek, ale fragmenty se signifikantně odlišným obsahem CG/AT, způsobeným například rozsáhlými monotónními repeticemi, tvoří méně intenzivní přídatné „satelitní“ proužky (Liška *et al.*, 2006). Velký podíl z běžné satelitní DNA se vyskytuje na telomerách či centromerách, což poukazuje na její zásadní úlohu pro chromozomy (Campbell *et* Reece, 2006). Z mnoha satelitů, nacházejících se v oblasti centromer, tvoří rodina alfa – satelitu (primární jednotka 171 bp) zřejmě funkční jádro centromery, neboť je významná pro poskládání kinetochoru během buněčného dělení, jelikož se některé proteiny na alfa – satelit v centromeře váží a zahajují tak sestavení kinetochoru (Liška *et al.*, 2006).

Řada genetických poruch je způsobena abnormálně dlouhými úseky tandemově repetitivních nukleotidových tripletů uvnitř zasaženého genu. Mezi nejznámější poruchy patří syndrom fragilního chromozomu X, kdy v normální alele genu, uvnitř 5' nepřekládané vedoucí oblasti počátečního exonu, je triplet CGG opakován přibližně třicetkrát. Pokud je ovšem gen pro fragilní chromozom X degenerován, opakuje se stejný triplet sto až tisíckrát a vytváří křehké (fragilní) místo. Všechny z dosud stanovených poruch, spojených s tripletovými repeticemi, zasahují nervový systém a ve všech případech se počet opakování zdá být přímo úměrný věku a závažnosti nemoci (Campbell *et* Reece, 2006). Běžná satelitní DNA se vyskytuje v rozpětí sto tisíc až deset milionů bp, existují ovšem i kratší repetitivní DNA, které označujeme jako minisatelitní (v celkové délce sto až sto tisíc párů bází) popř. mikrosatelitní (celková délka deset až sto párů bází), v závislosti na délce fragmentů (Campbell *et* Reece, 2006).

3.2.1. Minisatelity

Pojmem minisatelity označujeme kratší tandemové repetice o celkové velikosti 100 – 100 000 bp (Campbell *et* Reece, 2006). Velikost opakující se jednotky je maximálně 50 bází (Bennett, 2000). Vyskytují se v subtelomerických oblastech chromozomů.

Minisatelitní DNA můžeme rozdělit do dvou typů na telomerickou a hypervariabilní (Bennett, 2000). Telomerická je na konce telomer přijována pomocí telomerázy. Její funkcí je chránit konce před degradací a poskytnout prostředky pro kompletní replikaci telomerních sekvencí. Obvykle jsou vysoce polymorfnní co do počtu opakování jednotky repetice (mnoho alel v populaci). Hypervariabilní minisatelitová DNA bývá také označována jako VNTR neboli variable number of tandem repeats (= variabilní množství tandemových repetice). Sekvence jsou ovšem příliš dlouhé pro amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí a proto se k jejich identifikaci používá metoda Southern blotting s následnou hybridizací na membráně (Liška *et al.*, 2006). Minisatelitní DNA se v současnosti využívá jako sonda pro multilokusový DNA fingerprinting.

3.2.2. Mikrosatelity

Mikrosatelitní DNA je složena z krátkých úseků s jednotkou repetice o velikosti 1 – 6 bází. Vyskytuje se u prokaryot i eukaryot včetně člověka a to jak v kódující, tak nekódující oblasti (Zima *et al.*, 2004). Mikrosatelity jsou v genomu člověka rozšířeny více méně rovnoměrně. S rostoucí velikostí repetitivní jednotky klesá jejich celkový počet (Bennett, 2000). Mikrosatelity jsou charakteristické vysokou mutační rychlostí.

Mikrosatelity se, vzhledem k jejich struktuře, nazývají 2 synonymními názvy, buď krátké tandemové repetice – STR (= short tandem repeats) či repetice jednoduchých sekvencí – SSR (= simple sequence repeats) (Zima *et al.*, 2004). Typický je vysoký stupeň délkového polymorfizmu (Zane *et al.*, 2002). Ten je pravděpodobně způsoben zejména sklouznutím nukleotidového řetězce („replication slippage“) v průběhu replikace.

Nejčastěji se vyskytujícím motivem u člověka je sekvence poly(A)/poly(T). Ty jsou ovšem velice nestabilní při polymerázové řetězové reakci, což může způsobit i nemožnost stanovit velikost alel a tedy jejich nevhodnost pro populační studie.

Nejfrekventovanějšími motivy u člověka jsou dinukleotidové, zejména AC/TG. Dále trinukleotidové (hlavně AAT a CAG) a tetranukleotidové.

Mikrosatelity jsou v současnosti velmi využívané v laboratorní praxi díky mnoha benefitům, zejména vysoké proměnlivosti, jež z nich dělá vysoce účinné genetické markery, dále vysoké četnosti a přítomnosti v celém genomu, jednoduchosti analýzy a díky spojení s PCR i možnosti studia dávno vymřelých druhů organismů (Zane *et al.*, 2004; Zima *et al.*, 2004).

V současnosti se hromadí důkazy o zapojení mikrosatelitů v regulaci genové exprese. Promotory, které obsahují mikrosatelity (i mikrosatelity samotné), mohou sloužit jako zesilovače. Naopak delece v oblasti mikrosatelitu může vést k redukci tvorby proteinů. Některé mikrosatelity též váží řadu specifických regulačních proteinů.

