



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Palackého v Olomouci

Bakalá ská práce

Olomouc 2012

Eva Novosadová

a Palackého v Olomouci

Přirodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Cross-species amplifikace mikrosatelit
z řádu veslonozí a plameňáci
u šápa simbila (*Ciconia abdymii*)**

Bakalářská práce

Eva Novosadová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

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



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

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

V Olomouci dne 11. 12. 2012



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Chtěl bych podkovat vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Petru Nádvořníkovi, Ph.D. za jeho čas, trpělivost a materiály, které mi poskytl pro vypracování mé bakalářské práce.

Tato bakalářská práce se zaměřila na hledání polymorfních mikrosatelitových lokus metodou *cross-species* PCR amplifikace u ápa simbila (*Ciconia abdimii*) pomocí pár primerů odvozených od zástupců z ádu veslonožů (Pelecaniformes) a plameňáků (Phoenicopteriformes).

V teoretické části mé bakalářské práce byla řešena témata: zařazení ápa simbila do systému, mikrosatelity odvozené z ádu plameňáků a veslonožů, tandemová repetitivní sekvence, zastoupení mikrosatelit v ptáčím genomu a využití mikrosatelitní DNA.

V experimentální části se bakalářská práce zabývá hledáním polymorfních mikrosatelitních lokus metodou *cross-species* PCR amplifikace pomocí 198 párů primerů odvozených od zástupců z ádu plameňáků a veslonožů. Produkty PCR amplifikace byly následně podrobeny elektroforetické separaci v polyakrylamidovém gelu. Po vizualizaci byla u polymorfních mikrosatelitních lokus optimalizována teplota annealingu a čas elektroforetické separace. Ze 198 párů primerů, 24 amplifikovalo polymorfní mikrosatelitní lokusy. 10 párů primerů pocházelo od plameňáků a 14 od veslonožů.



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

This bachelor thesis is focused on finding of polymorphic microsatellite loci by cross-species PCR amplification in the Abdim's stork (*Ciconia abdimii*), using the primers derived from bird species of the order of Phoenicopteriformes and Pelecaniformes.

In the theoretic part of my bachelor thesis were described following topics: classification of Abdim's stork, microsatellites derived from the order of Phoenicopteriformes and Pelecaniformes, tandem repeats, number of microsatellite loci in the avian genome and the use of microsatellite DNA.

In the experimental part I was finding polymorphic microsatellite loci by cross-species PCR amplification using 198 pairs of primers derived from the order of Phoenicopteriformes and Pelecaniformes. Products of PCR amplification were separated by electrophoresis in polyacrylamide gel. Then I was optimizing temperatures of annealing and time of electrophoretical separation. 24 of 198 pairs of primers amplified polymorphic microsatellite loci. 10 pairs of primers were derived from Phoenicopteriformes and 10 were derived from Pelecaniformes.

1	Úvod	7
2	Cíle práce	8
3	Současný stav řešené problematiky	9
3.1	Charakteristika řádu brodiví	9
3.2	ele řápovití	9
3.2.1.	řáp simbil	10
3.3	Mikrosatelity z řádu veslonozí.....	11
3.4	Mikrosatelity z řádu plame řáci	13
3.5	Repetitivní sekvence DNA	14
3.5.1	Tandemov řepetitivní sekvence DNA	15
3.5.2	P řehled mikrosatelitních repetic.....	15
3.5.3	Zastoupení mikrosatelit v pta řím genomu	16
3.5.4	Vznik mikrosatelit	17
3.6	Vyuřití mikrosatelitní DNA.....	18
3.7	Cross-species PCR mikrosatelitov řa amplifikace.....	18
3.7.1	Polymer řazov řa řet zov řa reakce.....	19
3.7.2	Problémy p ři PCR reakci	20
3.8	Elektrofor řeza v polyakrylamidov řém gelu	20
4	Materi řal a metody	22
4.1	Biologick řy materi řal.....	22
4.2	Pou řit ř primery	22
4.3	PCR amplifikace mikrosatelitní DNA a elektroforetick řa separace	24
4.4	Elektrofor řeza PCR produkt v polyakrylamidov řém gelu	25
4.5	Pou řit ř chemik řalie	27
4.6	Pou řit ř roztoky.....	28
4.7	Vybaven ři laborato ře.....	29
5	V řsledky	43
6	Diskuze.....	49
7	Seznam pou řit řy zkratek.....	51
8	Seznam pou řit ř literatury	52

Áp simbil (*Ciconia amdbimii*) je ziroce rozzí ený zástupce brodivých v Africe. Typická je pro n j migrace z ji0ní do severní Afriky na hnízdi zt . Žije ve velkých skupinách, a to i v období rozmno0ování. Sdr0uje se v blízkosti lidských obydlí. Potravu hledá na zem d lské p d i v p irozeném prost edí volné krajiny a ba0inatých oblastí.

U ápa simbila nebyly zatím vyvinuty druhov specifické primery pro amplifikaci mikrosatelitních lokus . Tato bakalá ská práce se zabývá hledáním polymorfních mikrosatelitních lokus pro tento druh ápa pomocí *cross- species* PCR amplifikace s pou0itím ji0 navr0ených primer , které pocházejí od zástupc z ádu plame áci (Phoenicopteriformes) a veslonozí (Pelecaniformes).



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

- 1) Shromáždít dostupné literární zdroje a vypracovat rezerzi na téma bakalářské práce.
- 2) Nalézt polymorfní mikrosatelitové lokusy pomocí *cross-species* PCR amplifikace u ápa simbila (*Ciconia ambdimii*), za použití pár primer odvozených od zástupců z ádu plame áci (Phoenicopteriformes) a veslonoží (Pelecaniformes).
- 3) Zoptimalizovat podmínky PCR reakce a ás elektroforetické separace u polymorfních mikrosatelitových lokus .

2.1 Charakteristika řádu brodiví

Brodiví (Ciconiiformes) jsou řád středně velkých až velkých ptáků. Mají dlouhé nohy bez plovacích blán mezi prsty (Svensson *et al.*, 1999). Mohou se brodit, pohybovat se v mělké vodě (Hanzák *et Hudec*, 1974). Vyznačují se dlouhým krkem a zobákem (Svensson *et al.*, 1999). Jsou přízvisobní k získávání potravy z bažinatých biotopů. Dokáží výborně plachtit s využitím proudů, které vznikají oteplováním vzduchu nad pevninou. Hnízda staví jednotlivě nebo v koloniích, na stromech i v rákosinách. Mláďata jsou nidikolní. Líhnou se na nízkém stupni zárodečného vývoje a jsou zcela závislá na péči rodičů (Gaisler *et Zima*, 2007).

Řád brodiví zahrnuje čeledi ápovití (Ciconiidae), lunozobcovití (Balaenicipidae), ibisovití (Threskiornithidae), kladivouzovití (Scopidae) a volavkovití (Ardeidae) (del Hoyo *et al.*, 1992). Zástupci řádu brodiví obývají téměř celý svět kromě polárních oblastí (Hanzák *et Hudec*, 1974). Molekulární analýzy dokazují příbuznost některých zástupců brodivých s kondory (Avisé *et al.*, 1994; Burnie *et al.*, 2008).

2.2 Čeleď ápovití

Do čeledi ápovití (Ciconiidae) náleží dva rody áp (*Ciconia* a *Ephippiorhynchus*), jabiru (*Jabiru*), marabu (*Leptoptilos*), nesyt (*Mycteria*) a zejzob (*Anastomus*) (Brown *et al.*, 1992). Ápovití patří mezi největší ptáky z řádu brodivých. Od hlavy k ocasu měří až 1,5 m. Jejich nápadným znakem je dlouhý esovitý krk, který je za letu natažený. Na rozdíl od volavek, jejich krk je za letu esovitě zakřiven (Burnie *et al.*, 2008). Samci bývají obvykle větší než samice. Ve většině případů je barevnost operení stejná u obou pohlaví (del Hoyo *et al.*, 1992).

