Zachodniopomorski
Uniwersytet
Technologiczny

WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOŚCI

I RYBACTWA

Wydział
Nauk o Żywności
i Rybactwa

Remigiusz Andrzej Panicz

Zastosowanie metody real-time PCR oraz kompetycyjnego testu ELISA do określenia potencjału wzrostowego lina *Tinca tinca* L.

Application of real-time PCR and competitive ELISA assays for testing specific growth rate of tench (Tinca tinca L.)

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem:
Dr hab. inż. Jacka Sadowskiego, prof. nadzw.
w Zakładzie Akwakultury

Szczecin 2010

Serdecznie dziękuję
Dr hab. inż. Jackowi Sadowskiemu, prof. nadzw., za cenne uwagi, wytrwałość oraz wolę walki w kształtowaniu niniejszej dysertacji, ponadto pracownikom Zakładu Akwakultury za wsparcie merytoryczne.

Pracę dedykuję najbliższym, którzy swym wsparciem wnieśli w nią najwięcej.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei

Herrn Dr. med. vet. Sven M. Bergmann für die wertvollen praktischen und sachlichen Bemerkungen bei der Gestaltung der vorliegenden Arbeit.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP 7

2. CEL PRACY 10

3. BUDOWA I FUNKCJONOWANIE OSI SOMATOTROPOWEJ U RYB 11

4. MATERIAŁ I METODY 18

4.1 Klasyfikacja taksonomiczna badanego gatunku lina 18

4.2 Okreslenie sekwencji genu hormonu wzrostu lina. Model struktury tzeciorzędowej bialka hormonu wzrostu 18

4.2.1 Materiał do badań 18

4.2.2 Izolacja oraz ocena wyizolowanego DNA 19

4.2.3 Projektowanie starterów oraz łańcuchowe reakcje polimeraz 20

4.2.4 Porównanie mRNA gh lina względem innych gatunków ryb 26

4.2.5 Modelowanie struktury przestrzennej białka oraz weryfikacja poprawności otrzymanego modelu 27

4.3 Kontrola jednorodności genetycznej osobników doświadczalnych metodą PCR-RFLP. Pomiar aktywności genu hormonu wzrostu linów metodą qPCR. Ocena zależności między hormonem wzrostu a insulinopodobnym czynnikiem wzrostu typu I w osi somatotropowej lina za pomocą testu ELISA 28

4.3.1 Selekcja osobników lina do części doświadczalnej 28

4.3.2 Wybór osobników do oceny przydatności metod izolacji RNA 28

4.3.3 Ocena jednorodności genetycznej metodą PCR-RFLP 29

4.3.3.1 Izolacja DNA, ocena otrzymanych izolatów oraz amplifikacja genu *nd*-1 lina 29

4.3.3.2 Dobór enzymów restrykcyjnych oraz analiza PCR-RFLP genu nd-1 lina 31

4.3.4 Przygotowanie układu doświadczalnego, jego przebieg oraz pobór prób do badań 35

4.3.4.1 Układ oraz funkcjonowanie doświadczenia 35

4.3.4.2 Pobór oraz zabezpieczenie prób do analiz 36

4.3.5 Ocena skuteczności metod izolacji całkowitego RNA 37

4.3.5.1 Izolacja całkowitego RNA metodą kolumnową 38

4.3.5.2 Izolacja całkowitego RNA Trizolem® 38

4.3.5.3 Ocena wydajności porównywanych metod izolacji RNA 39

4.3.6 Pomiar aktywności genu hormonu wzrostu metodą real-time PCR w doświadczalnej grupie linów 40

4.3.6.1 Izolacja oraz ocena izolatów RNA 40

4.3.6.2 Przygotowanie rozcieńczeń IC-2 EGFP RNA oraz GH RNA lina 40

4.3.6.2.1 Charakterystyka i wykonanie rozcieńczeń dziesiętnych konstruktu IC-2 EGFP RNA 40

4.3.6.2.2 Wykonanie rozcieńczeń dziesiętnych z matryc RNA po in vitro transkrypcji 41

4.3.6.3 Pomiar aktywności genu hormonu wzrostu metodą real-time PCR 44
4.3.7 Określenie tendencji zmian GH i IGF-I za pomocą kompetycyjnego testu ELISA. 46
4.3.7.1 Przygotowanie prób wątroby oraz krwi do analizy. 46
4.3.7.2 Określenie stężenia GH i IGF-I w próbach plazmy krwi oraz wątroby . 47
5. WYNIKI 49
5.1 Określenie sekwencji genu hormonu wzrostu lina. Model białkowy hormonu wzrostu. 49
5.1.1 Ocena czystości otrzymanych izolatów. 49
5.1.2. Projektowanie starterów oraz łańcuchowa reakcja polimerazy. 50
5.2 Kontrola jednorodności genetycznej osobników doświadczalnych metodą PCR-RFLP. Pomiar aktywności genu hormonu wzrostu linów metodą qPCR. Ocena zależności między hormonem wzrostu a insulinopodobnym czynnikiem wzrostu typu I w osi somatotropowej lina za pomocą testu ELISA. 67
5.2.1 Ocena otrzymanych izolatów DNA 67
5.2.2 Amplifikacja genu nd-1 doświadczalnych osobników lina 67
5.2.3 Analiza długości fragmentów restrykcyjnych w obrębie genu nd-1 68
5.3 Ocena przydatności metod izolacji RNA 72
5.4 Pomiar aktywności genu hormonu wzrostu metodą real-time PCR w doświadczalnej grupie linów 74
5.4.1 Izolacja i ocena uzyskanych izolatów RNA 74
5.4.2 Krzywe standardowe dla reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym 75
5.5 Pomiar stężenia GH i IGF-I w próbach krwi oraz wątroby doświadczalnych linów metodą kompetycyjnego testu ELISA 81
5.5.1 Stężenie hormonu wzrostu w plazmie krwi oraz wątrobie, a doświadczalny wariant temperatury 81
5.5.2 Stężenie insulinopodobnego czynnika wzrostu typu I w plazmie krwi oraz wątrobie, a doświadczalny wariant temperatury 83
5.5.3. Analiza statystyczna 85
6. DYSKUSJA 87
7. WNIOSKI 98
8. PIŚMIENNICTWO 99
9. STRESZCZENIE 116
10. SUMMARY 118

1. WSTĘP

Historia chowu ryb w Polsce sięga początków ubiegłego tysiąclecia, kiedy to w przyklasztornych stawach przetrzymywano ryby jako jedno ze źródeł pożywienia, z których najbardziej ceniono takie gatunki jak: karpie, sumy, liny, sandacze, szczupaki oraz pstrągi (Guziur i in. 2003). Według Lirskiego (2007), nasza rodzima akwakultura jest ważnym sektorem produkującym żywność, gdzie głównymi gatunkami hodowanymi są karp (*Cyprinus carpio*) oraz pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus mykiss*), a w mniejszym stopniu sum afrykański (*Clarias gariepinus*). W celu poprawy konkurencyjności polskich gospodarstw wprowadza się do produkcji dodatkowe gatunki, takie jak amur biały (*Ctenopharyngodon idella*), tołpyga pstra (*Hypophthalmichthys nobilis*), tołpyga biała (*Hypophthalmichthys molitrix*), lipień (*Thymallus thymallus*), pstrąg źródlany (*Salvelinus fontinalis*), czy karaś srebrzysty (*Carassius auratus gibelio*) (Grabowska i in. 2008). Jednak, aby nowe gatunki ryb trafiły na stół konsumenta, muszą spełnić kilka warunków. Pierwszy z nich to opłacalność chowu, który nie może przynosić strat, kolejny to względnie krótki czas uzyskiwania masy towarowej ryb, następnie walory smakowe mięsa oraz minimalna ilość ości, pozwalająca na łatwe przygotowanie i konsumpcję.

Gatunkiem ryby, który od zarania polskiego rybactwa jest obecny w gospodarstwach rybackich, jest lin (*Tinca tinca*). Ryba ta, w dawnych czasach szczególnie ceniona ze względu na walory smakowe, z biegiem czasu straciła zainteresowanie ze względu na niskie tempo wzrostu. Ponowny jego wzrost nastąpił z początkiem XX wieku, głównie w Niemczech, jako przejaw mody na konsumpcję delikatnego i smacznego mięsa lina. Dzięki ówczesnej „modzie na lina" gatunek ten został wprowadzony do cyklu produkcyjnego gospodarstw rybackich w innych krajach Europy, ale także Azji, Ameryki Południowej oraz Afryki (Starmach 1951, Skrzypczak i Mamcarz 2006). Pomimo doskonalenia technik chowu i hodowli lina nie udało się w pełni rozwiązać problemu niskiego tempa wzrostu, które zawsze było wolniejsze niż w przypadku karpia. Przełomem były prace selekcyjne prowadzone w latach międzywojennych w Niemczech, gdzie opracowano szybkorosnącą linię lina zwaną Quolsdorf od nazwy miejscowości położonej w Saksonii. Osobniki lina należące do tej linii w drugim roku życia osiągały masę towarową 250 g. Istnieją także ustne przekazy, że osobniki należące do tej linii były introdukowane do gospodarstw rybackich leżących na terenie obecnego województwa dolnośląskiego. Ostatecznie, szybkorosnąca linia lina

Quolsdorf zanikła, pozostawiając problem niskiego tempa wzrostu otwartym (Milkau 1921, Müller 1961).

Od końca XX wieku prowadzone są szeroko zakrojone badania dotyczące zagadnień podchowu stadiów juwenilnych, udomowienia oraz poprawy wyjątkowo niskiego tempa wzrostu lina (Šestáková i in. 1988, Šestáková i in. 1989, Bilard i Flajshans 1995). Znaczna część tych badań poświęcona była zagadnieniom żywieniowym, między innymi sprawdzano przydatność poszczególnych pasz pod kątem składu, pochodzenia (naturalne, sztuczne, mieszane), strawności oraz okresu i sposobu ich podawania (Wolnicki i Korwin-Kossakowski 1993, Quirós i Alvariño 2000, Arlinghaus i in. 2003, Wolnicki i in. 2003, Celada i in. 2008). Interesującym spostrzeżeniem w eksperymentach żywieniowych były niekorzystne zmiany w morfologii linów, których pojawienie się było przypisywane nieodpowiednim składom pasz, a szczególnie nadmiernej zawartości lipidów (Rennert i in. 2003, Kamler i in. 2006, Wolnicki i in. 2006). Badania dotyczyły także wpływu czynników środowiska zewnętrznego na przeżywalność i tempo wzrostu lina oraz określenia właściwego zagęszczenia obsad (Billard i Flajshans 1995, Celada i in. 2007). Mimo tak szeroko zakrojonych badań nie rozwiązano podstawowego problemu, jakim jest nadal relatywnie niskie tempo wzrostu lina.

Czynniki środowiskowe istotnie wpływają na tempo wzrostu, aczkolwiek liczne programy hodowlane ryb oparte na danych uzyskanych z badań genetycznych, bądź bezpośrednio stosujące manipulacje genetyczne, modyfikują ten wpływ (Gomelsky 2003, Kause i in. 2004). Jak powszechnie wiadomo, wyraz cechy fenotypowej jest efektem ścierania się panujących warunków środowiskowych oraz genotypu, któremu przyszło zaistnieć w danym czasie. Dzięki wprowadzeniu badań genetycznych w prace hodowlane szybciej selekcjonuje się osobniki pod kątem pożądanej cechy (Fjalestad i in.1993, Chevassus i in. 2004). Efektem takiego podejścia są osobniki, które względem grupy kontrolnej charakteryzują się zwiększoną odpornością na patogeny, wyższą tolerancją na czynniki środowiskowe, korzystniejszymi wskaźnikami efektywności chowu oraz szybszym tempem wzrostu (Meuwissen i Sonesson 2004, Overturf i in. 2004).

W badaniach genetycznych lina można zauważyć dwie tendencje. Pierwsza z nich obejmuje badania filogenetyczne, rozważające zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe między osobnikami lina w oparciu o markery mikrosatelitarne (Kohlmann i Kersten 2006, Kohlmann i in. 2007). Druga natomiast dotyczy manipulacji w obrębie kariotypu, celem otrzymania osobników o zwiększonej ploidalności, bądź

takich, które kontynuują swój rozwój ontogenetyczny wyłącznie na podstawie informacji zapisanych w chromosomach matczynych bądź ojcowskich (Flajshans i in.1993, Linhart i in. 1995, Flajshans i in. 2007). Jakkolwiek badania pierwszego nurtu pośrednio dotyczą zagadnień hodowlanych, tak drugiego skupiły się bezpośrednio na manipulacjach, które miały zapewnić osobnikom wysoką przeżywalność oraz znaczą poprawę ich tempa wzrostu. Dzięki przeprowadzonym manipulacjom cytogenetycznym uzyskane osobniki triploidalne szybciej uzyskiwały masę towarową niż osobniki diploidalne. Jednak jak wskazują sami autorzy, taki wynik (tempo wzrostu) nadal w pełni nie gwarantuje sukcesu w hodowli lina, dostarcza natomiast kolejnych pytań związanych z ewentualnym wpływem triploidów bądź tetraploidów na środowisko naturalne (Flajshans i in. 2004).

2. CEL PRACY

Badania wpływu czynników biotycznych lub abiotycznych na osobnicze tempo wzrostu należą do najszerzej zakrojonych. W niniejszej pracy podjęto próbę wyprowadzenia właściwej metody badawczej, w oparciu o techniki biologii molekularnej oraz testy immunoenzymatyczne, które w przyszłości pozwolą na prowadzenie prac selekcyjnych w kierunku wyprowadzenia szybkorosnącej linii linów. Dlatego też ogólnym celem pracy było określenie możliwości zastosowania dwóch metod detekcji (real-time PCR oraz kompetycyjnego testu ELISA) w badaniach służących określeniu potencjału wzrostowego lina. Szczegółowymi celami były:

- określenie struktury genu hormonu wzrostu lina wraz z określeniem pokrewieństwa względem innych gatunków ryb,

- określenie struktury trzeciorzędowej białka hormonu wzrostu z zaznaczeniem potencjalnych miejsc zaangażowanych w wiązanie z receptorem GH,

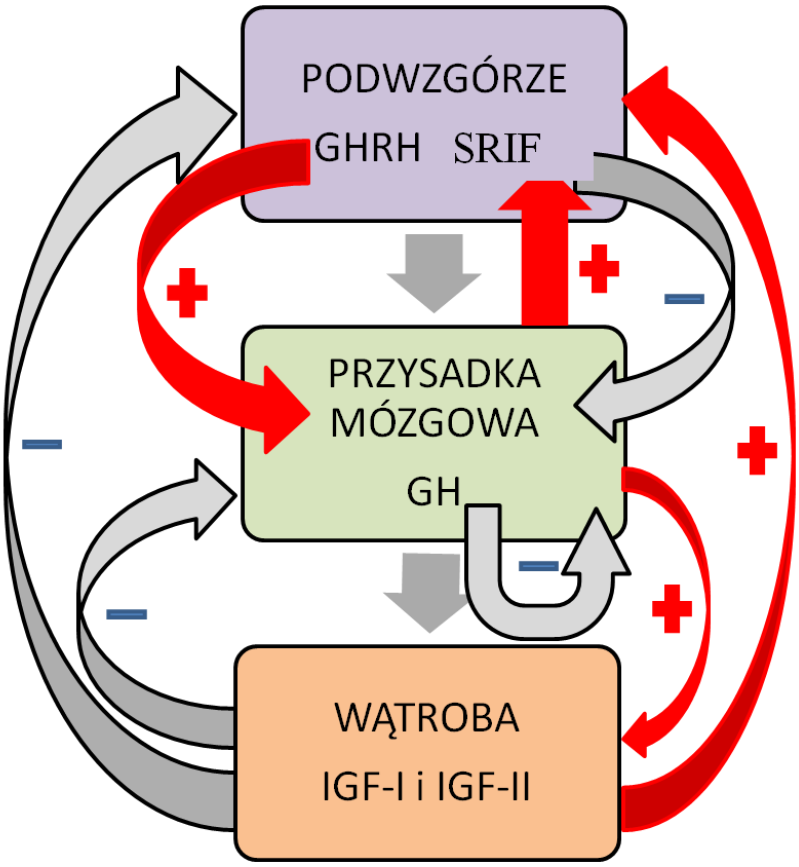
- określenie przydatności metody real-time PCR w określaniu możliwości wzrostowych lina,

- określenie przydatności kompetycyjnej odmiany testu ELISA w określaniu możliwości wzrostowych lina,

- określenie wpływu temperatury oraz płci na potencjał wzrostowy lina.

3. BUDOWA I FUNKCJONOWANIE OSI SOMATOTROPOWEJ U RYB

Wzrost ryb jest procesem szczególnie złożonym. W odróżnieniu od ptaków i ssaków trwa on w sposób ciągły w miarę upływu lat (Sumpter 1992). Regulowany jest wieloczynnikowo oraz wielopoziomowo, a zaangażowane czynniki współoddziaływują ze sobą, stymulując bądź hamując działanie innych. Tę ogromną sieć antagonistycznych zależności dodatkowo modulują czynniki środowiska, takie jak temperatura, fotoperiod oraz jakość dostępnego pokarmu, a całość jest dodatkowo ściśle powiązana ze szlakami regulującymi procesy rozrodcze. Czynniki środowiskowe kształtują wzrost organizmów poprzez rozbudowany system endokrynny, w którym centralną rolę zajmuje oś somatotropowa. Najważniejszymi elementami tej osi (Ryc.1) są hormon wzrostu (GH), receptory genu hormonu wzrostu (GHR) oraz insulinopodobne czynniki wzrostu typu I (IGF-I) oraz II (IGF-II) (Bolliet i in. 2001).



Ryc.1. Oś somatotropowa z zaznaczonymi podstawowymi zależnościami. GHRH pobudza a SRIF hamuje aktywność komórek somatotropowych, następnie GH pobudza poprzez GHR komórki wątroby do produkcji IGF-I i IGF-II. Ultrakrótka pętla (sprzężenia zwrotnego) – wydzielany GH wpływa ujemnie na komórki somatotropowe, mała pętla – GH stymuluje SRIF do zahamowania aktywności prosekrecyjnych innych

czynników względem komórek somatotropowych, duża pętla – IGF-I i IGF-II wpływają hamująco na komórki somatotropowe i GHRH, oraz dodatnio na SRIF.

Hormon wzrostu jest syntetyzowany w kwasochłonnych komórkach α (somatotropach) płata przedniego przysadki mózgowej w formie niedojrzałej, pre-hormonu. Etap ten jest głównie regulowany poprzez antagonistyczne działania neuropeptydów, somatoliberyny (GHRH) oraz somatostatyny (SRIF). Neurony wydzielające neuropeptydy wywodzą się odpowiednio z jądra łukowatego oraz okołokomorowego, następnie biegną unerwiając bezpośrednio przysadkę i w jej strukturze uwalniają GHRH i SRIF (Kah i in. 1993). Sekrecja hormonu wzrostu z przysadki mózgowej następuje w sposób pulsacyjny w zależności między innymi od temperatury wody, jakości dostępnego pokarmu oraz uwarunkowań rozwojowych danego organizmu (Marchant i Peter 1986, Reddy i Leatherland 1994, Björnsson i in. 2002). Zauważalne są także większe jego stężenia we krwi w momencie fazy ciemnej dobowego okresu i jest to najprawdopodobniej skorelowane z intensywnością wydzielania melatoniny (Holloway i Leatherland 1997, Falcón i in. 2003).

Hormon wzrostu wywiera wpływ na komórki docelowe poprzez aktywację receptorów GH (GHR) rozmieszczonych w ich błonach. Według analiz przeprowadzonych przez Butler i Le Roith (2001) największe zagęszczenie GHR znajduje się na powierzchni komórek wątroby, które po pobudzeniu zaczynają produkować, a następnie wydzielać do krwioobiegu, insulinopodobne czynniki wzrostu (IGF-I i IGF-II). Mniej liczne koncentracje GHR zostały zidentyfikowane w błonach komórkowych mięśni oraz adipocytów, regulując wzrost organizmu poprzez kierowanie metabolizmem białek oraz tłuszczów (Mommsen 2001). Lokalizacja receptorów GH w komórkach skrzeli, nerek oraz przewodu pokarmowego przemawia za ingerencją hormonu wzrostu w procesy osmoregulacji (Sakamoto i McCormick 2006). Natomiast, gdy organem docelowym są gonady oraz niektóre regiony mózgu wysoce prawdopodobny jest jego wpływ na procesy steroidogenezy, gametogenezy, witellogenezy, zachowania organizmów oraz samoregulację poprzez wpływ na podwzgórze (Canosa i in. 2007).

GHR należy do rodziny cytokinowych receptorów typu I, do których zalicza się m.in. receptor prolaktyny, interleukiny, erytropoetyny i leptyny (Waters 1999). Zbudowany jest z pojedynczego białka integralnego zawierającego domenę cytoplazmatyczną, transbłonową oraz zewnątrzkomórkową. Domena zewnątrzkomórkowa, do której przyłącza się GH, składa się z dwóch antyrównolegle ułożonych β-kartek, natomiast domena cytoplazmatyczna jest zbudowana z dwóch

zakonserwowanych ewolucyjnie struktur, uczestniczących w przekazywaniu sygnału do jądra komórkowego. Pierwsza struktura zawiera miejsce wiązania kinazy Janusa 2 (JAK2), pełniącej nadrzędne funkcje w transdukcji sygnału, druga utrzymuje konformację całej domeny (Govers i in. 1999). Pomimo, że struktura białkowa receptora hormonu wzrostu została w pełni poznana, to sam sposób przekazywania sygnału GH przez błonę do wnętrza komórki jest nadal przedmiotem licznych badań (Baumbach i Bingham 1995). Dostępne są informacje opisujące sekwencję zdarzeń wewnątrz komórki od czasu, gdy GH przyłączy się do GHR. Wtedy GHR ulega dimeryzacji, wewnątrzkomórkowe kinazy tyrozynowe JAK2 zbliżają się do siebie i dzięki ich domenom SH2 następuje proces wzajemnej fosforylacji. Zaktywowane kinazy JAK2 przeprowadzają następnie fosforylację reszt tyrozynowych na N - końcu cytoplazmatycznych czynników transkrypcyjnych STAT1, 3 oraz 5 (Meyer i in. 1994). Dzięki temu monomeryczne czynniki STAT ulegają dimeryzacji i w formie kompleksów z odpowiednimi białkami (importynami) transportowane są do wnętrza jądra, gdzie wiążą się z promotorowymi sekwencjami nukleotydowymi dla genów regulowanych tym sposobem (VanderKuur i in. 1995, Moutoussamy i in. 1998, Kopchick i Andry 2000, Takeda i Akira 2000, Woelfle i in 2003).

Dopuszczalna jest także droga przekazywania sygnałów z kompleksu GH-GHR do jądra komórkowego poprzez szlak rozpoczynający się od białka Ras. W takcie dimeryzacji GHR aktywacji ulega kinaza aktywowana mitogenami (MAP), która następnie przeprowadza fosforylację reszt tyrozynowych białka Shc. Ufosforylowane białko Shc nabywa aktywność katalityczną i wiąże się z kompleksem białko adaptorowe Grb2/białko Sos. W utworzonym kompleksie białko Sos pełni funkcję aktywatora wymiany nukleotydów guaninowych, dzięki czemu stymuluje wymianę GDP na GTP w białku Ras. Taka zmiana powoduje przejście nieaktywnej formy białka Ras-GDP w formę aktywną Ras-GTP, która następnie uruchamia szereg: kinazy Raf → kaskady kinaz MAP (MEK 1 i MEK 2) → kinaz ERK 1 i ERK 2, które ostatecznie transportowane są do jądra komórkowego i wpływają na sekwencje promotorowe odpowiednich genów (Aronheim i in. 1994, Vojtek i Der 1998, Paul i in. 2009).

Synteza insulinopodobnych czynników wzrostu nie zachodzi w równym stopniu przez cały okres życia osobnika. Zazwyczaj IGF-II jest produkowany jedynie we wczesnych stadiach rozwojowych, potem jego ilość maleje, w przeciwieństwie do IGF-I. Jest on produkowany stale, ale ze zmiennym natężeniem oraz w szeregu rodzajów komórek. Podobnie jak w przypadku hormonu wzrostu, IGF-I i IGF-II wymagają specyficznych receptorów, aby wywołać efekt w komórkach docelowych (Nakae i in.

2001, Pozios i in. 2001). Insulinopodobne czynniki wzrostu typu I, przyłączają się do heterotetramerycznych transbłonowych receptorów IGF-IR zbudowanych z dwóch zewnątrzkomórkowych podjednostek α oraz dwóch transbłonowych podjednostek β. Dodatkowo podjednostki β zawierają w przestrzeni wewnątrzkomórkowej domenę o aktywności kinazy tyrozynowej TKA (LeRoith i in. 1995, Stewart i Rotwein 1996). Od momentu aktywacji IGF-IR możliwe są dwa scenariusze przekazania sygnału do wnętrza jądra komórkowego. Pierwszy poprzez kaskadę MPAK oraz drugi za pomocą kinazy 3-fosfatydyloinozytolu, jednak obie drogi nie zostały dotychczas dokładnie zgłębione i dane ich dotyczące są fragmentaryczne (Parrizas i in. 1995, Florini i in. 1996, Castillo i in. 2006).

Istotnym czynnikiem dla funkcjonowania osi somatotropowej są białka wiążące insulinopodobne czynniki wzrostu (IGFBP), które przyłączając się do IGF regulują wzrost, rozwój, dojrzewanie oraz procesy rozrodcze organizmu (Zhou i in. 2008). IGFBP są produkowane głównie w komórkach wątroby, po czym wydzielane są do krwioobiegu, gdzie łączą się z IGF. U ryb łososiowatych ilość IGFBP występujących w kompleksach z IGF sięga ponad 99% (Shimizu i in. 1999). Pomimo prowadzonych badań dokładne informacje określające sposób oddziaływania IGFBP na IGF są nadal znikome.

To, w jaki sposób układa się cała oś somatotropowa, nie jest równoznaczne z tym, że jest ona wyłącznie regulowana przez jej produkty. Oś GH/GHR/IGF-I jest nieodłącznie powiązana z osią tyreotropową i gonadotropową poprzez oddziaływania przekazywane przez układ nerwowy, hormony oraz neurohormony. Wszystkie sygnały docierające do osi somatotropowej zdrowego organizmu wpływają na nią a zarazem powodują wzbudzenie aktywności czynnika o przeciwnym działaniu, który z kolei wywiera swój wpływ indukując kolejny antagonistyczny czynnik. U organizmów, u których taka wahadłowa regulacja nie przebiega w sposób właściwy, powstają zaburzenia wynikające z niedoboru bądź nadmiaru hormonu wzrostu. Dlatego też należyta regulacja wydzielania GH jest kluczowym elementem funkcjonowania osi somatotropowej oraz innych szlaków z nią związanych (Boeuf i in. 1999).

Najlepiej zbadanym czynnikiem hamującym produkcję oraz sekrecję hormonu wzrostu jest 14 aminokwasowy peptyd somatostatyna, która moduluje podstawowy oraz wzbudzony poziom wydzielania GH niezależnie od źródła (czynnika), który zainicjował sekrecję (Yunker i Chang 2004). SRIF należy do dużej rodziny wielofunkcyjnych białek, czego dowodem jest ich ogromne rozproszenie w centralnym układzie nerwowym oraz tkankach peryferycznych (Youson i in. 2006). Przykładem może być

rozmieszczenie SRIF w komórkach nadnercza oraz przewodu pokarmowego wskazujące na zaangażowanie w regulację wydzielania insuliny i glukagonu (Eilertson i Sheridan 1993). U karasia pospolitego (*Carassius carassius*) rozmieszczenie SRIF w kresomózgowiu oraz polu przedwzrokowym kory mózgowej powiązano z migracją w okresach o różnym natężeniu światła, sugerując na aktywność SRIF, jako neuromodulatora i neurotransmitera (Canosa i Peter 2005). W przysadce mózgowej SRIF wpływa hamująco na wydzielanie hormonu wzrostu poprzez inaktywację cyklazy adenylowej, której brak powoduje zahamowanie produkcji cAMP, wstrzymanie translokacji Na^+ i Ca^{2+} w kanałach transbłonowych, co skutkuje hyperpolaryzacją błony poprzez wyrzut jonów K^+ (Sims i in. 1991, Kato 1995, Kato i Sakuma 1997).

Badania nad regulacją wpływu somatostatyny na hormon wzrostu wykazały, że może być ona blokowana przez estradiol, dzięki czemu nie hamuje wydzielania GH i ulega on sekrecji z większym natężeniem (Sheridan i Kittilson 2004). Natomiast podawanie dootrzewnowe żołądkowo-jelitowych białek, jak grelina lub cholecystokinina, nie wywiera żadnego efektu na poziom SRIF (Canosa i Peter 2005). Ponadto stwierdzono, że w momencie wysokiego poziomu GH we krwi zauważalny jest także wzrost ilości mRNA dla SRIF, wskazujący na zależność regulacyjną. Następstwem wysokiego stężenia mRNA SRIF jest produkcja samego białka, wzrost jego stężenia oraz kompletne blokowanie GHRH, dopaminy oraz polipeptydu aktywującego przysadkową cyklazę adenylanową (PACAP) (Canosa i Peter 2006). Do czynników hamujących aktywność komórek somatotropowych zaliczamy także neurotransmitery takie jak: norepinefrynę (NE), serotoninę (5HT), glutaminę oraz kwas gamma-aminomasłowy (GABA) (Peng i Peter 1997, Trudeau i in. 2000). Dodatkowo insulinopodobne czynniki wzrostu wstrzymują sekrecję GH poprzez negatywne sprzężenie zwrotne. Brak jest nadal informacji jak dokładnie wpływają na GHRH i SRIF (Fruchtman i in. 2001).

W przeciwieństwie do inhibitorów ilość poznanych czynników stymulujących produkcję oraz sekrecję GH jest większa. Jednym z nich jest hormon uwalniający hormon wzrostu (GHRH), który zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* w komórkach przysadki karasia pospolitego stymuluje produkcję i sekrecję GH (Vaughan i in. 1992). Następuje to poprzez odpowiednie szlaki sygnałowe z udziałem cyklazy adenylowej lub białek Ras, które indukują produkcję hormonu wzrostu (Pombo i in. 2000). Dodatkowo sekrecję GH do krwi poprzedza enzymatyczne usunięcie peptydu sygnałowego z N-końca, warunkujące jego właściwe fałdowanie, a tym samym prawidłowe funkcjonowanie (Wong i in. 2006).

Jednakże jego działanie nie jest tak oczywiste i prostolinijne, jak czynnika PACAP, który jest kodowany przez tą samą sekwencję nukleotydową co GHRH, ale w wyniku alternatywnego splicingu (wycinania intronów i składania mRNA przed translacją) ich drogi się rozdzielają (Small i Nonneman 2001). W warunkach hodowli komórek przysadki nerki (*Oncorhynchus nerka*) stwierdzono, że PACAP był bardziej efektywny w stymulacji produkcji GH, niż GHRH (Parker i in. 1997). Podobne wyniki uzyskano także dla węgorza europejskiego (*Anguilla anguilla*), turbota (*Psetta maxima*), karpia oraz amura białego, gdzie PACAP przejawił oczywistą rolę stymulującą względem GH (Montero i in. 1988, Rousseau i in. 2001, Xiao i in. 2002, Wood i in. 2005).

Kolejnym stymulatorem jest dopamina (DA), która w układach doświadczalnych poprzez receptory D-1 pobudza komórki somatotropowe do produkcji i wydzielania GH, jednak jej aktywność jest z łatwością hamowana przez SIRF. Ponadto Ágústsson i in. (2000) opublikowali rezultaty swoich badań, w których stwierdzili, że dopaminergiczne kanaliki neurotransmisyjne w przysadce kończą się w pobliżu komórek produkujących GH (Wong i in. 1993). Interesującym jest, że DA może wpływać hamująco na komórki uwalniające gonadotropiny, przykładowo poprzez bezpośrednie oddziaływanie na komórki produkujące lutropinę (Peter i Yu 1997). Analizując oś gonadotropową stwierdzono, iż hormon uwalniający gonadotropiny (GnRH) jest także stymulatorem produkcji GH u wielu gatunków ryb, ze względu na położenie swoistych neuronów (Kah i in. 1993). Zależność ta nie była tak ewidentna u gatunków ryb łososiowatych i nadal trwają badania *in vivo* mające na celu dostarczenie dodatkowych informacji (Holloway i Leatherland 1997).

Bardzo interesującym białkiem jest grelina, która reguluje poziom hormonu wzrostu, wpływa na intensywność pobierania pokarmu, stymuluje wydzielanie lutropiny i prolaktyny. Grelina wydzielana jest w przewodzie pokarmowym a w mniejszym stopniu w komórkach tkanek peryferycznych oraz mózgu. Wpływa ona na komórki somatotropowe bezpośrednio, a tuż po wprowadzeniu jej do hodowli komórek przysadki tilapii nilowej (*Oreochromis niloticus*) stwierdzono zwiększoną produkcję GH (Unniappan i Peter 2005). Jest ona ważnym elementem osi mózgowo-jelitowej, pobudza neuropeptyd Y (NPY), który także stymuluje komórki somatotropowe do produkcji GH (Peng i in. 1993, Wren i in. 2002).

Do wyżej opisanych stymulatorów GH należy jeszcze dodać cholecystokininę, która integruje sekrecję GH z momentem pobierania pokarmu oraz procesem trawiennym. Jej podawanie powoduje zachowanie łaknienia u ryb, natomiast podanie

jej antagonistów wywołuje efekt przeciwny (Gélineau oraz Boujard 2001, Volkoff i in. 2005). Cholecystokinina ze względu na posiadaną strukturę tetrapeptydu na N-końcu jest bardzo podobna do gastryny, wydzielanej pod wpływem GRP (białko uwalniające gastrynę). GRP natomiast jako neuroendokrynny czynnik produkowany w komórkach przysadki mózgowej, jajnikach, skrzelach, przewodzie pokarmowym oraz skórze silnie oddziaływuje na komórki somatotropowe (Volkoff i in. 2000**)**.

W ogromie czynników należy jeszcze wymienić hormon uwalniający tyreotropinę, hormon uwalniający kortykotropinę, aminokwasy (głównie kwas glutaminowy) i bombezynę, które odgrywają istotne role względem osi somatotropowej oraz osi do niej przyległych, gonadotropowej oraz tyreotropowej. Przedstawienie wszystkich występujących zależności nie jest możliwe, ponieważ właściwości poszczególnych czynników nie zostały dostatecznie scharakteryzowane. Ponadto w miarę prowadzenia badań stale odkrywane są kolejne elementy tej ogromnej sieci współzależności, które często dostarczając odpowiedzi na postawione pytanie równocześnie generują kilka kolejnych. Przykładem nowego czynnika jest dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa (G6PDH), której stężenie w komórkach wątroby jest skorelowane z poziomem zasolenia, które to z kolei w istotny sposób moduluje aktywność osi somatotropowej (Riley i in. 2002, Deane i Woo 2005). Innym podejściem są badania nutrigenomiczne określające wpływ składników pokarmowych na poziom ekspresji mRNA genów, zaangażowanych głównie w funkcjonowanie osi somatotropowej. Dzięki nim można ustalić, czy poprzez podawanie pokarmu ze zwiększoną ilością danego komponentu spowodujemy wzrost sekrecji GH z komórek somatotropowych (Peterson i in. 2009). Badania tego rodzaju dążą do zgromadzenia kompletnych informacji na temat regulacji osi, jej funkcjonowania oraz o jej współzależnościach z otoczeniem.