Změna v délce mikrosatelitních sekvencí může způsobit změny ve fyziologii či ontogenetickém vývoji na úrovni organismu (Zima *et al.*, 2002). U některých prokaryot se můžeme setkat s pohotovostními („contingency“) geny. Tyto geny jim umožňují vyrovnat se s enviromentálními změnami. Např. bakterie *Neisseria gonorrhoeae* má přibližně tucet genů, které jí umožní překonat imunitní systém. Tyto geny kódují proteiny vnější membrány a každý obsahuje nestabilní pentanukleotidové repeticce. Změny v počtu kopií mikrosatelitů způsobí změnu ve čtecím rámci a geny se stanou neaktivní, což způsobí, že v jedné generaci jsou aktivní pouze některé geny. Geny se předávají z generace na generaci a mění se jejich aktivita. To umožňuje neustálou změnu antigenního systému a možnost překonání imunitního systému hostitele (Bennett, 2000).

Nevýhodou mikrosatelitů je nutnost izolovat jednotlivé lokusy pro nově zkoumané druhy *de novo*, díky umístění mikrosatelitů v nekódujících oblastech genomu, typických vysokou sekvencí nukleotidových substitucí (Zane *et al.*, 2004). Při takové izolaci se využívá genomických knihoven (Zane *et al.*, 2004). Jinou metodou pro získání nových mikrosatelitových lokusů pro nově zkoumané druhy je amplifikace mikrosatelitových lokusů pomocí *cross-species* PCR (Primmer *et al.*, 1996). Produkty PCR jsou následně elektroforeticky separovány. Tato metoda je oproti izolaci *de novo* levnější avšak méně úspěšná. Další jejich nevýhodou je to, že primery pro *cross-species* PCR amplifikaci nejsou univerzální a nedají se využít pro široké spektrum druhů (Primmer *et al.*, 2005).

3.2.3. Analýza mikrosatelitů pomocí PCR

Polymerázová řetězová reakce (*polymerase chain reaction*) je jednoduchá technika, která umožňuje mnohonásobné zmnožení nukleotidové sekvence DNA, ohraničené dvěma primery. Množství DNA v původním vzorku může být i extrémně malé.

Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin, což je základní proces živých organismů (Šmarda *et al.*, 2005). Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků ds DNA ve směru od 5' konce ke 3' konci a to prostřednictvím DNA polymerázy (Šmarda *et al.*, 2005). Na počátcích používání techniky PCR při tepelné degradaci DNA docházelo i k degradacím DNA polymeráz a bylo je nutné dodávat opakovaně při každém cyklu. Proto byla zavedena nová DNA polymeráza, izolovaná z termofilních gramnegativních bakterií *Thermus aquaticus*, k jejíž denaturaci nedocházelo ani při vyšších teplotách užitých při PCR. Tato polymeráza získala název dle uvedené bakterie *Thermus aquaticus* – *Taq* polymeráza (Zima *et al.*, 2004).

Charakteristickou vlastností DNA polymeráz je rozpoznání ss DNA jako matrice (templát) a zároveň navázání se na deoxyribonukleozidtrifostáty (dNTP). Pokud je na jednořetězcovou DNA navázán krátký oligonukleotid (RNA či DNA primer), pak se příslušná polymeráza naváže těsně za tento segment a s využitím energie z vazeb v trifosfátech (dNTP) katalyzuje syntézu komplementárního nukleotidového řetězce (Zima *et al.*, 2004). Studovaný nukleotidový úsek je vymezen dvěma primery připojenými na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě.

Polymerázová řetězová reakce je proces, kdy se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídá proces denaturace, nasednutí primerů a prodlužování primerů prostřednictvím DNA-polymerázy a to většinou 20 – 40x.

Zahřátím ds DNA na teplotu přesahující 90 °C (obvykle 92 - 95 °C) se denaturuje a fragmenty dvouřetězcové DNA disociují na jednotlivé řetězce (Zima *et al.*, 2004) neboli dojde k rozrušení vodíkových můstků v DNA a rozvolnění dvoušroubovice. Vznikne tak ss DNA, na kterou mohou v následujícím kroku nasednout primery. Pokud jsou oba primery v reakční směsi přítomny ve velkém množství, budou s nimi po snížení teploty na 45 - 60 °C jednotlivé řetězce reasociovat. Díky tomu, že jsou primery velmi krátké a ve velkém množství, nasednou na ss DNA rychleji než komplementární vlákno, což vede ke kroku třetímu, kdy při teplotě 72 °C

(optimální teplota *Taq* polymerázy) jsou nové řetězce syntetizovány podle matricové sekvence. Matricová sekvence je následně kopírována v několika po sobě jdoucích cyklech, kdy se v každém z nich počet kopií zdvojnásobí, protože vytvořené fragmenty slouží dále jako matrice a počet kopií DNA geometricky narůstá (2^n , n = počet cyklů). Teoreticky bychom po 35 cyklech dostali 2^{35} kopií. V praxi je takový výsledek ovšem nereálný, jelikož se DNA polymeráza postupně degraduje. Nabízející se předpoklad, že čím více opakování, tím lépe, nemusí být vždy platný, zejména v případě vysokých nároků na přesnost amplifikace či je-li amplifikovaný segment dlouhý a pravděpodobnost chybného zařazení nukleotidu je vyšší (Zima *et al.*, 2004).

Polymerázová řetězová reakce probíhá v zařízení zvaném termocyklér, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech.

Pro PCR jsou jako zdroj DNA často používány různé biologické materiály, např. extrakty z krve, tělní kultury mikroorganismů, buňky tkáňových kultur, apod. Výsledným produktem PCR jsou amplikony – úseky deoxyribonukleové kyseliny definované délky o velikosti desítek až tisíců párů bází (Šmarda *et al.*, 2005).