Nemají téměř žádné hlasové projevy. Některé druhy chraptají syčí a klapou zobákem (Hanzák *et Hudec*, 1974). Jejich *syrinx* (hlasové ústrojí) postrádá svaly, které umožňují tvořit zvuky (Alderton, 1995).

Hnízda si staví z větviček na skalách i na stromech, jednotlivě nebo v koloniích (Gosler *et al.*, 1994). Některé druhy si zvykly na lov kavičky a hnízdí

h potravu je živožná. Živí se malými obratlovci, hmyzem i mrzinami (Hanzák et Hudec, 1974).

Čápovití jsou celosvětově rozšířeni, kromě antarktických oblastí. Nejvyšší diverzity dosahují v tropech. Zástupci čeledi jsou přizpůsobeni svému prostředí. Avšak některé rody, nesyt (*Mycteria*) a zejzob (*Anastomus*), jsou striktně omezeny na mokřady a potravu získávají pouze z vody. Zatímco zástupci ostatních rodů mohou žít v areálech s travnatými porosty nebo řídkými lesy.

Čápovití mají široká křídla přizpůsobená k plachtění. Jejich velká a objemná tlapa jsou silně přizpůsobená tomuto způsobu letu (del Hoyo et al., 1992). Pták je nadnázen stoupajícími vzdušnými proudy, které vznikají nad prohřátými písky či pasekami, nebo při nárazech v trsu na svah či skálu (Hanzák et Hudec, 1974). Obvykle nelétají v pravidelných formacích, avšak v Brazílii bylo zaznamenáno, že čáp jihoamerický (*Ciconia maguari*) létá pravidelně v klínové formaci (del Hoyo et al., 1992).

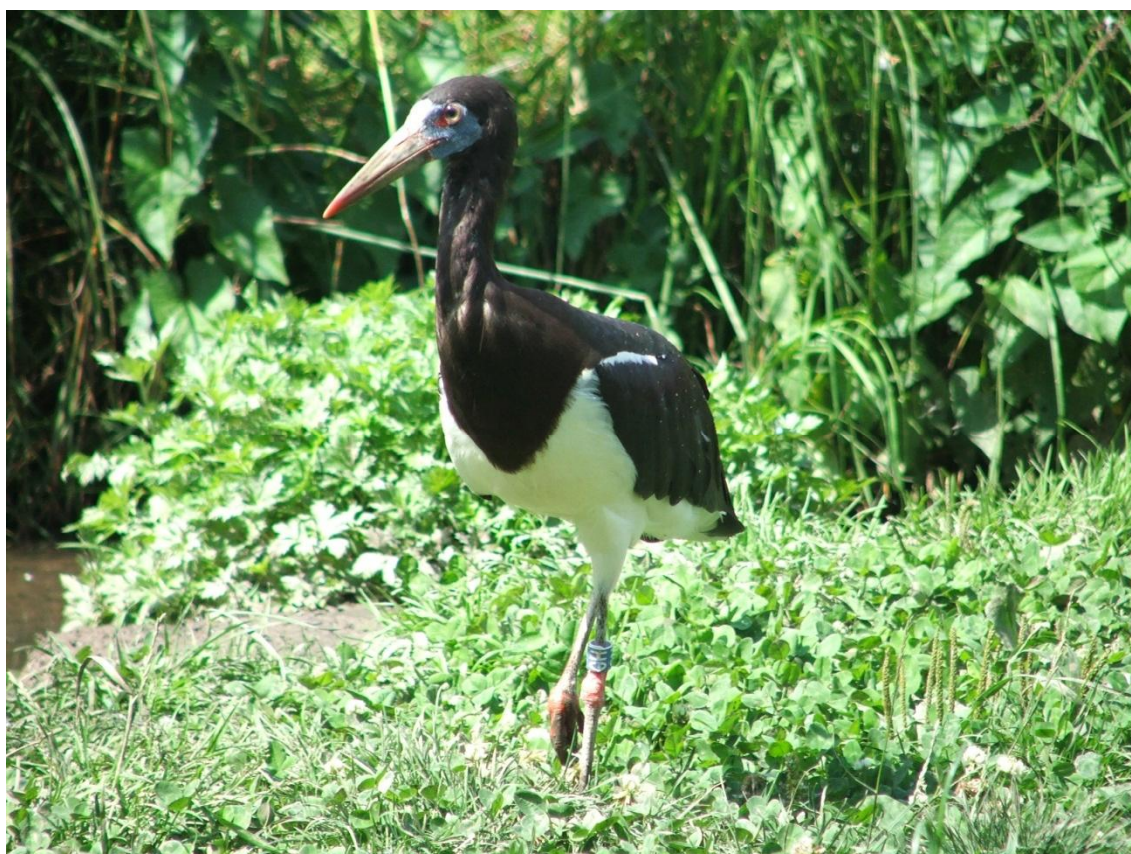
Nemají téměř žádné přirozené nepřátele, díky své velikosti. Ohrožení pro ně představuje ubývání bažinatých porostů (Alderton, 1995).

3.2.1. Čáp simbil

Čáp simbil (*Ciconia abdimii*) je pták vysoký 75-81 cm a váží přibližně 1-3 kg (del Hoyo et al., 1992). Svrchní strana těla je tmavá, spodní je bílá. Zobák je béžovo-žlutý. Na hlavě má modrou a červenou kůži. Narůžovělé žedé nohy mají na břišní straně kontrastní červený pruh. Mladí jedinci jsou hnědí s červeným zobákem.

Čáp simbil je rozšířen na africkém kontinentu. V období dezertů hnízdí v severní Africe. Po období rozmnožování přelétá do jižní Afriky, až do Kapska (Gosler et al., 1994). Žije ve velkých skupinách, i v době rozmnožování. Hnízdí kolonie obvykle přesahuje dvacet párů a bývá zřídka rozptýlená. Někdy se sdružuje i s jinými ptáky, s čápy marabu a pelikány, a hnízdí s nimi společně na stejném území. Usazuje se na stromech nebo útesech. Hnízda staví z větví a trávy, používá je i několik let. Materiál sbírá v blízkosti kolonie, občas jej krade z hnízd ostatních ptáků (Brown et al., 1992). Podobně jako čáp bílý (*Ciconia ciconia*) může stavět svá hnízda na stěch budov (del Hoyo et al., 1992).

hledá v blízkosti lidských obydlí, na pastvinách i v okrajových částech lesů. Živí se obyčejnými hmyzími živočichy, zejména čmeláky, motýly, houslemi a cvrčky. Nepohrdne však ani malými obratlovci, jako jsou například žáby a malé ryby. Obvykle potravu hledá samostatně, poté se sdružuje do skupin. Vzácně se hejno může vyskytovat u velkého roje hmyzu. Při vysokých teplotách létá vysoko ve vzduchu, a je tím nepozorovatelný. Za letu dochází k termoregulaci a tělo se chladí (Brown *et al.*, 1992).



Obrázek číslo 1: Dospělý jedinec šápa simbila. V zoologické zahradě ve Dvoře Králové nad Labem, fotografii poskytla Jana Myslivečková.

2.3 Mikrosatelity z řádu veslonozí

První izolované mikrosatelitní lokusy z řádu veslonozí pocházejí od kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*). Piattney *et al.* (1998) izolovali metodou *de novo* 7 mikrosatelitových lokusů u kormorána velkého. Primery navržené pro tyto mikrosatelitové lokusy byly testovány pomocí *cross-species* PCR amplifikace na kormoránovi uzatém (*P. auritus*), kormoránovi modrookém (*P. atriceps*), kormoránovi chocholatém (*P. aristotelis*) a podrodu

ovahollandiae). Mikrosatelitové lokusy po *cross-*
tyly polymorfní produkt s 9 a0 44 alelami.