4. MATERIAŁ I METODY

4.1 Klasyfikacja taksonomiczna badanego gatunku lina

Wszystkie przeprowadzone analizy oraz doświadczenia zostały przeprowadzone przy wykorzystaniu osobników lina, gatunku zaliczanego do rodziny karpiowatych (Krzykawski i in. 1999):

Domena – Eukarioty (Eucaryota)
Królestwo – Zwierzęta (Animalia)
Typ – Strunowce (Chordata)
Podtyp – kręgowce (Vertebrata)
Gromada – Promieniopłetwe (Actinopterygii)
Rząd – Karpiokształtne (Cypriniformes)
Rodzina – Karpiowate (Cyprinidae)
Rodzaj – *Tinca* (Cuvier, 1817)
Gatunek – Lin (*Tinca tinca*), (Linnaeus, 1758)

W zależności od specyfiki badań dobór osobników został przeprowadzony w odmienny sposób.

4.2 Okreslenie sekwencji genu hormonu wzrostu lina. Model struktury tzeciorzędowej bialka hormonu wzrostu

4.2.1 Materiał do badań

Skrawki mięśni do badań mających na celu ustalenie kompletnej struktury genu hormonu wzrostu oraz próby opracowania pierwszego modelu przestrzennego białka dla tegoż genu zostały pozyskane od osobników pochodzących z jeziora Południewo w obwodzie rybackim jezior Klebarskich w zlewni rzeki Łyny, nr 17. Dobór linów z tej konkretnej lokalizacji był podyktowany ich historią w tymże zbiorniku, względem, którego najprawdopodobniej nigdy nie była prowadzona gospodarka rybacka np. zarybianie, coroczne odłowy (inf. ustna Piotr Fenicki). Łącznie odłowiono w czerwcu 2008 roku metodą elektropołowów 29 osobników, które następnie uśmiercano kąpielą w roztworze 2-fenoxyetanolu o stężeniu 0,5 $mg \cdot dm^{-3}$ (Noga 2000). Każdą rybę przed pobraniem skrawka mięśni do izolacji DNA zważono na wadze WLC C/2 (RADWAG) oraz zmierzono liniałem (długość całkowita) z dokładnością odpowiednio do 1 grama

oraz do 1 mm (Tab. 1). Następnie ryby, w osobnych, odpowiednio opisanych opakowaniach foliowych umieszczano w temperaturze - 20ºC.

Tabela 1. Długość całkowita oraz masa osobników, z których pobrano skrawki mięśni do izolacji DNA.

Lp.	Długość całkowita (cm)	Masa (g)	Lp.	Długość całkowita (cm)	Masa (g)
1	24,4	205,92	16	25,5	241,53
2	22,5	187,05	17	20,5	124,67
3	19,9	118,19	18	23,9	209,02
4	19,5	125,24	19	24,2	204,77
5	18,9	111,79	20	19,8	120,02
6	19,8	140,61	21	19,3	120,44
7	19,4	122,82	22	20,0	114,23
8	25,2	215,47	23	19,0	95,51
9	19,6	124,05	24	18,7	103,73
10	19,9	133,79	25	28,8	326,93
11	20,6	136,62	26	27,2	305,20
12	16,8	81,00	27	27,0	292,98
13	18,6	114,31	28	25,5	268,53
14	21,2	141,66	29	30,5	397,53
15	18,8	100,58			

4.2.2 Izolacja oraz ocena wyizolowanego DNA

Izolację DNA przeprowadzono zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu peqGOLD Tissue DNA Mini Kit (PEQLAB Biotechnologie). Celem określenia jakości pozyskanych izolatów przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1 % żelu agarozowym. Żel przygotowano poprzez podgrzewanie mieszaniny składającej się z odważonej ilości agarozy Basica LE GQT (Prona) z odpowiednią objętością 1 % buforu TBE (Fermentas) aż do uzyskania jednorodnego roztworu. Następnie, gdy roztwór uzyskał temperaturę około 60ºC dodano do niego 2,5 µl bromku etydyny (MP Biomedicals) o stężeniu 10 $mg \cdot \mu l^{-1}$ i całość umieszczono w komorze formującej. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w aparacie Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad) zasilanym generatorem napięcia PowerPac 300 (Bio-Rad) przy napięciu 80V przez 40 minut. Izolaty wizualizowano i sfotografowano w komorze do dokumentacji żeli Gel Doc™ XR (Bio-Rad).

W celu precyzyjnego określenia czystości wyizolowanego kwasu nukleinowego dla każdej z prób przeprowadzono pomiar absorbancji światła UV przy falach o długości 260 i 280 nm. Pomiar wykonano na aparacie Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Po przeanalizowaniu izolatów przechowywano je w temperaturze -20ºC do czasu przygotowywania mieszanin PCR.

4.2.3 Projektowanie starterów oraz łańcuchowe reakcje polimeraz

Do projektowania starterów wykorzystano sekwencję mRNA genu hormonu wzrostu lina, opublikowaną w bazie NCBI pod numerem dostępu DQ980027. Jednakże, ze względu na brak zdefiniowanych długości a zarazem i granic miedzy egzonami przeszukano bazy DDBJ, EMBL oraz NCBI pod kątem opublikowanych sekwencji nukleotydowych tego genu dla innych gatunków ryb. Do analiz porównawczych wytypowano 7 sekwencji mRNA *gh* gatunków, które ze względu na zajmowane stanowisko systematyczne w obrębie ryb z rodziny karpiowatych mogły być blisko spokrewnione. (Tab. 2).

Tabela 2. Zestawienie gatunków ryb, których sekwencje mRNA *gh* zostały wykorzystane do porównań.

Nazwa	**Numer dostępu**	**Długość sekwencji (pz)**
Karaś srebrzysty (*Carassius auratus gibelio*)	AY265352.1	1180
Karp (*Cyprinus carpio*)	M27000.1	1164
Amur (*Ctenopharyngodon idella*)	AY616661.1	633
Danio pręgowany (*Danio rerio*)	AJ937858.1	711
Carassius cuvieri	AF389237.1	633
Tołpyga biała (*Hypophthalmichthys molitrix*)	EU157194.1	633
Tołpyga pstra (*Hypophthalmichthys nobilis*)	X60473.1	1158

Zgromadzone w formacie FASTA sekwencje mRNA *gh* ośmiu gatunków ryb zaimportowano do internetowej wersji programu CLUSTAL W i przeprowadzono hierarchiczne dopasowanie sekwencji (Thompson i in. 1994). Wysokości kar (ujemnych punktów jednostkowych w ogólnym rozliczeniu porównania) za wstawienie przerwy (GPO) oraz za wydłużenie już istniejącej (GEP) były zachowane na domyślnym poziomie i wynosiły odpowiednio 10 i 0,05. Wyniki dopasowania sekwencji zostały następnie zaimportowane do programu BioEdit (7.0.9.0.) dla lepszego zobrazowania zestawienia (Hall 1999). Na podstawie metody średnich połączeń (UPGMA)

w programie MEGA 4.0 zbudowano proste drzewo, które graficznie obrazowało stopień podobieństwa między badanymi sekwencjami (Tamura i in. 2007).

Dla genu hormonu wzrostu, którego sekwencja mRNA wykazała największe podobieństwo względem testowanej sekwencji lina została odszukana opublikowana pełna sekwencja wraz z odcinkami intronowymi. Sekwencja ta następnie w programie BLAST (bl2seq) została porównana z mRNA *gh* lina celem zlokalizowania egzonów oraz ustalenia ich przybliżonej długości (Altschuli i in. 1990). Bazując na wyniku porównania zaprojektowano 4 pary starterów wykorzystując przy tym program Primer3 (Rozen i Skaletsky 2000). Sekwencje starterów dodatkowo zweryfikowano w programie Oligo 6.0 (Molecular Biology Insights). Syntezę starterów oraz ich oczyszczanie metodą HPLC wykonała na zlecenie firma Genomed (Tab. 3).

Tabela 3. Zestawienie starterów wykorzystanych do reakcji polimeraz względem genu hormonu wzrostu lina.

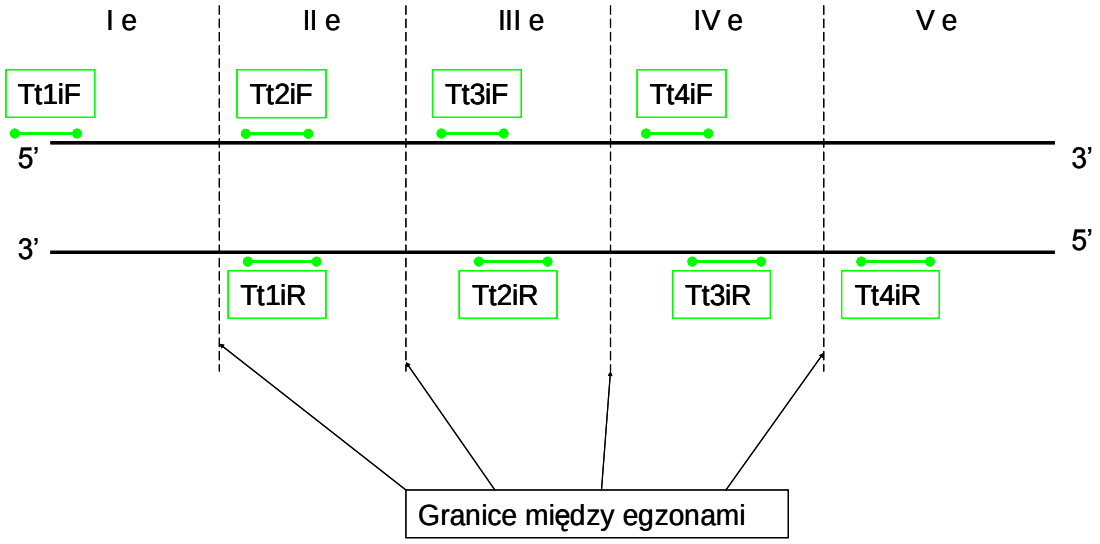
Nazwa startera	**Sekwencja startera 5'→3'**	**Długość startera**	**Lokalizacja w sekwencji NCBI (numer dostępu)**	**Flankowany region**
Tt1iF	GTCTACCCTGAGCGAAATGG	20	15 – 35 (M94348)	Intron I
Tt1iR	AGCACCACCGACAATAGCAC	20	18 – 37 (DQ980027)	
Tt2iF	CAATGCAGTCATCCGTGTTC	20	92 – 111 (DQ980027)	Intron II
Tt2iR	ACTCAGCTGTCTGCGTTCCT	20	172 – 191 (DQ980027)	
Tt3iF	GGAACGCAGACAGCTGAGTA	20	173 – 192 (DQ980027)	Intron III
Tt3iR	ACGGTCAGGCTGTTTGAGAC	20	345 – 364 (DQ980027)	
Tt4iF	ACCGTCTCAAACAGCCTGAC	20	342 – 361 (DQ980027)	Intron IV
Tt4iR	CTCTCCCCCATGGTCAAGTA	20	498 – 517 (DQ980027)	

Wydajność łańcuchowej reakcji polimerazy jest znacznie obniżona, gdy startery nieprawidłowo zaprojektowane przybierają struktury typu primer – dimer bądź „spinki do włosów". Dlatego tez przy ich projektowaniu starano się opierać na poniższych kryteriach (Sambrook i Russell 2006):

- w sekwencji startera nie powinien występować po sobie układ złożony z czterech (lub więcej) identycznych nukleotydów,
- procentowy udział zasad guaninowych oraz cytozynowych powinien zawierać się w granicach od 40 do 60 %,
- sekwencja startera powinna stanowić od 18 do 22 nukleotydów i nie powinny się one różnić długością o więcej niż 2 zasady,

- na końcu 3’ pośród pięciu ostatnich nukleotydów powinny znajdować się maksymalnie dwie zasady guaninowe bądź cytozynowe,
- brak dłuższych niż cztery dwunukleotydowe powtórzenia w sekwencji startera,
- startery nie mogą tworzyć struktur typu spinki bądź primerów – dimerów,
- w projektowanej sekwencji należy unikać motywów palindromowych oraz odwróconych sekwencji powtarzających się,
- między nukleotydami starterów komplementarność powinna być jak najniższa.

Pary starterów (intronowe) zostały tak zaprojektowane by hybrydyzowały w obrębie egzonów a produkt PCR z ich udziałem zawierał pełne sekwencje intronów (Ryc. 2).



Ryc. 2. Schemat budowy mRNA genu hormonu wzrostu lina wraz orientacyjną lokalizacją starterów „intronowych”.

Dla zweryfikowania teoretycznych (wyliczonych z składu nukleotydowego starterów) temperatur hybrydyzacji starterów, wykonano dla każdej z par reakcję polimerazy w gradiencie temperaturowym. Profile czasowo – temperaturowe były realizowane w termocyklerze Mastercycler (Eppendorf) i składały sie z 6 etapów: denaturacja wstępna 94 °C przez 3 minuty, denaturacja właściwa 94 °C przez 30 s, przyłączanie starterów w gradiencie temperatury od 63 °C do 70 °C, wydłużanie starterów 72 °C przez 30 s, etapy denaturacji właściwej, przyłączania oraz wydłużania starterów zostały powtórzone 35 razy, wydłużanie końcowe 72 °C przez 7 min oraz schłodzenie mieszaniny reakcyjnej do 10 ºC (zakończenie reakcji). Każda 25µl mieszanina składała się z następujących komponentów: Bufor GoTaq® Flexi (Promega) – 5 µl, 25 mM $MgCl_2$ (Promega) – 2,5 µl, 10 mM DTP (Fermentas) – 0,5 µl, , 10 pmol

starter przedni – 0,3 µl, 10 pmol starter wsteczny – 0,3 µl, Polimeraza GoTaq® 5 $u \cdot \mu l^{-1}$ (Promega) -0,125 µl, H_2O DEPC (Sigma Aldrich) - 15,275 µl, matryca DNA (0.05-1.0 $\mu g \cdot \mu l^{-1}$) – 1 µl.

Po zakończeniu PCR przeprowadzono rozdział elektroforetyczny dla każdej z 4 mieszanin w identyczny sposób jak dla wyizolowanych matryc. Na podstawie przeanalizowanych elektroforegramów wybrano odpowiednie temperatury annelaingu, przy których oczekiwanym produktom nie towarzyszyły dodatkowe prążki świadczące o niespecyficznej amplifikacji. Następnie wprowadzono wybrane temperatury do programu czasowo – temperaturowego termocyklera i przeprowadzono ponownie reakcje polimerazy dla czterech par starterów. Wyniki tych reakcji oceniono za pomocą rozdziału elektroforetycznego identycznie jak dla wyizolowanych matryc. Produkty tych reakcji, którym nie towarzyszyły niespecyficzne produkty zostały bezpośrednio oczyszczone z objętości pozostałej po nałożeniu mieszaniny reakcyjnej na żel. Oczyszczanie przeprowadzono według procedury producenta zestawem peqGOLD Gel Extraction Kit (PEQLAB). W dalszym postępowaniu produkty zostały poddane sekwencyjnej PCR, oczyszczaniu poprzez precypitację alkoholem oraz reakcji sekwencjonowania zgodnie z zaleceniami producenta dołączonymi do zestawu GenomeLab DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter). Reakcje sekwencjonowania dla każdego z amplikonów zostały wykonane dwukierunkowo (z wykorzystaniem obu starterów). Powyższe czynności zostały przeprowadzone w Pracowni Genetyki Ryb Zakładu Akwakultury Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Poprawność otrzymanych sekwencji nukleotydowych dla każdej z reakcji zweryfikowano za pomocą programów BioEdit (7.0.9.0.) oraz Clustal X (Jeanmougin i in. 1998). Dzięki dwukierunkowemu sekwencjonowaniu uzyskano kompletne sekwencje dla każdego z amplikonów.

W dalszym toku badań dążąc do opracowania szybkiej metody określania sekwencji genu *gh* badanych linów a tym samym poznania pierwszej kompletnej struktury genu zaprojektowano w programie Primer3 dodatkową piątą parę starterów. Startery tej pary zostały ulokowane w obrębie sekwencji tak, aby flankowały region 3' badanego genu wraz regionem kodonu STOP. W trakcie tej czynności postępowano zgodnie z wyżej wymienionymi zasadami projektowania starterów a następnie ich syntezę i oczyszczanie HPLC zlecono firmie Genomed (Tab. 4).

Tabela 4. Piąta para starterów zaprojektowana w celu amplifikacji fragmentu końcowego genu hormonu wzrostu lina.

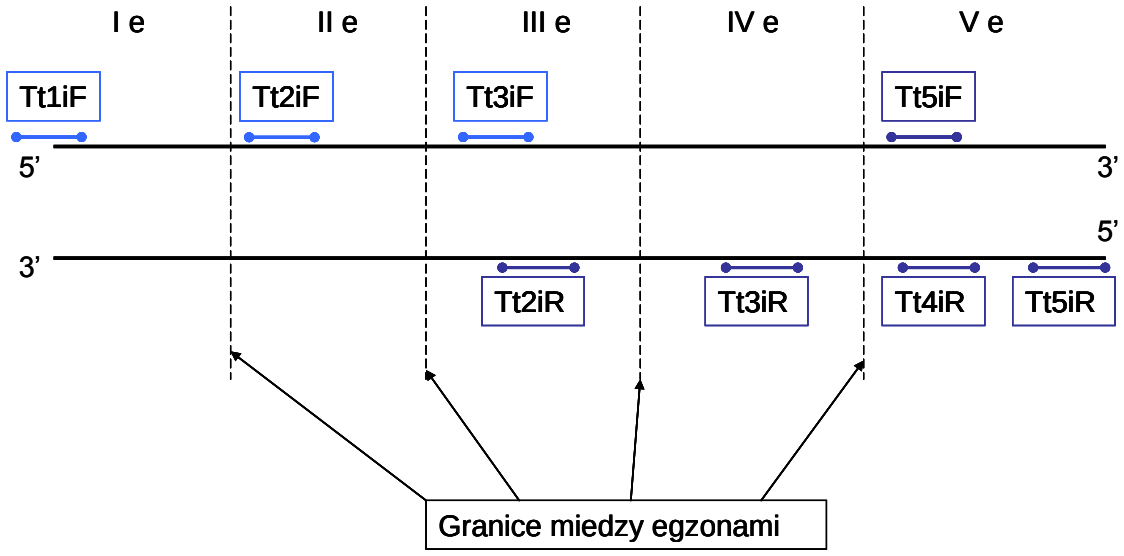
Nazwa startera	Sekwencja startera 5'→3'	Długość startera	Lokalizacja w sekwencji NCBI (numer dostępu)
TtVeF	CAACCAAACATGGATGATAACG	22	447 – 468 (DQ980027)
TtVeR	TCTACAGGGTGCAGTTGGAA	20	617 – 636 (DQ980027)

Dla piątej pary starterów wykonano reakcję polimerazy w gradiencie temperatury celem określenia optymalnej temperatury przyłączania starterów do matrycy. Skład mieszaniny reakcyjnej był identyczny jak dla starterów intronowych. Różnił się natomiast profil czasowo – temperaturowy, gdzie jedynie gradient temperatury dla hybrydyzacji starterów rozciągał się w zakresie od 49 ºC do 69 ºC.

Podstawowa objętość mieszaniny reakcyjnej została odpowiednio przemnożona tak, aby pokryć próbami rząd 12 dołków boku termocyklera. Następnie na podstawie elektroforegramu zaprogramowano w profilu czasowo - temperaturowym PCR optymalną temperaturę przyłączania oraz wydłużania starterów i przeprowadzono kolejną reakcję polimerazy dla wszystkich badanych prób. Wynik reakcji analizowano po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego na 1 % żelu agarozowym. Sekwencjonowanie amplikonów, których wynik reakcji polimerazy uznano za prawidłowy (brak niespecyficznych produktów amplifikacji na elektroforegramie) zlecono firmie Genomed. Uzyskane rezultaty sekwencjonowania opracowano za pomocą identycznych programów jak, dla amplikonów intronowych. Dzięki temu uzyskano kompletne sekwencje nukleotydowe produktów reakcji polimerazy ze starterami TtVeF i TtVeR.

Dysponując sprawdzonymi już starterami TtVeF i TtVeR, skupiono się na uprzednio zsyntetyzowanych parach i podjęto próbę stworzenia ich nowych kombinacji. W tym celu wybrano takie pary starterów, aby uzyskane dzięki nim produkty zachodziły na siebie ułatwiając tym samym uzyskanie kompletnej sekwencji badanego genu (Ryc. 3).

- Tt1iF oraz Tt2iR,
- Tt2iF oraz Tt3iR,
- Tt3iF oraz Tt4iR.



Ryc. 3 Rozlokowanie par starterów w obrębie genu *gh* lina.

Podobnie jak dla pary starterów TtVeF i TtVeR przeprowadzono reakcję PCR w gradiencie temperatury dla „nowych" kombinacji. Zwiększono jedynie czas wydłużania starterów z 30 sekund do 45 sekund ze względu na oczekiwaną długość produktu. Po zakończeniu etapu powielania oceniono produkty za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1,5 % żelu agarozowym. Następnie na podstawie elektroforegramu zmodyfikowano profile czasowo-temperaturowe głównie dla temperatur przyłączania starterów i przeprowadzono 3 odrębne reakcje PCR dla każdej z par starterów. Produkty łańcuchowej reakcji polimerazy, którym nie towarzyszyły niespecyficzne prążki zostały przeznaczone do sekwencjonowania firmie Genomed. Odczyt sekwencji dla każdego z amplikonów został przeprowadzony dwukierunkowo, aby przy etapie „składania" sekwencji zweryfikować poprawność odczytu sekwenatora oraz uzyskać ich całkowite długości.

Uzyskane sekwencje zweryfikowano pod względem ewentualnych błędów wprowadzonych przez program sekwenatora w trakcie sczytywania sekwencji a następnie przystąpiono do składania cząstkowych sekwencji w jedną. W tym celu wykorzystano programy BLASTn, BioEdit (7.0.9.0.) oraz Reverse Complement należący do grupy programów internetowych na platformie The Sequence Manipulation Siute (http://www.bioinformatics.org). Następnie otrzymane sekwencje wszystkich osobników uliniowano w programie CLUSTAL celem określenia stopnia podobieństwa.

4.2.4 Porównanie mRNA gh lina względem innych gatunków ryb

W dalszym toku badań z sekwencji genu gh lina wybrano jedynie regiony egzonowe, utworzono z nich jedną sekwencję. Następnie w programie MEGA 4.0 porównano ją z sekwencjami mRNA wybranych gatunków ryb należących do różnych grup taksonomicznych (Tab. 5).

Tabela 5. Gatunki ryb, których sekwencja mRNA *gh* została wybrana do porównania

Nazwa polska	**Nazwa łacińska**	**Grupa taksonomiczna**	**Numer dostępu NCBI**
Karp	*Cyprinus carpio*	Ostariophysi	M27000
Bufallo czarny	*Ictiobus bubalus*	Ostariophysi	AY375301
Pirania pacu	*Piaractus mesopotamicus*	Ostariophysi	DQ206404
-	*Pangasianodon gigas*	Ostariophysi	L27835
-	*Silurus meridionalis*	Ostariophysi	AF530481
Amia	*Amia calva*	Neopterygii	S73969
Tilapia nilowa	*Oreochromis niloticus*	Acanthopterygii	M97765
Skalnik prążkowany	*Morone saxatilis*	Acanthopterygii	S78253
Pstrąg tęczowy	*Oncorhynchus mykiss*	Protacanthopterygii	M24683
Łosoś atlantycki	*Salmo salar*	Protacanthopterygii	X14305
-	*Odontesthes argentinensis*	Acanthopterygii	AF236091

Analizując sekwencje parami (każda z każdą), otrzymano dla nich wartości odległości genetycznych (macierz podobieństwa), na podstawie kórych skonstruowano drzewo obrazujące zróżnicowanie między gatunkami. Macierz podobieństwa (topologia drzewa) obrazującego umiejscowienie lina w obrębie wytypowanych gatunków ryb uzyskana została przy wykorzystaniu modelu substytucji o dwóch parametrach K2P (Kimura 1980). Podstawą obliczeń tej kalkulacji jest założenie, że tranzycje pojawiają się w sekwencji stosunkowo częściej niż transwersje ze względu na strukturę chemiczną zasad azotowych z grupy puryn (dwupierścieniowe) bądź pirymidyn (jednopierścieniowe). Celem zweryfikowania poprawności topologii otrzymanego dendrogramu ilość powtórzeń próbkowania (losowanie ze zwracaniem poszczególnych miejsc w macierzy przyrównanych sekwencji) przyjęto na poziomie 5 000.

4.2.5 Modelowanie struktury przestrzennej białka oraz weryfikacja poprawności otrzymanego modelu

Po zaimportowaniu sekwencji mRNA do programu BioEdit (7.0.9.0.) przepisano ją na język aminokwasów. W tym celu wykorzystano genomowy kod genetyczny o następujących cechach: bezprzecinkowość, trójkowość, jednoznaczność oraz nie przechodzenie jednego z nukleotydów do innego kodonu niż ten, który jest mu przypisany. Otrzymany ciąg jednoliterowych oznaczeń aminokwasów został następnie przeszukany w programie NetNglyc pod względem występowania potencjalnych miejsc glikozylacji. Są to szczególnie ważne regiony, do których przyłączane są reszty cukrowe za pomocą wiązań N-glikozydowych. Proces ich przyłączania jest rodzajem modyfikacji potranslacyjnych, których obecność determinuje utworzenie prawidłowej konformacji przestrzennej białka oraz zapewnia im stabilność (Blom i in. 2004, Gupta i Brunak 2002).

W kolejnym etapie analiz sekwencję aminokwasów GH wykorzystano do wyszukania wzorów przestrzennych (szablonów) białek, które swą sekwencją wykazują największe podobieństwo. Etap ten przeprowadzono na metaserwerze BioInfoBank, który zapewnia dowolny wybór ilości serwerów jednostkowych do wyszukiwania szablonów (Kaján i Rychlewski 2007). Aby rzetelnie porównać badaną sekwencję, w zasobach metaserwera BioInfoBank wybrano serwery ESyPred3D, FFAS03, PDB-Basic, PDB-PSI oraz PDB-RPS. Zestaw szablonów został dobrany dzięki algorytmowi wykorzystywanemu przez system 3D-Jury. System ten dla każdej zestawionej pary wyliczył wynik „J score" będący składową porównań między atomami węgla α (Cα) w odległości nie większej niż 3,5 Å. Dla skrócenia czasu oraz zawężenia poszukiwań przyjęto linię progową dla porównywanych szablonów na poziomie 40 znalezionych podobieństw między Cα (Ginalski i in. 2003). Szablony o największej użyteczności (nie zawsze o największym podobieństwie) zostały następnie zaimportowane do programu Swiss-PdbViewer (Guex i Peitsch 1997). W tym programie wybrany szablon zestawiono z modelowaną sekwencją, dzięki czemu do jej sekwencji aminokwasowej wprowadzono zmiany w postaci przerw. Gruntownie zweryfikowaną sekwencję następnie wprowadzono do programu MODELLER 9v8 celem modelowania homologicznego (Eswar i in. 2006). Otrzymany model wynikowy zweryfikowano pod względem poprawności za pomocą serwera do oceny modeli Verify 3D (Lüthy i in. 1992). Prezentację wynikowego modelu przedstawiono graficznie dzięki programowi UCSF Chimera (Pettersen i in. 2004). Reasumując etapy modelowania przestrzennej

struktury białka obejmowały: wybór szablonów, porównanie szablonów z modelowaną sekwencją, budowanie modelu oraz jego ocena (Schwede i in. 2003).

4.3 Kontrola jednorodności genetycznej osobników doświadczalnych metodą PCR-RFLP. Pomiar aktywności genu hormonu wzrostu linów metodą qPCR. Ocena zależności między hormonem wzrostu a insulinopodobnym czynnikiem wzrostu typu I w osi somatotropowej lina za pomocą testu ELISA

4.3.1 Selekcja osobników lina do części doświadczalnej

Materiał do badań stanowiło 25 samic oraz 25 samców lina pozyskanych z Rybackiej Stacji Doświadczalnej w Nowym Czarnowie. Wszystkie wybrane ryby były otrzymane w wyniku sztucznego tarła a ich linia przodków była dobrze scharakteryzowana. Podczas wyławiania osobników z sadzy starano się wyselekcjonować osobniki o zbliżonych wymiarach oraz masie. W momencie odłowu każdej rybie odcinano skrawek płetwy ogonowej i umieszczano w osobnych 1,5 ml probówkach typu Eppendorf wypełnionych w 75 % alkoholem etylowym. Skrawki w takiej postaci były przechowywane w temperaturze pokojowej do momentu izolacji DNA. Ryby w wieku 3+ niewykazujące objawów chorobowych, nienoszące śladów otarć oraz skaleczeń, będące w ogólnie pojętej dobrej kondycji zostały przewiezione do laboratorium doświadczalnego Zakładu Akwakultury na Wydziale Nauk o Żywności i Rybactwa. W tym celu umieszczono je w workach wypełnionych tlenem gdzie na 1 kg ryby przypadało 6 l wody o temperaturze od 11 - 15 ºC zgodnie z zaleceniami podanymi przez Szczerbowskiego (2008). W laboratorium umieszczono worki z rybami w uprzednio przygotowanych basenach, które kilka dni wcześniej wypełniono wodą celem samoistnego usunięcia chloru. Po godzinnej aklimatyzacji ryby zostały uważnie wpuszczone do basenów z wodą o temperaturze 14 ºC, którą dodatkowo napowietrzano. Przetransportowane ryby przez 4 doby były obserwowane a woda w basenie była dwukrotnie wymieniona w odstępach co 2 dni celem usunięcia odchodów.

4.3.2 Wybór osobników do oceny przydatności metod izolacji RNA

Z zasobów Rybackiej Stacji Doświadczalnej w Nowym Czarnowie wyselekcjonowano 10 osobników lina należących do różnego sortymentu (Tab. 6).

Tabela 6. Osobniki lina wybrane do oceny metod izolacji RNA

Lp.	Sortyment	Płeć osobnika	Masa (g)
1	Ryba towarowa	♀	351
2	Ryba towarowa	♂	350
3	Tarlak	♀	1680
4	Tarlak	♂	645
5	Forma barwna	♀	1238
6	Forma barwna	♂	1312
7	Ryba towarowa	♀	283
8	Ryba towarowa	♂	520
9	Tarlak	♂	703
10	Tarlak	♀	860

W doborze osobników kierowano się chęcią pozyskania prób (przysadka, skrawek wątroby, skrawek tkanki mięśniowej) z jak najbardziej zróżnicowanej (przeznaczenie, ubarwienie, masa ciała) grupy ryb. Takie podejście pozwala na rzetelne zweryfikowanie, która z metod izolacji całkowitego RNA jest najbardziej przydatna do przeprowadzenia dalszych etapów badawczych.

4.3.3 Ocena jednorodności genetycznej metodą PCR-RFLP

Pomimo pewności, iż wybrane do doświadczenia osobniki pochodziły od wiadomej pary rodzicielskiej przeprowadzono reakcję polimerazy połączoną z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP). Metoda ta miała za zadanie zweryfikować czy w trakcie hodowli nie nastąpiło przypadkowe „wymieszanie" potomstwa pozyskanego z różnych par rodzicielskich. Jednym z głównych założeń etapu doświadczalnego jest udział osobników, które charakteryzuje brak zróżnicowania genetycznego (homogenność genetyczna). Ocenę zróżnicowania metodą PCR-RFLP przeprowadzono w obrębie sekwencji nukleotydowej genów zlokalizowanych w mitochondrialnym DNA (mtDNA).

4.3.3.1 Izolacja DNA, ocena otrzymanych izolatów oraz amplifikacja genu *nd*-1 lina

Etap izolacji DNA ze skrawków płetw przeprowadzono zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu peqGOLD Tissue DNA Mini Kit (PEQLAB Biotechnologie). Jakość oraz pośrednio ilość pozyskanych izolatów oceniono po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego w 1 % żelu agarozowym. Bezpośrednio po ocenie izolatów przystąpiono do przygotowania mieszaniny reakcyjnej dla reakcji polimerazy

w gradiencie temperatury celem ustalenia właściwej temperatury hybrydyzacji starterów do matrycy (Tab. 7).

Tabela 7. Składniki reakcyjne oraz ich objętości w przeliczeniu na jedną 25µl próbkę

H_2O DEPC	Bufor GoTaq® Flexi	$MgCl_2$ 25 mM	Mieszanina dNTP 10 mM	Starter F 100 pmol·µl^{-1}	Starter R 100 pmol·µl^{-1}	Polimeraza GoTaq® 5 u·µl^{-1}	Matryca DNA 0.05-1.0 ug·µl^{-1}
16,875 µl	5 µl	1 µl	0,4 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,125 µl	1 µl

Profil czasowo - temperaturowy został realizowany zgodnie z etapami:

- denaturacja wstępna - 94 ºC przez 3 min,
- denaturacja właściwa - 94 ºC przez 30 s,
- przyłączanie starterów - gradient temperaturowy od 50 do 60 ºC przez 30 s,
- wydłużanie starterów - 72 ºC przez 2 min,
- wydłużanie końcowe - 72 ºC przez 7 min,
- schłodzenie mieszaniny reakcyjnej do 4 ºC.

Etapy denaturacji właściwej, przyłączania starterów oraz wydłużania starterów powtórzono 35 razy. Sekwencje starterów zaczerpnięto z pracy nad mtDNA u ryb łososiowatych (Nielsen i in. 1998):

***nd*-1F:** 5’ –GCC TCG CCT GTT TAC CAA AAA CAT- 3’

***nd*-1R:** 5’ –GGT ATG GGC CCG AAA GCT TA- 3’

Ocenę powodzenia reakcji polimerazy w gradiencie temperatury przeprowadzono za pomocą standardowego rozdziału elektroforetycznego w 1 % żelu agarozowym.

Po określeniu właściwej temperatury dla hybrydyzacji starterów oraz po wprowadzeniu zmian w profilu czasowo - temperaturowym wykonano reakcję polimerazy dla wszystkich izolatów. Po reakcji polimerazy ocenę amplikonów wykonano za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1 % żelu agarozowym. Wszystkie reakcje polimerazy przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler (Eppendorf). Natomiast przygotowanie żeli, rozdziały elektroforetyczne, wizualizacje oraz kompletną dokumentację dla tego etapu badań zrealizowano zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.2.2.