3.2.3.1. Primery pro PCR

Základním předpokladem pro úspěšnou PCR je správná volba primerů, při které je třeba držet se určitých pravidel. Velmi důležitá je délka jednotlivých primerů. Za optimální se považují primery dlouhé 17 až 25 bází. Výjimečně může být jejich délka až 80 bp. Pokud jsou ovšem primery příliš dlouhé a nepurifikované, počet nesprávně zařazených bází do oligonukleotidu se může zvyšovat. Většinou vážnější problémy nenastanou, avšak v některých problematictějších případech může dojít i k selhání PCR. Za optimální se obsah C a G bází doporučuje přibližně 50 – 60 % (Zima *et al.*, 2004). Primery musí být chemicky syntetizovány a proto může být PCR použita jen pro klonování DNA, u které známe alespoň počáteční a konečnou sekvenci (Campbell *et* Reece, 2006).

Primery musí být komplementární ke známým sekvencím ohraničujícím oblast zájmu, aby mohla být ve zkumavce zahájena enzymatická amplifikace části DNA mezi těmito sekvencemi (Snustad *et* Simmons, 2009). Primerová sekvence by neměla obsahovat repetitivní sekvence, pro vyloučení přisednutí primeru ve více různých místech zároveň (Zima *et al.*, 2004).

Forward i reverse primer by neměly být komplementární vůči sobě navzájem. Mohla by pak vzniknout mezi nimi vazba, což by při PCR mohlo způsobit tvorbu artefaktů. Zásadní pro průběh celé reakce je, aby teplota, při níž primery nasedají na templát, byla pro oba primery obdobná (Zima *et al.*, 2004).

3.2.3.2. Elektroforetická separace produktů PCR

Produkty PCR jsou v současnosti nejčastěji hodnoceny formou elektroforetické separace, kdy se záporně nabitě ionty pohybují od anody ke katodě. Tento pohyb probíhá v případě nukleových kyselin v gelech, které mohou být buď agarózové nebo polyakrylamidové. Agarózové gely jsou využívány pro separaci větších segmentů (cca 100 – 50 000 bp), zatímco gely polyakrylamidové se využívají pro separaci segmentů o maximální délce 1000 bp. Obecně platí, že čím větší molekula, tím se v gelu pohybuje pomaleji. Jednotlivé segmenty se tak seřadí od nejdelších po nejkratší. Pro vyhodnocení je ovšem potřeba je vizualizovat. V současnosti se k tomu využívají nejčastěji fluorescenční barviva (např. ethidium bromid) v případě gelů agarózových či dusičnan stříbrný v případě gelů polyakrylamidových.

3.2.3.3. Problémy při analýze produktů PCR

Analýza PCR produktů může být zkomplikována či úplně znemožněna několika faktory. Nejčastěji se jedná tzv. *stutter* bandy, nulové alely či alelovou homoplazii.

3.2.3.3.1. *Stutter* bandy

Stutter bandy jsou častým jevem, vyskytujícím se při analýzách, využívajících elektroforetické separace. Jedná se o bandy, které i v několika kopiích doprovázejí band hlavní a bývají o 2 a více nukleotidů kratší (Walsh *et al.*, 1996). Nejčastěji vznikají v průběhu replikace v důsledku sklouznutí DNA polymerázy (tzv. *slippage*). *Stutter* bandy jsou nejčastěji pozorovány u lokusů s dinukleotidovou jednotkou repetice. Nejčastěji se u nich vyskytují *stutter* bandy kratší o 2 báze než band hlavní, viditelné jsou ovšem i *stutter* bandy kratší o 4 i 6 bází. Díky tomu může být interpretace dinukleotidových lokusů komplikovaná, zejména jedná-li se o vzorky DNA, jež jsou směsí ze 2 či více individuí, popřípadě podobají-li se alely stejného jedince velikostí.

Nejlépe hodnotitelné jsou lokusy tetranukleotidové. U nich nalzááme pouze jeden *stutter* band, který je kratší o 4 báze než band hlavní a jeho intenzita nedosahuje ani 10% intenzity hlavního bandu. Díky tomu jsou tetranukleotidové lokusy studovány jako potenciální forenzní markery DNA (Walsh *et al.*, 1996). Dosud nebyly nalezeny žádné metody, které by umožnily *stutter* bandy eliminovat, pouze se mohou využít jiné druhy DNA polymeráz, které alespoň umožní snížit jejich množství v daném PCR produktu.

3.2.3.3.2. Nulové alely

Dakin *et Avice* (2004) definují nulové alely, jako alely, které nemůžeme úspěšně detekovat pomocí PCR amplifikace. Jejich vznik zapříčiňují bodové mutace v oblastech, které obklopují mikrosatelitovou sekvenci. Tyto oblasti nazýváme též „*flanking regions*“. Díky mutaci je primeru znemožněno nasednout na řetězec templátové DNA a daná alela se neamplifikuje (Dakin *et Avice*, 2004; Chapuis *et Estoup*, 2006). Nulové alely mohou vznikat i během PCR amplifikace, kdy primery nasednou správně, avšak v průběhu dojde ke sklouznutí (tvz. *slippage*) polymerázy (Chapuis *et Estoup*, 2006).