Dearborn *et al.* (2008) navrhli primery pro mikrosatelitové lokusy fregatky obecné (*Fregata minor*) s použitím genomické knihovny obohacené o mikrosatelity. Primery byly navrženy pro 28 lokusů. Z toho jeden pár neamplifikoval, jeden poskytoval nerozeznatelný produkt, osm bylo monomorfních. 18 párů primerů bylo testováno na 23 příbuzných jedincích z jedné populace. Polymorfní mikrosatelitové lokusy obsahovaly 2 a0 12 alel.

Hickman *et al.* (2008) navrhli primery k 9 mikrosatelitovým lokusům pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*). Tyto páry primerů testovali na 23 jedincích pelikána severoamerického, polymorfní mikrosatelitové lokusy obsahovaly 3 a0 8 alel.

Kormorán galapáoský (*Phalacrocorax harrisi*) je nelétavý zástupce veslonohých. Duffie *et al.* (2008) odebrali DNA pro izolaci mikrosatelitových lokusů z jedinců pocházejících ze dvou populací. Metodou *de novo* izolovali 8 polymorfních mikrosatelitových lokusů a k nim navrhli primery. Polymorfní mikrosatelitové lokusy obsahovaly 3 a0 9 alel. Duffie *et al.* (2009) testovali metodou *cross-species* PCR amplifikace primery odvozené od kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*), které navrhli Piertney *et al.* (1998), na populaci kormoránů galapáoských. Testování jedinci pocházeli z devíti kolonií na Galapáoských ostrovech. Pár primerů PcT1 odvozený od kormorána velkého amplifikoval polymorfní mikrosatelitový lokus u kormorána galapáoského.

De Ponte Machado *et al.* (2009) navrhli 10 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Všechny deset mikrosatelitových lokusů bylo polymorfních a obsahovaly 2 a0 19 alel.

Fike *et al.* (2009) navrhli primery pro amplifikaci 51 mikrosatelitových lokusů u kormorána uzatého (*Phalacrocorax auritus*). 46 párů primerů z 51 vodních 51 amplifikovalo mikrosatelitové lokusy. Tyto primery byly dále testovány a 24 amplifikovalo polymorfní mikrosatelitové lokusy, které obsahovaly 2-14 alel. Mercer *et al.* (2010) izolovali dalších 8 mikrosatelitových lokusů u kormorána uzatého a navrhli pro ně primery. Navržené primery testovali metodou

na 60 nepříbuzných jedincích kormorána uzatého, kterých bylo použito osm pár primerů, které amplifikovaly polymorfní mikrosatelitové lokusy, počet alel se pohyboval od 2 do 17. Pomocí těchto primerů byla testována *cross-species* PCR amplifikace u kormorána západního (*P. penicillatus*) a kormorána mořského (*P. pelagicus*).

Faircloth *et al.* (2009) navrhli jako první primery pro tereje modronohého (*Sula nebouxi*) a testovali je na 31 jedincích. 11 mikrosatelitových lokus obsahovalo 3 až 22 alely. Taylor *et al.* (2010) izolovali u tereje modronohého 6 mikrosatelitových lokusů a u tereje guánového (*Sula variegata*) 9 mikrosatelitových lokusů. Pomocí těchto primerů testovali *cross-species* PCR amplifikaci na obou druhích terejů a zároveň i na tereji olutonohém (*Sula leucogaster*). Mikrosatelitní lokusy, které byly polymorfní, obsahovaly 2 až 10 alel u tereje modronohého, 2 až 12 alel u tereje guánového a 3 až 10 alel u tereje olutonohého.

Morris-Pocock *et al.* (2010) izolovali a charakterizovali 15 polymorfních mikrosatelitových lokusů z tereje červenonohého (*Sula sula*). Počet alel se pohyboval od 2 do 11. Tyto primery použili při *cross-species* PCR amplifikaci u tereje modronohého a guánového. U tereje modronohého amplifikovali 4 polymorfní mikrosatelitové lokusy a u tereje guánového 5 polymorfních mikrosatelitových lokusů.

Humeau *et al.* (2010) izolovali 11 mikrosatelitových lokusů z faetona olutozobého (*Phaethon lepturus*) a navrhli k nim primery. Všechny mikrosatelitové lokusy byly polymorfní a obsahovaly 2 až 38 alel.

Barlow *et al.* (2010) metodou *de novo* izolovali 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů u kormorána chocholatého (*Phalacrocorax aristotelis*) a navrhli k nim primery. Podmínky PCR reakce optimalizovali na osmi jedincích, následně páry primerů testovali na 20 jedincích. Polymorfní mikrosatelitové lokusy obsahovaly 2 až 15 alel.

2.4 Mikrosatelity z řádu plaměnic

Kapil (2005) se ve své práci zabýval nalezením mikrosatelitových markerů pro studium populací plaměnic v zajetí i ve volné přírodě.

satelitových lokus u plame áka karibského
drou *cross-species* PCR amplifikace testoval tyto
primery na plame ákovi r 0ovém (*Phoenicopterus roseus*). Polymorfní
mikrosatelitové lokusy u plame áka r 0ového m ly vyzží po et alel ne0 u
plame ákakaribského. Výsledky ukazují vyzží genetickou diverzitu v populaci
plame áka r 0ového. Autor se domnívá, 0e plame ák karibský je poddruhem
plame áka r 0ového pocházejícího z Afriky. Preston (2005) ve své diserta ní
práci popsala dalších sedm polymorfních mikrosatelitových lokus plame áka
karibského. Kapil *et al.* (2010) se snaóí uve ejnit lánek, do kterého vybrali dev t
mikrosatelitních lokus plame áka karibského, ze dvou p edchozích diserta ních
prací. Uvád jí jejich charakteristiky získané testováním na 60 jedincích tohoto
druhu. Amplifikované polymorfní mikrosatelitové lokusy poskytly 3 a0 14 alel.

Geraci *et al.* (2010) popsali a izolovali 37 polymorfních mikrosatelitových
lokus u plame áka r 0ového. K t mto mikrosatelitovým lokus m navrhli primery
a testovali je na vzorcích genomické DNA odebrané z 22 jedinc . Po et alel na
lokusech se pohyboval mezi 2 a0 33.

2.5 Repetitivní sekvence DNA

Repetitivní DNA je nekódující DNA. Sekvence repetitivní DNA se
v genomu vyskytují v mnoha kopiích, rozptýlené nebo v tandemu (Campbell *et*
Reece, 2006). Rozlišují se ty i hlavní skupiny rozptýlených repetitivních
sekvencí. Dlouhé rozptýlené repetitivní sekvence LINEs (*Long Interspersed*
Nuclear Elements), sekvence s dlouhými terminálními repeticemi LTRs (*Long*
Terminal Repeats), DNA transpozony a krátké rozptýlené repetitivní sekvence
SINEs (*Short Interspersed Nuclear Elements*) (Webster, 2002). LINEs jsou
odvozeny z p edch dc podobných retrovir m. Nejznám jí LINEs jsou LINE-1
elementy, obsahující a0 7 000 bp. LINE-1 obsahují gen pro reverzní
transkriptázu. V t zina t chto element je nefunk ní, jejich sekvence je p eruzena
bodovými mutacemi (Snustad *et* Simmons, 2000). SINEs nejsou schopné
autonomní replikace, na rozdíl od LINEs, LTRs a DNA transponovatelných
element . SINEs se mohou replikovat pomocí jiných element , jsou to obvykle
LINEs (Webster, 2002). LTRs obsahují terminální repetice, které ohrani ují
transponovatelný element a jsou nezbytné pro jeho replikaci (Webster, 2002).

je typický proces transpozice. Transponovatelný í vlastního enzymu, transponázy (Campbell *et al.*, 2011).

2.5.1 Tandemov repetitivní sekvence DNA

Jednotky tandemových repeticí DNA jsou uspořádané za sebou a mnohokrát se opakují. Na určitém lokusu genomu může být umístěno několik stovek až tisíc stejných úseků DNA (Campbell *et al.*, 2006).

