

ANALÝZA RŮSTOVÉHO HORMONU LÍNA OBECNÉHO (*TINCA TINCA*)

Zrůstová J. ¹, Bílek K. ¹, Baránek V.², Knoll A. ¹

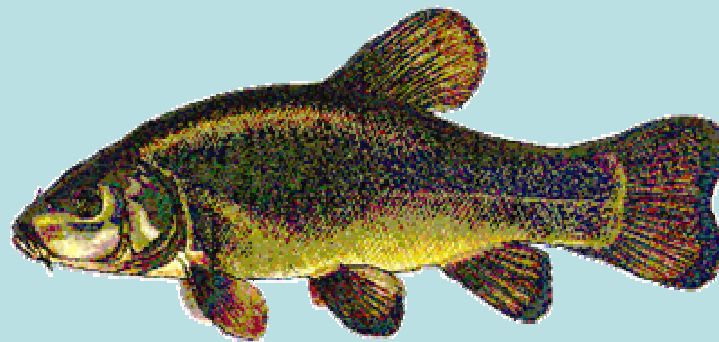
¹ Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat

² Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství

Podpořeno projektem FRVŠ 2030/2007

Cíl

- v rámci přípravy semináře byl analyzován růstový hormon u lína obecného (*Tinca tinca*)

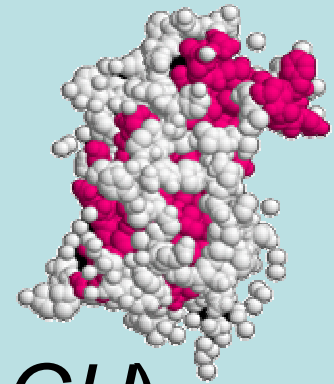


Úvod

- LÍN OBECNÝ

- tradiční ryba chovaná v rybnících střední a východní Evropy
- produkce lína v ČR: 206 – 275 tun
- snaha o jeho uplatnění v technické akvakultuře, nevýhodou relativně pomalý růst
- možné použití genetických metod pro urychlení růstu

Úvod



- Růstový hormon (Growth hormone, *GH*)
 - patří k polypeptidovým hormonům
 - tvořen v hypofýze obratlovců
 - reguluje somatický růst, má vliv na metabolismus proteinů, lipidů a sacharidů
 - podporuje rovněž syntézu NK
 - optimální účinky *GH* se uskutečňují pouze za spoluúčasti hormonů štítné žlázy a insulinu