Pokud se odlišně amplifikují alely lišící se délkou řetězce, tak se díky kompetitivní povaze PCR amplifikují přednostně kratší alely (Wattier *et al.*, 1998). V tomto případě pak u heterozygotního jedince může dojít k tomu, že je detekována jen alela kratší a jedinec se jeví jako homozygotní (Dakin *et Avice*, 2004). Nulové alely, které jsou způsobeny odlišnou amplifikací, nazýváme též jako alely částečně nulové („*partial nulls*“), jelikož je můžeme zviditelnit např. větším množstvím templátové DNA, popřípadě nastavením kontrastu (Dakin *et Avice*, 2004).

V současnosti jsou nulové alely detekovány pomocí počítačových programů, díky nimž je možno stanovit odchylku od Hardy – Weinbergovy rovnováhy (Jones *et Arden*, 2003). Musíme ovšem nejprve vyloučit biologické faktory, díky kterým by došlo také k narušení Hardy – Weinbergovy rovnováhy např. imbreeding či Wahlundův efekt (Dakin *et Avice*, 2004).

Mikrosatelity jsou hojně využívány při paternitních studiích. Spolehlivost při určení paternity však může být narušena právě přítomností nulových alel. Heterozygotní rodič s nulovou alelou je detekován jako homozygotní bez nulové alely a může být následně z okruhu možných biologických otců vyloučen (Jones *et Arden*, 2003).

Detekce nulových alel je velice důležitá při populačních studiích. Nulové alely mohou způsobit, že pozorovaná heterozygotnost klesá, navzdory předpokládaným hodnotám, vykazujících Hardy – Weinbergovu rovnováhu. Nulové alely je možno detekovat pomocí sekvenace krajních oblastí, dotýkajících se z obou stran mikrosatelitového lokusu u alel s podezřením na přítomnost nulové alely a porovnáním výsledku se homologí sekvencí, u které se nulová alela nevyskytuje (Chapuis *et Estoup*, 2006).

3.2.3.4. Homoplazie alel

Homoplazie je definována jako zdánlivá podobnost, maskující evoluční odlišnost. Po stránce molekulární se jedná o stav, kdy odlišné kopie jednoho lokusu jsou identické co do sekvence, avšak původem se liší.

Výskyt homoplazie je spojen se způsobem, jakým vznikají nové mutace, a rychlostí jejich vzniku (Angers *et al.*, 2000). Homoplazie představuje velkou překážku při tvorbě fylogenetických stromů.

Angers *et al.* (2000) rozdělují homoplazické alely na 2 skupiny. Některé alely se mohou shodovat v délce sekvence, avšak v motivu sekvence se liší. Tento druh homoplazických alel může být detekován pomocí sekvenace. V druhém případě se alely shodují nejen délkou ale i motivem sekvence. Jejich detekce je mnohem složitější a prakticky se mohou získat jen studiem již dříve zdokumentovaných mutací.

Celkově homoplazie nepředstavuje pro genetické analýzy žádný signifikantní problém. Estoup *et al.* (2002) publikovali ve své studii tvrzení, že velká míra variability mikrosatelitových lokusů vysokou měrou kompenzuje jejich homoplazickou evoluci. Za předpokladu, že by míra mutací byla vysoká a jednalo se o velkou populaci s malou velikostí alel, by homoplazie ovšem problém představovat mohla (Estoup *et al.*, 2002).

3.2.4. Mikrosatelity v ornitologii

V současnosti se mikrosatelity čím dál více využívají při fylogenetických a paternitních studiích. Využitím mikrosatelitů v ornitologii se zabývali Primmer *et al.* (1996), kteří provedli *cross-species* PCR amplifikaci u 48 různých druhů ptáků, s použitím primerů odvozených od lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*) a vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*). Primmer *et al.* (1996) v této studii uvedli skutečnost, že čím

větší je fylogenetická vzdálenost mezi jednotlivými druhy, tím je polymorfismus jednotlivých mikrosatelitových lokusů menší. Díky tomu se mikrosatelity mohou využívat při fylogenetických studiích.

Mikrosatelitové lokusy u plameňáka růžového již studovali Geraci *et al.* (2010). Ti izolovali 37 mikrosatelitových lokusů pro plameňáka růžového. Počet alel se pohyboval od 2 do 33, s průměrem 7,32 alel na mikrosatelitový lokus.

Kapil *et al.* (2010) se zabývali studiem mikrosatelitových lokusů u příbuzného druhu plameňáka karibského. Izolovali 9 mikrosatelitových lokusů. Počet alel byl v rozmezí od 3 do 14, s průměrem 8,56 alel na lokus.

Drobek se ve své bakalářské (2008) a následně diplomové práci (2010) zaměřil na hledání mikrosatelitových lokusů u plameňáka růžového, pomocí *cross-species* PCR, s využitím primerů odvozených od fylogeneticky různě příbuzných řádů. Celkem testoval 284 párů primerů, odvozených od 26 zdrojových druhů, ze kterých většina patřila do řádů brodiví a veslonozí. Nalezl 29 párů primerů, amplifikujících polymorfni mikrosatelitové lokusy u druhu plameňák růžový. Tyto páry primerů byly odvozeny od druhů z řádů brodiví, dlouhokřídlí a veslonozí.