4.3.3.2 Dobór enzymów restrykcyjnych oraz analiza PCR-RFLP genu nd-1 lina

Dysponując sekwencjami starterów *nd*-1F oraz *nd*-1R zlokalizowano w sekwencji genomu mitochondrialnego lina miejsca ich hybrydyzacji, a tym samym wyznaczono dokładną długość sekwencji nukleotydowej. Wykorzystana sekwencja mtDNA lina została zdeponowana pod numerem dostępu NC_008648 w bazie NCBI w ramach badań nad zależnościami ewolucyjnymi w obrębie rodziny karpiokształtnych. Z 16 612 pz mtDNA lina wykorzystano flankowany starterami region o długości 2 015 pz (Ryc. 4).

GCCTCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCCTGCAACTAAATTGAGTATAGGAGGTCCAGCCTGCCCAGTGACTACGGGTTCAACGGC
CGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTTAAATAGAGACCTGTATGAATGGCTAAACGAGGGCTTAACTGTC
TCCCCCTTCAAGTCAGTGAAATTGATCTATCCGTGCAGAAGCGGGTATAAAAATACAAGACGAGAAGACCCTTTGGAGCTTAAGGTAC
AAAATTCAACCACGTCAAGAAATTCAATAAAAAACAAAAACTTAGTGGATTATAAACTTTTACCTTCGGTTGGGGCGACCACGGAGGA
AAAACAAGCCTCCGAGTGGAATGGGTTAAATACCTAAAACTAAGAGAAACATCTCTAAGCCACAGAAAATCTGACCAAAAATGATCCG
GCTTAATGCCGATCAACGAACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTCTCCCAGAGTCCATATCGACGAGGGGGTTTACGACC
TCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTTTGTTCAACGATTAAAGTCCTACGTGATCTGAGTTCA
GACCGGAGCAATCCAGGTCAGTTTCTATCTGTAACGCTATTTTTCCTAGTACGAAAGGATCGGAAAAAAGGGGCCTATACTTAAAGCA
CGCCCCACCCCTAATTAATGAAAACAAATAAATTAAATAAAGGGAGGGCCAAACCCTGCCAGCCAAAATAAGGACATACTGGGGTGGC
AGAGCATGGTAAATTGCGAAAGGCCTAAGCCCTTTTAACCAGAGGTTCAAATCCTCTTCCCAGTTCATGCTAAACACTTTAATAAATC
ACTTAATTAACCCACTAGCCTATATCGTTCCAGTTCTACTAGCAGTAGCCTTCTTAACCCTACTTGAACGAAAAATTCTAGGATACAT
GCAACTACGAAAAGGACCTAATGTAGTAGGACCTTACGGACTACTACAGCCAATCGCCGACGGCGTTAAACTATTTATTAAAGAACCC
GTACGCCCCTCTACCTCATCTCCATTCCTATTTTTAGCCACGCCCATCCTTGCACTTACCCTTGCAATGACACTATGAGCACCAATAC
CTATGCCTCACCCCGTAATTGATCTCAACTTAGGAGTCCTATTTATCTTAGCCCTATCAAGCCTCGCAGTATATTCCATTCTAGGGTC
AGGATGGGCATCAAATTCGAAATACGCACTAATTGGAGCCCTACGAGCAGTAGCCCAAACAATTTCATATGAAGTAAGCCTTGGACTT
ATTCTTTTATCAGTAATTATTTTTTCCGGGGGATATACCCTACAAACATTTAATACAGCCCAAGAAAGCATCTGATTACTAGCCCCCG
CGTGACCTCTAGCTGCAATATGATACATTTCAACTCTAGCAGAAACAAACCGAGCACCATTCGACTTAACAGAGGGAGAATCCGAGCT
AGTCTCAGGATTTAACGTAGAATATGCCGGAGGACCATTTGCCCTATTTTTCCTAGCTGAGTATGCAAACATCTTACTCATAAACACC
CTATCAGCCGTGTTATTTATAGGAACTTCACACTTCCCACACATCCCTGAATTAACCACAATTAGTCTAATAACTAAAGCCGCATTTC
TCTCCATTATTTTCCTATGAGTGCGAGCCTCCTATCCACGATTCCGATACGACCAACTCATACACCTTGTATGAAAAAACTTTCTCCC
CCTAACACTAGCCCTAGTGCTATGACACATCGCCCTACCAATTGCGCTAGCAGGCCTCCCCCCACAACTATAACCCAGGAACTGTGCC
CGAATGCCTAGGGACCACTTTGATAGAGTGGCCAATAGGGGCTAAAATCCCCTCAGTTCTTAGAAAGAAGGGGGTCGAACCCATGCCC
AAGAGATCAAAACTCTTAGTGCTTCCTCTACACCACTTTCTAAGATGGGGTCAGCTAATTAAGCTTTCGGGCCCATACC

Ryc. 4. Fragment sekwencji mtDNA lina (NC_008648) oflankowany starterami nd-1F oraz nd-1R (wyróżnione na zielono).

Sekwencja flankowana przez startery *nd*-1F oraz *nd*-1R zawiera kolejno niepełną sekwencję genu kodującego podjednostkę 16S rRNA (1 – 781 pz), pełną sekwencję genu kodującego tRNA dla leucyny (782 – 857 pz), pełną sekwencję genu kodującego pierwszą podjednostkę dehydrogenazy NADH (859 – 1 833 pz), pełną sekwencję genu kodującego tRNA dla izoleucyny (1 838 -1 909 pz), pełną sekwencję genu kodującego tRNA dla glutaminy (1 910 – 1 978 pz) oraz niepełną sekwencję genu kodującego tRNA dla metioniny (1 979 – 2 015 pz) (Saitoh i in. 2006). W niniejszej pracy dla przejrzystości oraz spójności autor posługuje się określeniem gen *nd*-1 dla badanego amplikonu scharakteryzowanego w powyższym zdaniu.

Zdefiniowaną sekwencję zaimportowano następnie do ogólnodostępnego programu internetowego NEBcutter (V2.0) celem wyboru enzymów restrykcyjnych do przeprowadzenia późniejszych reakcji trawienia amplikonów. Wyboru dokonano z puli 19 endonukleaz restrykcyjnych dostępnych w danym czasie w Pracowni Genetyki Ryb, z czego 17 miało specyficzne miejsca cięcia DNA a 2 pozostałe zostały zaklasyfikowane jako enzymy nietnące (Tab. 8).

Tabela 8. Charakterystyka enzymów restrykcyjnych.

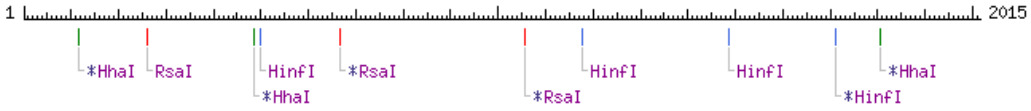
Lp.	Enzym restrykcyjny	Rozpoznawane miejsce	Ilość cięć	Umiejscowienie cięć w obrębie analizowanej sekwencji
1	AciI	C▼CG▲C	6	*88/90, *90/92, *217/219, *562/564, *1406/1408, *1664/1666
2	AluI	AG|CT	6	254/254, 1420/1420, 1494/1494, 1552/1552, 1990/1990, 1999/1999
3	ApaI	G▲GGCC▼C	1	*2009/2005
4	AvaII	G▼GWC▲C	5	54/57, 982/985, 997/1000,1528/1531, 1860/1863
5	BfaI	C▼TA▲G	15	471/473, 662/664, 895/897, 919/921, 958/960, 1225/1227, 1399/1401, 1417/1419, 1444/1446, 1495/1497, 1549/1551, 1768/1770, 1774/1776, 1807/1809, 1856/1858
6	FatI	▼CATG▲	4	796/800, 857/861, 965/969,1929/1933
7	FokI	GGATG(N)$_9$▼NNNN▲	4	532/536, 1087/1091, 1247/1251, 1612/1616
8	HaeIII	GG|CC	7	*87/87, 689/689, 752/752, 815/815, 1814/1814, 1879/1879, 2007/2007
9	HhaI	G▲CG▼C	3	*117/115, *485/483, *1806/1804
10	HinfI	G▼ANT▲C	4	499/502, 1178/1181, 1486/1489, *1712/1715
11	HpaII	C▼CG▲G	4	*438/440, *619/621, *1346/1348, *1523/1525
12	HpyAV	CCTTC(N)$_5$▲N▼	4	191/190, *337/336, 939/938, 1909/1908
13	MboI	▼GATC▲	8	#199/203, #434/438, *#450/454, #537/541, #604/608, *#673/677, #1164/1168,#1940/1944
14	NlaIV	GGN|NCC	4	688/688, 1269/1269, 1861/1861, *2007/2007
15	RsaI	GT|AC	3	262/262, *666/666, *1058/1058
16	TaqI	T▼CG▲A	5	508/510, 529/531, 1249/1251, 1469/1471, 1923/1925
17	Tsp509I	▼AATT▲	18	39/43, 195/199, 266/270, 284/288, 716/720, 734/738, 803/807, 884/888, 953/957, 1160/1164, 1245/1249, 1262/1266, 1292/1296, 1334/1338, 1633/1637, 1643/1647, 1799/1803, 1992/1996

* - wydajność cięcia może być zmieniona poprzez metylację w obrębie wysepek CpG,

- wydajność cięcia może być zmieniona poprzez inny rodzaj metylacji.

Kolorem niebieskim oznaczono enzymy, które wykorzystano w analizach.

Ostatecznie wytypowano 5 enzymów restrykcyjnych. Trzy z nich HhaI, RsaI oraz HinfI to enzymy tnące (rozpoznają a następnie tną w obrębie rozpoznawanej sekwencji DNA), wybrane spośród 17 na podstawie ilości i długości fragmentów powstałych po wirtualnym trawieniu w programie NEBcutter (V2.0). Pozostałe dwa to SspI oraz XbaI, dla których program nie znalazł specyficznych miejsc w sekwencji amplikonu. Wybrane enzymy restrykcyjne należą do drugiej klasy, dlatego też miejsce cięcia powinno się znajdować w obrębie rozpoznawanej sekwencji palindromowej (Ryc. 5).



Ryc. 5. Mapa miejsc restrykcyjnych dla wybranych endonukleaz restrykcyjnych.

Wykorzystując wskazane przez program NEBcutter (V2.0) unikalne miejsca aktywności enzymów wyliczono spodziewane długości fragmentów restrykcyjnych po reakcji trawienia każdego z amplikonów:

- HinfI – 226 pz, 303 pz, 308 pz, 499 pz oraz 679 pz,
- HhaI – 116 pz, 210 pz, 368 pz oraz 1321 pz,
- RsaI – 262 pz, 392 pz, 404 pz oraz 957 pz.

Wszystkie mieszaniny reakcyjne oraz warunki reakcji dla każdego z wybranych enzymów restrykcyjnych przygotowane zostały zgodnie zaleceniami zawartymi w kartach charakterystyk enzymów dołączonych przez firmę Fermentas (dostawca). Profile czasowo – temperaturowe dla wszystkich reakcji trawienia zostały zrealizowane w szafie grzewczej GI7 (SHEL LAB). Wynik trawienia enzymów restrykcyjnych oceniano za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 2,5 % żelu agarozowym na bazie agarozy Basica LE GQT (Prona). Przygotowanie żeli, rozdziały elektroforetyczne, wizualizacje oraz kompletną dokumentację dla tych analiz zrealizowano zgodnie z procedurą opisaną w sekcji 4.2.2. Jedyną wprowadzoną zmianą było wydłużenie czasu rozdziału do jednej godziny ze względu na wyższą procentowość zastosowanego żelu. W przypadku, gdy rozdział elektroforetyczny nie zapewniał wymaganej rozdzielczości bądź była ona na niskim poziomie przeprowadzano rozdział w natywnym 8 bądź 15 % żelu poliakrylamidowym (PAGE). W zależności od wymaganej procentowości żelu odczynniki mieszano w odpowiednich proporcjach (Tab. 9).

Tabela 9. Objętości poszczególnych składników mieszaniny do przygotowania 36 ml 8 lub 15 % żelu poliakrylamidowego.

Składnik mieszaniny	**8 % żel**	**15 % żel**
Mieszanina akrylamidów	9,6 ml	18 ml
5 x TBE	7,2 ml	7,2 ml
H_2O DEPC	19,2 ml	10,8 ml
Odgazowywanie mieszaniny – 5 minut		
10 % Nadsiarczan amonu	200 µl	200 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Do przyrządzenia żelu poliakrylamidowego skorzystano z 30 % mieszaniny akrylamidów w stosunku Akrylamid/Bis-akrylamid 29:1 (Sigma), pięciokrotnego buforu TBE (Fermentas), wody DEPC (Sigma), katalizatora polimeryzacji akrylamidu TEMED (Sigma) oraz 10 % roztworu nadsiarczanu amonu (Sigma). Początkowo do zlewki przeniesiono odpowiednie objętości mieszaniny poliakrylamidów, 5 X TBE oraz wody i całość umieszczono (bez opcji wirowania) w koncentratorze Plus (Eppendorf) na 5 minut celem odgazowania mieszaniny. W tym czasie przygotowano stanowisko do uformowania żelu w pozycji pionowej. Po etapie odgazowywania dodano do mieszaniny 10 % nadsiarczan amonu oraz TEMED. Całości wymieszano i za pomocą pipety Pasteura naniesiono między szklane szyby. Po upływie 45 minut żel uległ zestaleniu i został przeniesiony do komory przeznaczonej do rozdziału elektroforetycznego w pionie PROTEAN II xi (BioRad) zasilanej generatorem napięcia PowerPac 300 (Bio-Rad). Przed przeprowadzeniem właściwej elektroforezy przeprowadzono wstępną elektroforezę poprzez przyłożenie napięcia do żelu bez nakładania prób w celu usunięcia kationów amonowych. Ten wstępny etap trwał 20 min przy napięciu 8 V na jeden cm żelu, poczym bezpośrednio przystąpiono do naniesienia analizowanych prób do dołków uformowanych w żelu. Każdą z prób przed naniesieniem wymieszano z 2 µl buforu obciążającego 6 x DNA Loading Dye (Fermentas). Rozdział prowadzono w warunkach obniżonej temperatury (chłodzenie zimną wodą) przy napięciu 8 V na jeden cm żelu przez okres 4 h dla 8 % oraz 10 h dla 15 % żelu poliakrylamidowego. Po PAGE rozklejono szyby a szybę z przylegającym żelem inkubowano w roztworze bromku etydyny (MP Biomedicals) o stężeniu 0,5 $mg \cdot ml^{-1}$ przez 30 minut. Po tym czasie przeprowadzono wizualizację oraz

dokumentację otrzymanego wyniku za pomocą komory do analizy żeli Gel Doc™ XR (Bio-Rad).

4.3.4 Przygotowanie układu doświadczalnego, jego przebieg oraz pobór prób do badań

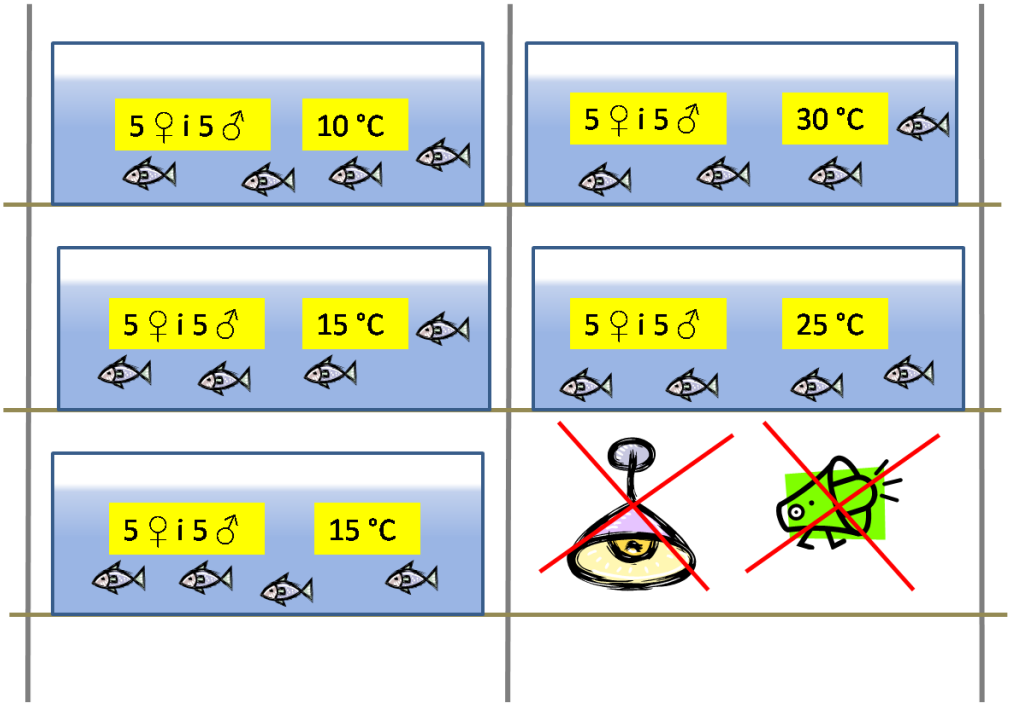
Część doświadczalną przeprowadzono w laboratorium badawczym Katedry Anatomii i Embriologii Ryb Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Kolejne etapy konstruowania układu doświadczalnego podporządkowano założeniu, ze odłów ryb oraz pobór prób z każdej z nich ma przebiegać w łatwy i szybki sposób.

4.3.4.1 Układ oraz funkcjonowanie doświadczenia

Do doświadczenia wybrano 4 szklane akwaria o pojemności 140 l oraz jedno dwukrotnie większe (280 l). Zbiorniki następnie dokładnie umyto wodą ze środkiem myjącym i gruntownie płukano wodą. Tak przygotowane akwaria umieszczono na stelażu i zamontowano w nich kostki napowietrzające obciążone tak, by przez cały okres trwania doświadczenia znajdowały się przy dnie. Dodatkowo do akwariów, w których temperaturę wody w trakcie doświadczenia utrzymywano na poziomie 20, 25 oraz 30 ºC zamontowano 150 W grzałki akwarystyczne z termostatem (AQUAEL). Akwaria, gdzie temperatura wody miała temperaturę 10, 15 ºC wyposażono w elektronicznie sterowane urządzenia chłodzące utrzymujące zaprogramowaną temperaturę z dokładnością do 0,2 ºC. W trakcie, gdy przewiezione z RSD Nowe Czarnowo ryby aklimatyzowały się w basenach przeprowadzono test stabilności temperatury. Napełniono akwaria wodą i uruchomiono cały system doświadczalny. Temperaturę wody w każdym z wariantów termicznych mierzono 3 razy dziennie i wprowadzano ewentualne zmiany w termostatach by podczas doświadczenia nie ingerować w jego przebieg. Po zweryfikowaniu stabilności temperatur w każdym z wariantów wyłączono grzałki, chłodnice oraz napowietrzanie a akwaria oklejono czarną, nieprzepuszczającą światła folią.

Gdy woda w układzie doświadczalnym samoistnie osiągnęła temperaturę około 15 ºC ryby z basenu, partiami przeniesiono do laboratorium doświadczalnego w konwiach do transportu ryb. Do każdego z akwariów następnie wprowadzono po 5 samców i 5 samic, załączono napowietrzanie oraz odpowiednio grzałki akwarystyczne bądź urządzenia chłodzące. Gdy tylko doświadczenie się zaczęło początkowo skontrolowano stabilność temperatury a w pomieszczeniu gdzie doświadczenie miało

miejsce panowała ciemność oraz cisza. Celem zachowania takich wymogów świetlno – głosowych było ujednolicenie otaczających akwaria warunków (homogenność warunków otoczenia). Jedynym różniącym każdy wariant elementem była temperatura wody (heterogenność temperaturowa), która przez cały okres doświadczenia była utrzymywana dla każdego z akwariów odpowiednio na poziomie 10, 15, 20, 25, 30 ºC (Ryc. 6). Ryby przez okres doświadczenia (5 dób) nie były karmione, aby uniknąć ewentualnego oddziaływania ze strony składników pokarmowych na wynik doświadczenia.



Ryc. 6. Schemat i podstawowe zasady panujące przez cały okres doświadczenia akwariowego

4.3.4.2 Pobór oraz zabezpieczenie prób do analiz

Po 5 dobach do każdego akwarium kolejno dodawano 2-fenoxyetanolu o stężeniu 0,5 mg·dm^{-3} celem wprowadzenia ryb w stan uśpienia. Po jego stwierdzeniu z każdego akwarium losowo oraz pojedynczo wyławiano kasarkiem po 3 samice i 3 samce. Procedura poboru prób oraz gromadzenia danych wagowo-merystycznych przebiegała następująco:

- krew obwodową (1 cm^3) pobierano za pomocą sterylnej strzykawki 3 ml (Polfa Lublin) oraz igły (TERUMO) o przekroju 0,7 mm z żyły ogonowej. Bezpośrednio ze strzykawki przenoszono ją do 1,5 ml probówek typu Eppendorf i umieszczano w lodówce zaprogramowanej na 4 ºC na okres 24 godzin,

- uśmiercenie ryby poprzez pojedyncze, solidne uderzenie metalową rurką w czaszkę,
- ważenie na wadze WLC C/2 (RADWAG) oraz pomiar długości całkowitej liniałem z dokładnością odpowiednio do 1 grama oraz do 1 mm,
- pobór całej przysadki mózgowej, skrawka wątroby oraz skrawka tkanki mięśniowej (z części podosiowej wielkiego mięśnia bocznego) o masach od 30 do 35 mg od każdej z ryb. Pobrany materiał zabezpieczono przed nukleazami (szczególnie rybonukleazami) w osobnych 1,5 ml probówkach typu Eppendorf, wypełnionych płynem stabilizującym RNA*later* (QIAGEN). Należyta objętość płynu została obliczona zgodnie z zaleceniami producenta i wynosiła 350 ml. Po wprowadzeniu przysadki bądź skrawków do probówek z płynem intensywnie nimi potrząsano by oleisty płyn z każdej strony otoczył, spenetrował i zabezpieczył próbę. Probówki z zawartością przetrzymywano w temperaturze - 20 ºC, aż do momentu izolacji całkowitego RNA.
- fragmenty wątroby (około 1 g) każdej z ryb umieszczano w osobnych 1,5 ml probówkach typu Eppendorf a następnie umieszczano w - 20 ºC, aż do momentu wykonywania dalszych analiz.

4.3.5 Ocena skuteczności metod izolacji całkowitego RNA

Badania genetyczne należą do grupy analiz, w których nie można sobie pozwolić na błędy zwłaszcza na samym początku. Zazwyczaj prace z tego zakresu rozpoczyna się od kolekcjonowania oraz zabezpieczenia zebranego materiału przed degradacją bądź zmianą poziomu aktywności metabolicznej bądź genetycznej, którą chcemy oszacować (Fleige i Pfaffl 2006). Dlatego przeprowadzono izolację całkowitego RNA dwoma metodami, gdyż ten etap stanowi punkt wyjścia do określenia aktywności genu hormonu wzrostu lina poprzez określenie swoistego poziomu mRNA. Osobniki lina scharakteryzowane w tabeli 8 zostały podzielone na 2 grupy. Pierwsza z nich to ryby oznaczone numerami 1, 4, 5, 8 oraz 10. Druga natomiast to ryby oznaczone numerami 2, 3, 6, 7 oraz 9. Od każdej ryby niezależnie od grupy pobrano do 1,5 ml probówki typu Eppendorf zawierającej 350 µl płynu RNA*later* (QIAGEN) całą przysadkę mózgową, skrawek wątroby oraz skrawek tkanki mięśniowej o masach od 30 do 35 mg. Łącznie od 10 ryb zebrano 30 prób. Z prób pobranych od ryb należących do pierwszej grupy wyizolowano całkowity RNA metodą kolumnową. Natomiast próby pobrane od ryb

należących do 2 grupy zostały wykorzystane do izolacji całkowitego RNA za pomocą Trizolu®.

4.3.5.1 Izolacja całkowitego RNA metodą kolumnową

Izolację całkowitego RNA przeprowadzono w oparciu o gotowy zestaw odczynników RNeasy®Mini (QIAGEN). Zastosowana metoda izolacji opierała się na selektywnym wiązaniu RNA na silikonowych membranach kolumn. Absolutną koniecznością było przeprowadzenie po sobie osobnych etapów dezintegracji (błon komórkowych) oraz homogenizacji próbek. Dezintegracja komórek miała na celu uwolnienie całkowitego RNA zawartego w komórkach tworzących. Natomiast etap homogenizacji zredukowanie lepkości jednorodnego lizatu po przeprowadzeniu dezintegracji.

Z metod dezintegracji proponowanych przez producenta RNeasy®Mini wybrano rozcieranie prób tłuczkiem w moździerzu z ciekłym azotem. Homogenizację roztartych na proszek prób wykonano w 2ml probówkach typu Eppendorf, które wcześniej zostały schłodzone w ciekłym azocie. W tym celu przeciągnięto kilkakrotnie przez 1000 ml końcówkę pipety roztartą próbę zawieszoną w buforze dołączonym do zestawu przez producenta. Po tej czynności proces izolacji kontynuowano zgodnie z procedurą dołączoną do zestawu RNeasy®Mini.

4.3.5.2 Izolacja całkowitego RNA Trizolem®

Metoda izolacji Trizolem® (Invitrogen) jest skomercjalizowaną metodą ekstrakcji wykorzystującą tiocyjanian guanidyny, fenol oraz chloroform, opracowaną przez Chomczyńskiego i Sacchi (1987). Różni się znacząco od powyższej metody, gdyż wykorzystuje odmienne właściwości cząsteczek RNA i polega na uzyskaniu trzech faz: przezroczystej wodnej, w której znajduje się RNA, mlecznej środkowej fazy DNA oraz organicznej różowej zawierającej tłuszcze oraz białka. Procedurę dezintegracji oraz homogenizacji przeprowadzono w przy użyciu homogenizatora TissueLyser II. W tym celu w 2 ml probówkach typu Eppendorf umieszczono zrównane do 10 mg próby, metalową kulkę o średnicy 5 mm (QIAGEN) oraz 80 µl buforu $PBS^{(-)}$ (Dulbecco). Całość wytrząsano 2 minuty z częstotliwością 25 Hz. Następnie probówki z zawartością umieszczono na 24 godziny w – 20 ºC, poczym kontynuowano proces izolacji zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta Trizolu®.

4.3.5.3 Ocena wydajności porównywanych metod izolacji RNA

Koncentrację RNA oznaczono metodą spektrofotometryczną poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm (A_{260}) przy pomocy Spektrometru UV/Vis NanoDrop (Thermo Scientific) dla każdej z próbek w dwóch powtórzeniach. Spektrofotometrycznie została także oceniona czystość izolatu na podstawie wartości współczynnika A_{260}/A_{280}, który powinien się zawierać między 1,8 a 2.

Dodatkowo zastosowano drugą metodę oceny czystości izolatów RNA, dzięki której oceniono ewentualne zanieczyszczenie przez DNA. Wykonano jednoetapową RT-PCR ze starterami Tt3iF oraz Tt3iR, które hybrydyzują odpowiednio z sekwencją nukleotydową egzonu III oraz IV (tab. 3). Startery te, gdy hybrydyzują do DNA flankują i warunkują produkt PCR o długości 488 pz, gdyż amplifikacji ulega także region intronowy oddzielający egzon III od IV. Jednakże, gdy w wyizolowanej próbie RNA brak jest zanieczyszczeń kwasem deoksynukleinowym uzyskany produkt powinien być krótszy o długość intronu. Amplikon wtedy powinien mieć długość 192 pz. Reakcję dla 30 izolatów (połączenie izolatów z dwóch metod izolacji) wykonano wykorzystując zestaw odczynników OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) w termocyklerze Mastercycler (Eppendorf). Mieszanina reakcyjna składała się z następujących komponentów: 5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer – 5 µl, 40 mM dNTP – 1 µl, 10 pmol Tt3iF - 1 µl, 10 pmol Tt3iR - 1 µl, QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix – 1 µl, 5x Q-Solution – 0,5 µl, H_2O DEPC - 10,5 µl, izolat RNA – 5 µl. Stężenie matrycy zostało wyrównane dla wszystkich badanych prób na podstawie wyników z NanoDrop (Thermo Scientific). Profil czasowo-temperaturowy został zrealizowany zgodnie z przyjętym programem: odwrotna transkrypcja 45 min w 45 ºC, aktywacja polimerazy HotStarTaq DNA 15 min w 95 ºC, denaturacja 30 s w 94 ºC, przyłączanie starterów 30 s w 57 ºC, wydłużanie starterów 3 min w 68 ºC, etapy denaturacji, przyłączania i wydłużania zostały powtórzone 35 razy, następnie wydłużanie końcowe 10 min w 60 ºC oraz schłodzenie mieszaniny reakcyjnej do 10 ºC (zakończenie reakcji). Ocenę jednoetapowej RT-PCR wykonano poprzez rozdział prób w 1 % żelu agarozowym. Przygotowanie żelu, warunki rozdziału elektroforetycznego, wizualizacje oraz kompletną dokumentację dla tych analiz zrealizowano zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.2.2. Pozostałą objętość mieszaniny oczyszczono a firmie Genomed zlecono sekwencjonowanie amplikonów celem dodatkowej weryfikacji.

4.3.6 Pomiar aktywności genu hormonu wzrostu metodą real-time PCR w doświadczalnej grupie linów

4.3.6.1 Izolacja oraz ocena izolatów RNA

Izolację całkowitego RNA ze zgromadzonych prób przysadki, skrawków wątroby oraz skrawków tkanki mięśniowej przeprowadzono metodą wykorzystującą odczynnik Trizol®. Jako, że masa tkanek przeznaczonych do izolacji RNA powinna być taka sama, wszystkie zebrane próby zostały zrównane do masy 10 mg, która odpowiadała średniej masie całej przysadki mózgowej. Etap ten przeprowadzono wykorzystując wagę analityczną XA 110/X (RADWAG) o dokładności odczytu do 0,01 mg. Ocenę czystości izolatów RNA, wykonano przeprowadzając jednoetapową RT-PCR ze starterami Tt3iF oraz Tt3iR zgodnie z procedurą przedstawioną w sekcji traktującej o metodach izolacji RNA. Następnie przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1 % żelu agarozowym identycznie jak w pkt. 4.2.2.

4.3.6.2 Przygotowanie rozcieńczeń IC-2 EGFP RNA oraz GH RNA lina

Wykonanie krzywych standardowych i ich wykorzystanie w reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym ma umożliwić osobie przeprowadzającej analizę określenie czy, o ile oraz jak różni się poziom ekspresji (aktywność) danego genu między badanymi próbami. Określenie aktywności genu poprzez pomiar ilości bądź stężenia swoistego mRNA pociągało za sobą konieczność wykorzystania RNA a nie DNA do stworzenia właściwych krzywych standardowych. Do osiągnięcia tego celu obrano dwie drogi. Pierwsza to wykonanie rozcieńczeń dziesiętnych z wytworzonego w Federalnym Instytucie Badań Chorób Wirusowych Zwierząt (Riems, Niemcy) konstruktu RNA IC-2 (internal control), gdzie znana była wyjściowa ilość jego kopii. Druga to wykonanie rozcieńczeń dziesiętnych z fragmentu mRNA *gh*, gdzie punktem wyjścia był izolat RNA uzyskany z osobnika lina należącego do grupy doświadczalnej.

4.3.6.2.1 Charakterystyka i wykonanie rozcieńczeń dziesiętnych konstruktu IC-2 EGFP RNA

Kontrola wewnętrzna (IC-2) została wytworzona ze zmodyfikowanego genu kodującego białko zielonej fluorescencji (EGFP) na podstawie sekwencji zdeponowanej w bazie NCBI pod numerem dostępu U55761. Wyjściowa mieszanina IC-2 zawierała 2×10^5 cząsteczek RNA (kopii) i poprzez wykonanie 4 rozcieńczeń dziesiętnych uzyskano szereg 5 matryc o określonej koncentracji 2×10^5 (wyjściowa), 2×10^4,

2×10^3, 2×10^2, 2×10^1. Zgodnie z założeniem funkcjonowania krzywych standardowych próba, w której znajduje się matryca o największej koncentracji powinna przekroczyć próg detekcji najwcześniej (wartość Ct powinna być najniższa). Natomiast próba, w której znajduje się matryca o najmniejszej koncentracji powinna charakteryzować się najwyższą wartością Ct (punkt przecięcia krzywej obrazującej próbę z progiem detekcji). Region ograniczony starterami EGFP-1-F oraz EGFP-2-R wynosił 132 pz, a między nimi hybrydyzowała sonda TaqMan wyznakowana na końcu 5‘ barwnikiem fluorescencyjnym HEX a na końcu 3’ umieszczono wygaszasz fluorescencji BBQ (MWG Biotech AG) (Tab. 10).

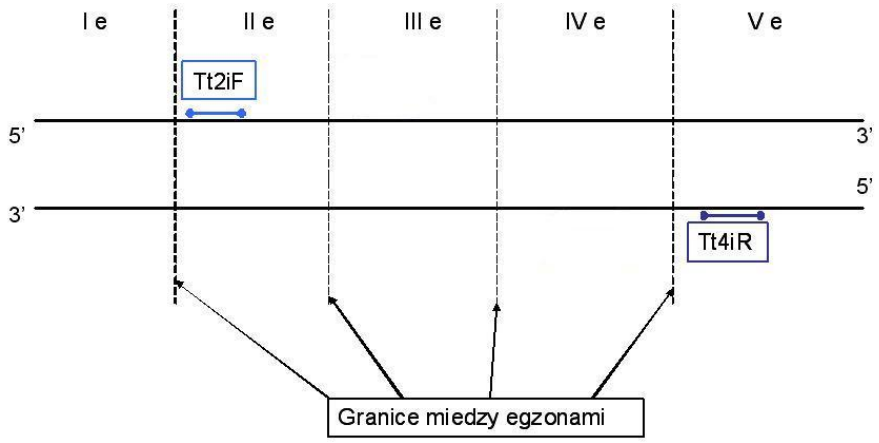
Tabela 10. Charakterystyka starterów oraz sondy przeznaczonych do amplifikacji i detekcji IC-2

Nazwa startera/sondy	**Sekwencja startera/sondy 5’→3’**	**Pozycja w NCBI (U55761)**
EGFP-1-F	GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC	637–656
EGFP-2-R	GAA CTC CAG CAG GAC CAT G	768–750
Sonda TaqMan	HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-Q	703–724

Wewnętrzna kontrola IC-2 została opracowana w celu określania początkowej liczby kopii wirusa w badanym materiale przy krwotocznej biegunce u bydła (BVDV). Co ciekawe liczba kopii RNA nie ulegała degradacji w miarę kolejnych cykli rozmrażania i zamrażania jak to jest zwyczajowo widoczne po kilku cyklach. Było to spowodowane zawieszeniem cząsteczek RNA w specjalnym buforze stabilizującym RSB (Hoffmann i in. 2006).

4.3.6.2.2 Wykonanie rozcieńczeń dziesiętnych z matryc RNA po in vitro transkrypcji

Punktem wyjścia było uzyskanie na mRNA genu hormonu wzrostu lina amplikonu o takiej długości by z łatwością można było w jego obrębie zaprojektować dodatkową wewnętrzną parę starterów wraz z sondą fluorescencyjną. W związku z tym przeprowadzono jednoetapową RT-PCR w oparciu o parę starterów Tt2iF oraz Tt4iR komplementarną z sekwencją nukleotydową odpowiednio w II i V egzonie (Ryc. 7).