Mezi hlavní typy tandemových repetitivní DNA patří satelity, minisatelity a mikrosatelity. Satelitní DNA je tvořena dlouhými sériemi repetic. Každá repetice obsahuje až tisíce opakování, o velikosti 200 bp. Obvykle se nacházejí v oblasti centromer. Minisatelity se skládají z deseti až sta repetic o 100 bp (Webster, 2002). Mikrosatelity, nebo-li STRs (*Short Tandem Repeats*), se skládají z deseti až sta repetic. Opakující se jednotka obsahuje 1-5 bp (Bennet, 2000). Tóth *et al.* (2000) uvádí, že opakující se jednotka může mít 1-6 bp. Mikrosatelity se hojně vyskytují v oblasti euchromatinu a jsou vysoce polymorfní (Bennet, 2000). Mikrosatelity se často nalézají v blízkosti rozptýlených repetitivních elementů SINEs a LINEs. Například lidský *Alu* element, patří k SINEs, obsahuje na 3' konci poly(A) sekvenci, která tvoří strukturu podobnou mikrosatelitům (Ellegren, 2004).

2.5.2 Pohled mikrosatelitních repetic

Mezi nejhojnější mononukleotidové repetice v eukaryotických organizmech patří poly(A/T) sekvence. Někdy zastoupení mají poly(C/G) sekvence (Tóth *et al.*, 2000; Mukund *et al.*, 2001). Poly(A/T) sekvence jsou nejvíce zastoupeny v intronových oblastech. Clarke *et al.* (2001) uvádí, že čím delší je mononukleotidová sekvence, tím častěji dochází k chybám při její PCR amplifikaci. Příslušnou délkou repetice pro PCR amplifikaci poskytuje (T)₉ sekvence. Sekvence (T)₁₁ je maximální délka poly(T) repetice, její produkt po PCR amplifikaci obsahuje 90% (T)₁₁. Při amplifikaci repetic delších než (T)₁₁ vznikají chyby častěji.

Dinukleotidové repetice jsou nejfrekventovanější v intronech a intergenových oblastech. Nejméně se vyskytují v oblastech exonových. Obratlovci

zastoupení poly(AC) motiv (Tóth *et al.*, 2000). Za nimi zastoupení poly(GC) motivy mají extrém nízké zastoupení ve v tzin organizm (Mukund *et al.*, 2001).

Mezi nejmén zastoupené trinukleotidové repetic nále0í poly(ACG) a poly(ACT). Je patrné v tzi mno0ství AGC repetic v exonech v porovnání s introny a intergenovými oblastmi. V intonech zcela chybí CCG repetic. V nesav ích genomech se trinukleotidové sekvence vyskytují ast ji ne0 tetranukleotidové. N které trinukleotidové repetic jsou zodpov dné za rozvoj neurodegenerativních onemocn ní. Jsou to Huntingtonova choroba i myotonická dystrofie (Sanjeeva *et al.*, 1997).

Hojnost tetranukleotidových repetic v obratlov ích intronech a intergenových oblastech je vyzží ne0 po et trinukleotidových repetic. Poly(AAAG)/(AAAT) jsou nejzastoupen jí tetranukleotidové repetic v sav ím genomu.

Pentanukleotidové repetic se vyskytují se stejnou frekvencí jako trinukleotidové.

Hexanukleotidové repetic se nej ast ji vyskytují v exonech. Nejb On jí hexanukleotidovou repeticí je poly(AACCCT) repetic v genomu obratlovc (Tóth *et al.*, 2000).

2.5.3 Zastoupení mikrosatelit v pta ím genomu

Pta í genom je pom rn malý a obsahuje 15-20 % repetitivní DNA. Jeho velikost je, ve srovnání se sav ím genomem, o polovinu menší (Gaisler *et Zima*, 2007).

Mikrosatelity se v pta ím genomu vyskytují pr m rn ka0dých 31 kb. Tento výskyt je ní0zí v porovnání s lidským genomem, kde se mikrosatelity vyskytují ka0dých 6 kb. Obecn jsou mikrosatelity v pta ím genomu mén frekventované, ne0 v sav ím genomu (Primmer *et al.*, 1997). To je z ejm zp sobeno menším množstvím nekódující DNA, která poskytuje mikrosatelit m p íle0itost k rozvoji. Mikrosatelity se asto nacházejí v rozptýlených repetitivních elementech, SINEs a LINEs (Ellegren, 2004). Nedostate ná asociace SINEs a

enzí po et mikrosatelit , v porovnání se savci, elementy nacházejí v t sné blízkosti. Sav í SINEs a LINEs obvykle kon í poly(A) sekvencí vznikající p i retrotranspozici. Pta í rozptýlené elementy nejsou zakon ené poly(A) sekvencí, která poskytuje materiál pro vznik r zných typ repetice. I to m 0e být d vodem malé hustoty mikrosatelit v pta ím genomu (Primmer *et al.*, 1997).

2.5.4 Vznik mikrosatelit

Mikrosatelity mohou vznikat mutacemi, které m ní délku mikrosatelitní repetic. Na délku repetic p sobí dv protich dné muta ní síly. První prodlu0uje mikrosatelitní repetic a ta m 0e dosahnout libovolné délky. Druhá vytvá í bodové mutace v dlouhých úsecích repetic a naruzuje je (Ellegren, 2004).

Další mo0ností vzniku mikrosatelit je sklouznutí DNA polymerázy. Chybné párování bází vede ke sklouznutí polymerázy b hem replikace (Ellegren, 2004). K chybnému párování bází dochází p i lokální denuraci a p emíst ní et zc dvouzroubovice DNA v míst , kde se nachází krátká tandemová repetic (Levinson *et* Gutman, 1987). Pokud chybné párování bází vytvá í vlásenkovou strukturu na jednom et zci DNA, další replikace vede k prodlou0ení nebo zkrácení repetic. P i replikaci DNAPolymeráza v míst smy ky úsek nereplikuje. Pokud se smy ka vytvo í na templátovém vlákn DNA, vede jeho replikace ke zkrácení délky repetic (Ellegren, 2004). Následn , po replikaci i oprav chybného párování bází, m 0e dojít k inzerci i delecí (Levinson *et* Gutman, 1987). Mnoho t chto primárních mutací je opraveno repara ním systémem a pouze malá ást t chto mutací vede ke vzniku mikrosatelitní sekvence (Ellegren, 2004).

Mikrosatelity mohou vznikat spontánn (*de novo* mikrosatellity) z unikátních sekvencí, nebo jejich p enesením pomocí transponovatelných element (adoptované mikrosatelity). *De novo* mikrosatelity vznikají z ejm z protomikrosatelit . P edpokládalo se, 0e protomikrosatelity vznikají zám nou bází. Nap íklad zám nou guaninu za adenin (GACGCACG GACACACG) v tomto et zci vzniká protomikrosatelit, který je materiálem pro vznik nového mikrosatelitu. Nov jí hypotéza p edpokládá vznik protomikrosatelit pomocí inzercí i delecí (Buschiazzo *et* Gemmel, 2006).

DNA

Mikrosatelity mají široké využití díky svým charakteristickým vlastnostem. Hojně se vyskytují v eukaryotických genomech (Tóth *et al.*, 2000; Mukund *et al.*, 2001) a jsou vysoce polymorfní (Bennet, 2000). Mikrosatelity patří mezi nejvariabilnější sekvenční DNA. Polymorfismus mikrosatelit je odvozen hlavně z délkové variability, neboli délkového polymorfismu, než z primární sekvence (Ellegren, 2004). Tyto vlastnosti je předurčily stát se ideálními genetickými markery, nejen v oblasti forenzní a lékařské genetiky (Bennet, 2000), ale i při studiu evolučních vztahů různých druhů organismů, například u ptáků (Hackett *et al.*, 2008). Lze je snadno analyzovat pomocí PCR s použitím primerů, které jsou komplementární k unikátním sekvencím, které navazují z obou stran na sekvenci mikrosatelit (Lagercrantz *et al.*, 1993).