Jako nejúspěšnější v amplifikaci polymorfních lokusů určil primery, odvozené od druhů z řádu veslonozí. Úspěšnost amplifikace u nich byla 13,67 %. Z 18 párů primerů, odvozených od druhu fregatka obecná, amplifikovaly polymorfni mikrosatelitové lokusy u plameňáka růžového 4 páry. Z 19 párů primerů, odvozených od pelikána bílého a pelikána severoamerického, amplifikovaly polymorfni lokusy u plameňáka růžového 3. Dva byly primárně navrženy pro pelikána bílého a jeden pro pelikána severoamerického. U plameňáka růžového bylo testováno i 41 párů primerů, primárně izolovaných pro tereje guánového, tereje červenonohého a tereje modronohého. Z toho počtu amplifikovaly u plameňáka růžového 4 páry primerů polymorfni mikrosatelitové lokusy. 3 pocházely od tereje modronohého, 1 od tereje červenonohého. Primery odvozené od tereje guánového u plameňáka růžového neamplifikovaly žádné polymorfni mikrosatelitové lokusy. Z 39 párů primerů, odvozených od kormorána galapážského, kormorána ušatého a kormorána velkého, 5 párů amplifikovalo polymorfni mikrosatelitové lokusy u plameňáka růžového. 3 pocházely od kormorána galapážského, 1 od kormorána ušatého a 1 od kormorána velkého.

Úspěšnost amplifikace polymorfních lokusů u druhů z řádu brodiví byla 8,75 %. Ze 35 párů primerů, primárně navržných pro volavku velkou a volavku žlutozobou,

amplifikovalo polymorfní lokusy u plameňáka růžového 5 párů. 4 pocházely od volavky žlutozobé, 1 od volavky velké. U plameňáka růžového testoval Drobek (2010) 24 párů primerů, primárně navržených pro ibise čínského. Z tohoto počtu amplifikovaly polymorfní lokusy 2 páry. Z 15 párů primerů, odvozených od nesyta lesního, amplifikoval polymorfní lokus u plameňáka růžového pouze 1. Jeden pár primerů, amplifikující polymorfní lokus u plameňáka růžového, byl nalezen i u 13 párů primerů, původně izolovaných pro čápa bílého. Z 23 párů primerů, izolovaných pro kolpíka malého, amplifikovaly polymorfní lokusy u plameňáka růžového 3 páry.

Drobek (2010) testoval na plameňákovi růžovém 2 páry primerů, odvozených od alkounka drobného z řádu dlouhokřídlí. 1 pár amplifikoval u plameňáka růžového polymorfní mikrosatelitový lokus.

Do skupiny naprosto neúspěšných *cross-species* druhů Drobek (2010) zařadil kvakoše nočního, koplíka růžového, kachnu divokou, kachnici laločnatou, kajku mořskou a pižmovku velkou.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Biologický materiál

Biologický materiál představovala krev, odebraná jedincům plameňáka růžového ze ZOO Liberec a ZOO Dvůr Králové nad Labem.

Krev byla odebrána jedincům pomocí injekční stříkačky z tarzální žíly. Objem odebrané krve se pohyboval v rozmezí 50 - 100 μ l. Dále se smíchala s 1ml Queen's pufu (Seutin *et al.*, 1991).

Genomická DNA byla izolována vedoucím bakalářské práce RNDr. Petrem Nádvorníkem, Ph.D. pomocí fenolchloroformové metody, převzaté dle Maniatis *et al.* (1982), s úpravami pro materiální a technické zázemí Laboratoře populační genetiky, Katedry buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

4.2. Hledání vhodných mikrosatelitových markerů pro plameňáka růžového

Tato bakalářská práce je zaměřena na ověření a optimalizaci primerů, navržených pro plameňáka růžového, na 6 jedincích tohoto druhu, pocházejících ze ZOO Liberec a ZOO Dvůr Králové nad Labem. Dále se zaměřuje na vyhledávání nových párů primerů, které by amplifikovaly polymorfní mikrosatelitové lokusy u plameňáka růžového. Tyto primery byly navrženy pro druhy z řádů brodiví (Ciconiiformes) a veslonozí (Pelecaniformes).

V tabulce č.1 jsou znázorněny řády a do nich patřící druhy, pro které byly mikrosatelitové lokusy navrženy, mikrosatelitové lokusy a autoři, kteří tyto mikrosatelitové lokusy publikovali.

Tabulka č.1: Testované mikrosatelitové lokusy u Plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*).

Řád	Zdrojový druh	Mikrosatelitový lokus	Autor
Plameňáci (Phoenicopteriformes)	Plameňák růžový (<i>Phoenicopterus roseus</i>)	PrA2, PrA3, PrA9, PrA102, PrA103, PrA104, PrA105, PrA110, PrA111, PrA113, PrB1, PrB2, PrB3, PrB102, PrB105, PrB110, PrC1, PrC6, PrC12, PrC107, PrC109, PrC117, PrC122, PrD3, PrD4, PrD5, PrD7, PrD9, PrD10, PrD12, PrD102, PrD105, PrD108, PrD117, PrD121, PrD126, PrD139	Geraci <i>et al.</i> (2010)
Veslonoží (Pelecaniformes)	Kormorán ušatý (<i>Phalacrocorax auritus</i>)	DCCO1, DCCO2, DCCO3, DCCO4, DCCO5, DCCO6, DCCO7, DCCO8,	Mercer <i>et al.</i> (2010)
	Kormorán chocholatý (<i>Phalacrocorax aristotelis</i>)	Phaari1, Phaari2, Phaari3, Phaari4, Phaari5, Phaari6, Phaari7, Phaari8, Phaari9, Phaari11, Phaari12, Phaari13, Phaari14, Phaari15, Phaari16, Phaari17	Barlow <i>et al.</i> (2010)
	Faeton žlutozobý (<i>Phaethon lepturus</i>)	P3A3, P3A4, P3C1, P3D7, P3F3, P3F5, P3F7, P3G12, P3H10, P4F2, P4G1	Humeau <i>et al.</i> (2010)
Brodivi (Ciconiiformes)	Volavka purpurová (<i>Egretta rufescens</i>)	Er21, Er22, Er23, Er24, Er31, Er41, Er42, Er43, Er44, Er45, Er46, Er51	Hill <i>et Green</i> (2010)

4.3. PCR amplifikace DNA

Pro PCR jsem nejprve připravila reakční směs. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č.2, u jednotlivých objemů je počítáno s případnými ztrátami při pipetování.