Ryc. 7. Rozmieszczenie starterów Tt2iF oraz Tt4iR w obrębie mRNA genu hormonu wzrostu lina.

Reakcję wykonano wykorzystując zestaw odczynników OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN). Mieszanina reakcyjna składała się z następujących komponentów: 5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer – 5 µl, 40 mM dNTP – 1 µl, 10 pmol Tt2iF – 1 µl, 10 pmol Tt4iR - 1 µl, QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix, 5x Q-Solution – 0,5 µl, 10,5 µl H_2O DEPC, izolat RNA – 5 µl. Właściwe stężenie matrycy zostało dobrane dzięki urządzeniu NanoDrop (Thermo Scientific). Profil czasowo-temperaturowy został zrealizowany w termocyklerze Mastercycler (Eppendorf) zgodnie z niniejszym programem: odwrotna transkrypcja 45 min w 45 ºC, aktywacja polimerazy HotStarTaq DNA 15 min w 95 ºC, denaturacja 30 s w 94 ºC, przyłączanie starterów 30 s w 57 ºC, wydłużanie starterów 3 min w 68 ºC, etapy denaturacji, przyłączania i wydłużania zostały powtórzone 35 razy, następnie wydłużanie końcowe 10 min w 60 ºC oraz schłodzenie mieszaniny reakcyjnej do 10 ºC (zakończenie reakcji). Ocenę jednoetapowej RT-PCR wykonano poprzez rozdział prób w 1 % żelu agarozowym. Przygotowanie żelu, warunki rozdziału elektroforetycznego, wizualizacje oraz kompletną dokumentację dla tych analiz zrealizowano zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.2.2.

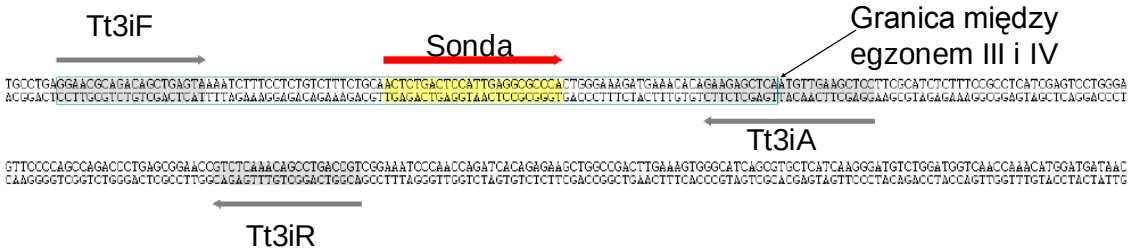
Otrzymany amplikon następnie oczyszczono przy użyciu zestawu Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) i wprowadzono go do wektora pGEM-T EASY (Promega) zgodnie z procedurą podaną przez producenta celem namnożenia insertu. Po zakończeniu inkubacji z wybranych kolonii przy użyciu Wizard® Plus Minipreps DNA Purification oczyszczono wektor zawierający nasz produkt RT-PCR. Aby określić orientację insertu przeprowadzono reakcję sekwencjonowania z wykorzystaniem zestawu GenomeLab DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter) oraz dedykowanych do tego celu starterów pUC/M13 (Promega), które go flankowały. Po

określeniu orientacji, przecięto wektor restryktazą *Pst*I, która rozpoznawała swoje miejsce cięcia za wstawką (insertem) a przed regionem paromotorowym SP 6. Trawienie prowadzono przez 1 h przy 37 ºC w 10 µl mieszaninie reakcyjnej składającej się z: 2 µl wektora, 1 µl buforu NEB 3 (New England Biolabs), 1 µl restryktazy *Pst*I (New England Biolabs) oraz 6 µl wody DEPC (Sigma). Aby określić czy restryktaza właściwie przecięła wektor całą objętość mieszaniny po inkubacji naniesiono na 1 % żel agarozowy i prowadzono rozdział w 80 V przez 30 minut. Następnie fragment żelu zawierający wektor wycięto i oczyszczono zestawem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) tak, aby pozbyć się zanieczyszczeń a jedynie uzyskać oczyszczony zlinearyzowany (wcześniej) wektor. Kolejnym krokiem była *in vitro* transkrypcja warunkowana promotorem T7, którego charakterystyczna sekwencja znajdowała się przed (wraz z) insertem na nici 5'→ 3'. Reakcję tą początkowo prowadzono w termocyklerze Mastercycler (Eppendorf) przez 1 h w 37 ºC, następnie dodano 1 µl DNAzy I RQ1 o stężeniu 1 $u \cdot \mu l^{-1}$ i kontynuowano inkubację przez 15 min w 37 ºC. Mieszanina reakcyjna składała się z następujących komponentów: 8,5 µl zrekombinowanego wektora pGEM-T EASY, 5 µl 5x buforu transkrypcyjnego, 1 µl 10mM ATP, 1 µl 10mM CTP, 1 µl 10mM GTP, 1 µl 10mM UTP, 0,75 µl 0,1M DTT, 1 µl inhibitora RNaz RNasin Plus oraz 0,75 µl polimerazy RNA T7 o stężeniu 15 $u \cdot \mu l^{-1}$. Wszystkie odczynniki zostały zakupione w firmie Promega a przy ich przygotowaniu oraz przechowywaniu postępowano zgodnie z zaleceniami producenta.

Po zakończeniu etapu *in vitro* transkrypcji oczyszczono transkrypty za pomocą zestawu RNeasy Mini Kit (QIAGEN) a następnie oceniono ich koncentrację oraz czystość za pomocą aparatu Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Znając koncentrację transkryptów wykonano 5 rozcieńczeń dziesiętnych, z których każde stanowiło punkt wyjścia do otrzymania krzywych standardowych podczas etapu badawczego z wykorzystaniem real-time PCR. Etapy badania związane z wprowadzaniem zamplifikowanego fragmentu do wektora pGEM-T EASY (Promega) zostały przeprowadzone w laboratorium Federalnego Instytutu Badań Chorób Wirusowych Zwierząt (Riems, Niemcy), które posiada odpowiednią klasę zabezpieczeń dla takich celów.

4.3.6.3 Pomiar aktywności genu hormonu wzrostu metodą real-time PCR

Pomiar ilości kopii matrycowego RNA poprzez łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym jest obok analiz z wykorzystaniem mikromacierzy właściwym podejściem do porównania poziomów ekspresji analizowanych genów. W niniejszych badaniach do przeprowadzenia reakcji wybrano parę starterów Tt3iF oraz Tt3iR, których miejsca hybrydyzacji znajdowały się odpowiednio w III i IV egzonie a sondę planowano tak zsyntetyzować, aby hybrydyzowała do matrycy mRNA *gh* lina na obszarze, gdzie stykają się egzony. Jednakże po konsultacjach z firmą TIB MOLBIOL i przeanalizowaniu zestawu starterów zrezygnowano z użycia startera Tt3iR, ponieważ hybrydyzował on do regionu bogatego w zasady GC, co w efekcie mogłoby podczas real-time PCR prowadzić do niespecyficznej amplifikacji. Ponadto flankowany region był za długi, gdyż według danych literaturowych wskazanym jest, aby miał do 150 pz (Marino i in. 2003, Li i in. 2008). W związku z tym zaprojektowano dodatkowy starter oznaczony jako Tt3iA, który podczas real-time PCR miał hybrydyzować do regionu mRNA *gh* lina gdzie stykają się dwa egzony (III oraz IV). Region, jaki wtedy ograniczały startery Tt3iF oraz Tt3iA wynosił 109 pz. Z pośród szeregu dostępnych sond wybrano sondę TaqMan wyznakowaną na końcu 5‘ barwnikiem fluorescencyjnym FAM a na końcu 3’ umieszczono wygaszasz fluorescencji BBQ (TIB MOLBIOL). Sonda TaqMan została zaprojektowana w ten sposób, aby hybrydyzowała do matrycy mRNA *gh* lina między starterami Tt3iF oraz Tt3iA na obszarze III egzonu (żółte wyróżnienie). Umiejscowienie startera Tt3iA na granicy egzonów (obok rzetelnej metody izolacji RNA) uniemożliwiło ewentualną amplifikację na matrycy DNA (Ryc. 8).



Ryc. 8. Rozmieszczenie starterów oraz sondy na obszarze granicznym między egzonem III a IV.

Sekwencje nukleotydowe starterów zostały dodatkowo tak dobrane, aby ich temperatury topnienia (Tm) były bardzo zbliżone (Tab. 11).

Tabela 11. Zestawienie starterów oraz sondy wykorzystanych w real-time PCR.

Nazwa startera/sondy	Sekwencja startera/sondy 5'→3'	Tm startera/sondy
Tt3iF	GGAACGCAGACAGCTGAGTA	55,6 ºC
Tt3iA	GGAGCTTCAACATTGAGCTCTTC	57,6 ºC
Sonda TaqMan	FAM - ACTCTGACTCCATTGAGGCGCCCA - Q	67,9 ºC

Reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym dla wszystkich badanych prób przeprowadzono w termocyklerze Mx3005P™ (Stratagene) wykorzystując zestaw odczynników QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN). Głównymi komponentami tego zestawu są QuantiTect RT Mix oraz 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix**.** Zestaw ten umożliwił jednoetapową odwrotną transkrypcję ze starterami specyficznymi dla danego regionu (QuantiTect RT Mix) oraz amplifikację z jednoczesną detekcją (sonda TaqMan) przyrostu produktu na powstałym cDNA (2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix). Takie podejście ogranicza do minimum możliwość wprowadzenia błędu wynikającego z pipetowania bądź zanieczyszczenia prób w trakcie dwuetapowej procedury, gdy najpierw przeprowadzamy odwrotną transkrypcję a potem amplifikację z detekcją na cDNA. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby wynosiła 25 µl. Skład szczegółowy mieszaniny przedstawiał się następująco: H_2O DEPC - 7,05 µl, 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix - 12,5 µl, QuantiTect RT Mix - 0,25 µl, Sonda TaqMan - 0,2 µl, Starter Tt3iF - 2 µl, Starter Tt3iA - 2 µl, Matryca RNA - 1 µl. Ponieważ sonda dla regionu EGFP RNA została wyznakowana barwnikiem fluorescencyjnym HEX a dla *gh* mRNA barwnikiem FAM koniecznością było wykonanie dwóch mieszanin. Różniły się one jedynie rodzajem dodanej sondy oraz ilością prób dla których zostały one przygotowane.

Mieszaninę reakcyjną z FAM sporządzono dla 85 prób, gdzie 72 stanowiły próby badane (24 ryby a z każde z nich po trzy izolaty RNA), następne 10 to 5 rozcieńczeń dziesiętnych matryc GH RNA (własnych) dla standardów w dwóch powtórzeniach oraz 2 próby negatywne. Z kolei mieszanina z HEX sporządzona została dla 10 prób stanowiących 5 rozcieńczeń dziesiętnych matryc IC-2 EGFP RNA dla standardów w dwóch powtórzeniach, oraz 2 prób negatywnych (Tab. 12).

Tabela 12. Rozlokowanie prób na płytce mikrotitracyjnej poddanej real-time PCR.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	1♀	3♀	2♂	GH1	GH5	2♂	1♀	3♀	2♂	1♀	3♀	EFGP2
B	2♀	1♂	3♂	GH1	GH5	3♂	2♀	1♂	3♂	2♀	1♂	EFGP3
C	3♀	2♂	1♀	GH2	X	1♀	3♀	2♂	1♀	3♀	2♂	EFGP3
D	1♂	3♂	2♀	GH2	X	2♀	1♂	3♂	2♀	1♂	3♂	EFGP4
E	2♂	1♀	3♀	GH3	1♀	3♀	2♂	1♀	3♀	2♂	X	EFGP4
F	3♂	2♀	1♂	GH3	2♀	1♂	3♂	2♀	1♂	3♂	EFGP1	EFGP5
G	1♀	3♀	2♂	GH4	3♀	2♂	1♀	3♀	2♂	1♀	EFGP1	EFGP5
H	2♀	1♂	3♂	GH4	1♂	3♂	2♀	1♂	3♂	2♀	EFGP2	X

Pogrubione liczby oraz litery bez kolorowego tła wyznaczają pozycję na płytce, wyróżnienia: żółte – próby przysadki, bordowe – próby z wątroby, pomarańczowe – próby z mięśni, zielone – matryce standardu GH RNA, niebieskie – matryce standardu EGFP RNA, czarne – próby negatywne.

Program czasowo-temperaturowy dla real-time PCR został zrealizowany poczynając od etapu odwrotnej transkrypcji w 50 ºC przez 30 min, następnie aktywacja polimerazy 15 min w 95 ºC, denaturacja 15 s w 95 ºC, przyłączanie starterów 30 s w 55 ºC, wydłużanie starterów 30 s w 76 ºC. Ostatnie 3 etapy zostały powtórzone czterdziestokrotnie a następnie schłodzono całą mieszaninę reakcyjną do 10 ºC, kończąc tym samym reakcję. Otrzymane wyniki poddano analizie sprawdzając krzywą standardową dla zastosowanych standardów oraz w dalszej kolejności analizując wartości Ct, stężenia oraz liczbę kopii mRNA *gh* dla badanych prób.

4.3.7 Określenie tendencji zmian GH i IGF-I za pomocą kompetycyjnego testu ELISA.

4.3.7.1 Przygotowanie prób wątroby oraz krwi do analizy.

Pobraną i przetrzymywaną przez 24 godziny w 4 ºC krew linów (z doświadczenia) wirowano w 4 ºC z prędkością 4 000 obr.·min.$^{-1}$ przez 10 min w wirówce 5415 R (Eppendorf). Po zakończeniu wirowania znajdującą się nad erytrocytami plazmę krwi przeniesiono do nowych 1,5 ml probówek typu Eppendorf i przystąpiono do pomiarów stężenia GH i IGF-I za pomocą dwóch kompetycyjnych testów ELISA. Do każdego z testów wykorzystano po 50 µl plazmy krwi.

Przechowywane w zamrażarce próby wątroby przeniesiono na blat laboratoryjny celem odtajania. Następnie wykorzystując wagę analityczną XA 110/X (RADWAG) o dokładności odczytu do 0,01 mg z każdej z prób pobrano do nowych 1,5 ml probówek typu Eppendorf po 0,1 g celem wyrównania ich mas. Do probówek z odważonym kawałkiem wątroby napipetowano 200 µl buforu $PBS^{(-)}$ (Dulbecco) i całość homogenizowano ręcznym homogenizatorem aż do uzyskania jednolitej zawiesiny. W celu uzyskania klarownego płynu wszystkie probówki w temperaturze pokojowej wirowano 5 min w 8 000 obr·min^{-1} Do oceny koncentracji GH i IGF-I w próbach wątroby za pomocą odpowiedniego kompetycyjnego testu ELISA wykorzystano łącznie po 50 µl supernatantu.

4.3.7.2 Określenie stężenia GH i IGF-I w próbach plazmy krwi oraz wątroby

Wzrost organizmów jest złożonym procesem, dlatego też oprócz pomiaru aktywności genu hormonu wzrostu poprzez qPCR skupiono się także na pomiarze stężenia hormonu wzrostu (GH) oraz dodatkowo insulinopodobnego czynnika wzrostu typu I (IGF-I). Pomiaru dokonano względem odpowiednio przygotowanych do tego celu próbach krwi oraz wątroby pozyskanych od osobników lina należących do grupy doświadczalnej. Metodą, jaką zastosowano do osiągnięcia tego celu była kompetycyjna odmiana testu ELISA. W przypadku GH zasada działania opierała się na współzawodnictwie między GH w badanych próbach a GH wyznakowanym biotyną w momencie przyłączania się do specyficznego antygenu stanowiącego fazę stałą. Natomiast podczas pomiaru stężenia IGF-I współzawodnictwo zachodziło między IGF-I zawartym w próbach a tym wyznakowanym peroksydazą chrzanową, gdyż oba dążyły do przyłączenia się do przeciwciała, które związało się z anty-przeciwciałem unieruchomionym na płytce. Stężenie GH oraz IGF-I w badanych próbach było odwrotnie proporcjonalne do natężenia barwy zmierzonej czytnikiem płytek iMark Microplate Absorbance Reader (BioRad) przy długości fali 450 nm. Stężenie GH lub IGF-I w badanych próbach odczytano z krzywej wykreślonej na podstawie wartości absorbancji i odpowiadającym im stężeniom białek (GH lub IGF-I) o znanej koncentracji. Rozcieńczenia standardu dla GH wynosiły 5 000 pg·ml^{-1}, 2 500 pg·ml^{-1}, 1 250 pg·ml^{-1}, 625 pg·ml^{-1} oraz 312 pg·ml^{-1}. Natomiast dla IGF-I 2 000 pg·ml^{-1}, 1 000 pg·ml^{-1}, 400 pg·ml^{-1}, 120 pg·ml^{-1} oraz 40 pg·ml^{-1}. Zestawy odczynników do pomiaru stężenia GH i IGF-I metodą kompetycyjnego testu ELISA były przeznaczone dla ryb i nazywały się odpowiednio Fish growth hormone (GH) ELISA kit oraz Fish insulin-

like growth factors 1 (IGF-1) ELISA kit (CUSABIO). Zastosowano analizę statystyczną do określenia wpływu temperatury oraz płci na poziom badanych białek. Do tego celu wykorzystano test LSD oraz test Levena w kierunku stwierdzenia jednorodności wariancji.

Wszystkie wykonane w niniejszej pracy badania zostały przeprowadzone na organizmach kręgowych (linach) po uprzednim uzyskaniu pozwolenia numer 2/1/2008, ze strony Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach.

Markery masowe (drabinki DNA) zastosowane w niniejszej pracy składały się z następujących fragmentów (pz):

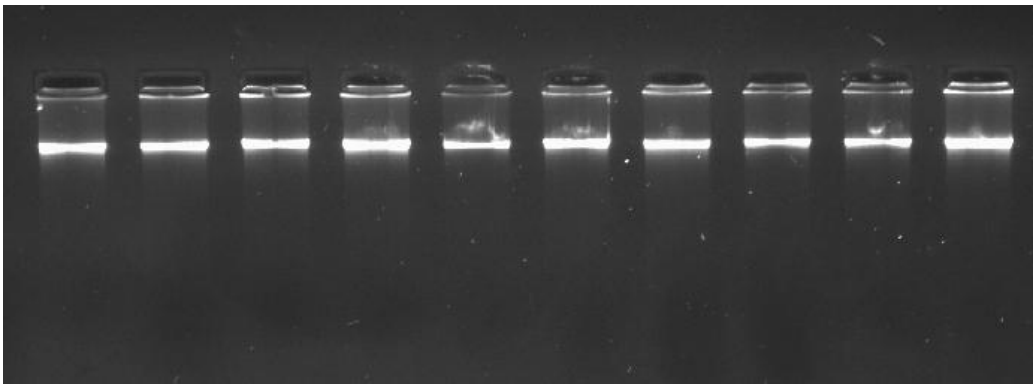
- peqGOLD 100 bp DNA Ladder Plus (PEQLAB) – 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1200, 1 500, 2 000 oraz 3 000,
- DNA Marker 100-1000 (A&A Biotechnology) – 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 oraz 1 000.

5. WYNIKI

5.1 Określenie sekwencji genu hormonu wzrostu lina. Model białkowy hormonu wzrostu.

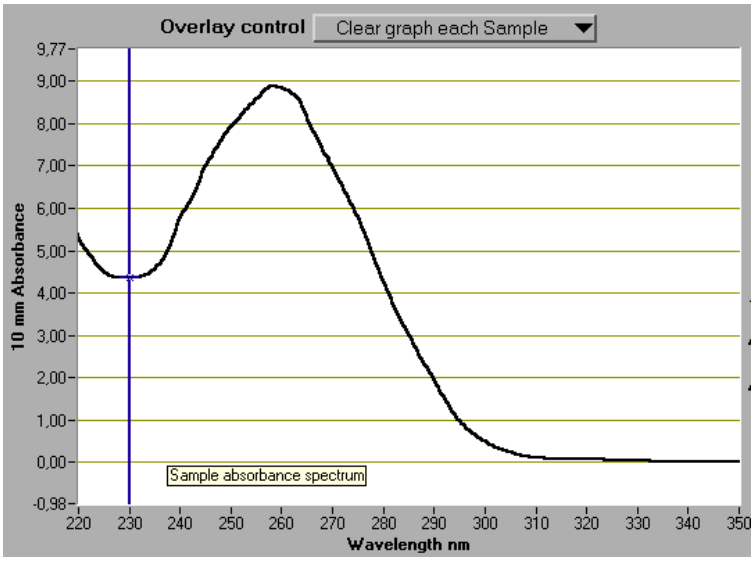
5.1.1 Ocena czystości otrzymanych izolatów.

Po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego 29 izolatów otrzymano elektroforegram wskazujący, iż otrzymany DNA jest wysokiej jakości, za czym ponadto przemawia brak dodatkowych prążków oraz wyraźnych smug na żelu agarozowym (Ryc. 9).



Ryc. 9. Wynik rozdziału elektroforetycznego izolatów.

Po przeprowadzeniu pomiarów absorbancji na aparacie Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) stwierdzono, że czystość wyizolowanych prób była zbliżona do wartości 1,8. Taki wynik wskazuje na brak w otrzymanych próbach zanieczyszczeń, których obecność mogłaby wpływać negatywnie na wydajność późniejszych reakcji (Ryc. 10).



Ryc. 10. Wykres absorbancji dla badanych izolatów za pomoca aparat Nanodrop ND-1000.

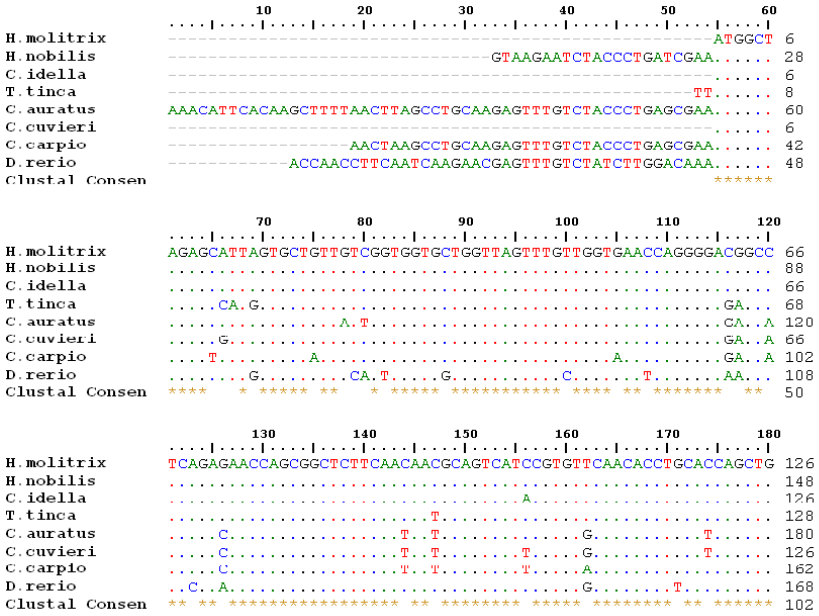
5.1.2. Projektowanie starterów oraz łańcuchowa reakcja polimerazy.

W wyniku hierarchicznego dopasowania 7 wybranych sekwencji genu hormonu wzrostu, program CLUSTAL W uszeregował sekwencje całej analizowanej grupy poczynając od najbardziej podobnych do tych, które wykazują największe zróżnicowanie (Tab. 13).

Tabela 13. Hierarchiczne zestawienie analizowanych sekwencji na podstawie stopnia wzajemnego podobieństwa.

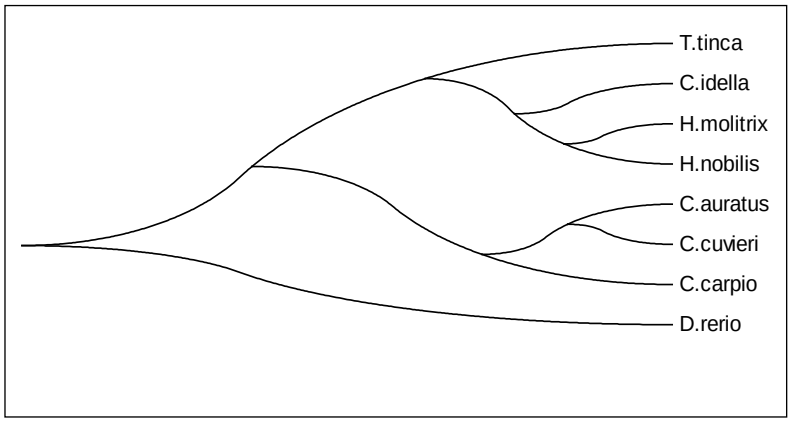
Sekwencja nr 1	Długość (pz)	Sekwencja nr 2	Długość (pz)	Homologia (%)
H. molitrix	633	H. nobilis	1158	100
C. auratus	1180	C. cuvieri	633	98
C. idella	633	H. molitrix	633	98
C. idella	633	H. nobilis	1158	98
T. tinca	636	H. molitrix	633	97
T. tinca	636	C. idella	633	96
T. tinca	636	H. nobilis	1158	96
C. carpio	1164	C. cuvieri	633	95
T. tinca	636	C. cuvieri	633	93
C. idella	633	C. cuvieri	633	93
C. cuvieri	633	H. molitrix	633	93
C. cuvieri	633	H. nobilis	1158	93
T. tinca	636	C. auratus	1180	92
T. tinca	636	C. carpio	1164	92
C. auratus	1180	C. idella	633	92
C. auratus	1180	H. molitrix	633	92
C. carpio	1164	C. idella	633	92
C. carpio	1164	H. molitrix	633	92
C. auratus	1180	C. carpio	1164	90
C. idella	633	D, rerio	711	89
D, rerio	711	H. molitrix	633	89
T. tinca	636	D, rerio	711	88
D, rerio	711	C. cuvieri	633	87
D, rerio	711	H. nobilis	1158	84
C auratus	1180	D, rerio	711	83
C. carpio	1164	D, rerio	711	83
C. carpio	1164	H. nobilis	1158	83
C. auratus	1180	H. nobilis	1158	82

Na podstawie wygenerowanego zestawienia stwierdzono, iż sekwencja genu *gh* tołpygi białej wykazuje największe podobieństwo względem analizowanej sekwencji lina (żółte wyróżnienie w tabeli powyżej). W dalszym etapie importując uliniowane sekwencje do programu BioEdit (7.0.9.0.) uzyskano bardzo przejrzysty układ sekwencji (Ryc. 11). W łatwy sposób zlokalizowano miejsca występowania mutacji oraz ich rodzaj, na podstawie których. program CLUSTAL W dokonał uliniowania sekwencji.



Ryc. 11. Wycinek z zestawienia uliniowanych sekwencji mRNA *gh* w programie BioEdit (7.0.9.0.).

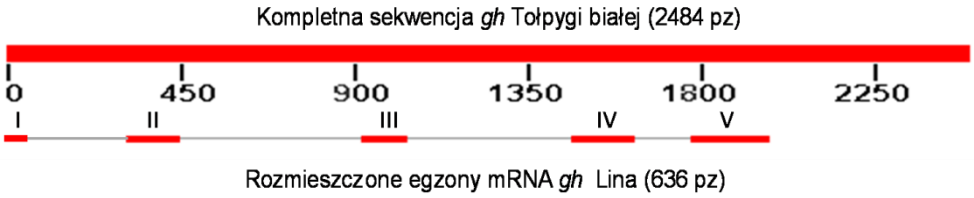
Potwierdzeniem tego, że sekwencja lina wykazuje wysokie podobieństwo do sekwencji tołpygi białej, jest ich bliskie położenie na gałęzi skonstruowanego w programie MEGA 4.0 drzewa. Ze względu na to, iż UPGMA jest algorytmem fenetycznym (łączy gałęzie drzewa na podstawie kryterium największego podobieństwa wśród par i według średnich łączonych par), to na tej samej gałęzi znalazły się także takie gatunki jak amur biały oraz tołpyga pstra (Ryc. 12).



Ryc. 12. Graficzne przedstawienie stopnia podobieństawa między porównywanymi sekwencjami.

Bazując na powyższych analizach wzajemnego podobieństwa między sekwencjami mRNA *gh*, w bazie rekordów NCBI odszukano dla tołpygi białej kompletną sekwencję genu *gh*. Następnie zaimportowaną sekwencję o numerze dostępu M94348 zawierającą regiony intronowe porównano z analizowaną sekwencją mRNA

gh lina, dzięki czemu graficznie zobrazowano rozmieszczenie wszystkich egzonów (nr. I, II, III, IV, V) względem sekwencji genu *gh* tołpygi białej (Ryc. 13).



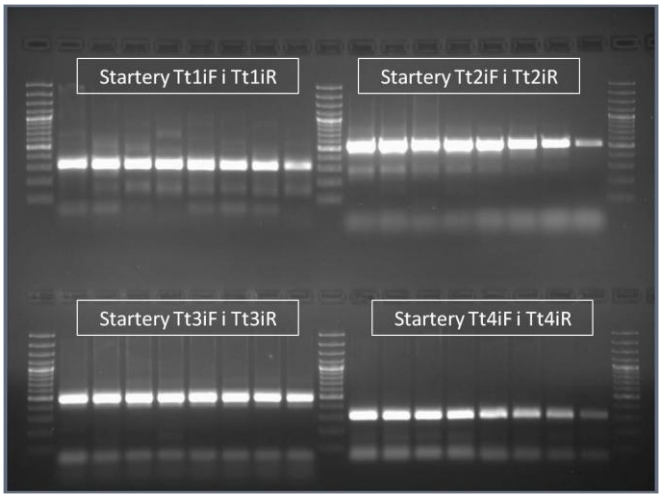
Ryc. 13. Rozmieszczenie czterech egzonów względem sekwencji genu *gh* tołpygi białej.

W wyniku porównania, wydzielone sekwencje egzonów I, II, III, IV oraz V wykazały względem sekwencji genu *gh* tołpygi białej homologię od 96 do 100 % (Ryc. 14).

```
 Score = 18.3 bits (9),  Expect = 9e-04
 Identities = 9/9 (100%), Gaps = 0/9 (0%)
 Strand=Plus/Plus
                                          „Egzon 1”
Query  31  ATGGCTAGA  39
           |||||||||
Sbjct  3   ATGGCTAGA  11

 Score =  228 bits (252),  Expect = 2e-63
 Identities = 132/136 (97%), Gaps = 0/136 (0%)
 Strand=Plus/Plus                         „Egzon 2”

Query  316  GTGCTGTTGTCGGTGGTGCTGGTTAGTTTGTTGGTGAACCAGGGGACGGCCTCAGAGAAC  375
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  18   GTGCTGTTGTCGGTGGTGCTGGTTAGTTTGTTGGTGAACCAGGGGAGAGCCTCAGAGAAC  77

Query  376  CAGCGGCTTTTCAACAACGCAGTCATCCGTGTTCAACACCTGCACCAGCTGGCTGCAAAA  435
            |||||||| |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  78   CAGCGGCTCTTCAACAATGCAGTCATCCGTGTTCAACACCTGCACCAGCTGGCTGCAAAA  137

Query  436  ATGATTAACGACTTTG  451
            ||||||||||||||||
Sbjct  138  ATGATTAACGACTTTG  153

 Score =  201 bits (222),  Expect = 3e-55
 Identities = 114/116 (98%), Gaps = 0/116 (0%)
 Strand=Plus/Plus                         „Egzon 3”

Query  922   GAGGACAACCTGTTGCCTGAGGAACGCAGACAGCTGAGTAAAATCTTTCCTCTGTCTTTC  981
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  153   GAGGACAACCTGTTGCCTGAGGAACGCAGACAGCTGAGTAAAATCTTTCCTCTGTCTTTC  212

Query  982   TGCAACTCTGACTCCATTGAGGCGCCCACTGGAAAAGATGAAACGCAGAAGAGCTC  1037
             |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||| ||||||||||
Sbjct  213   TGCAACTCTGACTCCATTGAGGCGCCCACTGGGAAAGATGAAACACAGAAGAGCTC  268

 Score =  268 bits (296),  Expect = 3e-75
 Identities = 157/163 (96%), Gaps = 0/163 (0%)
 Strand=Plus/Plus                         „Egzon 4”

Query  1462  ATGTTGAAGCTCCTTCGCATCTCTTTCCGCCTCATTGAGTCCTGGGAGTTCCCCAGCCAG  1521
             |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  270   ATGTTGAAGCTCCTTCGCATCTCTTTCCGCCTCATCGAGTCCTGGGAGTTCCCCAGCCAG  329

Query  1522  ACCCTGAGCGGAGCCGTCTCAAACAGCTTGACCGTCGGGAACCCCAACCAGATCACTGAG  1581
             |||||||||||| |||||||||||||| |||||||||| || |||||||||||||| |||
Sbjct  330   ACCCTGAGCGGAACCGTCTCAAACAGCCTGACCGTCGGAAATCCCAACCAGATCACAGAG  389

Query  1582  AAGCTGGCCGACTTGAAAGTGGGCATCAGCGTGCTCATCAAGG  1624
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  390   AAGCTGGCCGACTTGAAAGTGGGCATCAGCGTGCTCATCAAGG  432

 Score =  351 bits (388),  Expect = 3e-100
 Identities = 202/207 (97%), Gaps = 0/207 (0%)
 Strand=Plus/Plus                         „Egzon 5”

Query  1768  AGGGATGTCTGGATGGTCAACCAAACATGGATGATAACGACTCCCTGCCGCTGCCTTTTG  1827
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  430   AGGGATGTCTGGATGGTCAACCAAACATGGATGATAACGACTCCCTGCCGCTGCCTTTTG  489

Query  1828  AGGATTTCTACTTGACCATGGGGGAGAGCAGCCTCAGAGGGAGCTTCCGTCTTCTGGCTT  1887
             |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||| |||||| ||||||||||||
Sbjct  490   AGGATTTCTACTTGACCATGGGGGAGAGCAGCTTCAGAGAGAGCTTTCGTCTTCTGGCTT  549

Query  1888  GCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTGGAAACTTACCTAAGGGTTGCAAATTGCAGGAGAT  1947
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct  550   GCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTGGAAACTTACCTGAGGGTTGCAAATTGCAGGAGAT  609

Query  1948  CCCTGGATTCAAACTGCACCCTGTAGA  1974
             |||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  610   CCCTGGATTCCAACTGCACCCTGTAGA  636
```

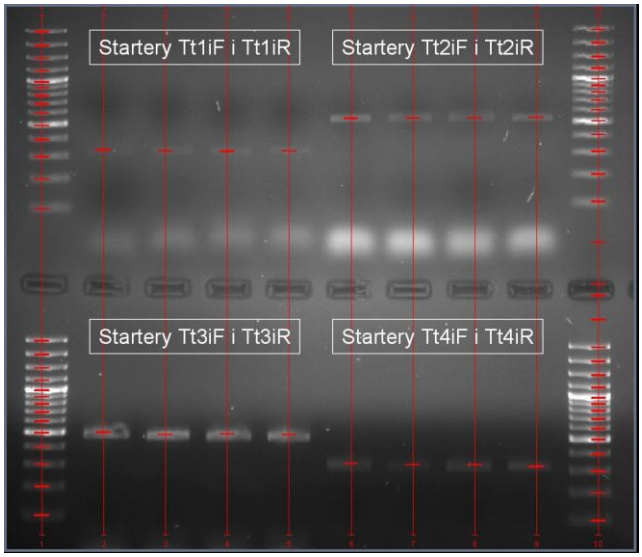
Ryc. 14. Porównanie sekwencji mRNA *gh* lina (dolna nić) z sekwencja genu *gh* tołpygi białej (górna nić).