Mikrosatelitové lokusy lze izolovat *de novo* pomocí DNA knihoven. Genomická DNA je ztřípana restriktivními enzymy. Fragmenty jsou následně tříděny podle velikosti. Pořadované fragmenty jsou vloženy do plazmidového vektoru. Po transformaci bakteriálních buněk jsou získány tisíce klonů, ve kterých pomocí sond komplementárních k repetitivním sekvencím, jsou vyhledány pozitivní klony, které obsahují pořadovaný mikrosatelitový lokus. K takto vybraným mikrosatelitům jsou poté navrženy primery pro PCR amplifikaci. Tato metoda je časově náročná a drahá (Zahne, 2002). Další možností získání použitelných primerů, pro studium fylogenetických vztahů ptáků, je použití již připravených primerů při *cross-species* PCR mikrosatelitové amplifikaci.

2.7 *Cross-species* PCR mikrosatelitová amplifikace

Nové mikrosatelitové primery lze získat bez vývoje specifických primerů pro každý studovaný druh. Nejčastější metodou jejich získání je *cross-species* PCR amplifikace (Galbusera *et al.*, 2000). Mikrosatelitové primery izolované z různých druhů ptáků amplifikují odpovídající mikrosatelitové lokusy u blízce příbuzných druhů (Primmer *et al.*, 1996). Galbusera *et al.* (2000) ve své práci testovali 40 mikrosatelitových primerů od rozdílných druhů ptáků z řádu pvců na 13 druzích z tohoto řádu. Vytvořili 520 kombinací primerů a testovaných

Úspěšně amplifikovalo a ve 158 případech objevili existenci polymorfismu klesá s fylogenetickou vzdáleností. S fylogenetickou vzdáleností se snižuje podobnost druhů. Primmer *et al.* (1996) testovali primery odvozené od mikrosatelitových lokusů vláztovky obecné (*Hirundo rustica*) a lejska ernohlavého (*Ficedula hypoleuca*) na 48 různých druzích. Primery odvozené z mikrosatelitových lokusů vláztovky obecné a lejska ernohlavého amplifikovaly i u ptáků, kteří podle klasické taxonomie nepatří mezi ně. Mezi testované druhy, u kterých byly amplifikované mikrosatelitové lokusy polymorfnní, patří buřák zedý (*Calonectris diomedea*), kondor havranovitý (*Coragyps atratus*), ostřelivník (*Falco eleonora*), strakapoud bělohřbetý (*Dendrocopus leucotos*), tetelík pelykavý (*Centrocercus urophasianus*), tučňák kroužkový (*Pygoscelis adeliae*) a vlhá pestrá (*Merops apiaster*). Studie ukázala, že tyto primery odvozené od vláztovky obecné mohou amplifikovat polymorfnní lokusy u vzdálených ptáčích linií.

2.7.1 Polymerázová a zová reakce

Polymerázová a zová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) je technika umožňující *in vitro* amplifikaci specifického úseku DNA (Zima *et al.*, 2004). Požadované sekvence DNA lze během několika hodin amplifikovat až milionkrát.

Aby bylo možné PCR amplifikaci provést, je nutné mít krátké nukleotidové sekvence ohraničující studovaný úsek DNA. Tyto úseky jsou nazývány primery. Pro PCR je potřeba roztok, který po napipetování obsahuje kromě DNA templátu, směs deoxyribonukleozidtrifosfátů (dNTP), dvojici primerů, *Taq* DNA polymerázu, roztok $MgCl_2$, pufr a destilovanou vodu.

Aby PCR proběhla, jsou potřeba dva primery komplementární k sekvencím určeným k amplifikaci. Dvoustranná DNA je zahřívána na vysokou teplotu, obvykle na 94°C, a dojde k její denaturaci. Primery nasedají na jednostrannou DNA, sloužící jako templát. Jejich připojení (annealing) na templátové vlákno DNA závisí na teplotě. Annealing je nejdůležitější krok, na kterém závisí celý průběh PCR. Teplota se pohybuje mezi 45-60°C (Zima *et al.*, 2004). Následně se připojuje DNA polymeráza. Obvykle to bývá *Taq* DNA polymeráza, izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Její důležitou vlastností je termostabilita,

...ra níh krocích (Snustad *et* Simmons, 2000).
...polymeráza p i pojí první deoxyribonukleozidtrifosfát
na primer, který je již navázán na templátový et zec. Následuje syntéza nového
et zce probíhající p i teplot 72°C. V dalzích cyklech slou0í nov
nasyntetizovaný úsek DNA jako templát a po ka0dém cyklu se po et
syntetizovaného úseku DNA zdvojnásobí (Zima *et al.*, 2004).

2.7.2 Problémy p i PCR reakci

Murray *et al.* (1993) zjistili, 0e p i PCR amplifikaci sekvence DNA
obsahující krátkou repetici, nap íklad dinukleotidovou repetici CA, dochází ke
tvorb stutter neboli shadow band v gelu p i elektroforetické separaci. P í inou
je zám na jedné dinukleotidové sekvence za druhou, nap íklad zám na TA
sekvence za CA sekvenci. Dalzí mo0ností pro tvorbu stutter band b hem PCR
amplifikace je sklouznutí DNA polymerázy. To vede ke tvorb vedlejších
produkt , které jsou obvykle o jeden a0 dva nukleotidy kratzí ne0 alela, která byla
amplifikována.

Vliv na istotu produktu PCR reakce má i teplota annealingu (T_a). Je to
teplota, p i které jsou p i pojovány primery na templátovou DNA. Pokud je T_a p ílíz
nízká tak se v gelu po elektroforetické separaci PCR produkt mohou
objevitsttuter bandy. Zvyzováním T_a se omezí jejich vznik, a bandy jsou v gelu po
elektroforéze lépe hodnotitelné (Rychlik *et al.*, 1990).

2.8 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Produkty PCR reakce se rozd lují pomocí gelové elektroforézy. P i
elektroforéze dochází k separaci nukleových kyselin v elektrickém poli. Nukleové
kyseliny migrují sm rem k anod , díky negativnímu náboji (¥marda *et al.*, 2005).
Separace je zalo0ena na schopnosti molekul s elektrickým nábojem pohybovat
se v gelu podle své molekulové hmotnosti. ím je fragment delzí, tím se v gelu
pohybuje pomaleji. Menzí úseky nukleových kyselin se pohybují rychleji (Zima *et al.*, 2004).

Polyakrylamidové gely vznikají polymerací dvou monomer , akrylamidu a
N, N'-metylenbisakrylamidu. Koncentrace monomer ur uje velikost pór . ím je
koncentrace akrylamidu v tzí, tím jsou póry v gelu menzí. Póry jsou nejmenzí p i

enbisakrylamidu. Nevýhodou elektroforézy
ysoká toxicita akrylamidu (Zima *et al.*, 2004). Pro
detekci molekul DNA separovaných v polyakrylamidovém gelu se používá
barvení st íbrem (Marda *et al.*, 2005).

3.1 Biologický materiál

Ve své bakalářské práci jsem pracovala s DNA zesti jedinců pápa simbila (*Cicconia abdimii*), kteří pocházeli ze zoologické zahrady ve Dvoře Králové nad Labem. DNA byla izolována z krve zesti nepříbuzných jedinců fenol-chloroformovou extrakcí. Izolovaná DNA byla uchovávána v TE pufru zmrazená v -20 °C.

3.2 Použité primery

Ve své bakalářské práci jsem testovala *cross-species* PCR amplifikací 198 párů primerů. Z nich je 44 odvozeno od zástupců z řádu plaměnců a 154 od zástupců z řádu veslonožů. Testované primery jsou shrnuty v tabulce číslo 1.

Tabulka číslo 1: Přehled testovaných mikrosatelitových lokusů. Jednotlivé sloupce tabulky uvádí řád a druh ptáka, ze kterého byl odvozen mikrosatelitový lokus, název testovaného mikrosatelitového lokusu a následně autora článku, ve kterém byl mikrosatelitový lokus popsán.