Tabulka č.2: Složení PCR reakční směsi přepočítané na 6 vzorků.

Složky PCR směsi	Objemy [μl]
Deionizovaná voda	41,9
Storage Buffer 10x	6,3
Roztok MgCl ₂ (25 mmol/l)	3,75
Roztok dNTPs (20 μmol/l)	0,65
Primery F a R (10 μmol/l)	3,1
<i>aTaq</i> DNA polymeráza	1

Vzorky reakční směsi jsem pipetovala do 6 mikrokumavek s různými vzorky genomické DNA. Po napipetování všech složek reakční směsi jsem mikrokumavky zvortexovala a centrifugovala. Každá PCR reakce se skládala z 9 μl PCR premixu a 1 μl DNA (50 μg/ml).

Vzorky jsem umístila do termocykléru s níže uvedeným časovým a teplotním profilem polymerázové řetězové reakce.

5 min:	94 °C	
30 s:	94 °C	} 35 cyklů
30 s:	50, 55 °C	
30 s:	72 °C	
7 min:	72 °C	

Základní teplotou *annealingu* u primerů, navržených pro plameňáka růžového, bylo 55 °C. U primerů pro řády brodiví a veslonozí byla základní teplota *annealingu* 50 °C. Tato teplota byla následně u jednotlivých mikrosatelitů upravována v závislosti na výsledcích elektroforetické separace.

4.4. Analýza PCR produktů

PCR produkty jsem analyzovala pomocí elektroforetické separace v 6% polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek a zviditelnila pomocí AgNO_3 . Separace probíhala v elektroforetické komůrce S2 Whatman Biometra o rozměrech použitých skel 333 x 418 mm, 333 x 392 mm a gelem o tloušťce 0,4 mm.

1. Sklo s většími rozměry jsem omyla deionizovanou vodou, otřela do sucha a ošetřila přípravkem pro odpuzování vody po dobu 5 minut.
2. Sklo menších rozměrů jsem omyla vodou s běžným saponátem, opláchla destilovanou vodou, ošetřila molekulárním lepidlem a nechala 5 minut působit a poté sklo omyla 4x 96% ethanolem.
3. Na větší sklo jsem přiložila 2 spacers a ošetřenou plochou dolů přiklopila malé sklo.
4. Obě skla jsem upevnila pomocí klipsů.
5. Připravila jsem si 6% polyakrylamidový gel, složený z 60 ml 6% akrylamidu, 400 μl 10% peroxodisíranu amonného a 40 μl N, N, N', N'-tetramethylethylendiaminu. Vzniklý roztok jsem opatrně vlévala mezi připravená skla.
6. Do místa, kde delší sklo přesahovalo menší a kde byly později pipetovány vzorky, jsem vložila obrácenou stranou hřebínek a upevnila jej pomocí klipsů.
7. Gel jsem nechala polymerizovat 1 hodinu.
8. Po ztuhnutí gelu jsem odstranila klipsy, sklo důkladně omyla, osušila, vložila do elektroforetické komůrky menším sklem dovnitř, odstranila hřebínek. Katodový i anodový prostor jsem vyplnila 0,5x TBE pufrem.
9. Gel jsem nechala 30 – 45 minut nahřívat na teplotu 48 – 50 °C při 90 W, elektrickém proudu 150 mA a napětí 3000 V.
10. Do produktu PCR jsem mezitím připipetovala 5 μl nanášecího pufru a nechala v termocykléru denaturovat a posléze ihned vložila do ledové tříště, aby nedošlo k renaturaci.
11. Do zahřátého gelu jsem po odpojení od zdroje vložila hřebínek tak, aby jeho zoubky byly zaraženy cca 1 mm v gelu.

12. Do mezer mezi jednotlivými zoubky jsem nanesla 2 μl vzorku. Poté opět připojila ke zdroji a nastavila zdroj na výkon 70 W, elektrický proud 150 mA a napětí 3000 V.
13. Elektroforetickou separaci jsem nechala probíhat 1,5 – 4 hodiny, dle jednotlivých optimalizací, pro co nejlepší vizualizaci polymorfizmu.
14. V průběhu separace jsem si přichystala roztoky, sloužící pro vizualizaci separovaných DNA fragmentů, tj. Fix/Stop roztok, 1% roztok kyseliny dusičné, 1% roztok AgNO_3 a vývojku.
15. Po skončení separace jsem vypustila pufr z katodové části, vyjmula skla s gelem, odstranila spacers, hřebínek a skla oddělila pomocí nože od sebe.
16. Menší sklo s gelem jsem vložila do misky a nechala promývat po dobu 20 minut na třepačce (100 otáček/ minuta) ve Fix/Stop roztoku, který jsem po uplynutí doby slila a uchovala pro další použití.
17. Následně jsem sklo 3x promyla v deionizované vodě, vložila do 1% roztoku kyseliny dusičné a nechala promývat 5 minut na třepačce (100 otáček/ minuta).
18. Po uplynutí 5 minut jsem roztok vylila, 4x opláchla deionizovanou vodou, vložila do 1% roztoku AgNO_3 smíchaném s 1,2 ml formaldehydu a dala na třepačku (100 otáček/ minuta). Poté jsem roztok slila zpět do zásobní nádoby.
19. Sklo jsem ponořila na 5 – 10 sekund do deionizované vody, přenesla na třepačku (100 otáček/ minuta) a vložila do vychlazené vývojky.
20. Pozorovala jsem vznik hnědých proužků a ve chvíli jejich dostatečné viditelnosti přelila Fix/Stop roztokem, pro zastavení reakce. Sklo s gelem jsem vložila na několik minut do deionizované vody a následně nechala 15 - 20 minut sušit při 90 °C v sušárně.
21. Usušený gel jsem dále hodnotila s vedoucím bakalářské práce na negatoskopu.
22. Sklo s již nepotřebným gelem bylo likvidováno vedoucím laboratoře vložením na několik hodin do hydroxidu sodného (1 mol/l), který způsobil odlepení gelu od skla. Gel byl vložen do toxického odpadu, sklo omyto a tím připraveno k dalšímu použití.