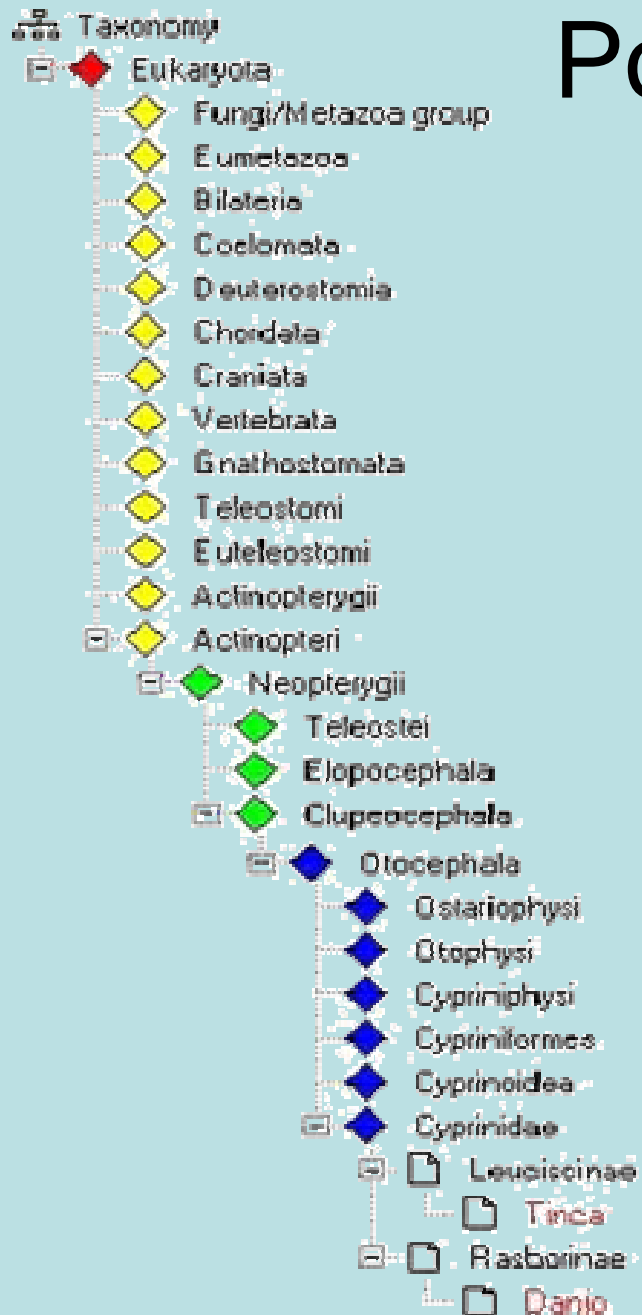
Sekvenování GH lína obecného

- Ze sekvence DQ980027 636 bp mRNA linear *Tinca tinca* growth hormone (*GH*) mRNA, complete cds. – byly navrženy primery

LGH 1A	GGT GGT GCT GGT TAG TTT GTT
LGH 1B	TGT GTT TCA TCT TTC CCA GTG
LGH 2A	CAA CAA TGC AGT CAT CCG TG
LGH 2B	GGC AGG GAG TCG TTA TCA TC
LGH 3A	TGA TAA CGA CTC CCT GCC G
LGH 4B	ACA GGG TGC AGT TGG AAT CC

Získaná sekvence lína obecného bez intronu mezi exony 1 a 2

```
ATGGCTAGAGCCATGGTGCTGTTGTCGGTGGTGCTGGTTAGTTTGTGGTGAACCAGGGG  
AGAGCCTCAGAGAACCAGCGGCTCTTCAACAATGCAGTCATCCGTGTTCAACACCTGCAC  
CAGCTGGCTGCAAAAATGATTAAACGACTTTGTAAGATTTCCATTCAAATCTATTCAGAAT  
TAGTAGATTCTAACCAGAACA AAAACAATTGFTCA AACCTATTCAAGTAA AAAAATATGA  
GCTTAAAGGGATAGTTCAACC AAAAATGAAAATTC TGTATCATTGCTCACCCTCGAGT  
TGTTCCAAACCTGTATGAACTTCTTTCTTCTGCTGAACACAAAAGAAGATATTTTAAAGA  
ATATGGGTAACCAAACAGTTGATTGACTTCCATAGTATGGGGGAAAAAAA CTTTGGAAACA  
ACTTGAGGGTGAGTAAATGAA GACAGAATTTTCATTTTGTAGTGA ACTATCCCTTTTTGT  
AAGTGTTCTTTGCATTTCTATCAGATGCATTTGTTGATTTAGCTATTTGAGTGAATAAAA  