Po przeprowadzeniu reakcji polimerazy (z 4 parami starterów) w gradiencie temperaturowym odczytano z elektroforegramu optymalne temperatury hybrydyzacji starterów z matrycą DNA. Dla starterów pierwszej pary (Tt1iF i Tt1iR) wynosiła ona 65,5 C, drugiej (Tt2iF i Tt2iR) 67°C, trzeciej (Tt3iF i Tt3iR) 68°C oraz czwartej (Tt4iF i Tt4iR) 68°C. Dodatkowo na podstawie otrzymanego elektroforegramu skrócono czasy wydłużania oraz hybrydyzacji starterów do 15 sekund oraz zredukowano stężenie jonów magnezowych do 2 µl na pojedynczą mieszaninę reakcyjną (Ryc. 15).



Ryc. 15. Elektroforegram produktów gradientowej PCR z czterema parami starterów względem markera wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB).

Zmiany wprowadzone do profilu czasowo – temperaturowego oraz składu mieszaniny reakcyjnej wpłynęły korzystnie na wynik reakcji polimerazy. Po rozdziale elektroforetycznym otrzymano dla każdej z par starterów pojedyncze produkty reakcji (Ryc. 16).



Ryc. 16. Elektroforegram produktów PCR z czterema parami starterów względem markera wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB).

W wyniku reakcji sekwencjonowania a następnie analizy „surowych” wyników otrzymano dla każdej z par starterów kompletne sekwencje. Sekwencje te zawierały w swym ciągu regiony egzonowe oznaczone poniżej jako regiony bez wyróżnienia. W regionach kolejnych egzonów umieszczone były także sekwencje starterów, zobrazowane poniżej poprzez wyróżnienie kolorem zielonym. Nieznane dotychczas regiony intronowe oznaczono kolorem siwym. Powyższy opis sekwencji obrazuje poniższe zestawienie sekwencji (Ryc. 17).

Produkt PCR ze starterami Tt1iF i Tt1iR

GTCTACCCTGAGCGAAATGGCTAGAGGTAGGGATGAGATGATTTCTGTGGATGTAATGTATAAGACTTAT
TTTTGACAACTCCCTATTTAGTTTAGATGTTTTTGTGCTTTCTTCTTACCAGTAAAACTAATTTAACCGT
AAAAGAGTTTATTGGAGCATGGCAAATAAAACAACAACATTTATTTGATCTTTTGATTAATCCAAAATCT
TGATTTCATTGGCTATTTTATCAGGAGCTTTGAAGCAACCGTGTGGCAAATGTGGCAAACAAACCTCTTT
CTTTTCTCCTCCTAGCATTAGTGCTGTTGTCGGTGGTGCT

Produkt PCR ze starteramiTt2iF i Tt2iR

ACAATGCAGTCATCCGTGTTCAACACCTGCACCAGCTGGCTGCAAAAATGATTAACGACTTTGTAAGATT
TCCATTCAAATCTATTCAGAACTAGTAGATTCTAACCAGAACAAAAACAATTGGTCACACCTATTCAAGT
GAAATATGAGCTTAAAGGGATAGTTCACCCAAAAATGAAAATTCTGTTATCATTTGCTCACCCTCGAGTT
GTTCCAAACCTGTATGAACTTCTTTCTTCTGCTGAACACAAAAGAAGATATTTTAAAGAATATGGGTAAC
CAAACAGTTGATTGACTTCCATAGTATGGGGGAAAAAAACTTTGGAACAACTTGAGGGTGAGTAAATGAA
GACAGAATTTTCATTTTTGAGTGAACTATCCCTTTTTGTAAGTTTCTTTGCATTTTATCAGATGCATTTG
TTGATTTAGCTATTTGAGTGACTAAAATGTATTATAGTAAATACGATTTTCCTTTTGTTATCAAGGAGGA
CAACCTGTTGCCTGAGGAACGCAGACAGCTGAGT

Produkt PCR ze starteramiTt3iF i Tt3iR

GGAACGCAGACAGCTGAGTAAATCTTTCCTCTGTCTTTCTGCAACTCTGACTCCATTGAGGCGCCCACT
GGGAAAGATGAAACACAGAAGAGCTCAGTAAGTAGACAGTATGGTTAAAAATGATGTTTTATTCAACAAA
ATATAGAACTATGAAACAAATAGTAGTGTCAAACAATGAACAAAAATACAACATACTGTACAATACAAAA
AAAAAATATATCTTGTTTTCACACAATTAGATGACAATTTTACTCTTTAAATTGCTCAGAAATCAGAAAA
TGCTAAGTATTGTCTTGCACAGTTTGGAAAACACTTACACCAAATATGGGCAGCATAAACATCAAAAATG
GCTAGTGGTCTGAAGCCTCCAGTATCCTTTTTTCTTTCTTCAGATGTTGAAGCTCCTTCGCATCTCTTTC
CGCCTCATCGAGTCCTGGGAGTTCCCCAGCCAGACCCTGAGCGGAACCGTCTCAAACAGCCTGACCGT

Produkt PCR ze starteramiTt4iF i Tt4iR

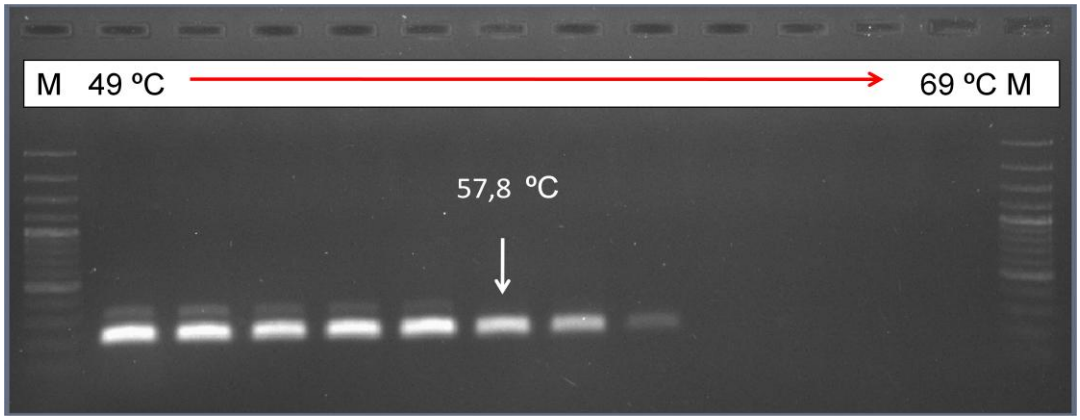
ACCGTCTCAAACAGCCTGACCGTCGGAAATCCCAACCAGATCACAGAGAAGCTGGCCGACTTGAAAGTGG
GCATCAGCGTGCTCATCAAGGGATGTCTGTGAGAGAGACCAGATTTATTCTAGGCTACTTCATTTTCTCA
CACAGTGTGTCAAGTGGTTTTACCAGGAGGTGTGATGGCATCTTCTGGTCTTCTTCGGATAGCTATGTCA
TAATTTGCCATTTGTATCTGCACAGGGATGGTCAACCCAACATGGATGATAACGACTCCCTGCCGCTGCC
TTTTGAGGATTTCTACTTGACCATGGGGGAGAG

Ryc. 17. Zestawienie uzyskanych sekwencji dla genu hormonu wzrostu

Długość poszczególnych sekwencji intronów wynosiła kolejno:

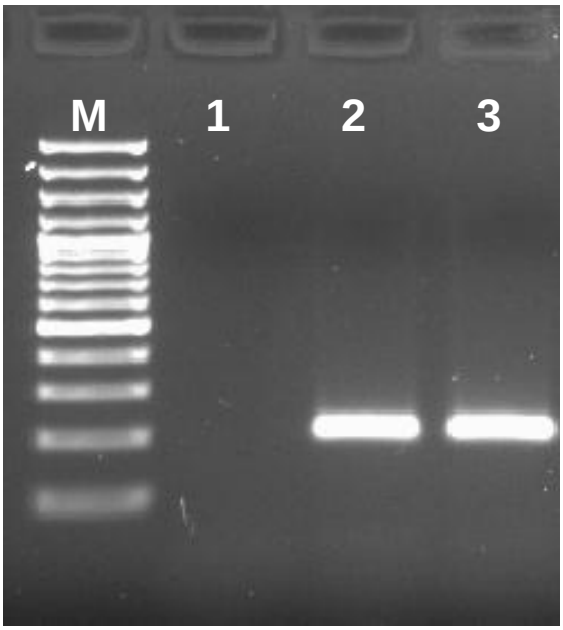
- 269 pz – intron I zlokalizowany między egzonem I i II,
- 408 pz – intron II zlokalizowany między egzonem II i III,
- 296 pz – intron III zlokalizowany między egzonem III i IV,
- 137 pz – intron IV zlokalizowany między egzonem IV i V.

Następnie przeprowadzono gradientową PCR ze starterami TtVeF i TtVeR. Analizując otrzymany układ prążków po rozdziale elektroforetycznym stwierdzono, że optymalną temperaturą dla hybrydyzacji starterów do matrycy jest temperatura 57,8 ºC (Ryc. 18).



Ryc. 18. Wynik reakcji polimerazy w gradiencie temperatury dla starterów TtV3F i TtVeR. M – marker wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB).

Po wprowadzeniu zweryfikowanej temperatury przyłączania starterów (57,8 ºC) do programu czasowo – temperaturowego uzyskano amplikony o spodziewanej długości bez towarzyszących im niespecyficznych produktów (Ryc. 19).



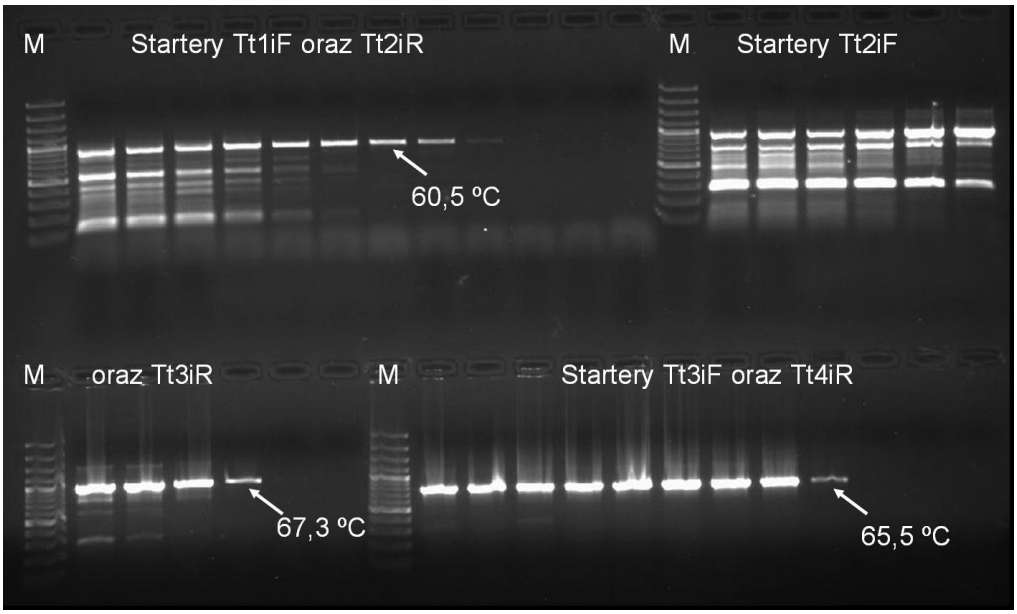
Ryc. 19. Elektroforegram uzyskany po reakcji polimerazy ze starterami TtV3F i TtVeR. M – marker wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB), 1 - próba ujemna (bez matrycy w PCR), 2 oraz 3 – przykładowe badane próby.

Po przeanalizowaniu otrzymanych wyników sekwencjonowania uzyskano sekwencję 190 par zasad regionu końcowego genu *gh* lina. Fragmenty sekwencji oznaczone na zielono przedstawiają sekwencję nukleotydową flankujących ją starterów.

Produkt PCR ze starterami TtV3F i TtVeR

CAACCAAACATGGATGATAACGACTCCCTGCCGCTGCCTTTTGAGGATTTCTACTTGACCATGGGGGAGA
GCAGCTTCAGAGAGAGCTTTCGTCTTCTGGCTTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTGGAAACTTACCT
GAGGGTTGCAAATTGCAGGAGATCCCTGGATTCCAACTGCACCCTGTAGA

Wykorzystując „nowe" kombinacje starterów do reakcji polimerazy w gradiencie temperatury otrzymano wzór prążkowy, na podstawie którego zweryfikowano, czy dobrane kombinacje mogą być stosowane. Przeciwwskazaniem do tworzenia takich kombinacji jest zazwyczaj widmo tworzenia się struktur typu primer – dimer. Wtedy startery mają tendencję do hybrydyzowania z drugim starterem bądź z samym sobą, zamiast z komplementarnym regionem matrycy. Jednakże projektując startery przestrzegano zalecanych zasad i dzięki temu nowe kombinacje starterów hybrydyzowały do matrycy, a nie generowały niepożądanych struktur. Po przeprowadzeniu gradientowej PCR na podstawie elektroforegramu wybrano optymalne temperatury hybrydyzacji dla każdej z par starterów (Ryc. 20).



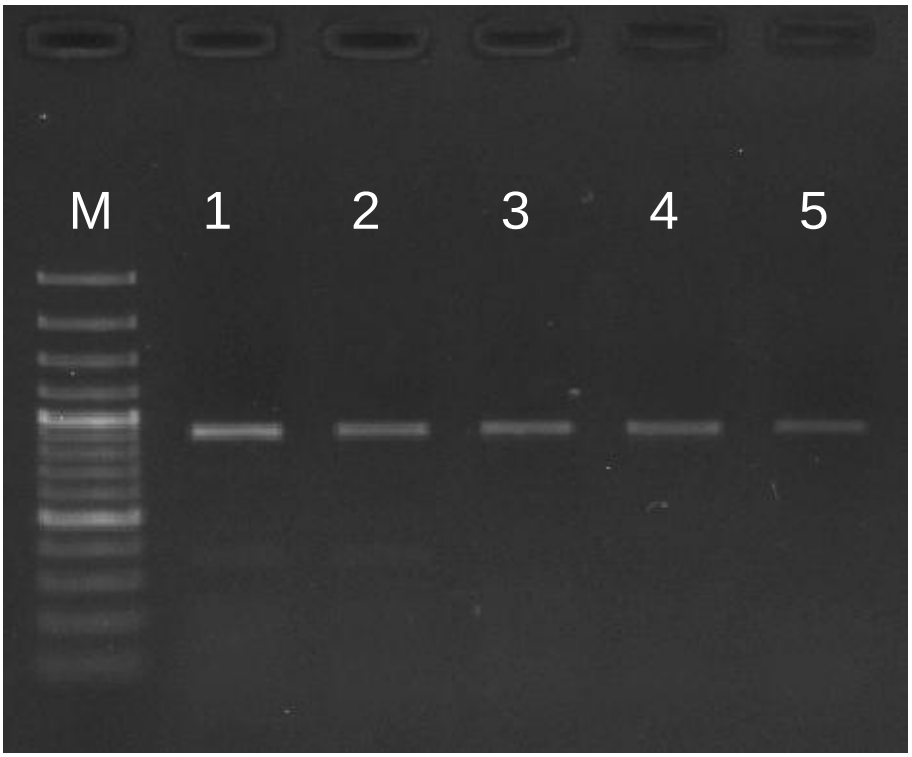
Ryc. 20. Wynik PCR w gradiencie temperatury dla nowych zestawów starterów. M – marker wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB).

Optymalne temperatury hybrydyzacji dla nowych kombinacji starterów wynosiły:

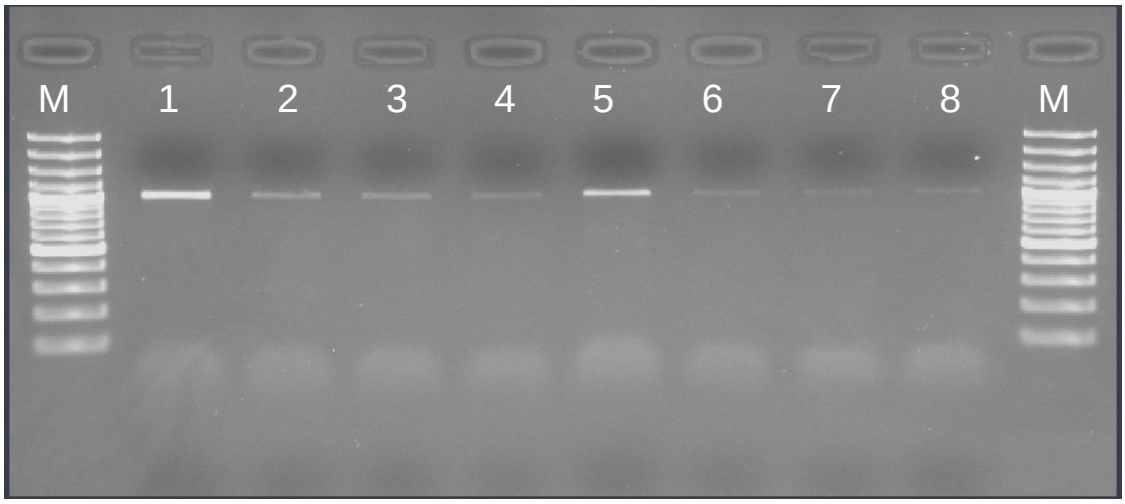
- Tt1iF oraz Tt2iR - 60,5 ºC,
- Tt2iF oraz Tt3iR - 67,3 ºC,
- Tt3iF oraz Tt4iR – 65,5 ºC.

Po przeprowadzeniu trzech odrębnych (ze względu na różne temperatury hybrydyzacji starterów) reakcji polimerazy, otrzymano dla wszystkich badanych prób

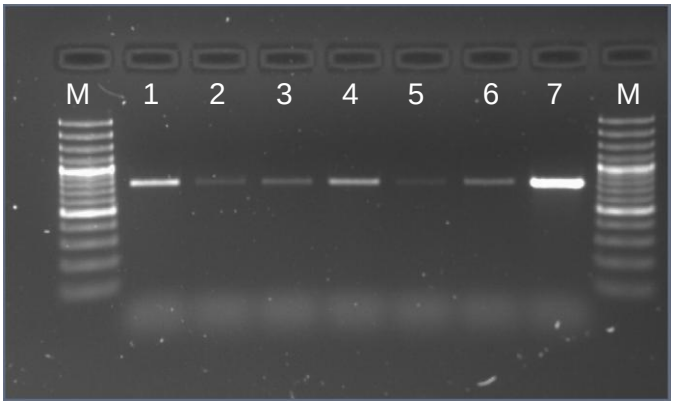
pozytywne wyniki w postaci pojedynczych prążków na 1 % żelu agarozowym. Dla pierwszej pary starterów otrzymano prążki na wysokości około 900 pz (Ryc. 21), dla drugiej około 1000 pz (Ryc. 22) oraz trzeciej około 800 pz (Ryc. 23).



Ryc. 21. Wynik rozdział elektroforetycznego dla przykładowych prób po PCR wykorzystaniem starterów Tt1iF oraz Tt2iR. Ścieżki od 1 do 5 przykładowe próby. M – marker wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB).



Ryc. 22. Wynik rozdział elektroforetycznego dla przykładowych prób po PCR wykorzystaniem starterów Tt2iF oraz Tt3iR. Ścieżki od 1 do 8 przykładowe próby. M – marker wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB).



Ryc. 23. Wynik rozdziału elektroforetycznego dla przykładowych prób po PCR z wykorzystaniem starterów Tt3iF oraz Tt4iR. Ścieżki od 1 do 7 przykładowe próby M – marker wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB).

Otrzymane wyniki sekwencjonowania każdego z produktów reakcji polimerazy porównano ze sobą w programie CLUSTAL X i nie stwierdzono żadnych różnic w składzie nukleotydowym miedzy nimi. Faktyczna długość amplikonów uzyskanych przy udziale nowych kombinacji starterów wynosiła dla trzech kolejnych kombinacji starterów odpowiednio: 898 pz, 993 pz oraz 778 pz. Zielonym kolorem wyróżniono miejsca, do których hybrydyzowały startery (Ryc. 24).

Produkt PCR ze starterami Tt1iF oraz Tt2iR

GTCTACCCTGAGCGAAATGGCTAGAGGTAGGGATGAGATGATTTCTGTGGATTTAATGTATAAGACTTAT
TTTTGACAACTCCCTATTTAGTTTAGATGTTTTTGTGCTTTCTTCTTACCAGTAAAACTAATTTAACCGT
AAAAGAGTTTATTGGAGCATGGCAAATAAAACAACAACATTTATTTGATCTTTTGATTAATCCAAAATCT
TGATTTCATTAGCTATTTTATCAGGAGCTTTGAAGCAACCGTGTGGCAAATGTGGCAAACAAACCTCTTT
CTTTTCTCCTCCTAGCATTAGTGCTGTTGTCGGTGGTGCTGGTTAGTTTGTTGGTGAACCAGGGGAGAGC
CTCAGAGAACCAGCGGCTCTTCAACAATGCAGTCATCCGTGTTCAACACCTGCACCAGCTGGCTGCAAAA
ATGATTAACGACTTTGTAAGATTTCCATTCAAATCTATTCAGAACTAGTAGATTCTAACCAGAACAAAAA
CAATTGGTCACACCTATTCAAGTGAAATATGAGCTTAAAGGGATAGTTCACCCAAAAATGAAAATTCTGT
TATCATTTGCTCACCCTCGAGTTGTTCCAAACCTGTATGAACTTCTTTCTTCTGCTGAACACAAAAGAAG
ATATTTTAAAGAATATGGGTAACCAAACAGTTGATTGACTTCCATAGTATGGGGGAAAAAAACTTTGGAA
CAACTTGAGGGTGAGTAAATGAAGACAGAATTTTCATTTTTGAGTGAACTATCCCTTTTTGTAAGTTTCT
TTGCATTTCTATCAGATGCATTTGTTGATTTAGCTATTTGAGTGACTAAAATGTATTATAGTAAATACGA
TTTTCCTTTTGTTATCAAGGAGGACAACCTGTTGCCTGAGGAACGCAGACAGCTGAGT

Produkt PCR ze starterami Tt2iF oraz Tt3iR

CAATGCAGTCATCCGTGTTCAACACCTGCACCAGCTGGCTGCAAAAATGATTAACGACTTTGTAAGATTT
CCATTCAAATCTATTCAGAACTAGTAGATTCTAACCAGAACAAAAACAATTGGTCACACCTATTCAAGTG
AAATATGAGCTTAAAGGGATAGTTCACCCAAAAATGAAAATTCTGTTATCATTTGCTCACCCTCGAGTTG
TTCCAAACCTGTATGAACTTCTTTCTTCTGCTGAACACAAAAGAAGATATTTTAAAGAATATGGGTAACC
AAACAGTTGATTGACTTCCATAGTATGGGGGAAAAAAACTTTGGAACAACTTGAGGGTGAGTAAATGAAG
ACAGAATTTTCATTTTTGAGTGAACTATCCCTTTTTGTAAGTTTCTTTGCATTTCTATCAGATGCATTTG
TTGATTTAGCTATTTGAGTGACTAAAATGTATTATAGTAAATACGATTTTCCTTTTGTTATCAAGGAGGA
CAACCTGTTGCCTGAGGAACGCAGACAGCTGAGTAAAATCTTTCCTCTGTCTTTCTGCAACTCTGACTCC
ATTGAGGCGCCCACTGGGAAAGATGAAACACAGAAGAGCTCAGTAAGTAGACAGTATGGTTAAAAATGAT
GTTTTATTCAACAAAATATAGAACTATGAAACAAATAGTAGTGTCAAACAATGAACAAAAATACAACATA
CTGTACAATACAAAAAAAAAATATATCTTGTTTTCACACAATTAGATGACAATTTTACTCTTTAAATTGC
TCAGAAATCAGAAAATGCTAAGTATTGTCTTGCACAGTTTGGAAAACACTTACACCAAATATGGGCAGCA
TAAACATCAAAAATGGCTAGTGGTCTGAAGCCTCCAGTATCCTTTTTTCTTTCTTCAGATGTTGAAGCTC
CTTCGCATCTCTTTCCGCCTCATCGAGTCCTGGGAGTTCCCCAGCCAGACCCTGAGCGGAACCGTCTCAA
ACAGCCTGACCGT

Produkt PCR ze starterami Tt3iF oraz Tt4iR

GGAACGCAGACAGCTGAGTAAAATCTTTCCTCTGTCTTTCTGCAACTCTGACTCCATTGAGGCGCCCACT
GGGAAAGATGAAACACAGAAGAGCTCAGTAAGTAGACAGTATGGTTAAAAATGATGTTTTATTCAACAAA
ATATAGAACTATGAAACAAATAGTAGTGTCAAACAATGAACAAAAATACAACATACTGTACAATACAAAA
AAAAAATATATCTTGTTTTCACACAATTAGATGACAATTTTACTCTTTAAATTGCTCAGAAATCAGAAAA
TGCTAAGTATTGTCTTGCACAGTTTGGAAAACACTTACACCAAATATGGGCAGCATAAACATCAAAAATG
GCTAGTGGTCTGAAGCCTCCAGTATCCTTTTTTCTTTCTTCAGATGTTGAAGCTCCTTCGCATCTCTTTC
CGCCTCATCGAGTCCTGGGAGTTCCCCAGCCAGACCCTGAGCGGAACCGTCTCAAACAGCCTGACCGTCG
GAAATCCCAACCAGATCACAGAGAAGCTGGCCGACTTGAAAGTGGGCATCAGCGTGCTCATCAAGGTGAG
AGAGACCAGATTTATTCTAGGCTACTTCATTTTCTCACACAGTGTGTCAAGTGGTTTTACCAGGAGGTGT
GATGGCATCTTCTGGTCTTCTTCGGATAGCTATGTCATAATTTGCCATTTGTATCTGCACAGGGATGTCT
GGATGGTCAACCAAACATGGATGATAACGACTCCCTGCCGCTGCCTTTTGAGGATTTCTACTTGACCATG
GGGGAGAG

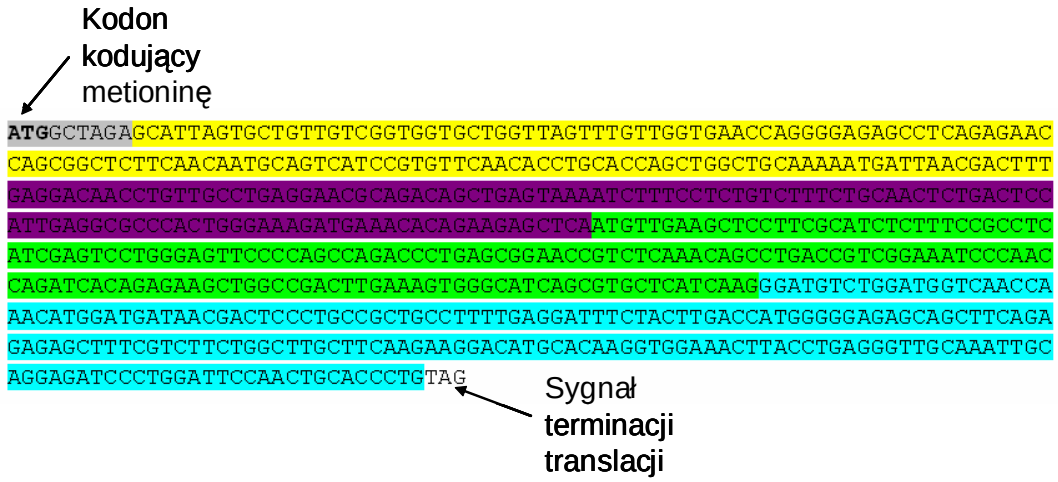
Ryc. 24. Zestawienie sekwencji genu hormonu wzrostu lina uzyskanych za pomocą nowych kombinacji starterów

Po przeanalizowaniu wszystkich otrzymanych sekwencji nie stwierdzono żadnych różnic w składzie nukleotydowym sekwencji genu *gh* badanych 29 osobników. Oznacza to, że ta sekwencja jest silnie zakonserwowany ewolucyjnie i ewentualne systemy naprawcze kontrolują zmiany w tak ważnym elemencie osi somatotropowej. Uzyskane sekwencje z udziałem starterów Tt1iF oraz Tt2iR, Tt2iF oraz Tt3iR, Tt3iF oraz Tt4iR i TtVeF i TtVeR pozwoliły na stworzenie kontigu, który reprezentował pierwszą kompletną strukturę genu hormonu wzrostu lina opublikowaną w bazie NCBI pod numerem dostępu HM114351.1 (Ryc. 25).

GTCTACCCTGAGCGAAATGGCTAGAGGTAGGGATGAGATGATTTCTGTGGATTTAATGTATAAGACTTAT
TTTTGACAACTCCCTATTTAGTTTAGATGTTTTTGTGCTTTCTTCTTACCAGTAAAACTAATTTAACCGT
AAAAGAGTTTATTGGAGCATGGCAAATAAAACAACAACATTTATTTGATCTTTTGATTAATCCAAAATCT
TGATTTCATTAGCTATTTTATCAGGAGCTTTGAAGCAACCGTGTGGCAAATGTGGCAAACAAACCTCTTT
CTTTTCTCCTCCTAGCATTAGTGCTGTTGTCGGTGGTGCTGGTTAGTTTGTTGGTGAACCAGGGGAGAGC
CTCAGAGAACCAGCGGCTCTTCAACAATGCAGTCATCCGTGTTCAACACCTGCACCAGCTGGCTGCAAAA
ATGATTAACGACTTTGTAAGATTTCCATTCAAATCTATTCAGAACTAGTAGATTCTAACCAGAACAAAAA
CAATTGGTCACACCTATTCAAGTGAAATATGAGCTTAAAGGGATAGTTCACCCAAAAATGAAAATTCTGT
TATCATTTGCTCACCCTCGAGTTGTTCCAAACCTGTATGAACTTCTTTCTTCTGCTGAACACAAAAGAAG
ATATTTTAAAGAATATGGGTAACCAAACAGTTGATTGACTTCCATAGTATGGGGGAAAAAAACTTTGGAA
CAACTTGAGGGTGAGTAAATGAAGACAGAATTTTCATTTTTGAGTGAACTATCCCTTTTTGTAAGTTTCT
TTGCATTTCTATCAGATGCATTTGTTGATTTAGCTATTTGAGTGACTAAAATGTATTATAGTAAATACGA
TTTTCCTTTTGTTATCAAGGAGGACAACCTGTTGCCTGAGGAACGCAGACAGCTGAGTAAAATCTTTCCT
CTGTCTTTCTGCAACTCTGACTCCATTGAGGCGCCCACTGGGAAAGATGAAACACAGAAGAGCTCAGTAA
GTAGACAGTATGGTTAAAAATGATGTTTTATTCAACAAAATATAGAACTATGAAACAAATAGTAGTGTCA
AACAATGAACAAAAATACAACATACTGTACAATACAAAAAAAAAATATATCTTGTTTTCACACAATTAGA
TGACAATTTTACTCTTTAAATTGCTCAGAAATCAGAAAATGCTAAGTATTGTCTTGCACAGTTTGGAAAA
CACTTACACCAAATATGGGCAGCATAAACATCAAAAATGGCTAGTGGTCTGAAGCCTCCAGTATCCTTTT
TTCTTTCTTCAGATGTTGAAGCTCCTTCGCATCTCTTTCCGCCTCATCGAGTCCTGGGAGTTCCCCAGCC
AGACCCTGAGCGGAACCGTCTCAAACAGCCTGACCGTCGGAAATCCCAACCAGATCACAGAGAAGCTGGC
CGACTTGAAAGTGGGCATCAGCGTGCTCATCAAGGTGAGAGAGACCAGATTTATTCTAGGCTACTTCATT
TTCTCACACAGTGTGTCAAGTGGTTTTACCAGGAGGTGTGATGGCATCTTCTGGTCTTCTTCGGATAGCT
ATGTCATAATTTGCCATTTGTATCTGCACAGGGATGTCTGGATGGTCAACCAAACATGGATGATAACGAC
TCCCTGCCGCTGCCTTTTGAGGATTTCTACTTGACCATGGGGGGAGAGCAGCTTCAGAGAGAGCTTTCGTC
TTCTGGCTTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTGGAAACTTACCTGAGGGTTGCAAATTGCAGGAGATC
CCTGGATTCCAACTGCACCCTGTAGA

Ryc. 25. Kompletna sekwencja genu hormonu wzrostu lina zdeponowana w bazie NCBI pod numerem dostępu HM114351.1.

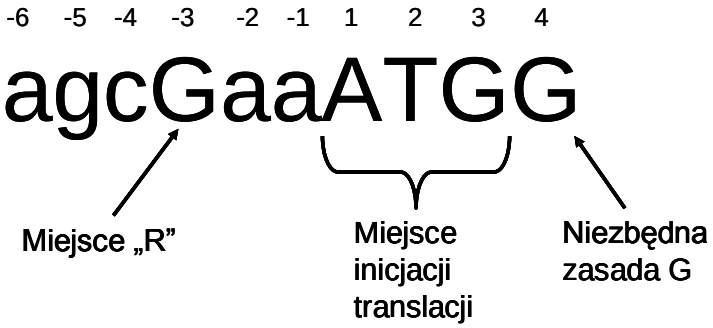
Sekwencja nukleotydowa genu *gh* lina, poczynając od początku pierwszego egzonu, a kończąc na ostatniej zasadzie piątego egzonu, liczy 1 776 par zasad i jest podana zgodnie z kierunkiem od 5’ do 3’. W skład tej sekwencji wchodzą cztery introny, które oddzielają od siebie pięć regionów egzonowch. Ich długość wynosi kolejno 269 pz, 424 pz, 296 pz oraz ostatni 137 pz. Dla przejrzystego zobrazowania egzonów zostały one zgrupowane oraz wyróżnione kolorami. Obszar oznaczony na siwo obejmuje egzon pierwszy składający się 9 par zasad. Egzon ten rozpoczyna się trzema nukleotydami (kodonem) kodującymi aminokwas metioninę, która w genomowym kodzie genetycznym eukariotów odpowiedzialna jest za inicjację syntezy białka (Crick 1988). Kolorem żółtym wyróżniono egzon drugi, fioletowym trzeci, zielonym czwarty a niebieskim piąty, których długość par zasad wynosiła kolejno 141 pz, 117 pz, 162 pz oraz 201 pz (Ryc. 26).



Ryc. 26. Otwarta ramka odczytu genu hormonu wzrostu lina.