řád	Zdrojový druh	Testované lokusy	Autor
Plaměnci (Phoenicopteriformes)	Plaměnc karibský (<i>Phoenicopiterus ruber ruber</i>)	Prum 1, Prum2, Prum3, Prum 4, Prum 6, Prum 7, Prum 8, Prum 9	Kapil <i>et al.</i> , 2010
		Prum 13	Preston, 2005
	Plaměnc rosový (<i>Phoenicopiterus roseus</i>)	PrA2, PrA3, PrA9, PrA102, PrA103, PrA104, PrA105, PrA110, PrA111, PrA113, PrB3, PrB102, PrB105, PrB110, PrC1, PrC6, PrC12, PrC101, PrC109, PrC117, PrC122, PrD3, PrD4, PrD5, PrD7, PrD9, PrD10, PrD12, PrD102, PrD105, PrD108, PrD117, PrD121, PrD126, PrD139	Geraci <i>et al.</i> , 2010
Veslonož (Pelecaniformes)	Fregatka obecná (<i>Fregata minor</i>)	Fmin01, Fmin02, Fmin03, Fmin04, Fmin05, Fmin06, Fmin07, Fmin08, Fmin09, Fmin10, Fmin11, Fmin12, Fmin13, Fmin14, Fmin15, Fmin16, Fmin17, Fmin18	Dearborn <i>et al.</i> , 2008
		PhB2, PhB4, PhB11, PhC11, PhD11, PhF12, PhG8, PhG12	Duffie <i>et al.</i> , 2008

ád	Zdrojový druh	Testované lokusy	Autor
Veslonozí (Pelecaniformes)	Kormorán chocholatý (<i>Phalacrocorax aristotelis</i>)	Phaari01, Phaari02, Phaari03, Phaari04, Phaari05, Phaari06, Phaari07, Phaari08, Phaari09, Phaari10, Phaari11, Phaari12, Phaari13, Phaari14, Phaari15, Phaari16, Phaari17	Barlow <i>et al.</i> , 2010
	Kormorán uzatý (<i>Phalacrocorax auritus</i>)	Dcoo-01, Dcoo-02, Dcoo-03, Dcoo-05, Dcoo-06, Dcoo-07, Dcoo-08	Mercer <i>et al.</i> , 2010
		COR 01, COR 03, COR 05, COR 06, COR 07, COR 12, COR 15, COR 17, COR 19, COR 20, COR 21, COR 22, COR 23, COR 26, COR 28, COR 30, COR 31, COR 35, COR 38, COR 40, COR 41, COR 43, COR 45, COR 47	Fike <i>et al.</i> , 2009
	Kormorán velký (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	PcD2, PcD4, PcD5, PcD6, PcT1, PcT3, PcT4	Piertney <i>et al.</i> , 1998
	Pelikán bílý (<i>Pelecanus onocrotalus</i>)	PEL086, PEL149, PEL175, PEL185, PEL188, PEL190, PEL221, PEL 226, PEL207, PEL265, PEL304	De Ponte Machado <i>et al.</i> , 2008
	Pelikán severoamerický (<i>Pelecanus erythrorhynchos</i>)	Per01, Per02, Per03, Per04, Per05, Per06, Per07, Per08, Per09	Hickman <i>et al.</i> , 2008
	Terej guánový (<i>Sula variegata</i>)	Sv2A-2, Sv2A-26, Sv2A-45, Sv2A-47, Sv2A-50, Sv2A-53, Sv2A-152, Sv2B- 27, Sv2B-138	Taylor <i>et al.</i> , 2010
	Terej modronohý (<i>Sula nebouxii</i>)	Boob-RM2-F07, Boob-RM3-D07, Boob-RM3-F11, Boob-RM4-A08, Boob-RM4-B03, Boob-RM4-C03, Boob-RM4-D07, Boob-RM4-E03, Boob-RM4-E10, Boob-RM4-F11, Boob-RM4-G03	Faircloth <i>et al.</i> , 2009
		Sn2A-36, Sn2A-90, Sn2A-123, Sn2B- 68, Sn2B-83, Sn2B-100	Taylor <i>et al.</i> , 2010
	Terej ervenonohý (<i>Sula sula</i>)	Ss1b-16, Ss1b-51, Ss1b-57, Ss1b-98, Ss1b-106, Ss1b-142, Ss2b-2, Ss2b-35, Ss2b-48, Ss2b-71, Ss2b-88, Ss2b-92, Ss2b-110, Ss2b-138, Ss2b-153	Morris- Pocock <i>et al.</i> , 2010
Faeton Olutozobý (<i>Phaethon lepturus</i>)	P3A3, P3D7, P3C1, P4F2, P3F3, P3F5, P3A4, P3G12, P3F7, P4G1, P3H10	Humeau <i>et al.</i> , 2010	

osatelit ní DNA a elektroforetická s eparace

Do 0,2ml mikrozkrumavek byl napipetován 1 µl DNA o koncentraci 10-50 µg/ml a 9 µl PCR mixu. PCR mix byl p ípraven pipetováním jednotlivých slo0ek podle tabulky 2.

Reakce probíhala v termocykléru podle následujícího asového a teplotního profilu:

1. 5 min 94 °C
 2. 30s 94 °C
 - 30s 50 °C
 - 30s 72 °C
 3. 7min 72 °C
- } 35 cykl

Aby byly produkty PCR amplifikace po elektroforetické separaci dobře hodnotitelné, byly optimalizovány podmínky PCR reakce zvýšením i snížením teploty annealingu a byl upraven as elektroforetického d lení. Teplota 50 °C byla zvolena jako základní teplota annealingu primer . Pokud byl produkt PCR reakce po elektroforetické separaci slab viditelný, byla teplota annealingu sí0ena z 50°C na 48 i 46°C. Pokud byl produkt po elektroforetické separaci siln viditelný a bandy nerozeznatelné, byla teplota annealingu zvyzována nad 50°C. Základní as separace byl 90 minut. Pokud byly bandy p ílíz blízko a nebylo možné zjistit po et alel, byl prodlou0en as separace na 2-4 hodiny.

Tabulka íslo 2: Slo0ení PCR mixu pro zest vzork .

Slo0ky PCR mixu	Koncentrace zásobního roztoku	Objem [µl]
Deionizovaná voda		43,9
Storage buffer	10x	6,7
Roztok MgCl ₂	25 mmol/l	4,1
Roztok dNTPs	20 µmol/l	0,8
Primer F	10 µmol/l	3,3
Primer R	10 µmol/l	3,3
Taq DNA polymeráza	1 U/µl	1,5

Produkt v polyakrylamidovém gelu

Tento postup byl optimalizován pro použití vyhledávané sekvenční elektroforetické komrky S2 Whatman Biometra, a rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tlouškou gelu 0,4 mm.

Příprava skel:

- 1) Obě skla důkladně omýt vodou se saponátem a vydrhnout kartáčkem. Následně opláchnout deionizovanou vodou, osušit, dvakrát omýt 96% ethanol a osušit papírovým ručníkem.
- 2) V těžší sklo ozet it na ploze, která se bude dotýkat gelu, přípravkem pro odpuzování vody ze skel automobil (Clear Vue Rain Repellent). Přípravek rozet it papírovým ubrouskem a nechat 5 minut zaschnout, pak opláchnout deionizovanou vodou a osušit papírovým ručníkem.
- 3) Menší sklo ozet it na ploze, která se bude dotýkat gelu, 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu s 3 μ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu. Ten rozet it papírovým ubrouskem a nechat 5 minut zaschnout. Pak čtyikrát omýt 96% ethanol a em.
- 4) Na ozet enou plochu v těžšího skla umístit po stranách 0,4 mm silné spacers. Na n položit menší sklo ozet enou plochou dol . Gummy spaceru p iložít k menšímu sklu, aby se její t sn dotýkaly. Skla na každé straně sepnout dvěma klipsy.
- 5) Dobře promíchaný roztok polyakrylamidu lít z kádinky mezi skla. Vsunout hřebíček mezi skla, sepnout ty mi klipsami a nechat 1 hodinu polymerizovat. Skla poté důkladně umýt od zbytků gelu a osušit.