4.5. Použité chemikálie

- Akrylamid (Serva)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/ μ l), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosidtrifosfáty (100 mmol/l, 400 μ l každého), U1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Lachema)
- Ethanol – 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiamintetraoctan sodný (Na₂EDTA) (Lachema)
- Ethylendiamintetraoctanová kyselina (EDTA) (Lachema)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná (65% roztok) (Lachema)
- Kyselina octová (ledová) (Lachema)
- 3-methakrylopropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachema)
- N, N'- methylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N',N'- tertamethylethylendiamin (TEMED) (Serva)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Rain Repellent – Clear Vue (Turtle wax Europe B.V.)
(přípravek odpuzující vodu)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Xylenocyanol FF) (AppliChem)

4.6. Použité roztoky

- *Akrylamid (6% zásobní roztok)*

420 g močoviny

484 ml deionizované vody

50 ml 10x TBE

- *AgNO₃ dusičnan stříbrný (0,1% zásobní roztok)*

0,8 g AgNO₃

800 ml deionizované vody

- *Vývojka*

24 g uhličitanu sodného Na₂CO₃

800ml deionizované vody

před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% thiosíranu sodného Na₂S₂O₃

- *Fix/Stop roztok*

88 ml ledové kyseliny octové

800 ml deionizované vody

- *NaOH hydroxid sodný (1 mol/l) (roztok)*

40 g hydroxidu sodného

doplnit deionizovanou vodou do 1 l

- *HNO₃ kyselina dusičná (1% roztok)*

12 ml 65% kyseliny dusičné

800 ml deionizované vody

- *Nanášecí pufr*

0,125 g bromfenolové modře

0,125 g xylenové modře

25 ml deionizované vody

100 ml formamidu

- *Peroxodisíran amonný* $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (10% roztok)

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

uchovávat ve 400 μl zkumavkách při $-20\text{ }^\circ\text{C}$

- *Polyakrylamidový gel* (6%)

60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu

40 μl N, N, N', N'- tertamethylethylendiaminu

400 μl 10% roztoku peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

- *Queen's pufr*

10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,8

2 ml zásobního roztoku NaCl (5 mol/l)

2,92 g ethylendiaminotetraoctové kyseliny (EDTA)

10 g N-lauroylsacosinu

rozpustit v 900 ml deionizované vody

pH upravit na 7,5

doplnit deionizovanou vodou na 1 l

- *Roztok 3 – methakrylopropyltrimethoxysilanu* (molekulární lepidlo)

1ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu

3 μl 3 – methakrylopropyltrimethoxysilanu

- *TBE pufr* (zásobní roztok 10x)

108 g trishydroxymethylamonometanu (Tris)

55 g kyseliny borité H_3BO_3

40 ml roztoku Na_2EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0

doplnit deionizovanou vodou na 1l a zfiltrvat

4.7. Použité laboratorní přístroje

- Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)
- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy max 620g +/- 0,1 g Mark S (BelEngineering)
- Mikropipety Finnpiquette 0,5 až 10 μ l (osmikanálová) a 0,3 μ l až 1 ml (Labsystems)
- Mikropipety Nichpipet EX 0,5 μ l až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific Ltd.)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna HS 122S (Chirana)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocyklér XP Thermal Cycler (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

5. VÝSLEDKY

6. DISKUZE

7. ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se zabývala dvěma dílčími částmi. První částí bylo v podmínkách Laboratoře populační genetiky, Katedry buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci ověřit a zoptimalizovat PCR amplifikaci 37 mikrosatelitových lokusů, navržených pro plameňáka růžového Geracim *et al.* (2010), na 6 jedincích, pocházejících ze ZOO Liberec a ZOO Dvůr Králové nad Labem. Z celkového počtu 37 mikrosatelitových lokusů jich 36 bylo polymorfních, pouze 1 lokus byl monomorfní.

Ve druhé části jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace s využitím primerů, primárně navržených pro amplifikaci polymorfních mikrosatelitových lokusů u druhů z řádů brodiví a veslonozí, hledala mikrosatelitové lokusy, jež by byly vhodné pro determinaci paternity u jedinců druhu plameňák růžový (*Phoenicopterus roseus*). Z celkového počtu 47 párů primerů jsem našla 5 polymorfních lokusů a pocházely od druhů volavka purpurová (*Egretta rufescens*) z řádu brodiví, faeton žlutozobý (*Phaethon lepturus*) a kormorán chocholatý (*Phalacrocorax aristotelis*) z řádu veslonozí.