TGTATTATAGTAAATACGATTTTCTTTTGTATCAAGGAGGACAACCTGTTGCCTGAGG  
AACGCAGACAGCTGAGTAAAA TCTTTCCTCTGTCTTTCTGCAACTCTGACTCCATTGAGG  
CGCCCACTGGGAAAGATGAAA CACAGAAGAGCTCA GTAAGTAGACAGTATGGTTAAAAAT  
GATGTTTTATTCAACAAAATA TAGAACTATGAAAC AAATAGTAGTGTCAAACAATGAACA  
AAAATACAACATACTGTACAA CAATACAAAAAAA AAAATCTTGTTTTCA CACAATTAGA  
TGACAATTTTACTCTTTAAATTGCTCAGAAATCAGAAAATGCTAAGTATTGTCTTGCACA  
GTTTGGAAAACACTTACACCAAATATGGGCAGCATAAACATCAAAAATGGCTAGTGGTCT  
GAAGCCTCCAGTATCCTTTTTTCTTTCTTTCAGATGTTGAAGCTCCTTCGCATCTCTTTCC  
GCCTCATCGAGTCCTGGGAGTTCCCCAGCCAGACC CTGAGCGGAACCGTCTCAAACAGCC  
TGACCGTCGGAAATCCCAACCAGATCACAGAGAAGCTGGCCGACTTGAAA GTGGGCATCA  
GCGTGCTCATCAAGGTGAGAGAGACCAGATTTATTCTAGGCTACTTCATTTTCTCACACA  
GTGTGTCAAGTGGTTTTACCA GGAGGTGTGATGGCATCTTCTGGTCTTCTTCGGATAGCT  
ATGTCATAATTTGCCATTTGTATCTGCACAGGGATGTCTGGATGGTCAACCAAACATGGA  
TGATAACGACTCCCTGCCCTGCTGCTTTTGTAGGATTTCTACTTGACCATGGGGGAGAGCAG  
CTTCAGAGAGAGCTTTCGTCTTCTGGCTTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTGGAAAC  
TTACCTGAGGGTTGCAAATTGCAGGAGATCCCTGGATTCCAACTGCACCCTGTAGA
```