Příprava elektroforetické komrky:

- 1) Omyté a osušené sklo upevnit pomocí zroubovacích úchytů do elektroforetické komrky. Kratší sklo umístit k hliníkové desce elektroforetické komrky. Upevnit pomocí zroubovacích úchytů .
- 2) Katodový i anodový prostor zalít 0,5x TBE puřem, vytáhnout hřebíček. Katodový i anodový prostor uzavřít, nasadit elektrody. Na zdroji stejnosměrného

hodnotu výkonu 90 W, napětí 3 000 V a proudu 150

Elektroforetická separace:

- 1) Po nahátí gelu vložit hřebínek. Produkt PCR reakce smísit s 5 μ l nanázečního pufru a nechat 3 minuty denaturovat v termobloku při 96 °C. Po denaturaci ihned umístit vzorky do ledové tůžky. Nanést vzorky po 2 μ l do jamek mezi zoubky hřebínku. Zapojit elektrody. Na zdroji stejnosměrného elektrického proudu nastavit hodnotu výkonu 70 W, napětí 3 000 V a proud 150 mA.
- 2) Skloky nanázečního pufru (xylénová modula a bromfenolovou modula) ukazují průběh elektroforetického dělení.

Vizualizace produktů elektroforetické separace:

- 1) Vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu. Odpojit obě elektrody. Vypustit pufr z katodové části elektroforetické komůrky. Vyjmout skla s gelem. Pomocí nože odlepit malé sklo s gelem od velkého.
- 2) Malé sklo s gelem vložit do fotomisky a zalít fix/stop roztokem. Nechat působit po dobu 20 minut. Fix/stop roztok slít zpět do banky.
- 3) Třikrát promýt sklo s gelem deionizovanou vodou. Zalít 1% roztokem HNO_3 a nechat působit 5 minut. Poté roztok vylít. Třikrát promýt deionizovanou vodou.
- 4) Umístit sklo s gelem na tůžku do 0,1% roztoku AgNO_3 , do nich bylo těsně předtím napipetováno 1,2 ml formaldehydu. Roztok nechat na gel působit 30 minut. Roztok AgNO_3 slít do zásobní lahve. Ponořit sklo s gelem na 5 sekund do misky s deionizovanou vodou.
- 5) Vložit sklo s gelem do misky na tůžku a zalít vývojkou. Při dostatečné viditelnosti proužků PCR produktu, přelit gel fix/stop roztokem.
- 6) Sklo s gelem omýt v misce s deionizovanou vodou a usuzit v suzárně. Gel s viditelnými produkty vyhodnotit na negatoskopu. Z elektroforetogramu zjistit počet alel polymorfních mikrosatelitových lokusů.

Akrylamid	Applichem
aTaq DNA polymeráza (5U/μl), M1241	Promega
Bromfenolová mod	Serva
dNTPs (100 mmol/l, 400 μl ka0dého), U1240	Promega
Deionizovaná voda	
Dusi nan st íbrný	Lachema
Ethanol - 96% roztok	Lihovar Vrbátky
Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na ₂ EDTA)	Lachema
Formaldehyd	Lachema
Formamid	Lachema
Kyselina boritá	Lachema
Kyselina dusi ná - 65% roztok	Lachema
Kyselina octová - ledová	Lachema
3-methakryloxypropyltrimethoxysilan	Serva
Mo ovina	Lachema
N,N' - methylenbisakrylamid	Applichem
N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Peroxodisíran amonný	Serva
P ípravek na odpuzování vody Clear Vue Rain Reppelent	Turtle WAX
Thiosíran sodný	Lachema
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	AppliChem
Uhli itan sodný	Lachema
Xylénová mod (Xylencyanol FF)	Applichem

Akrylamid (6% zásobní roztok)

420 g mo oviny

484 ml deonizované vody

50 ml 10 x TBE

150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid: N,N'- methylenbisakrylamid 19:1 po rozpuzt ní vzech slo0ek zfiltrvat a ulo0it v temné láhvi ve 4 °C

Polyakrylamidový 6% gel

60 ml 6% zásobního roztoku akr ylamidu

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

40µl N, N, N', N'- tetramethylethylendiaminu

Fix/stop roztok

80 ml ledové kyseliny octové

Objem doplnit deionizovanou vodou na 800 ml

Roztok 1% HNO_3

12 ml 65% HNO_3

Objem doplnit deionizovanou vodou na 800 ml

Roztok 0,1% AgNO_3

0,8 g AgNO_3

Objem doplnit deionizovanou vodou na 800 ml

P ed pou0itím napipetovat 1,2 ml formaldehydu

Vývojka

24 g uhli ítanu sodného Na_2CO_3

odou na 800 ml

Uložit ve 4 °C

Před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

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

3 µl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

Roztok 10% peroxodi síranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

1 g peroxodi síranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

Rozpustit v 10 ml deionizované vody

Nanázeční pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu

0,125 g bromfenolové modři

0,125 g xylénové modři

100 ml formamidu

25 ml deionizované vody

3.7 Vybavení laboratoře

Elektroforetický zdroj ECPS 3000/150

Pharmacia

Elektroforetický zdroj EV232

Consort

Chladnička kombinovaná

Whirlpool

Laboratorní váhy MARKS 622

BEL Engineering

Mikropipety FinnpiPETTE 0,5 a 0 10 µl
(osmikanálová) a 0,3 µl a 0 1 ml

Labsystem

Mikropipety NichipET EX 0,5 µl a 0 1 ml

Nichiryō

Minicentrifuga CLE CSQSP

Cleaver Scientific



PDF Complete

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Centrifuga mikrocentrifuga komerčná S2

Suzárna-sterilizátor CAT 8050

Termocyklér PTC 100-96 VHB

Termocyklér XP Thermal Cycler

Termocyklér Gene Pro

Termoplynová komora Orbit 1 900

Vortex MS2

Výrobník deionizované a ultračistej vody typ 02

Výrobník ledu Icematic F100 Compact

Maneko

Whatman Biometra

Contherm

MJ Research

BIOER Technology

BIOER Technology

Labnet International

Ika

AquaOsmotic

Castel Mac



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[*Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features*](#)



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[**Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features**](#)



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[**Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features**](#)



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[**Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features**](#)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Cross-species PCR amplifikací bylo u špařbka testováno 198 pár primerů odvozených od zástupců z řádu veslonozí a plameňáka. Z tohoto počtu amplifikovalo 24 pár primerů polymorfní mikrosatelitní lokusy, 10 pár primerů bylo odvozeno od plameňáka a 14 od veslonohých. U primerů, které poskytovaly po PCR mikrosatelitní amplifikaci polymorfní produkt, byly stanoveny optimální teploty annealingu a čas elektroforetické separace. Z celkového počtu pár primerů odvozených od plameňáka amplifikovalo polymorfní mikrosatelitový lokus 22 % pár primerů. Z pár primerů odvozených od veslonohých amplifikovalo polymorfní mikrosatelitový lokus 9 % pár primerů. U primerů odvozených od plameňáka je tedy více než 2,5x větší pravděpodobnost amplifikace polymorfního mikrosatelitového lokusu při cross-species PCR amplifikaci.