Sekwencje egzonowe genów rozpoczynające się od kodonu ATG (w mRNA AUG) a kończące się bezpośrednio przed kodonami warunkującymi terminację translacji TAA, TGA, TAG (odpowiednio dla mRNA UAA, UGA, UAG), określane są jako otwarta ramka odczytu (ang. ORF – open reading frame). ORF dla genu hormonu wzrostu lina składa się z 630 par zasad, determinujących sekwencję aminokwasów białka kodowanego przez ten gen. W obrębie miejsca gdzie zaczyna się ORF znajduje się sekwencja Kozak mająca kluczowe znaczenie dla inicjacji translacji **(**Kozak 1987). Występuje ona jedynie u organizmów eukariotycznych w mniej lub bardziej zmienionej postaci jako gccRccATGG. Nukleotydy ATG tworzą rdzeń i jednocześnie kodują początkowy aminokwas ramki, R oznacza dowolną zasadę azotową z grupy puryn (guaninę bądź adeninę) a G na końcu tego układu jest niezbędnym elementem warunkującym inicjację translacji na właściwym poziomie. W pozycjach, w których

występują zasady oznaczone małymi literami dopuszczalna jest obecność innych zasad, gdyż nie są one tak zakonserwowane ewolucyjnie, jak pozostałe składowe. Jednakże wtedy potencjał tego miejsca jest obniżony. W sekwencji Kozak miejscom zasad przypisane są stałe numery poczynając od adeniny (w kodonie ATG), która zajmuje miejsce oznaczone jako +1. Zasady poniżej miejsca +1 oznaczane są malejąco poczynając od -1. Brak jest zasady oznaczanej jako zero (Ryc. 27).



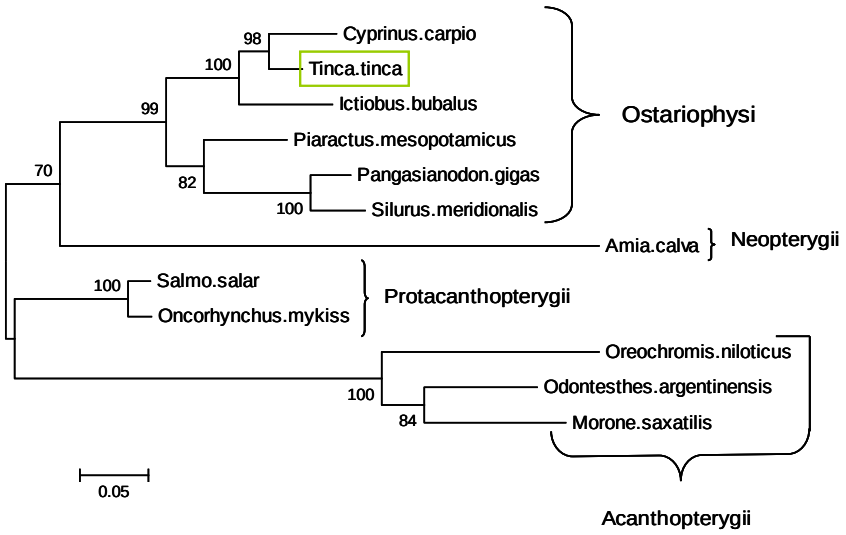
Ryc. 27. Zakonserwowana ewolucyjnie sekwencja Kozak genu hormonu wzrostu lina.

Na podstawie wzajemnego zestawienia sekwencji mRNA hormonu wzrostu lina oraz wybranych gatunków ryb otrzymano dla porównywanych par macierz podobieństwa. Osobniki (sekwencje mRNA *gh*), między którymi dystans genetyczny był najmniejszy, uznane zostały za filogenetycznie najbliższe. Przykładem tego może być porównanie karpia oraz lina, gdzie wynik 0,0732 świadczy o ich wysokim podobieństwie. Natomiast, przykład odwrotny obrazuje porównanie tilapii nilowej oraz *Silurus meridionalis*, gdzie wynik 0,7087 wskazuje na ich największe zróżnicowanie genetyczne w grupie badanych gatunków (Tab. 14).

Tabela 14. Odległości genetyczne między gatunkami z różnych grup taksonomicznych.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Ictiobus.bubalus												
2. Cyprinus.carpio	0.1395											
3. Odontesthes.argentinensis	0.6337	0.6601										
4. Pangasianodon.gigas	0.2834	0.2500	0.6226									
5. Silurus.meridionalis	0.2900	0.2615	0.6484	0.0686								
6. Tinca.tinca	0.1130	0.0732	0.6293	0.2326	0.2438							
7. Piaractus.mesopotamicus	0.1972	0.2033	0.5799	0.1546	0.1904	0.1864						
8. Salmo.salar	0.3306	0.3446	0.4707	0.3253	0.3504	0.3141	0.3102					
9. Tilapia.nilotica	0.6347	0.6613	0.2870	0.7076	0.7087	0.6699	0.6463	0.5357				
10. Oncorhynchus.mykiss	0.3372	0.3438	0.4845	0.3217	0.3430	0.3134	0.3238	0.0333	0.5176			
11. Amia.calva	0.5858	0.6012	0.7466	0.5899	0.5727	0.5578	0.5904	0.5880	0.8151	0.5920		
12. Morone.saxatilis	0.6470	0.6699	0.1847	0.6427	0.6458	0.6898	0.6172	0.4966	0.2754	0.4931	0.7921	

Analizując zestawione w macierzy podobieństwa wyniki, można stwierdzić, że lin poprzez skład nukleotydowy mRNA *gh* jest najbliżej spokrewniony z karpiem oraz bufallo czarnym. Dodatkowo skonstruowany w programie MEGA 4.0 dendrogram przejrzyście obrazuje, że badany gatunek lina został zaklasyfikowany do nadrzędu ryb otwartopęcherzowych (Ostariophysi), stanowiących część gromady promieniopłetwych (Actinopterygii) (Ryc. 28).



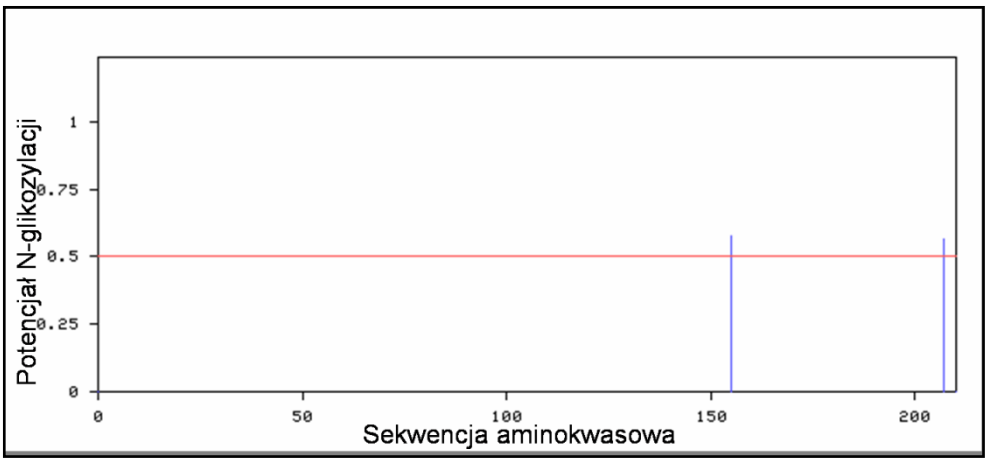
Ryc. 28. Dendrogram obrazujący klasyfikację lina do Ostariophysi na podstawie sekwencji mRNA *gh*. Skala oznacza stosunek 0,05 substytucji przypadających na dane miejsce w sekwencji.

Ponadto za pomocą programu BLASTn dowiedziono, że w rodzinie karpiowatych lin poprzez sekwencję mRNA *gh* jest najbardziej podobny do tołpygi pstrej, tołpygi białej oraz leszcza chińskiego (*Megalobrama amblycephala*). W wyniku przepisania mRNA *gh* lina na język aminokwasów, otrzymano w programie BioEdit (7.0.9.0.) fragment białkowy, składający się z 210 aminokwasów zakończony kodonem STOP (Ryc. 29).

```
1     ATG GCT AGA GCA TTA GTG CTG TTG TCG GTG GTG CTG GTT AGT TTG   45
1     Met Ala Arg Ala Leu Val Leu Leu Ser Val Val Leu Val Ser Leu   15
46    TTG GTG AAC CAG GGG AGA GCC TCA GAG AAC CAG CGG CTC TTC AAC   90
16    Leu Val Asn Gln Gly Arg Ala Ser Glu Asn Gln Arg Leu Phe Asn   30
91    AAT GCA GTC ATC CGT GTT CAA CAC CTG CAC CAG CTG GCT GCA AAA   135
31    Asn Ala Val Ile Arg Val Gln His Leu His Gln Leu Ala Ala Lys   45
136   ATG ATT AAC GAC TTT GAG GAC AAC CTG TTG CCT GAG GAA CGC AGA   180
46    Met Ile Asn Asp Phe Glu Asp Asn Leu Leu Pro Glu Glu Arg Arg   60
181   CAG CTG AGT AAA ATC TTT CCT CTG TCT TTC TGC AAC TCT GAC TCC   225
61    Gln Leu Ser Lys Ile Phe Pro Leu Ser Phe Cys Asn Ser Asp Ser   75
226   ATT GAG GCG CCC ACT GGG AAA GAT GAA ACA CAG AAG AGC TCA ATG   270
76    Ile Glu Ala Pro Thr Gly Lys Asp Glu Thr Gln Lys Ser Ser Met   90
271   TTG AAG CTC CTT CGC ATC TCT TTC CGC CTC ATC GAG TCC TGG GAG   315
91    Leu Lys Leu Leu Arg Ile Ser Phe Arg Leu Ile Glu Ser Trp Glu   105
316   TTC CCC AGC CAG ACC CTG AGC GGA ACC GTC TCA AAC AGC CTG ACC   360
106   Phe Pro Ser Gln Thr Leu Ser Gly Thr Val Ser Asn Ser Leu Thr   120
361   GTC GGA AAT CCC AAC CAG ATC ACA GAG AAG CTG GCC GAC TTG AAA   405
121   Val Gly Asn Pro Asn Gln Ile Thr Glu Lys Leu Ala Asp Leu Lys   135
406   GTG GGC ATC AGC GTG CTC ATC AAG GGA TGT CTG GAT GGT CAA CCA   450
136   Val Gly Ile Ser Val Leu Ile Lys Gly Cys Leu Asp Gly Gln Pro   150
451   AAC ATG GAT GAT AAC GAC TCC CTG CCG CTG CCT TTT GAG GAT TTC   495
151   Asn Met Asp Asp Asn Asp Ser Leu Pro Leu Pro Phe Glu Asp Phe   165
496   TAC TTG ACC ATG GGG GAG AGC AGC TTC AGA GAG AGC TTT CGT CTT   540
166   Tyr Leu Thr Met Gly Glu Ser Ser Phe Arg Glu Ser Phe Arg Leu   180
541   CTG GCT TGC TTC AAG AAG GAC ATG CAC AAG GTG GAA ACT TAC CTG   585
181   Leu Ala Cys Phe Lys Lys Asp Met His Lys Val Glu Thr Tyr Leu   195
586   AGG GTT GCA AAT TGC AGG AGA TCC CTG GAT TCC AAC TGC ACC CTG   630
196   Arg Val Ala Asn Cys Arg Arg Ser Leu Asp Ser Asn Cys Thr Leu   210
631   TAG   633
211   STOP
```

Ryc. 29. Otwarta ramka odczynu kodująca łańcuch peptydowy hormonu wzrostu lina.

W wyniku analizy przeprowadzonej w programie NetNglyc stwierdzono, że w badanej sekwencji aminokwasowej hormonu wzrostu lina występują dwa potencjalne miejsca N-glikozylacji. Ten rodzaj glikozylacji polega na przyłączeniu kompleksu oligosacharyd-dolichol (lipidowy nośnik) przez transferazę oligosacharydową do aminokwasu asparaginy w świetle struktury siateczki endoplazmatycznej. Program przewidujący potencjalne regiony dla tego procesu, wyszukuje charakterystyczne miejsca złożone kolejno z asparaginy, dowolnego aminokwasu (oprócz proliny) w drugiej pozycji a w trzeciej jedynie zamiennie seryny bądź treoniny (Knauer i Lehle 1999). Charakterystyczne miejsca w analizowanej sekwencji umieszczone są bliżej C końca, a reszty asparaginowe w tych motywach znajdują pozycje Asp 155 i Asp 207 (Ryc. 30).



Ryc. 30. Przewidywane miejsca N-glikozylacji w sekwencji aminokwasowej hormonu wzrostu lina.

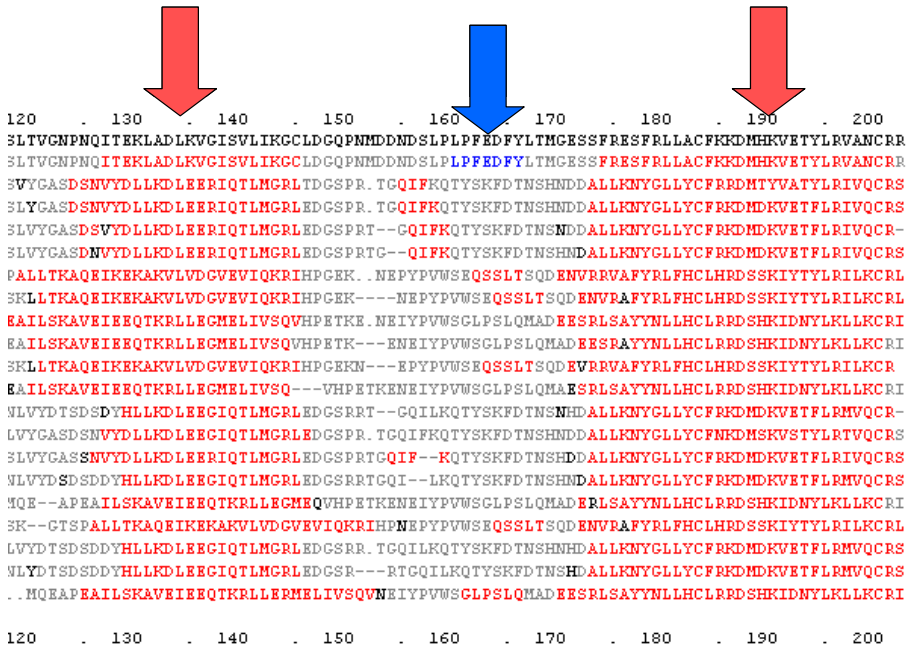
Potencjał N-glikozylacji został wyliczony jako średni wynik uzyskany z dziewięciu sieci neuronowych, na których program bazuje. Próg dla potencjałów glikozylacji według zaleceń autorów programów został przyjęty na poziomie 0,5 (Julenius i in. 2005).

Celem stworzenia modelu białka GH lina wykorzystano metaserwer BioInfoBank, który to przedstawił zbiór 20 uszeregowanych szablonów, poczynając od tych, dla których wynik „J score" był najwyższy względem porównywanej sekwencji aminokwasowej (Jomain i in. 2007). Opierając się na tym parametrze, najwyższy wynik otrzymał szablon 1HWG_A dla kompleksu ludzkiego hormonu wzrostu z białkiem wiążącym, zdeponowany w bazie białkowej PDB (Protein Data Bank) przez zespół pod kierownictwem Sundstorma (1996). Zestawienie to uzyskało wynik 109,33 podczas, gdy najniższa wartość (84,67) porównania w tej dwudziestce szablonów należała do prolaktyny o numerze PDB 2q98_A (Ryc. 31).

Model	Jscore	Rscore	Fssp	Scop	PDB Hit
ESY1_01	109.33	0	1.15.1	a.26.1	1HWG_A Complex (Hormone/receptor) : 1:2 Complex Of Human Growth Hormone With Its S
FFA3_02	109.00	-82.1	1.15.1	a.26.1	1axi_A Complex (Hormone/receptor) : Structural Plasticity At The Hgh:hghbp Interfa
FFA3_04	109.00	-81.5	1.15.1	a.26.1	1a22_A Complex (Hormone/receptor) : Human Growth Hormone Bound To Single Receptor
PSIB_02	108.00	5e-50	1.15.1	a.26.1	1a22A Complex (Hormone/receptor) ; Human Growth Hormone Bound To Single Receptor
RPSB_02	105.33	7e-40	1.15.1	a.26.1	1a22A Complex (Hormone/receptor) ; Human Growth Hormone Bound To Single Receptor
FFA3_06	103.33	-80.7	1.15.1	a.26.1	1f6f_A Hormone/growth Factor/hormone Receptor : Crystal Structure Of The Ternary C
BASI_03	102.67	201.78	1.15.1	a.26.1	1f6fA Hormone/growth Factor/hormone Receptor ; Crystal Structure Of The Ternary C
FFA3_08	101.00	-80.2		a.26.1	1rw5_A Hormone/growth Factor : Solution Structure Of Human Prolactin
BASI_01	100.33	214.5		a.26.1	3ew3A Hormone/hormone Receptor ; The 1:2 Complex Between A Nterminal Elongated Pr
RPSB_04	99.33	2e-33	1.15.1	a.26.1	1f6fA Hormone/growth Factor/hormone Receptor ; Crystal Structure Of The Ternary C
RPSB_03	97.67	4e-37		a.26.1	3ew3A Hormone/hormone Receptor ; The 1:2 Complex Between A Nterminal Elongated Pr
PSIB_04	96.33	7e-45		a.26.1	1z7cA Hormone/growth Factor ; Crystal Structure Of Human Placental Lactogen
FFA3_03	96.33	-82		a.26.1	1huw_A Hormone
BASI_02	94.67	206.15	1.15.1	a.26.1	1a22A Complex (Hormone/receptor) ; Human Growth Hormone Bound To Single Receptor
RPSB_01	94.67	8e-42		a.26.1	1z7cA Hormone/growth Factor ; Crystal Structure Of Human Placental Lactogen
PSIB_01	93.67	5e-62		a.26.1	3ew3A Hormone/hormone Receptor ; The 1:2 Complex Between A Nterminal Elongated Pr
PSIB_03	91.67	3e-48	1.15.1	a.26.1	1f6fA Hormone/growth Factor/hormone Receptor ; Crystal Structure Of The Ternary C
FFA3_05	86.33	-81.4		a.26.1	1z7c_A Hormone/growth Factor : Crystal Structure Of Human Placental Lactogen
BASI_04	85.67	189.7		a.26.1	1z7cA Hormone/growth Factor ; Crystal Structure Of Human Placental Lactogen
FFA3_07	84.67	-80.6		a.26.1	2q98_A

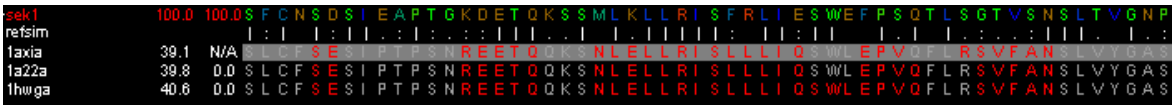
Ryc. 31. Zestawienie wyselekcjonowanych szablonów z systemu 3D-Jury na postawie parametru „J score” (w okręgu).

Wybór szablonów nie musi być dokonany wyłącznie na podstawie parametru „J score”. W modelowaniu homologicznym ważne jest także, aby dobrać taki szablon, który będzie określał elementami strukturalnymi białka niezdefiniowane (przez inne szablony) regiony badanej sekwencji. Dlatego też oprócz wartości „J score” zweryfikowano graficzną formę uliniowania, na której wyróżnione kolorami zostały elementy strukturalne białek w postaci alfa-helis (czerwony), beta-kartek (niebieski) oraz łączących je pętli bądź ewentualnych wstawek (szary) (Ryc. 32).



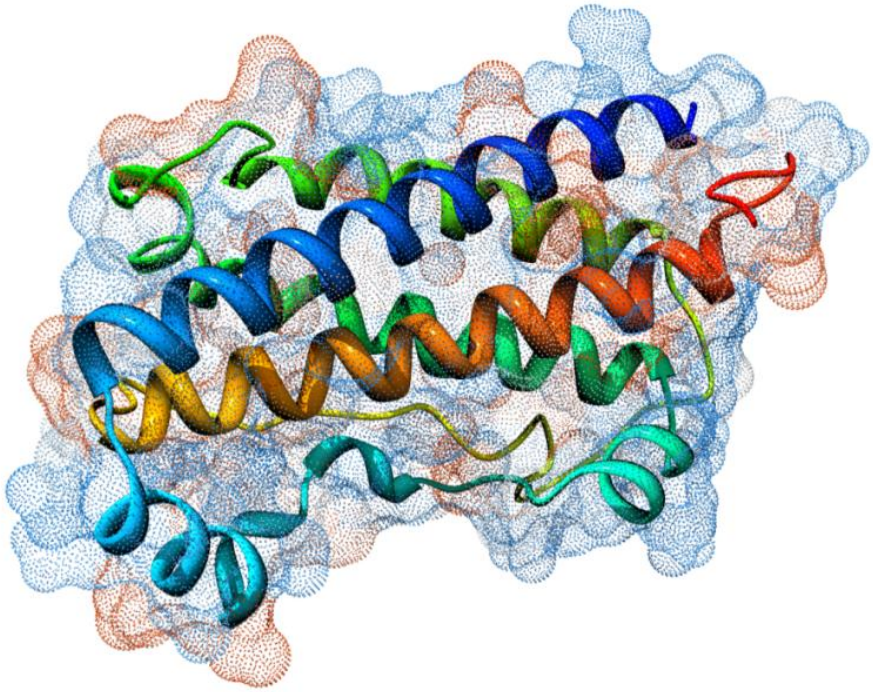
Ryc. 32. Graficzne zobrazowanie porównywanych szablonów względem badanej sekwencji aminokwasowej (pierwsza od góry). Strzałkami zaznaczono struktury białkowe szablonów: beta-kartki (niebieski) oraz alfa-helisy (czerwony).

Nawet przy szablonach o wysokim podobieństwie brak jest czasami pokrycia pewnego regionu badanego białka, dlatego niekiedy wykorzystuje się szablony o niskim podobieństwie, ale dostarczające niezbędnych danych do skompletowania projektu. W przypadku opracowywanego w niniejszej pracy modelu nie było konieczności by modyfikować domyślne ustawienia w metaserwerze BioInfoBank. Po analizie rezultatów „J score" oraz graficznego uliniowania szablonów wynikowych wybrano trzy szablony, 1HWG_A, 1axi_a oraz 1a22_a (Atwell i in. 1997, Clackson i in. 1998). Charakteryzowały się one największym podobieństwem do sekwencji aminokwasowej hormonu wzrostu lina a dodatkowo 1HWG_A dostarczył informacji dla regionu niezdefiniowanego przez żaden z 20 wynikowych szablonów. Szablony zaimportowane do programu Swiss-PdbViewer pozwoliły na wprowadzenie przerw do sekwencji badanego białka (Ryc. 33).



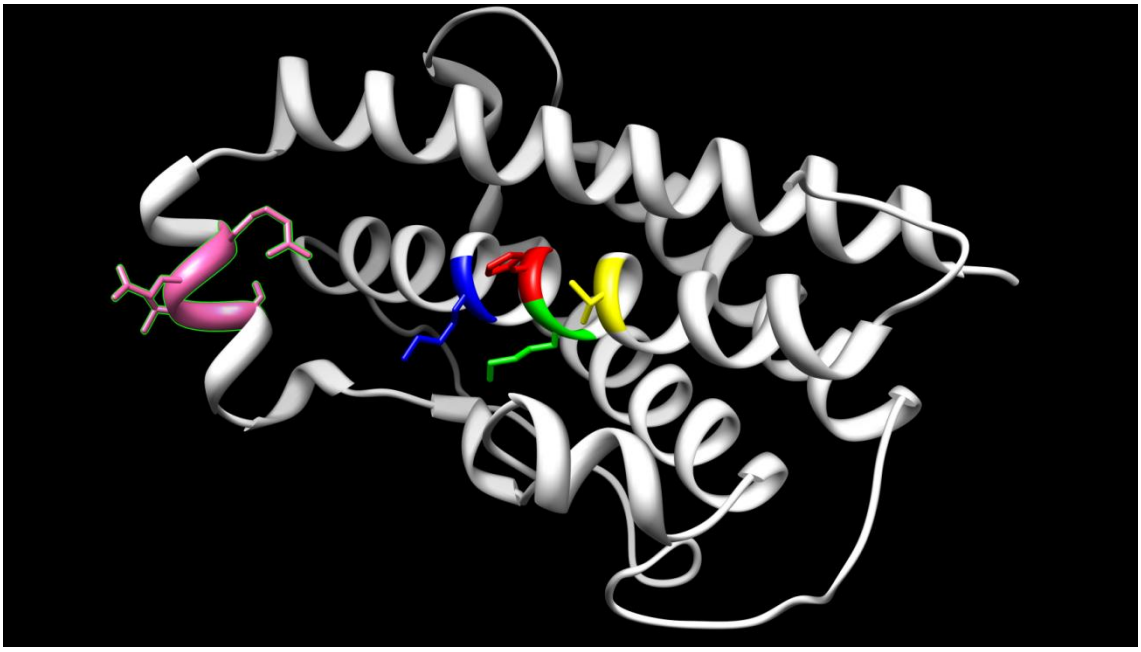
Ryc. 33. Zestawienie badanej sekwencji aminokwasowej GH lina z wybranymi szablonami.

Po przeprowadzeniu procedury modelowania homologicznego w oparciu o program MODELLER 9v8 otrzymane 3 modele wynikowe oceniono w programie Verify 3D. Z pośród nich jeden wykazał 70 % poprawność i został zobrazowany w programie UCSF Chimera (Ryc. 34).



Ryc. 34. Model strukturalny białka genu hormonu wzrostu lina.

Na podstawie wykonanego uliniowania oraz porównania z ludzkim hormonem wzrostu stwierdzono, że reszty aminokwasowe Lys 186 (niebieski), His 189 (czerwony), Lys 190 (zielony) oraz Thr 193 (żółty) w obrębie 4 helisy mogą być zaangażowane w proces wiązania GH z GHR na komórkach wątroby (Atwell i in. 1997). Ponadto region peptydu GH od 60 do 63 (różowy) aminokwasu może pełnić rolę w stabilizacji tego wiązania (Ryc. 35).

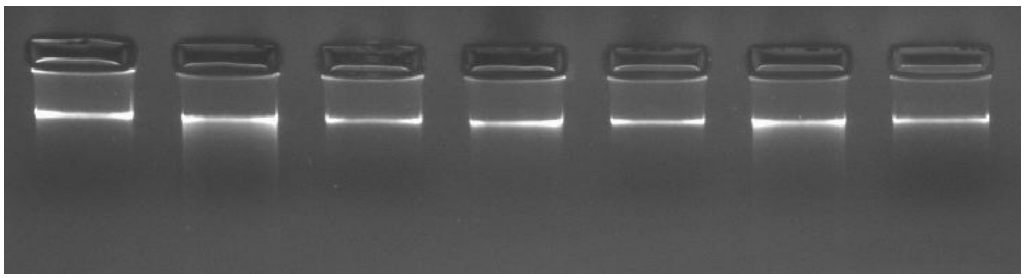


Ryc. 35. Proponowane reszty aminokwasowe zaangażowane w wiązanie z receptorem. Opis kolorów w tekście powyżej.

5.2 Kontrola jednorodności genetycznej osobników doświadczalnych metodą PCR-RFLP. Pomiar aktywności genu hormonu wzrostu linów metodą qPCR. Ocena zależności między hormonem wzrostu a insulinopodobnym czynnikiem wzrostu typu I w osi somatotropowej lina za pomocą testu ELISA.

5.2.1 Ocena otrzymanych izolatów DNA

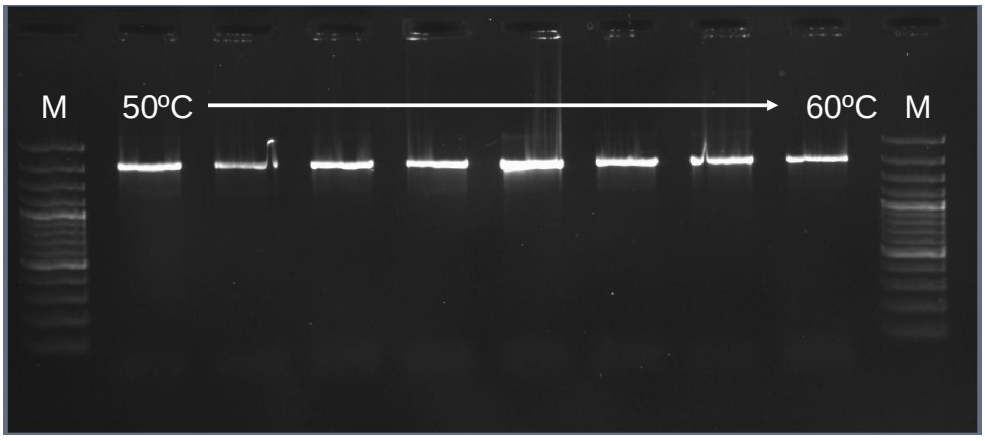
Izolaty rozdzielone na 1 % żelu agarozowym widoczne były w postaci pojedynczego, zwartego prążka. Nie stwierdzono żadnego smużenia przy żadnej z analizowanych prób, które mogłoby wskazywać na degradację wyizolowanego materiału genetycznego (Ryc. 36).



Ryc. 36. Elektroforegram izolatów pozyskanych z płetwy ogonowej doświadczalnych osobników lina.

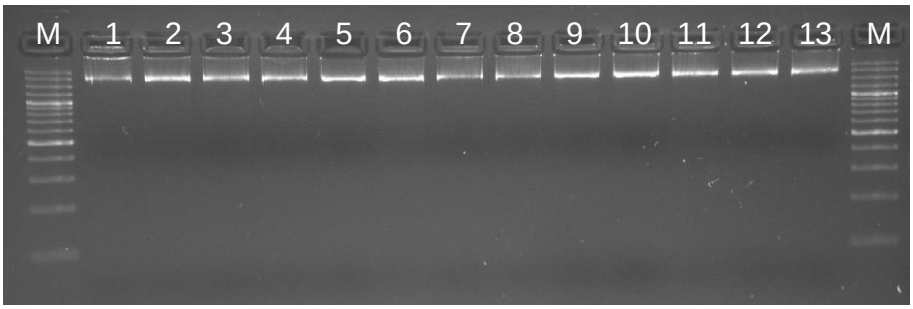
5.2.2 Amplifikacja genu *nd*-1 doświadczalnych osobników lina

Po przeprowadzeniu reakcji PCR w gradiencie temperatury oraz rozdziale elektroforetycznym prób na żelu agarozowym nie stwierdzono żadnych różnic, jakie miałyby wynikać z gradientowego rozkładu temperatury dla przyłączania starterów do matrycy. Prążki na żelu agarozowym, odzwierciedlające produkty reakcji polimerazy w gradiencie temperatury, jawiły się jako pojedyncze i odpowiadały wysokością (około 2 kpz) prążkom uzyskanym w pracy Nielsena i in. (1998)(Ryc. 37).



Ryc. 37. Elektroforegram prób po gradientowej reakcji PCR ze starterami *nd*-1F i *nd*-1R. M – marker wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB). Żel agarozowy 1 %.

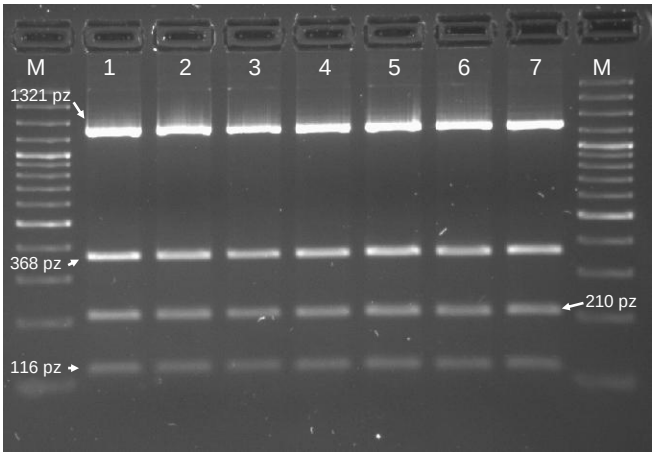
Przy braku różnic w wydajności oraz jednoznacznych wynikach, temperaturę hybrydyzacji starterów w dalszych reakcjach polimerazy przyjęto na poziomie 55 ºC. Zweryfikowano profil czasowo – temperaturowy i przeprowadzono dla wszystkich izolatów reakcję polimerazy, celem uzyskania produktu do trawienia enzymami restrykcyjnymi (Ryc. 38).



Ryc. 38. Wynik rozdziału elektroforetycznego dla przykładowych prób po reakcji PCR z wykorzystaniem starterów *nd*-1F i *nd*-1R. Ścieżki od 1 do 13 przykładowe próby. M – marker wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB). Żel agarozowy 1 %.

5.2.3 Analiza długości fragmentów restrykcyjnych w obrębie genu *nd*-1

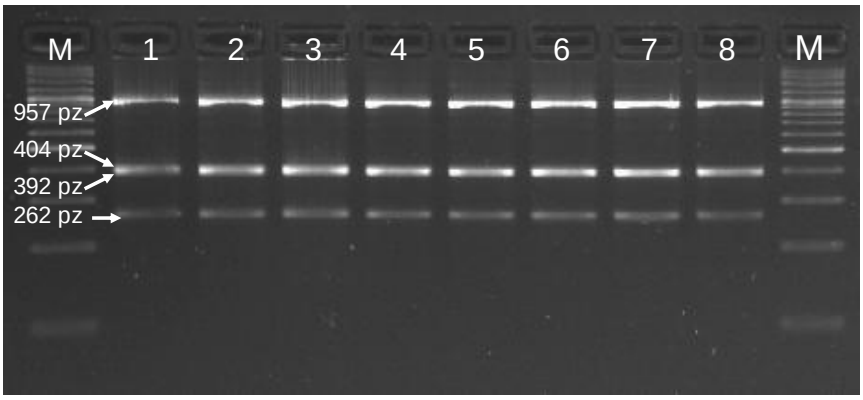
Po przeprowadzeniu etapu trawienia z enzymami restrykcyjnymi HhaI, RsaI oraz HinfI otrzymano dla wszystkich badanych prób jednakowe wzory restrykcyjne. REaza HhaI, zgodnie z tym, co przedstawił program NEBcutter (V2.0), przecięła amplikon trzykrotnie (Ryc. 39).



Ryc. 39. Obraz elektroforetyczny 2015 pz amplikonu strawionego endonukleazą restrykcyjną HhaI. Ścieżki od 1 do 7 to strawione przykładowe próby. M – marker wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB). Żel agarozowy 2,5 %.