Porovnání lína obecného s *Dania reria*

- využití známé sekvence *Dania reria* k navržení primerů na amplifikaci :
 - růstového hormonu (*GH*) na základě fylogenetické příbuznosti (88% shoda mRNA)
 - housekeepingových genů (*GAPDH*, *EEF1*, *TUBA1*)

Porovnání sekvence růstového hormonu Dania reria a lína obecného v ClustalW

```

lin_GH_mRNA      ATGGCTAGAGCCATGGTGC TGTGTCGGTGGTGC TGGTTAGTTTGT TGGTGAACCAGGGC 60
Danio_GH_mRNA   ATGGCTAGAGCATTGGTGC TGTTCAGCTTGGTGC TTTAGTTTGGTGC TGAATCAGGGC 60
*****          *****          * *****          *****          *****

lin_GH_mRNA      AGAGCCTCAGAGAACCAGCGGCTCTTCAACAATGCAGTCATCCGTGTTCAACACCTGCAC 120
Danio_GH_mRNA   AAAGCCTCCGAAAACCAGCGGCTCTTCAACAACGCAGTCATCCGTGTTCAACACCTTCAC 120
* ***** ** *****          *****          *****          *****

lin_GH_mRNA      CAGCTGGCTGCAAAAAATGATTAACGACTTTGAGGACAACCTGTTGCCTGAGGAACGCAGA 180
Danio_GH_mRNA   CAGCTGGCTGCAAAAAATGATTAACGACTTTGAGGAAAGCTTATGCCTGAGGAACGCAGA 180
*****          *****          ** *****          *****

lin_GH_mRNA      CAGCTGACTAAAATCTTCCCTCTGCTTTCTGCAACTCTGACTCCATTGAGCGCCCACT 240
Danio_GH_mRNA   CAGTTGACTAAAATCTTCCCTCTGCTTTCTGCAACTCTGACTCCATTGAGCGCCCACT 240
*** *****          *****          *****          *****          **

lin_GH_mRNA      CGGAAAGATGAAACACAGAAGACTCAATGTTGAAGCTCCTTCGCATCTCTTTCCGCCTC 300
Danio_GH_mRNA   CGGAAAGATGAAACACAAAAGACTCAATGTTGAAGCTCCTTCGTATCTCTTTCCGCCTC 300