A	adenin
bp	bases pair (páry bazí)
C	cytozin
G	guanin
LINEs	long interspersed elements (dlouhé rozptýlené elementy)
LTRs	long terminal repeats (dlouhé terminální repetice)
min	minuta
PCR	polymerase chain reaction (et zová polymerázová reakce)
SINEs	short interspersed elements (krátké rozptýlené elementy)
STRs	short tandem repeats (krátké tandemové r epetice)
T	tymin
T _a	teplota anneali ngu

- Alderton, D. (1995) Ptáci. Nakladatelský d m OP, Praha.
- Avise, J. C., Nelson, W. S., Sibley, C. G. (1994) DNA sequence support for a close phylogentic relationship between some storks and New Wolrd vultures. Proceedings of the National Academy of Science 91, 5173-5177.
- Barlow, E. J., Telford, A., Daunt, F., Cavers, S. (2010) Isolation and characterization of microsatellite markers for the European shag, *Phalacrocorax aristotelis*. Molecular Ecology Resources 10, 1098-1105.
- Bennet, P. (2000) Demystified . . . Microsatellites. Molecular Pathology53, 177-183.
- Burianová, E. (2011) Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelit pro determinaci paternity u ápa bílého (*Ciconia ciconia*). Diplomová práce(Dep. In: Knihovna biologických obor , P írodo- v decká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci)
- Buschiazzo, E., Gemmell, N. J. (2006) The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. BioEssay 28, 1040-1050.
- Brown, L. H., Urban, E.K., Newman, K. (1992) The birds of Africa. Vol. 1. Academic press, London.
- Burnie, D., Hoare, B. (2008) Ptáci obrazová encyklopedie pták celého sv ta. Euromedia Group, k.s. Kni0ní klub, Praha.
- Cahlíková, R. (2011) Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelit pro determinaci paternity u ápa erného (*Ciconia nigra*). Diplomová práce(Dep. In: Knihovna biologických obor , P írodo- v decká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci)

2006): Biologie. Computer Press a. s., Brno.

- Campbell, N. A., Reece J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., Jackson, R. B. (2011) Biology. 9th edition, Pearson, USA.
- Clarke, L. A., Rebelo, C. S., Goncalves, J., Bodavida, M. G., Jordan, P., (2001) PCR amplification introduces errors into mononukleotide and dinucleotide repeat sequences. Molecular Pathology 54, 351-353.
- Dearborn, D., Hailer, F., Fleischer R., (2008) Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). Molecular Ecology Resources 8, 1399-1401.
- del Hoyo, J., Elliott, J., A. & Sargatal, J. eds. (1992) Handbook of the birds of the world. Vol. 1. Lynx Edicions, Barcelona.
- De Ponte-Machado, M., Feldheim, K. A., Sellas, A. B., Bowie, R. C. K. (2008) Development and characterization of microsatellite loci from the Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*) and widespread application to other members of the Pelecanidae. Conservation Genetics 10, 1033-1036.
- Duffie, C., Glenn, T. C., Hagen, C., Parker, P., (2008) Microsatellite markers isolated from the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). Molecular Ecology 8, 625-627.
- Duffie, C. V., Glenn, T. C., Vargas, F. H., Parker, P. G. (2009) Genetic structure within and between island populations of the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). Molecular Ecology 18, 2103-2111.
- Ellegren, H. (2004) Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics 5, 435- 445.

- rummond, H., Gowaty, P. A. (2009) Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxi*). Conservation Genetic Resources 1, 159-162.
- Fike, J. A., Devault, T. L., Rhodes, O. E. (2009) Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). Molecular Ecology Resources 9, 1183-1185.
- Galbusera, P., van Dongen, S., Matthysen, E. (2000) Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. Conservation Genetics 1, 163-168.
- 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.
- Gaisler J., Zima J. (2007) Zoologie obratlovc , Academia, Praha.
- Gosler, A., Perrins, Ch., Brutt, E., Kesley, M., Ogivle, M. Lewis, A., Woodcock, M., Ford, H., Moore, A.(1994) Atlas pták sv ta. Příroda a.s., Bratislava.
- Hacket, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C. K., Braun, E. L., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Cox, W. A., Han, K. L., Harshman, J., Huddleston, Ch. J., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Sheldon, F. H., Steadman, D. W., Witt, Ch. C., Yuri, T. (2008) A phylogenomic Study of bird reveals their evolutionary history. Science 320, 1763-1767.
- Hickman, C.R., Peters, M. B., Crawford, N. G., Hagen, C., Glenn, T. C., Somers, C. M. (2008) Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). Molecular Ecology Resources8, 1439-1441.

- érin, F., Jaquement, S., Requier, J. B., le Corne,
and characterization of eleven polymorphic
microsatellite loci in the White-tailed tropicbird *Phaethon lepturus*
(Phaethontidae). Molecular Ecology Resources, preprint.
- Hanzák, J., Hudec, K. (1974): Světem zvířat, Díl II. - Ptáci (1. část). Albatros,
Praha.
- Chambers, G. K., MacAvoy, E. S.(2000) Microsatellites: consensus and
controversy. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 126,
455-476.
- Kapil, R., Sawyer, G. M., Preston, L., Benjamin, R. C. (2010) Isolation and
characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean
flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*), preprint.
- Kapil, R. (2005) Microsatellite-based genetic profiling for the management of
wild and captive flamingo populations. Ph.D. dissertation, University of
North Texas, USA.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H., Andersson, L. (1993) The abundance of various
polymorphic microsatellite motifs differs between plants and
vertebrates. Nucleic Acids Research 21, 1111-1115.
- Levinson, G., Gutman, G. (1987) Slipped-strand mispairing: A Major
Mechanism for DNA Sequence Evolution. Molecular Biology and
Evolution 3, 203-221.
- Mercer, D. M., Haig S. M., Mullins T. M. (2010) Isolation and characterization of
eight novel microsatellite loci in the double-crested cormorant
(*Phalacrocorax auritus*), Conservation Genetics Resources 2, 119-121.

- S. A., Sun, Z., Friesen, V. L., (2010) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). Molecular Ecology Resources. Preprint.
- Mukund, K., Prabhakar, R., Vidya, G., (2001) Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. Molecular Biology and Evolution 18, 1161-1167.
- Murray, V., Mochawin, Ch., England, P. R. (1993) The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. Nucleic Acid Research 2, 2395-2398.
- Nelson W., Sibley Ch. (1994) DNA sequence support for a close phylogenetic relationship between some storks and New World Vultures. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 91, 5173-5177.
- Piertney, S. B., Goostrey, A., Dallas, J. F., Carss, D. N. (1998) Highly polymorphic microsatellite markers in the great cormorant *Phalacrocorax carbo*. Molecular Ecology 7, 138-140.
- Preston, E., L. (2005) Isolation and characterization of polymorphic loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New tools for wildlife management. Ph.D. dissertation, University of North Texas, USA.
- Primmer, C. R., Moller, A. P., Ellegren, H. (1996) A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. Molecular Ecology 5, 365-378.
- Primmer, C.R., Raudsepp, T., Chowdhary, B. P., Moller, A. P., Ellegren, H. (1997) Low frequency of microsatellites in the avian genome. Genome Research 7, 471-482.

- Shoads, R. E. (1990) Optimization of the annealing and amplification *in vitro*. *Nucleic Acid Research* 18, 6409-6412.
- Sanjeeva, R. P., Housman, D. E. (1997) The complex pathology of trinucleotide repeats. *Current Opinion in Cell Biology* 9, 364-372.
- 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, P. D., Simmons, M. J. (2000) Principles of genetics. 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Svensson, L., Grant, P. (1999) Ptáci Evropy severní Afriky a blízkého východu. Svojtka & Co, Praha.
- Šmarda, J., Dozka, J., Růžičková, V., Koptíková, J. (2005) Metody molekulární biologie Masarykova Univerzita, Brno.
- Taylor, S. A., Morris-Pocock, J. A., Sun, Z., Friesen, V. L. (2010) Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxi*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* 15, 525-528.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and Analysis. *Genome Research* 10, 967-981.
- Webster, A. (2002) Encyclopedia of evolution. Vol. 2, Oxford University Press, New York.
- Zahne, L., Bargelloni, L., Patarneollo, T. (2002) Strategies for microsatellite isolation. *Molecular Ecology* 1, 1-16.



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

ndlinger, P., Piálek, J.(2004) Genetické metody
arlova, Karolinum, Praha.