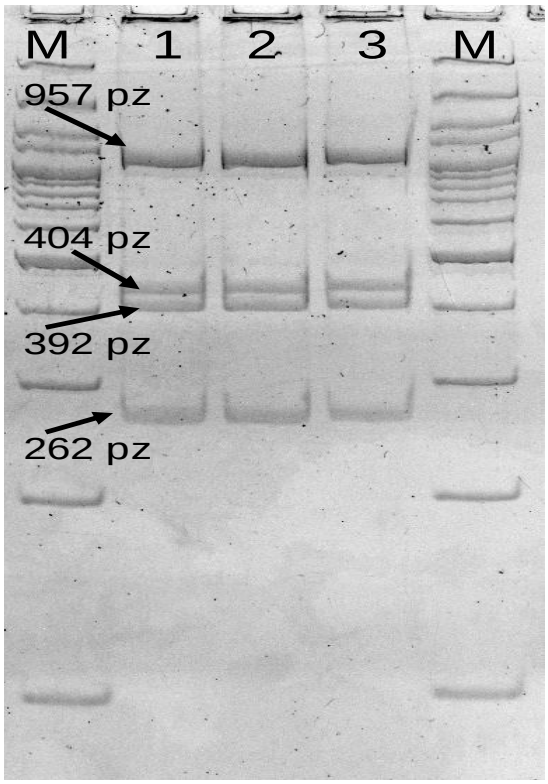
Druga z endonukleaz restrykcyjnych, RsaI według programu NEBcutter (V2.0) trawiła amplikon w trzech miejscach dając 4 fragmenty. Jednakże fragmenty o długościach 404 oraz 392 pz nie dały się rozdzielić na 2,5 % żelu agarozowym.

Prawdopodobnie byłoby to możliwe na żelu sporządzonym na bazie wysokorozdzielczej agarozy o bardzo wysokiej jakości (Ryc. 40).



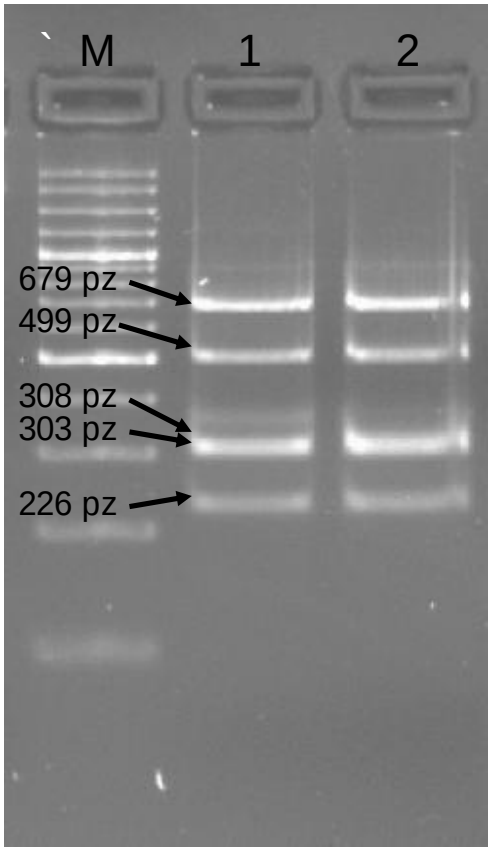
Ryc. 40. Obraz elektroforetyczny 2015 pz amplikonu strawionego enzymem restrykcyjnym RsaI. Ścieżki od 1 do 8 to strawione przykładowe próby. M – marker wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB). Żel agarozowy 2,5 %.

W celu uniknięcia kosztownego zakupu agarozy o wysokiej jakości, przeprowadzono rozdział strawionych endonukleazą restrykcyjną RsaI amplikonów na 8 % żelu poliakrylamidowym. Dzięki zwiększonym predyspozycjom rozdzielczym PAGE możliwe było uzyskanie obrazu elektroforetycznego, na którym widoczne były wszystkie prążki po trawieniu tą REazą (Ryc. 41).

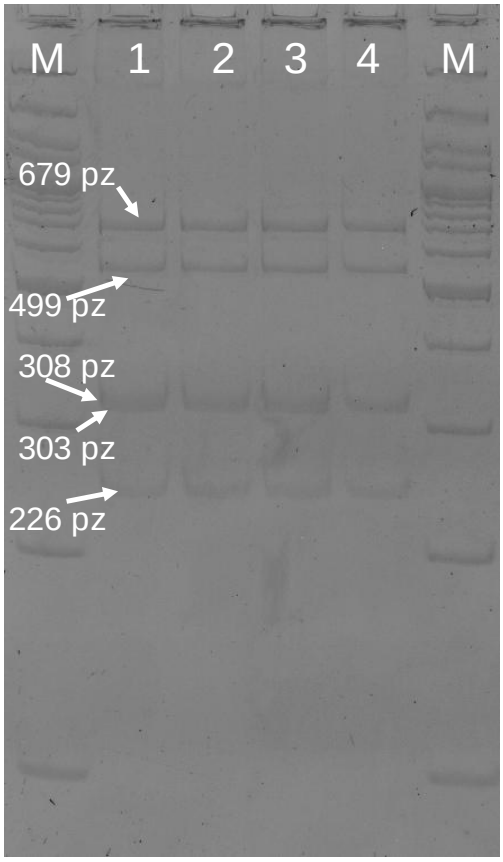


Ryc. 41. Obraz elektroforetyczny 2015 pz amplikonu strawionego enzymem restrykcyjnym RsaI. Ścieżki od 1 do 3 to strawione przykładowe próby. M – marker wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB). Żel poliakrylamidowy 8 %.

Enzym restrykcyjny HinfI w sekwencji amplikonu rozpoznawał cztery swoiste miejsca, dlatego też po rozdziale elektroforetycznym powinno być widocznych pięć fragmentów. Jednak rozdział elektroforetyczny, nawet w tak wysokoprocentowym żelu agarozowym jak 2,5 %, nie umożliwił uzyskania jednoznacznych wyników (Ryc. 42). Dlatego, dla uzyskania jednoznacznego wzoru restrykcyjnego przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 8 % żelu poliakrylamidowym. Również dzięki takiemu podejściu nie uzyskano jednoznacznych wyników (Ryc. 43).

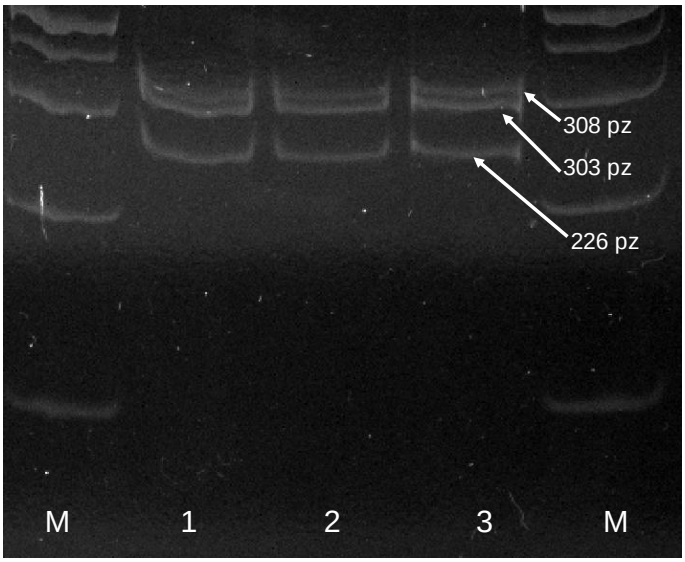


Ryc. 42. Obraz elektroforetyczny po trawieniu amplikonów enzymem HinfI. Ścieżki 1 oraz 2 to strawione przykładowe próby. M – marker wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB). Żel agarozowy 2,5 %.



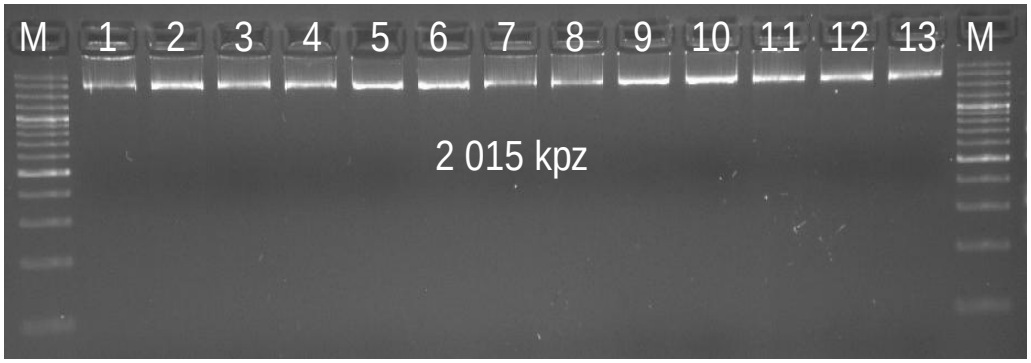
Ryc. 43. Obraz elektroforetyczny po trawieniu amplikonów enzymem HinfI. Ścieżki od 1 do 4 to strawione przykładowe próby. M – marker wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB). Żel poliakrylamidowy 8 %.

Rozdział strawionych prążków 303 oraz 308 pz uzyskano dopiero po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego w 15 % natywnym żelu poliakrylamidowym (Ryc. 44).



Ryc. 44. Częściowy (bez widocznych prążków 679 i 499 pz) obraz elektroforetyczny po trawieniu amplikonów enzymem restrykcyjnym HinfI. Ścieżki od 1 do 3 to pocięte przykładowe próby. M – marker wielkości 100 – 500 pz (DNA Gdańsk). Żel poliakrylamidowy 15%.

Po przeanalizowaniu reakcji trawienia z enzymami restrykcyjnymi SspI oraz XbaI stwierdzono na podstawie rozdziałów elektroforetycznych, że poddane reakcji trawienia amplikony nie zostały strawione (Ryc. 45). Uzyskany empirycznie wynik potwierdził informacje, które program NEBcutter (V2.0) przedstawił jako symulację.

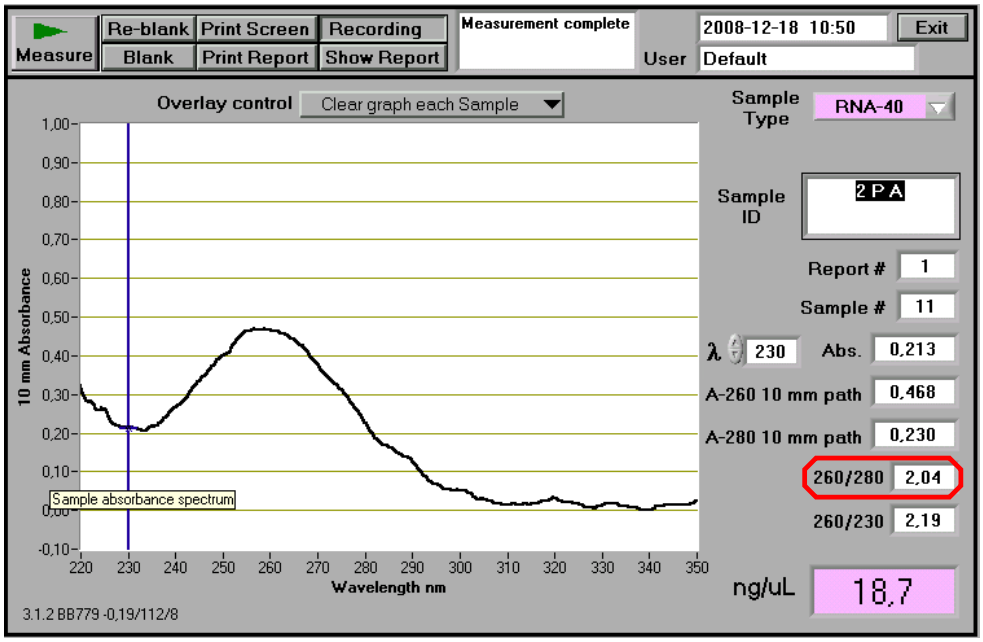


Ryc. 45. Obraz elektroforetyczny, jaki uzyskano za każdym razem po trawieniu enzymami restrykcyjnymi SspI oraz XbaI. Ścieżki 1 do 7 przykładowe próby trawione SspI oraz od 8 do 13 przykładowe próby trawione XbaI. M – marker wielkości 100 – 3 000 pz (PEQLAB). Żel agarozowy 2,5 %.

Reasumując, uzyskane wyniki analiz PCR-RFLP z łatwością można zauważyć, że wybrane do badań osobniki stanowią materiał genetycznie jednorodny. Zatem jedno z głównych założeń, homogenność genetyczna, została zachowana. W przypadku jej nie zachowania analiza danych uzyskanych po przeprowadzeniu doświadczenia w akwariach byłaby obarczona istotnym błędem metodycznym.

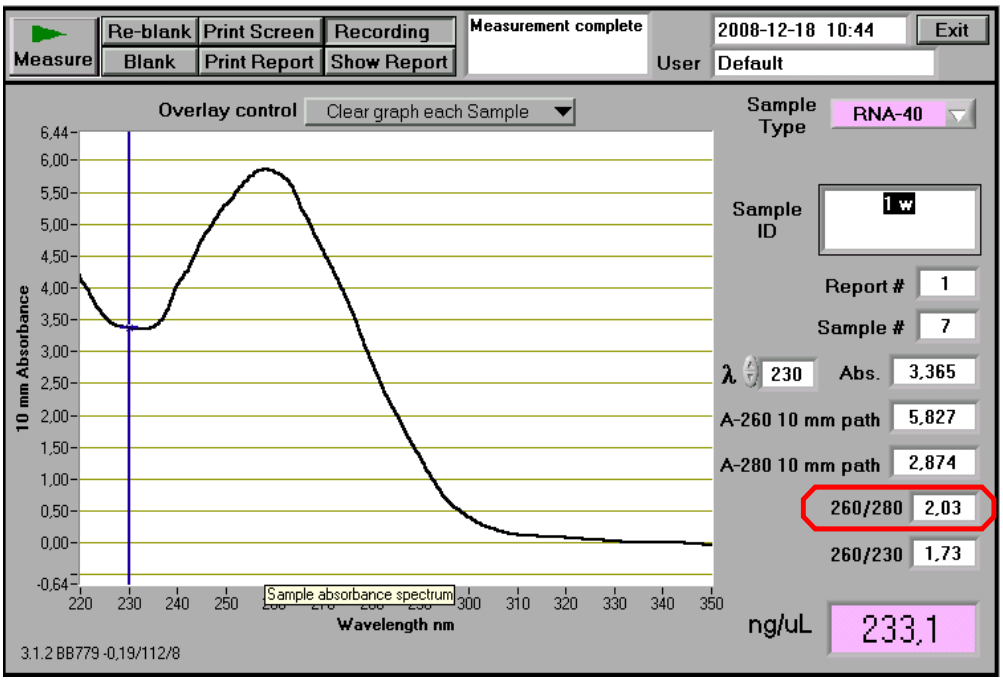
5.3 Ocena przydatności metod izolacji RNA

Dzięki wprowadzeniu do badań etapu oceny metod izolacji udało się wytypować metodę izolacji kolumnowej, jako mniej wydajną. Ilość uzyskanego tą metodą RNA oceniona na spektrometrze UV/Vis NanoDrop (Thermo Scientific) była odpowiednio mniejsza, chociaż pomiar absorbancji przy długościach fal A_{260}/A_{280} wskazywał, że czystość wszystkich prób była na zadowalającym poziomie (Ryc. 46). Jest to pewnego rodzaju kompromis, kiedy uzyskujemy wolny od zanieczyszczeń izolat ale o niewielkich koncentracjach.



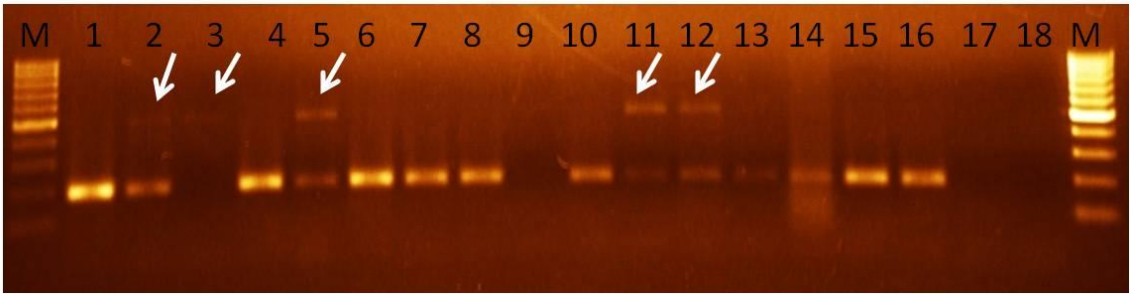
Ryc. 46. Reprezentatywny wynik pomiaru stężenia oraz czystości wyizolowanego RNA za pomocą metody kolumnowej.

W przypadku pomiaru całkowitego RNA wyizolowanego metodą z użyciem Trizolu® uzyskany izolat był wysokiej jakości. Ponadto stężenie RNA w wyizolowanych próbach oscylowało wokół wartości 233 $ng \cdot \mu l^{-1}$. Taka ilość w zupełności jest wystarczająca do podjęcia dalszych analiz. Wartość współczynnika A_{260}/A_{280} dla każdej z prób zawierała się w zakresie od 1,8 do 2,0 (Ryc. 47).



Ryc. 47. Reprezentatywny wynik pomiaru stężenia oraz czystości wyizolowanego RNA z wykorzystaniem Trizolu®.

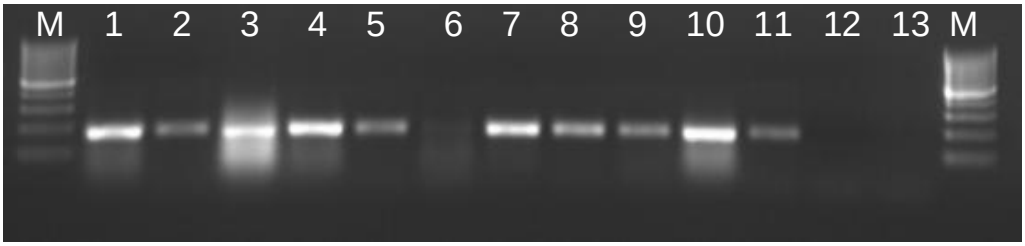
Analiza prób po RT-PCR dostarczyła dodatkowych informacji odnośnie skuteczności zastosowanych metod do izolacji RNA. Matryce RNA wyizolowane za pomocą metody kolumnowej były zanieczyszczone pozostałościami DNA, pomimo zastosowania podczas izolacji etapu trawienia z użyciem DNAzy I. Obecność dwóch kwasów w tych izolatach skutkowała pojawieniem się na żelu dwóch prążków, których długości korespondowały z długościami produktów w przypadku amplifikacji na matrycy DNA oraz RNA (Ryc. 48).



Ryc. 48. Obraz elektroforetyczny prób po jednoetapowej RT-PCR z wykorzystaniem matrycy po izolacji kolumnowej. Ścieżki od 1 do 16 przykładowe próby, 17 oraz 18 kontrola negatywna (reakcja bez matrycy). M – marker wielkości 100 - 1 000 pz (A&A Biotechnology). Żel agarozowy 1 %.

W przypadku analizy elektroforegramu wykonanego po przeprowadzeniu jednoetapowej RT-PCR nie stwierdzono obecności dodatkowych prążków

świadczących o amplifikacji na matrycy DNA. Jedynymi produktami na żelu były amplikony o długości 192 pz (Ryc. 49).



Ryc. 49. Obraz elektroforetyczny prób po jednoetapowej RT-PCR z wykorzystaniem matrycy po izolacji z Trizolem®. Ścieżki od 1 do 11 przykładowe próby, 12 oraz 13 kontrola negatywna (reakcja bez matrycy). M – marker wielkości 100 - 1 000 pz (A&A Biotechnology). Żel agarozowy 1 %.

Etap izolacji miał ogromne znaczenie dla dalszych analiz. W przypadku przyjęcia za pewnik metody izolacji na kolumnach nie można by było na podstawie wykresów real-time PCR (z sondą) ocenić, czy mamy jeden, czy dwa produkty reakcji. Należałoby wtedy przeprowadzić rozdział prób na żelu agarozowym, by zweryfikować specyficzność reakcji, co byłoby ekonomicznie nieuzasadnione. W związku z tym podczas izolacji prób pozyskanych od doświadczalnych osobników lina posłużono się nieznacznie dłuższą, ale bardziej skuteczną metodą z wykorzystaniem odczynnika Trizol®. Po zweryfikowaniu wyników reakcji sekwencjonowania stwierdzono jednoznacznie, że otrzymane w reakcji RT-PCR amplikony są na całej swej długości komplementarne z odpowiadającym fragmentem kompletnej sekwencji lina zdeponowanej w bazie NCBI pod numerem dostępu HM114351.1.

5.4 Pomiar aktywności genu hormonu wzrostu metodą real-time PCR w doświadczalnej grupie linów

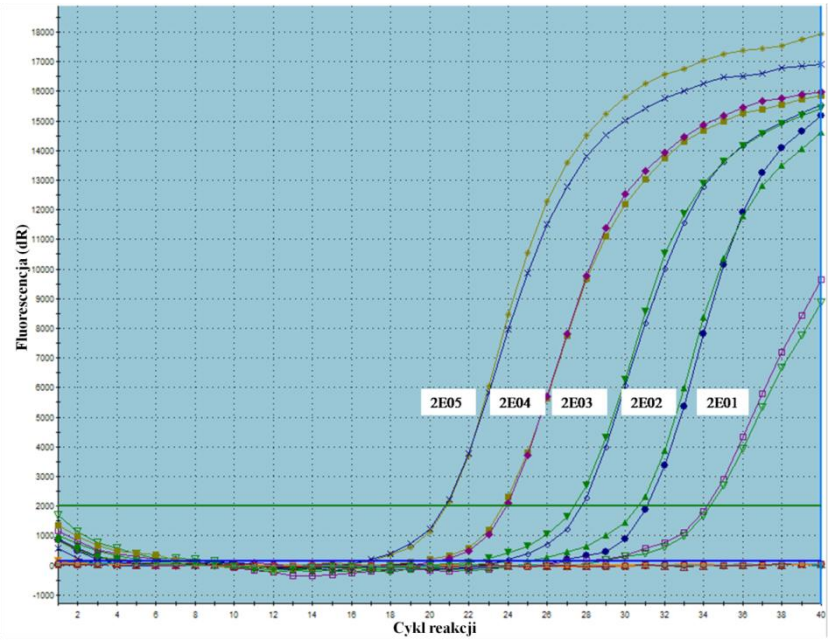
5.4.1 Izolacja i ocena uzyskanych izolatów RNA

Z pobranych przysadek mózgowych, skrawków mięśni oraz wątroby wyizolowano całkowity RNA metodą z użyciem Trizolu®. Bezpośrednio po przeprowadzeniu izolacji RNA wykonano jednoetapową RT-PCR, a następnie ocenę amplikonów na 1 % żelu agarozowym. Dla badanych prób uzyskano identyczne wyniki, jak w sekcji testującej metody izolacji RNA z użyciem Trizolu®. Na elektroforegramie widoczne były jedynie prążki świadczące o amplifikacji na matrycy RNA (właściwa długość produktu). Jednakże, z powodu nadmiernych śnięć nie udało się pobrać materiału od osobników przetrzymywanych w temperaturze 30ºC. Dlatego też,

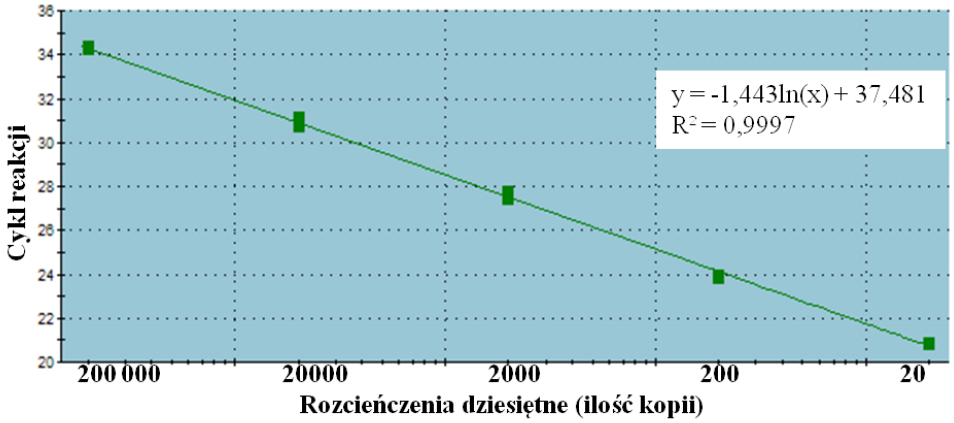
w dalszych etapach analizowano jedynie próby z czterech pozostałych wariantów temperaturowych.

5.4.2 Krzywe standardowe dla reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym

Po przeprowadzeniu reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym uzyskano dwa zestawy wykresów amplifikacji oraz krzywych standardowych. Pierwszy z nich otrzymano, gdy jako matryce RNA zostały wykorzystane rozcieńczenia dziesiętne wykonane na postawie fragmentu EGFP RNA (Ryc. 50 i Ryc. 51). Drugi z zestawów został uzyskany, gdy wykorzystano transkrybowany fragment *gh* RNA lina (Ryc. 52 i Ryc. 53).

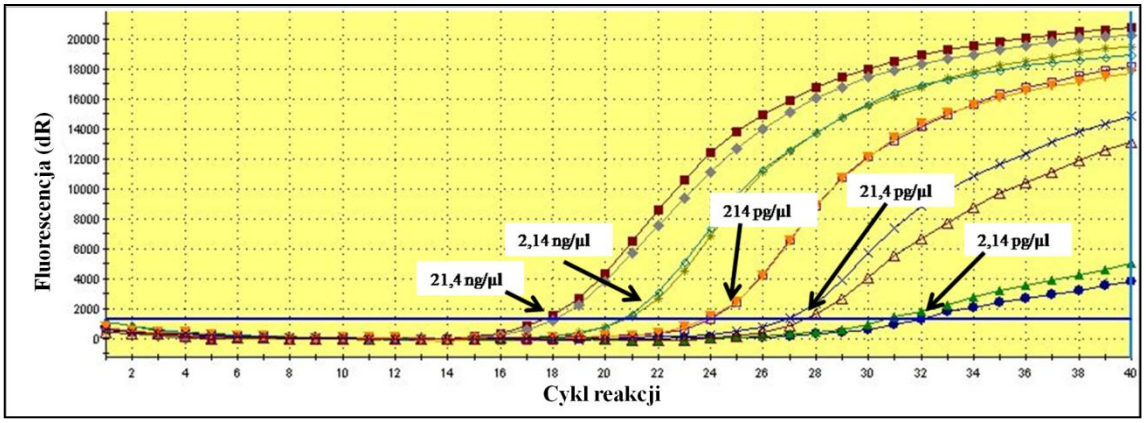


Ryc. 50. Wykres amplifikacji dla matryc EGFP RNA na podstawie ich rozcieńczeń dziesiętnych.

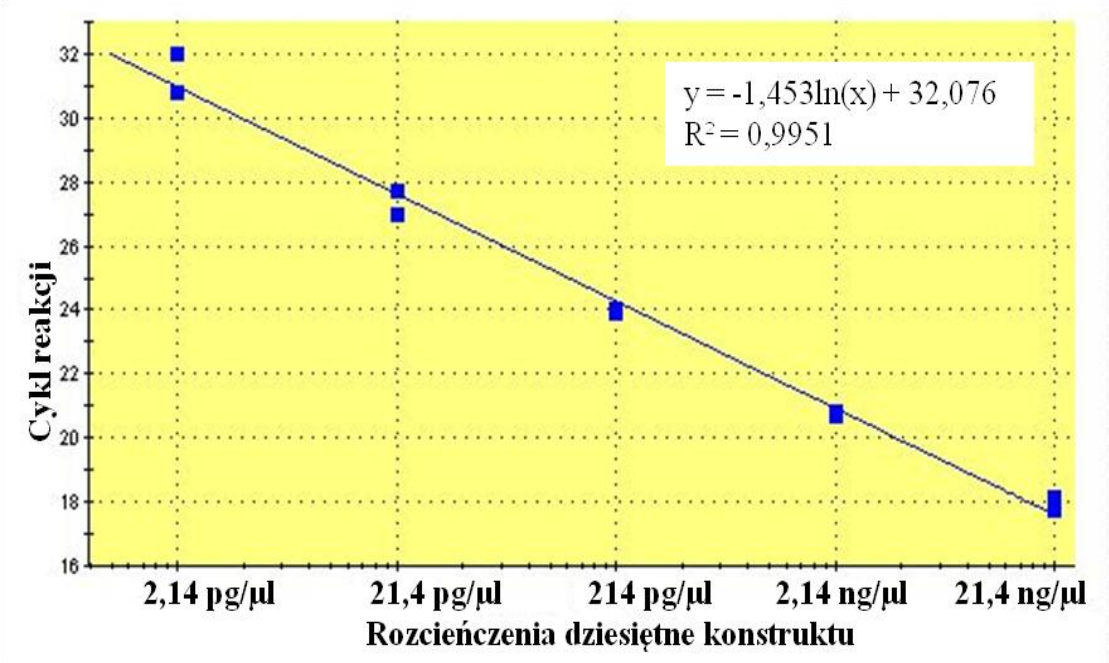


Ryc. 51. Wykres krzywych standardowych dla rozcieńczeń dziesiętnych matrycy EGFP RNA.

Praktycznie równe odstępy między rozcieńczeniami dziesiętnymi na wykresie amplifikacji oraz wartość parametru R^2 bliska 1 dla krzywych standardowych dowodzą, że matryce EGFP RNA zostały przygotowane poprawnie a wydajność (podwojenie ilości produktu w każdym cyklu reakcji) amplifikacji jest bliska 100 %.



Ryc. 52. Wykres amplifikacji dla matryc *gh* RNA na podstawie ich rozcieńczeń dziesiętnych.

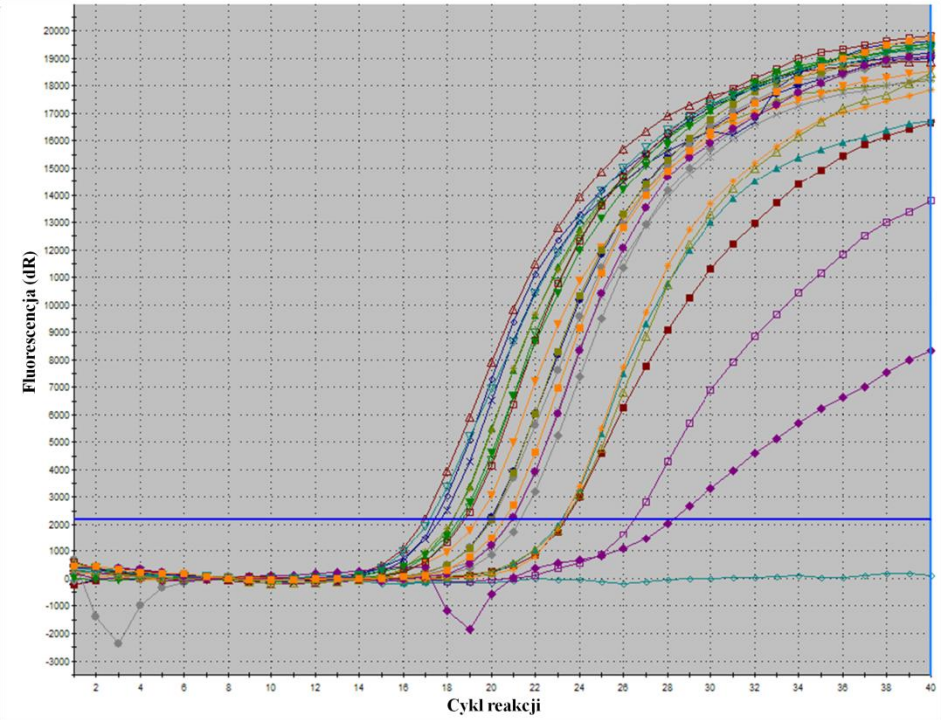


Ryc. 53. Wykres krzywych standardowych dla rozcieńczeń dziesiętnych matrycy *gh* RNA.

Pomimo, iż wykres krzywych amplifikacji dla rozcieńczeń *gh* RNA nie jest idealny (niektóre krzywe nie nakładają się na siebie oraz ich nachylenie nie jest tak strome jak w przypadku wykresu dla EFGP RNA), to wykres krzywych standardowych wskazuje na wydajność amplifikacji rzędu 90%. Wydajność amplifikacji w zakresie od

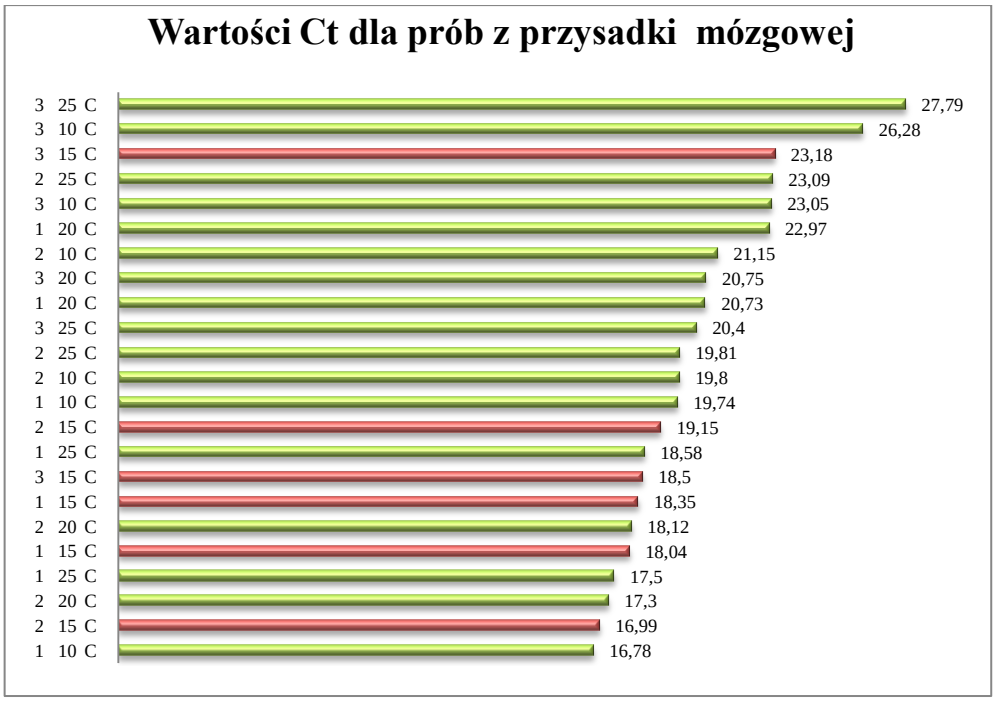
90 do 110 % jest wynikiem powszechnie uznanym za dobry i na takich krzywych można polegać w dalszych etapach analiz (Bustin 2004**)**.

Po zweryfikowaniu poprawności krzywych standardowych przeanalizowano wykresy amplifikacji dla badanych prób i przedstawiono je osobno. Najwięcej krzywych amplifikacji uzyskano dla matryc mRNA *gh* wyizolowanych z przysadki mózgowej (Ryc. 54).