** *****          ** * *****          *****          *****          *****

lin_GH_mRNA      ATCGAGTCC TGGGACTTCCCCAGCCAGACCC TGAGCCGAACCGTCTCAAACAGCCTGACC 360
Danio_GH_mRNA   ATTGAA TCC TGGGACTTCCCCAGCCAGACCTTGAGCTCCACTATCTCAAACAGCCTGACC 360
** * *****          *****          *****          ** *****          *****

lin_GH_mRNA      GTCGGAATCCCAACCAGATCACAGAGAAGCTGGCCGACTTGAAAGTGGGCATCAGCGTG 420
Danio_GH_mRNA   ATCGGAACCCCAACCAGATCACAGAGAAGCTGGCCGACTGAAAGTGGGCATCAGCGTG 420
*****          *****          *****          *****          *****          *****

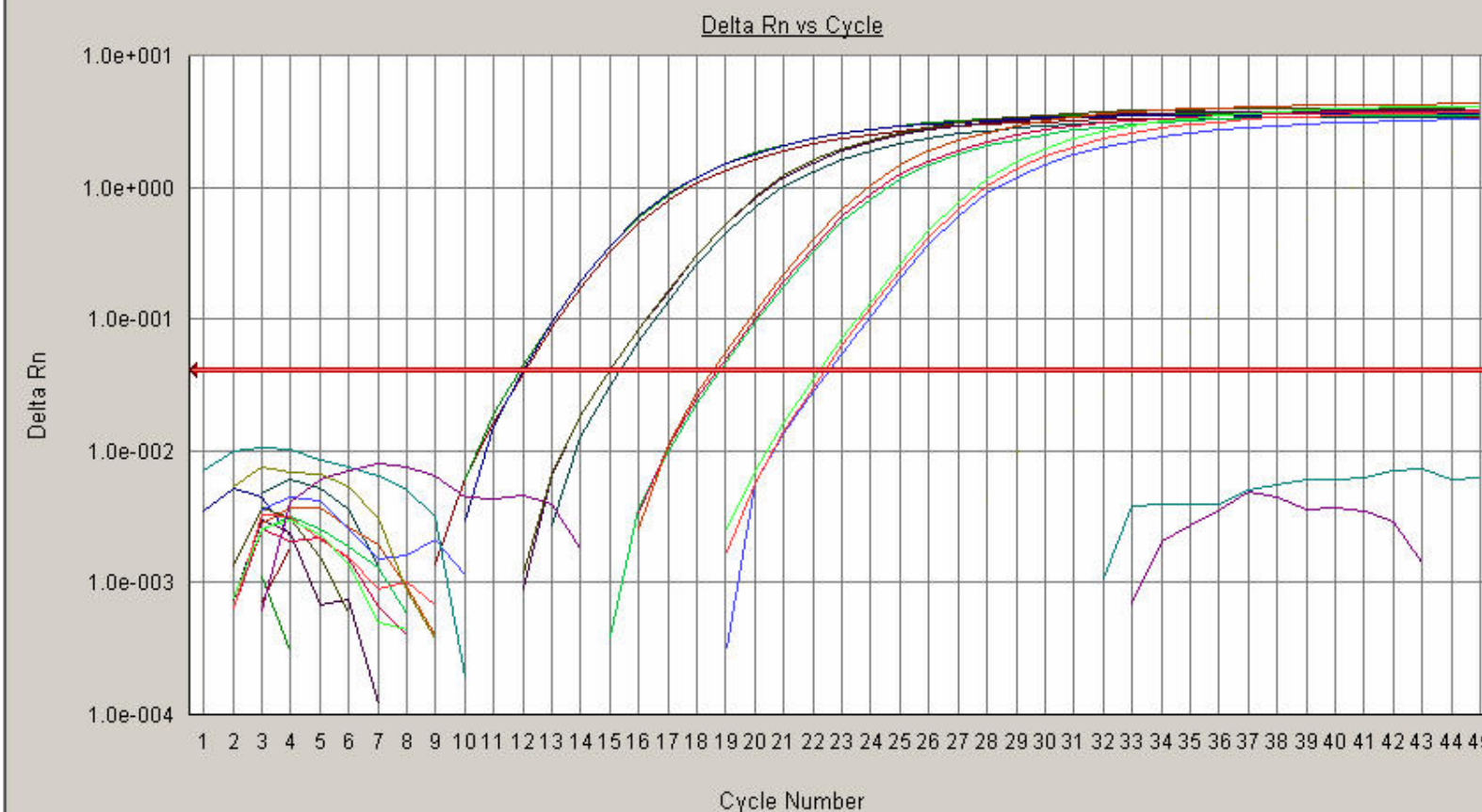
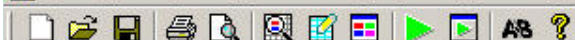
lin_GH_mRNA      CTCATCAACGGATGTC TGGATGCTCAACCAACA TGGATGATAACGACTCCCTGCCCGTG 480
Danio_GH_mRNA   CTCATCAACGGATGTC TGGATGGACAGCCAAATA TGGATGACAACGACTCCCTGCCCGTG 480
*****          *****          ** *****          *****          *****          **

lin_GH_mRNA      CCTTTTGAGGATTTCTACTTGACCATCGCGGAGACCAGCTTCAGAGAGAGCTTTCCGCTT 540
Danio_GH_mRNA   CCTTTTGAGGATTTCTACTTGACCATCGCGGAGACCAGCTTCAGAGAGAGCTTTCCGCTT 540
*****          *****          * *****          *** *****          *****          **

lin_GH_mRNA      CTGGCTTGCCTTCAAGAAGGACATGCCAAGCTGCAAACTTACCTGAGCGTTCCAAATTGC 600
Danio_GH_mRNA   CTGGCTTGCCTTCAAGAAGGACATGCCAAGCTGCAAACTTACCTGAGCGTTCCGAATTGC 600
*****          *****          *****          *****          *****          *****

lin_GH_mRNA      AGGAGATCCCTGGATTCCAAC TGCACCTGTAGA 634
Danio_GH_mRNA   AGGAGATCTCTGGATTCCAAC TGTACCCTGTAG- 633
*****          *****          *****          *****