Polymorfní lokusy, mnou nalezené, by mohly být dále využity při studiu determinace paternity a pro analýzu příbuzenských vztahů pro jedince druhu plameňák růžový.

8. SEZNAM ZKRATEK

A	adenin
bp	pár bází (base pair)
C	cytozin
DNA	deoxyribonukleový kyselina
dNTP	deoxyribonukleozidtrifosfáty
ds DNA	dvouvláknová DNA (double stranded DNA)
G	guanin
PCR	polymerázová řetězová reakce
ss DNA	jednovláknová DNA (single stranded DNA)
SSR	repetice jednoduchých sekvencí (simple sequence repeats)
STR	krátké tandemové repetice (short tandem repeats)
T	thymin
T _A	teplota <i>annealingu</i>
VNTR	variabilní množství tandemových repetice (variable number of tandem repeats)

9. POUŽITÁ LITERATURA

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1998): *Základy buněčné biologie*, 2.vydání, Espero Publishing, s.r.o.
- Angers B., Estoup A., Jarne P. (2000): Microsatellite size homoplasy, SSCP, and population structure: a case study in the freshwater snail *Bulinus truncatus*. *Molecular Biology and Evolution* 17, 1926-1932.
- Anonymous (2003): Systém řádu Plameňáci. Biolib. www.biolib.cz, navštíveno dne 15.6.2011.
- Anonymous (2007a): Charakteristika řádu. Biolib. www.biolib.cz, navštíveno dne 19.7.2011.
- Anonymous (2007b): Zařazení v systému. Biolib. www.biolib.cz, navštíveno dne 31.4.2011.
- Anonymous (2009): Charakteristika řádu. www.zoozlin.eu, navštíveno dne 21.6.2011.
- Barlow E.J., Telford A., Daunt F., Cavers S. (2010): Isolation and characterization of microsatellite markers the European shag, *Phalacrocorax aristotelis*. *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- Bennett P. (2000): Demystified... Microsatellites. *Molecular Pathology* 53, 177-183.
- Bouchner M. (1972): Kapesní atlas ptáků. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
- Burnie D., Hoare B., DiCostanzo J. (2008): Ptáci, obrazová encyklopedie ptáků celého světa. Knižní klub, Praha.
- Campbell N.A., Reece J.B. (2006): *Biologie*. Computer Press, Brno.
- Dakin E.E., Avise J.C. (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504-509.
- Del Hoyo J., Elliot A., Sargatal, J. (1992): *Handbook of the Bird of the world*. Vol. 1, Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona.
- Drobek A. (2008): Studium paternity u plameňáků (*Phoenicopterus* sp.) pomocí analýzy mikrosatelitové DNA. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

- Drobek A. (2010): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Gaisler J., Zima J. (2007): Zoologie obratlovců. Vydavatelství Academia, Praha.
- Geraci J., Gaillard M., Bechet A., Cezilly F., Wattier R.A.(2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*, preprint.
- Hill A., Clay Green M. (2010): Characterization of 12 polymorphic microsatellites for Reddish Egret, *Egretta rufescens*. *Conservation Genetic Resources*. Publikováno online, www.springerlink.cz, navštíveno dne 11.6.2011.
- Humeau L., Da Silva D., Guérin F., Jaquemet S., Requier J.-B., Le Corre M. (2010): Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed tropic bird *Phaethon lepturus* (Phaetontidae). *Molecular Ecology Resource*, preprint.
- Chapuis M.-P., Estoup A. (2007): Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24, 621-631.
- Jones A.G., Ardren W.R. (2003): Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12, 2511-2523.
- Kapil R., Sawyer G.M., Presto L., Benjamin R.C. (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*). Department of Biological Science, University of North Texas. Preprint.
- Liška F., Šeda O., Šedová L. (2006): Aktuální genetika. Publikováno online, www.biol.lf1.cuni.cz, navštíveno dne 2.6.2011.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Mayr G. (2004): Morphological evidence for sister group relationship between flamingos (Aves: Phoenicopteridae) and grebes (Podicipteridae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 140, 157 – 169.
- Mercer D.M., Haig S.M., Mullins T.D. (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetic Resources*, in press.

- Primmer C.R., Miller A.P., Ellegren H. (1996): A wide-range 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., Merilä J. (2005): Factors affecting avian *cross-species* microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* 36, 348-360.
- Seutin G., White B.N., Boag P.T.(1991): Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69: 82-90.
- Snustad D.P., Simmons M.J. (2009): Genetika, 1.vydání. Masarykova univerzita, Brno.
- Svensson L., Grant P.J. (2004): Ptáci Evropy, Severní Afriky a Blízkého Východu. Nakladatelství Svojtka&Co., Praha.
- Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V. (2005): Metody molekulární biologie. Vydavatelství MU, Brno.
- Tuinen M., Butvill D.B., Kirsch J.A.W., Hedges S.B. (2001): Konvergence and divergence in evolution of aquatic birds. *Proceedings of the Royal Society Series B*, 268, 1345-1350.
- Walsh S.P., Fildes N.J., Reynolds R. (1996): Sequence analysis and characterization of stutter product at tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acid Research* 24, 2807-2812.
- Wattier R., Engel C.R., Saumitou-Laprade P., Valero M. (1998): Short Allene dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilit* (Rhodophyta). *Molecular Ecology* 7, 1569-1573.
- 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 J. (2004): Genetické metody v zoologii. Nakladatelství Karolinum, Praha.