```

Data:

Detector:

Line Color:

Analysis Settings

Auto Ct

Manual Ct

Threshold:

Auto Baseline

Manual Baseline:

Start (cycle):

End (cycle):

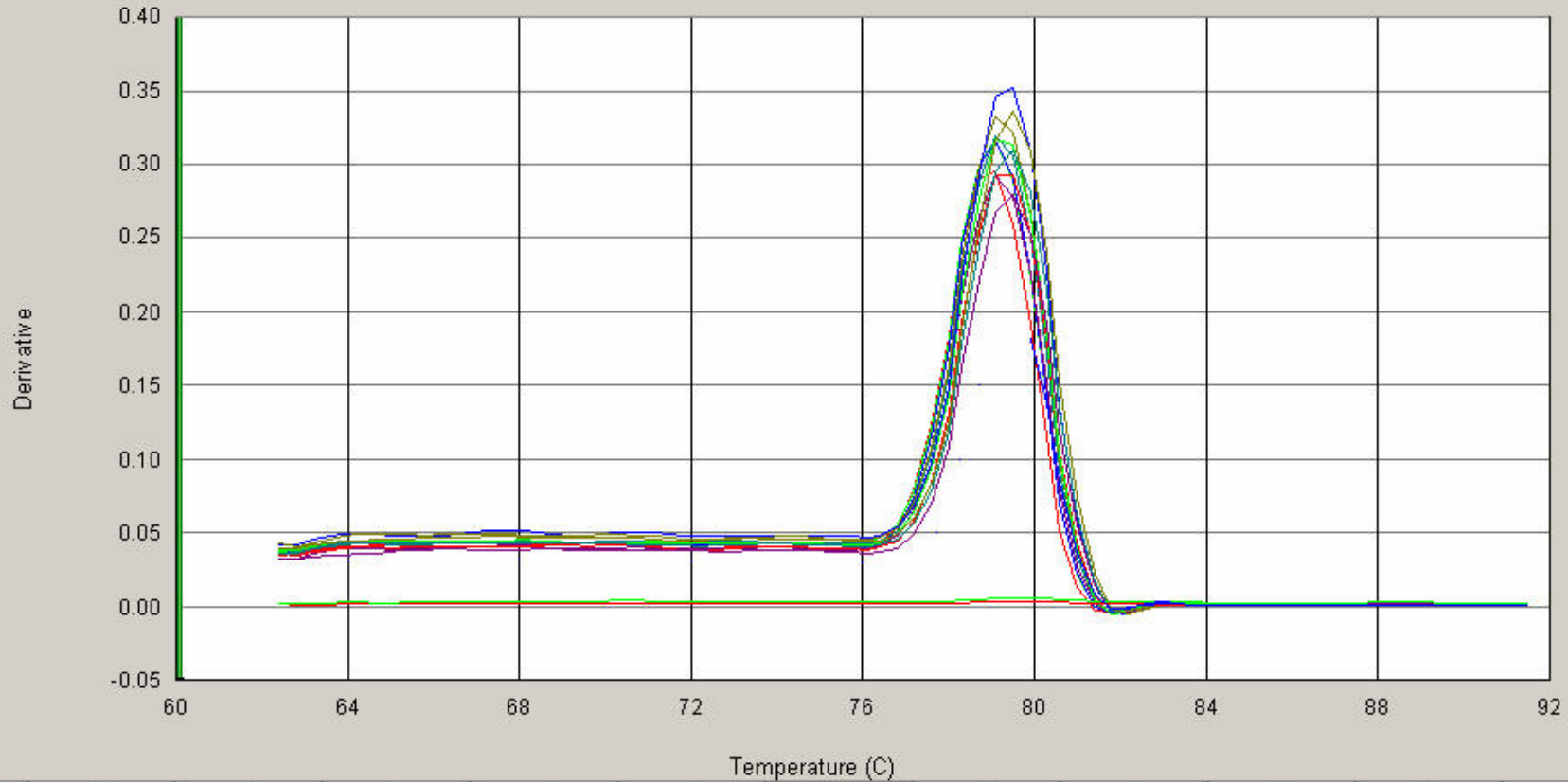
Analyze

Help

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

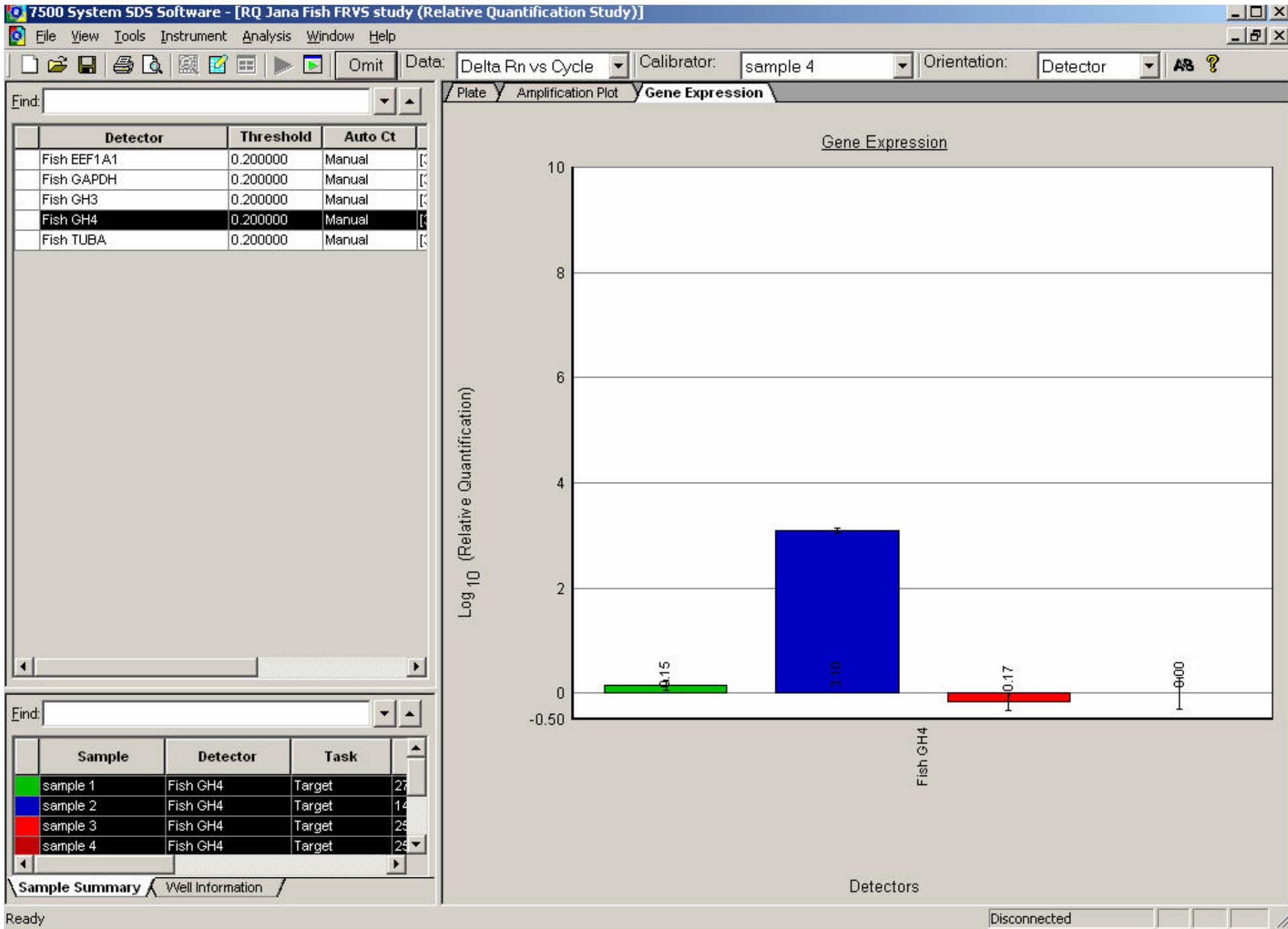


Dissociation Curve



Data Type:
 Derivative
 Detector:
 Fish GH4
 Tm = 60.1 °C

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



Vz. 1 (260 mm), vz.2 (235 mm), vz. 3 (213 mm), vz. 4 (165 mm)

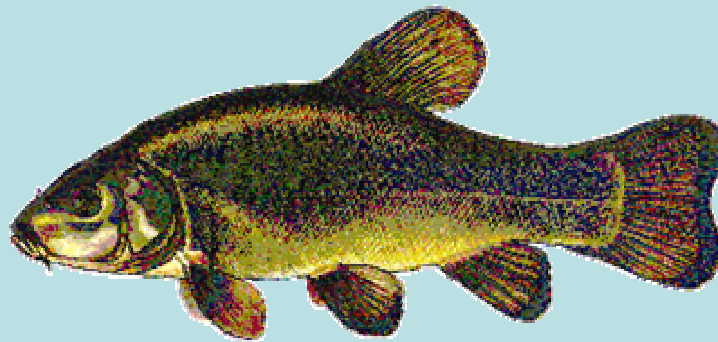
Závěr

- byly porovnány sekvence dvou fylogeneticky příbuzných druhů tj. *Dania reria* a lína obecného
- na základě zjištěné homologie sekvencí byly navrženy primery pro *GH* a referenční geny
- získané PCR produkty byly sekvenovány a nejdelší produkt byl i klonován
- byla potvrzena sekvence exonů a získána neznámá sekvence tří intronů
- byly optimalizovány reakční podmínky pro RT-PCR
- u testovaného setu vzorků nebyla významně zvýšená genová exprese

Využití

- výsledky budou využity pro připravovaný seminář, který bude pořádán pro zájemce z řad studentů MZLU v Brně
- získané poznatky budou dále využity v další experimentální činnosti

Děkuji za pozornost



Podpořeno projektem FRVŠ 270241/1102 a GAČR 523/03/H076