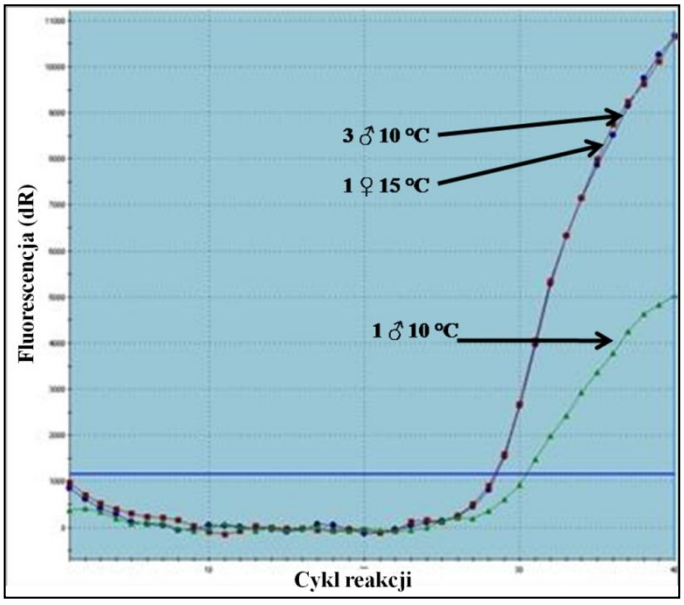
Ryc. 54. Krzywe amplifikacji prób gdzie matrycą były mRNA *gh* pozyskane z przysadek mózgowych.

Jedynie jedna próba samca numer 3 inkubowanego w temperaturze 20 °C okazała się negatywna. Pozostałe próby uszeregowano na podstawie wartości Ct, które są wyznaczane w punkcie przecięcia krzywej amplifikacji z linią progu detekcji (niebieska linia). Bazując na powyższym, największą ilość mRNA *gh* zawierał izolat samicy numer 2 inkubowanej w 15 °C, a najmniejszą samicy numer 3 z temperatury 25 °C. Przeanalizowano także zależności wartości Ct od temperatury. Jak się okazało najwięcej matrycy mRNA *gh* w izolacie uzyskano w większości prób z osobników przetrzymywanych w wodzie o temperaturze 15 °C. Analizując średnie wartości Ct dla samców oraz samic stwierdzono, że wartość ta była niższa u samców (19,66) a wyższa u samic (20,98) (Ryc. 55).



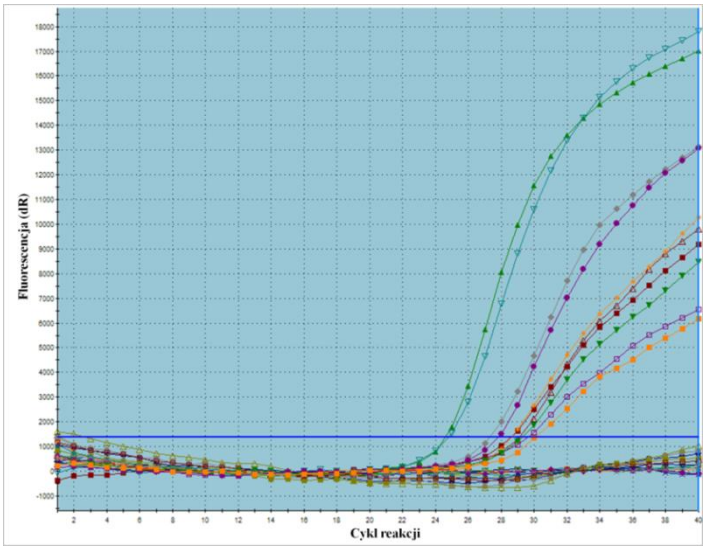
Ryc. 55. Wartości Ct dla izolatów mRNA *gh* pozyskanych z przysadki mózgowej.

Dla izolatów z wątroby uzyskano jedynie trzy krzywe amplifikacji. Dwie o podobnych wartościach Ct 28,57 (samiec numer 3 z 10 °C) i 28.45 (samica numer 1 z 15 °C), oraz jedną, gdzie wartość Ct wyniosła 30,48 (samiec numer 1 z 10 °C). Otrzymane wartości w porównaniu do powyższych są stosunkowo duże, co oznacza że ilość matrycy mRNA *gh* w izolatach otrzymanych ze skrawków wątroby jest bardzo mała (Ryc. 56).



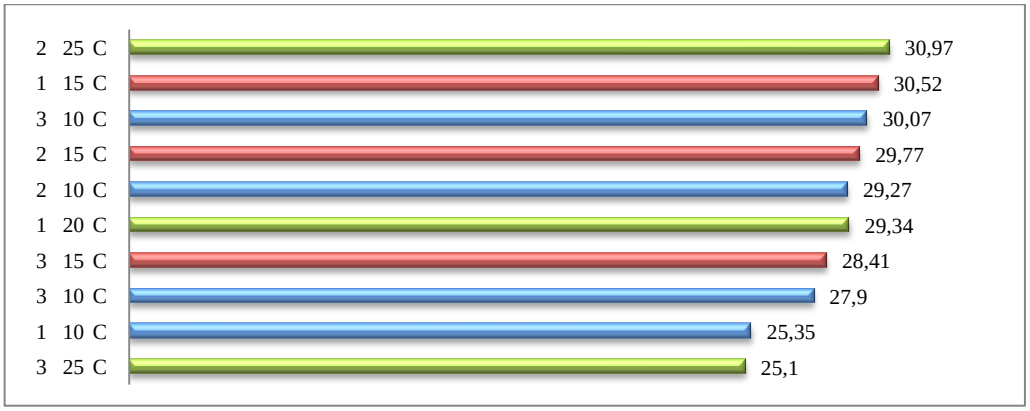
Ryc. 56. Krzywe amplifikacji prób gdzie matrycą były mRNA *gh* pozyskane ze skrawków wątroby.

Trzecią badaną grupą były próby z mięśni, gdzie uzyskano dziesięć krzywych amplifikacji świadczących o produkcji cząsteczek mRNA *gh* lina w miocytach (Ryc. 57).



Ryc. 57. Krzywe amplifikacji prób gdzie matrycą było mRNA *gh* pozyskane ze skrawków mięśni.

Z pośród dziesięciu otrzymanych wartości Ct siedem należało do prób pozyskanych od ryb, które w czasie doświadczenia przetrzymywane były w temperaturach 10 i 15 °C. Z czego trzy przypadały na wariant 15 °C (słupki oznaczone kolorem czerwonym), a cztery na wariant 10 °C (słupki oznaczone kolorem niebieskim). Pozostałe trzy osobniki (słupki oznaczone kolorem zielonym) należały do wariantów, 20 °C (1 próba) i 25 °C (2 próby). Zakres wartości Ct rozciągał się od największej 30,97 (samica numer 2 z 25 °C) do najmniejszej 25,10 (samica numer 3 z 25 °C) i w stosunku do zakresu prób z przysadki mózgowej (11,36) był węższy i wynosił prawie 6 Ct (5,87 Ct). Dodatkowo z pośród wszystkich wartości Ct 70 % należało do samic a pozostała do samców (Ryc. 58).



Ryc. 58. Wartości Ct dla izolatów mRNA *gh* pozyskanych ze skrawków mięśniowych.

Wykorzystując opcje termocyklera przeznaczone do analizy krzywych amplifikacji wprowadzono do niego znane wartości stężeń oraz ilości kopii do odpowiedniego zestawu krzywych standardowych. Następnie program wykorzystując wartości Ct każdej z badanych prób wyliczył dla każdej z nich stężenie oraz ilość kopii. Jedynie dla trzech ryb udało się uzyskać pełen zakres badanych informacji. Były to ryby, dla których otrzymano pozytywny sygnał w postaci krzywych amplifikacji z prób pozyskanych ze skrawka mięśni. Z zestawienia wyłania się także oczywista zależność, że wraz ze spadkiem stężenia mRNA *gh* w badanych próbach spada także ilość jego kopii (Tab. 15).

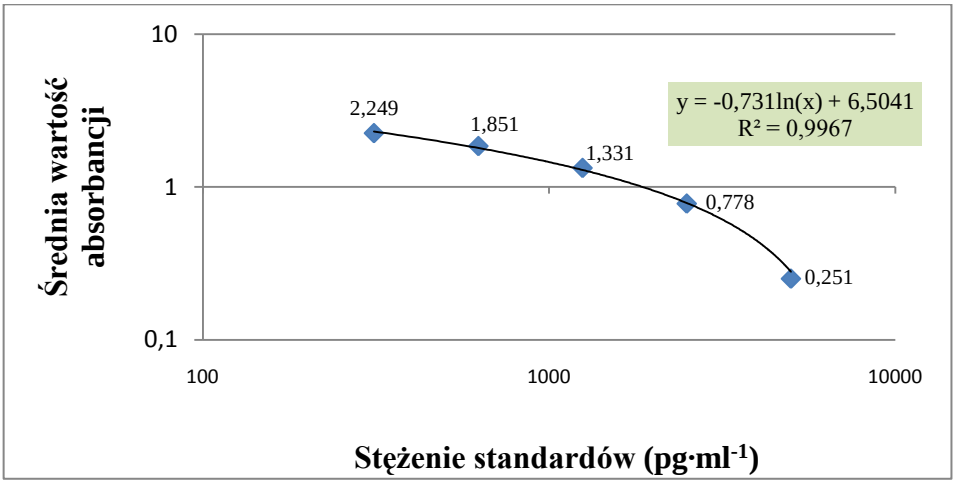
Tabela 15. Zestawienie stężeń oraz ilości kopii w próbach, dla których uzyskano krzywe amplifikacji.

Badana próba	**Ilość kopii przysadka**	**Ilość kopii mięśnie**	**Ilość kopii wątroba**	**Stężenie przysadka (pg/µl)**	**Stężenie mięśnie (pg/µl)**	**Stężenie wątroba (pg/µl)**
1♂10°C	1 699 659	4477,71	49,52	37311	102,41	1,17
2♀15°C	1 469 462	209,30		32290	4,89	
2♀20°C	1 185 381			26086		
1♀25°C	1 031 963			22732		
1♂15°C	709 808			15676		
2♂20°C	671 526			14836		
1♀15°C	572 585	124,46	280,01	12664	2,92	6,53
3♂15°C	516 054	537,14		11422	12,47	
1♂25°C	488 222			10810		
2♂15°C	328 901			7302		
1♀10°C	218 521			4865		
2♂10°C	209 621			4669		
2♀25°C	208 173	91,12		4637	2,14	
3♂25°C	138 310			3089		
1♂20°C	110 036			2462		
3♀20°C	108 521			2428		
2♀10°C	82 248	295,98		1844	6,90	
1♀20°C	23 300	281,96		527	6,57	
3♂10°C	22 044	764,87	272,36	499	17,71	6,35
2♂25°C	21 441			485		
3♀15°C	20 145			456		
3♀10°C	2 350	170,01		54	3,98	
3♀25°C	825	5324,74		19	121,64	

5.5 Pomiar stężenia GH i IGF-I w próbach krwi oraz wątroby doświadczalnych linów metodą kompetycyjnego testu ELISA

5.5.1 Stężenie hormonu wzrostu w plazmie krwi oraz wątrobie, a doświadczalny wariant temperatury

W odpowiednio przygotowanych próbach wątroby oraz plazmy krwi przeprowadzono analizę zmian stężenia hormonu wzrostu metodą kompetycyjnego testu ELISA w zależności od przyjętych doświadczalnych wartości temperatury. Wyniki odczytane czytnikiem płytek iMark Microplate Absorbance Reader (BioRad) przeliczono na podstawie zależności między uśrednioną wartością absorbancji dla kolejnych standardów GH a odpowiadającymi im stężeniami. (Ryc. 59).



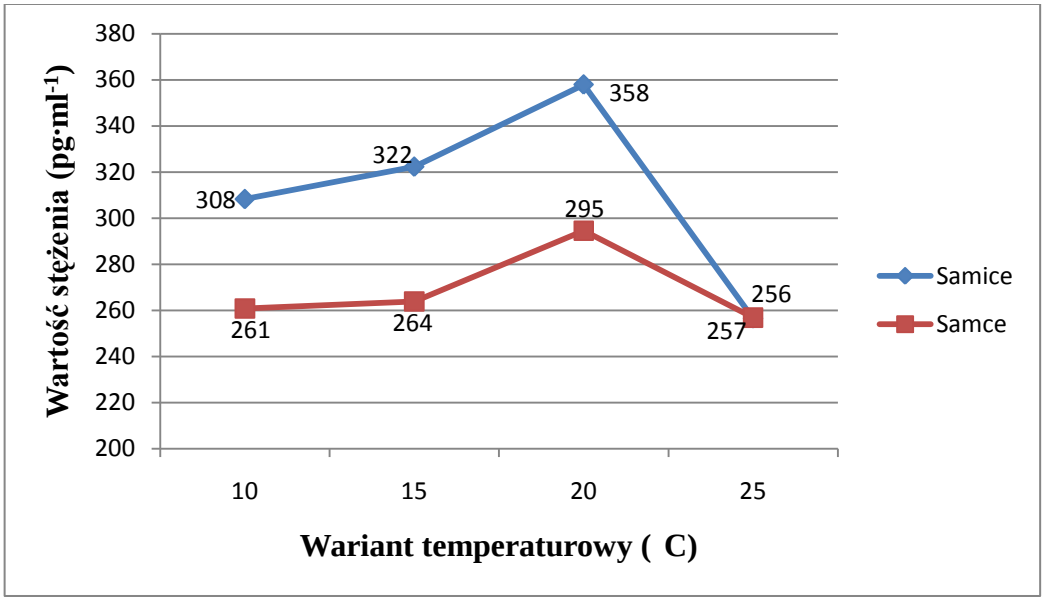
Ryc. 59. Zależność między średnią wartością absorbancji dla kolejnych standardów GH a odpowiadającymi im stężeniami.

Wzór opisujący przebieg krzywej logarytmicznej „y = -0,731ln(x) + 6,5041" przekształcono w postać „x = 10 ^(6,5041– y)/1,6832". Na podstawie tak przekształconego wzoru wyliczono wartości stężeń z uśrednionych wartości absorbancji dla trzech samic bądź trzech samców z danego wariantu temperaturowego. Dzięki temu uzyskano osobno dla samców i samic wartości stężeń dla każdego z wariantów temperaturowych (Tab. 16).

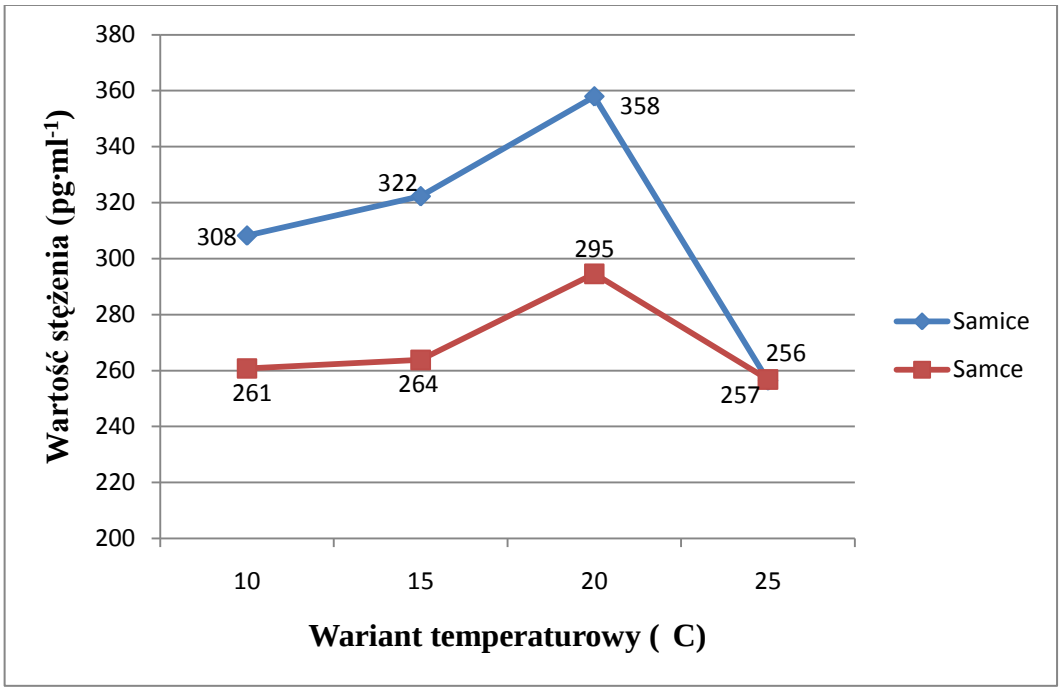
Tabela 16. Stężenia GH w próbach wątroby oraz plazmy krwi względem doświadczalnych warianów temperaturowych.

		10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
Wątroba	**samice**	308±68,2	322±108,2	358±49,2	256±61,2
	samce	261±128,9	264±114,5	295±70,6	257±112,1
Plazma krwi	**samice**	910±241,2	1920±560,3	3213±736,3	1191±486,3
	samce	1074±499,5	1930±729,1	2404±323,3	1119±286,5

Wstępna analiza krzywych zależności wartości stężenia GH w próbach wątroby od temperatury pokazała, że mają one podobny przebieg dla obu płci (z maksymalnymi wartościami przy 20 ºC - Ryc. 60). Identyczną tendencję zaobserwowano dla prób plazmy krwi (Ryc. 61).



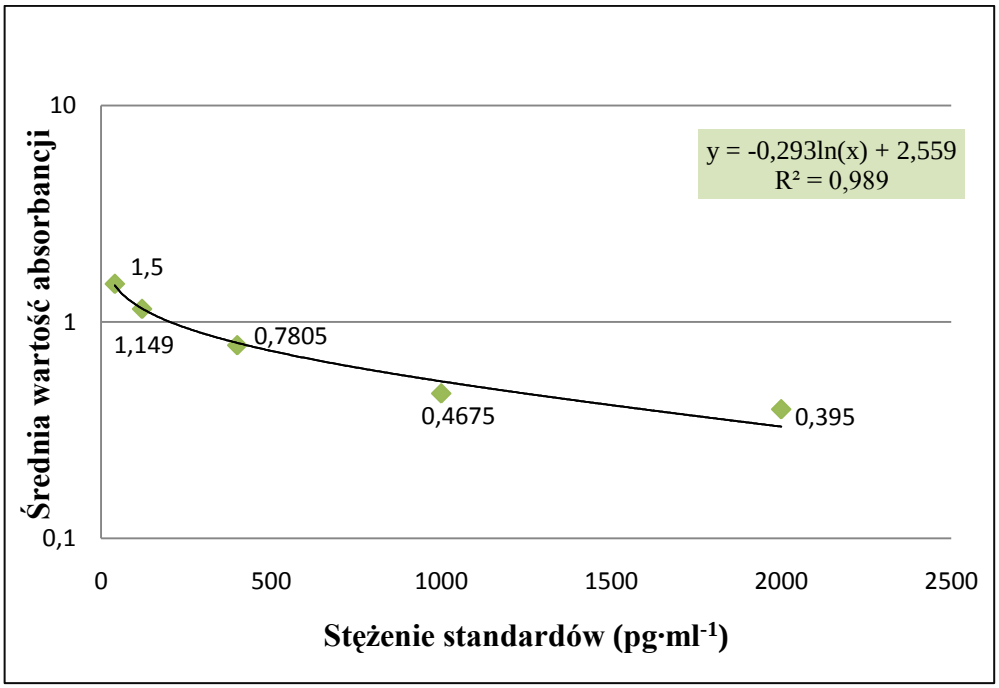
Ryc. 60. Zmiana wartości stężenia GH w próbach wątroby samców oraz samic w zależności od wartości temperatury.



Ryc. 61. Zmiana wyliczonych stężeń GH w próbach plazmy krwi samców oraz samic w zależności od wartości temperatury.

5.5.2 Stężenie insulinopodobnego czynnika wzrostu typu I w plazmie krwi oraz wątrobie, a doświadczalny wariant temperatury

Na podstawie pomiaru dokonanego czytnikiem płytek iMark Microplate Absorbance Reader (BioRad) przy długości fali 450 nm otrzymano dla wszystkich prób wartości absorbancji IGF-I. Wyniki przeliczono na podstawie zależności między uśrednioną wartością absorbancji dla kolejnych standardów IGF-I a odpowiadającymi im stężeniami (Ryc. 62).



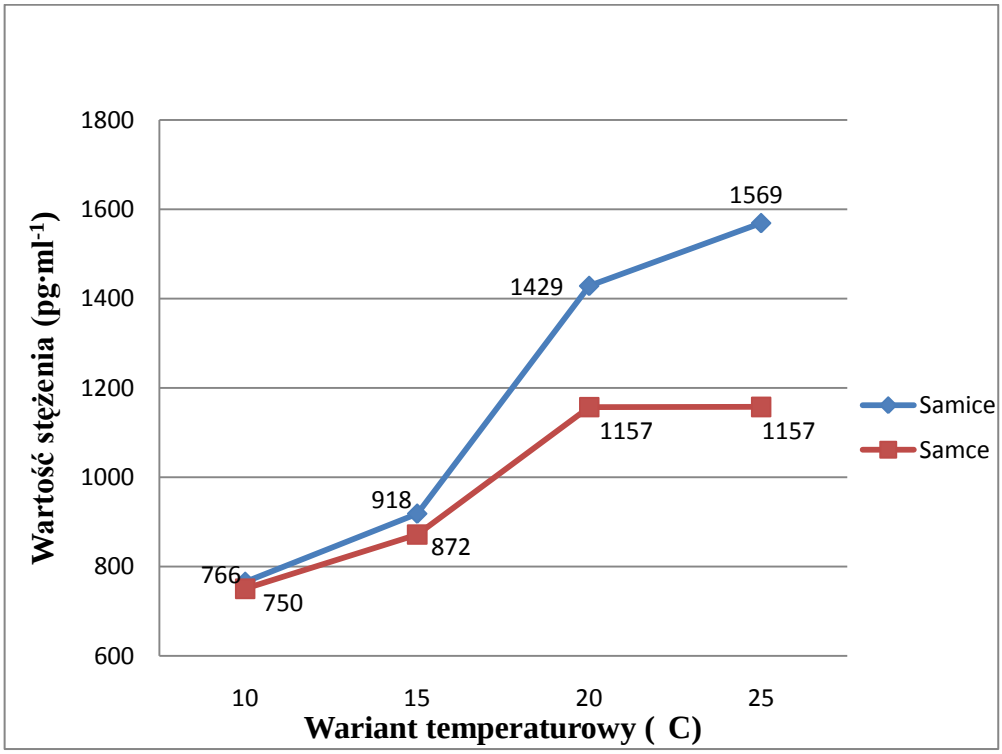
Ryc. 62. Zależność między zmierzoną średnią wartością absorbancji dla standardów IGF-I a odpowiadającym im stężeniom.

Korzystając z prostego równania, opisującego przebieg krzywej logarytmicznej „y = - 0,293ln(x) + 2,559" przekształcono je w postać „x = 10 ^ (2,559 – y)/0,67466", dzięki czemu podstawiając za „y" wartość absorbancji badanego białka można było wyliczyć jego stężenie. Następnie wyliczono średnią wartość z trzech stężeń wyliczonych dla prób wątroby samic bądź samców pochodzących z danego wariantu temperaturowego. Dodatkowo dla wyliczonych średnich obliczono także odchylenia standardowe. W identyczny sposób przeliczono także wartości absorbancji zmierzone w próbach plazmy krwi (Tab. 17).

Tabela 17. Stężenia IGF-I w próbach wątroby oraz plazmy krwi względem doświadczalnych warianów temperaturowych.

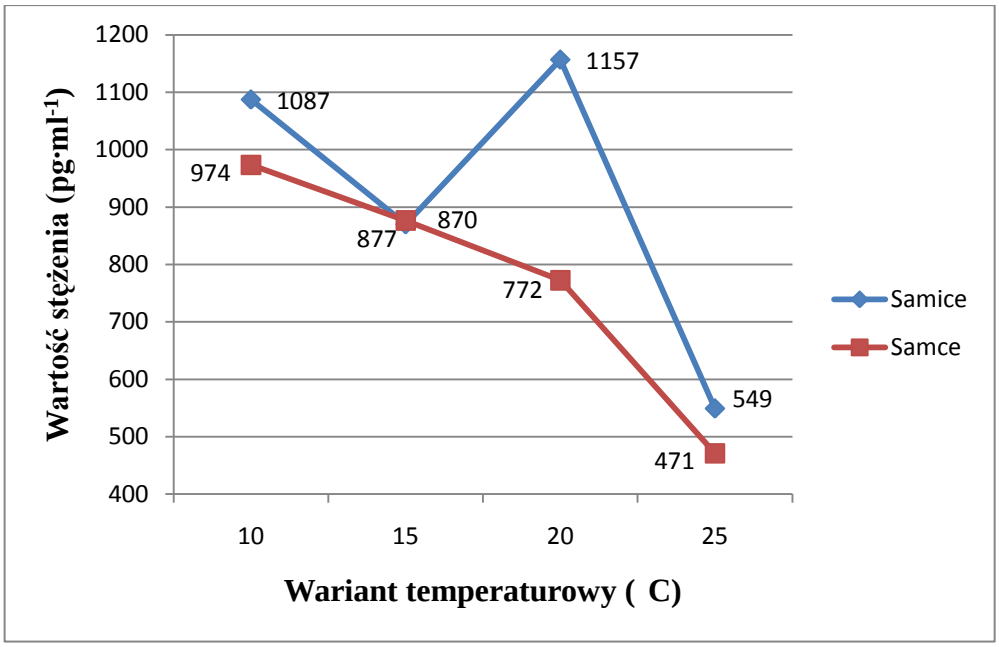
		10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
Wątroba	**samice**	766 ± 67,2	918 ± 348,3	1429 ± 302,0	1569 ± 98,6
	samce	750 ± 111,2	872 ± 113,6	1157 ± 375,4	1157 ± 278,4
Plazma krwi	**samice**	1087 ± 137,2	870 ± 536,4	1157 ± 567,1	549 ± 47,8
	samce	974 ± 550,1	877 ± 253,1	772 ± 347,4	471 ± 18,6

Na podstawie wyliczonych wartości stężeń IGF-I w próbach wątroby stwierdzono, że stężenie tego białka niezależnie od płci badanych osobników lina zwiększało się w miarę wzrostu temperatury. Dodatkowo wzrost stężenia tego białka u samic (ogólna tendencja) był większy (Ryc. 63).



Ryc. 63. Wpływ temperatury na stężenie IGF-I w wątrobie linów obu płci.

Po zestawieniu wartości stężeń IGF-I w próbach plazmy krwi samic oraz samców względem przyjętych temperatur uzyskano krzywe, na podstawie których stwierdzono, że wraz ze wzrostem temperatury obniżało się stężenie badanego białka w plazmie. Przebieg krzywych (opadający) obrazujących zmiany stężenia IGF-I w plazmie był przeciwny w stosunku do przebiegu krzywych (wznoszący) obrazujących stężenie tegoż samego białka w próbach wątroby. Gdy temperatura wynosiła 10 ºC to stężenia IGF-I w plazmie krwi były wyższe niż w wątrobie, odwrotnie niż w temperaturze 25 ºC (Ryc. 64).



Ryc. 64. Wpływ temperatury na stężenie IGF-I w plazmie krwi linów obu płci.

5.5.3. Analiza statystyczna

Ze względu na stosunkowo małą liczebność prób i dużą rozpiętość uzyskanych wyników w obrębie wariantów analizę statystyczną ograniczono do testu jednorodności wariancji Levena, jednoczynnikowej analizy wariancji oraz testu NIR dla wartości stężeń GH i IGF-1 oddzielnie dla samców i samic w zależności od temperatury wody (Ryc. 65).

Test NIR; zmienna GHplazma (remiksamce)
Grupy jednorodne, alfa = ,05000
Błąd: MS międzygrupowe = 2419E2, df = 8,0000

Nr podkl.	temperatura	GHplazma Średnie	1	2
1	10	1074,385	****	
4	25	1119,483	****	
2	15	1929,523	****	****
3	20	2403,810		****

Test NIR; zmienna GHplazma (remiksamice)
Grupy jednorodne, alfa = ,05000
Błąd: MS międzygrupowe = 2877E2, df = 8,0000

Nr podkl.	temperatura	GHplazma Średnie	1	2	3
1	10	909,523	****		
4	25	1190,734	****	****	
2	15	1919,900		****	
3	20	3212,934			****

Test NIR; zmienna IGF1watroba (remiksamice)
Grupy jednorodne, alfa = ,05000
Błąd: MS międzygrupowe = 56698,, df = 8,0000

Nr podkl.	temperatura	IGF1watroba Średnie	1	2
1	10	765,622	****	
2	15	918,382	****	
3	20	1428,698		****
4	25	1569,464		****

Ryc. 65. Wyniki analizy statystycznej – test LSD dla GH i IGF-I.

Przeprowadzono także test porównawczy NIR dla obu płci inkubowanych, w temperaturze 20^{o}C. Wszystkie przeprowadzone testy jednorodności wariancji wykazały, że badane wariancje są jednorodne. Pozwoliło to na przeprowadzanie dalszych analiz, które wykazały, że jedynie statystycznie istotne różnice pomiędzy średnimi uzyskano dla GH w plazmie krwi dla obu płci oraz dla IGF-I w wątrobie samic. Na ich podstawie stwierdzono, że najkorzystniejsze wartości stężeń uzyskano dla temperatury 20^{o}C dla obu płci niezależnie.

6. DYSKUSJA

Badania nad tempem wzrostu lina trwają od wielu lat, ale do dziś nie udało się ani stworzyć nowej linii hodowlanej, ani odtworzyć historycznej, która w pierwszej połowie XX wieku istniała w miejscowości Quolsdorf położonej w Saksonii (Milkau 1921, Müller 1961). Pokładano wielkie nadzieje w badaniach nad jakością i ilością paszy skarmianej linom w różnych stadiach rozwojowych, ale i to nie przynosiło oczekiwanych rezultatów a dodatkowo wywoływało deformacje w ich szkielecie (Wolnicki i in. 2003). Problem wolnego tempa wzrostu lina był także badany w Turcji, Chinach i Czechach. Jak dotąd jedynym rezultatem tych badań jest stwierdzenie, że hodowla tej ryby jest nieopłacalna (Altındağ i in. 1998, Gela i in. 2006, Wang i in. 2006b). W Czechach prowadzono także badania związane z manipulacjami w składzie chromosomowym, lecz pomimo zwiększonego tempa wzrostu osobniki poliploidalne nie były w stanie prawidłowo się rozwijać (Flajshans i in. 2004).

Dlatego przeprowadzone badania poza opracowaniem metodyki badawczej skupiły się na sprawdzeniu, czy występuje zależność między temperaturą wody a aktywnością genu hormonu wzrostu oraz stężeniem produktu białkowego GH w zależności od płci lina. Badania real-time PCR potwierdziły, że mRNA genu hormonu wzrostu lina transkrybowany jest głównie w przysadce mózgowej (Reinecke i in. 2005), gdyż oznaczono go tam dla 23 z 24 badanych osobników. Otrzymane wyniki zostały następnie przeanalizowane pod kątem fenomenu SSD (ang. sexual size dimorphism), polegającym na zróżnicowaniu tempa wzrostu osobników danego gatunku w powiązaniu z ich płcią. Bazując na otrzymanych wynikach dla badanych osobników lina nie potwierdzono powszechnie znanego fenomenu szybszego tempa wzrostu samic lina (Nordquist 1927, Walter 1927, Kennedy i Fitzmaurice 1970).

Możliwe, że na postać otrzymanych wyników wpływ mogło mieć oddziaływanie ze strony układu doświadczalnego. Dowodów weryfikujących powyższą myśl dostarczają rezultaty badań nad karpiem oraz okoniem żółtym (*Perca flavescens*). Ryby w tych badaniach pozyskano ze środowiska naturalnego, bezpośrednio po czym pobrano z nich próby i przeprowadzono analizy za pomocą reakcji real-time PCR. Na podstawie otrzymanych wartości Ct dla mRNA *gh* stwierdzono, że u tych gatunków istnieje wyraźna zależność między płcią osobnika a charakterystycznym tempem wzrostu. Samice obu gatunków zawsze charakteryzowały się niższymi wartościami Ct dla mRNA *gh* niż samce, co oznaczało, że aktywność genu hormonu wzrostu u szybciej

rosnących samic była na wyższym poziomie niż u samców (Devlin i Nagahama 2002, Lynn i in. 2009). Takiej zależności nie stwierdzono u badanych ryb. Nawet uśrednione wartości Ct dla samców lina okazały się nieznacznie niższe niż dla samic (średnio 1,32).

Wyższe tempo wzrostu stwierdzono także u samic gatunków ryb łososiowatych, gdzie między zdefiniowanymi regionami chromosomów a determinacją płci, dojrzewaniem oraz hormonami zaangażowanymi w steroidogenezę, istniała silna współzależność (Haidle i in. 2008). Natomiast przykładem gatunku, gdzie samce charakteryzują się szybszym wzrostem niż samice, jest tilapia nilowa. Wykorzystywane jest to w masowej produkcji, gdzie samicom podaje się androgeny maskulinizujące je w pełni funkcjonalne samce (Mair i in. 1997).

Analizując uzyskane wartości Ct dla mRNA *gh* pod kątem poszczególnych wariantów temperaturowych zauważyć można pewną prawidłowość. Pięć z sześciu ryb przetrzymywanych w akwarium, gdzie woda miała temperaturę 15 °C, stanowiło połowę pierwszych dziesięciu wyników uszeregowanych od najmniejszej wartości Ct. Oznacza to, że między temperaturą, w jakiej przetrzymywane były ryby, a aktywnością ich genu hormonu wzrostu, istnieje zależność, która wskazuje, że aktywność badanego genu w przysadce mózgowej linów jest największa w stosunkowo niskiej temperaturze wody. Możliwym jest, że stan ten jest skorelowany z początkiem syntezy oraz sekrecją gonadotropin, które stymulują komórki somatotropowe do produkcji hormonu wzrostu niezależnie od fotoperiodu a zależnie od temperatury. Gdy woda osiągnie minimum 10 °C komórki gonadotropowe lina ulegają aktywacji i w miarę wzrostu temperatury produkują więcej gonadotropin. W momencie, gdy woda osiągnie temperaturę 20 °C ich aktywność stopniowo obniża się, czego następstwem jest spadek stężenia produkowanych hormonów, które stymulują syntezę genu *gh* w przysadce (Breton i in. 1980a, Breton i in. 1980b, Horoszewicz i in. 1981). Niemniej jednak, niezależnie od drogi, jaką stymulowane są komórki somatotropowe, otrzymane wyniki dowodzą, że transkrypcja mRNA *gh* lina zachodziła w sposób najbardziej efektywny w temperaturze oscylującej wokół 15 °C. Podobne relacje stwierdzono także u innych gatunków ryb. Przykładem mogą tu być badania nad karasiem pospolitym oraz doradą (*Sparus aurata*). Synteza i sekrecja hormonu wzrostu zachodziła u tych gatunków najintensywniej od marca do połowy maja, gdy pora dnia wydłużała się, a temperatura wody mieściła się w granicach między 15 a 20 °C. W innych badaniach nad karpiem, Figueroa wraz z zespołem (1995) dowiódł, że temperatura ma istotny wpływ na poziom ekspresji genu hormonu wzrostu. Ponadto na podstawie analiz ekspresji innych genów

(prolaktyny, proopiomelanokortyny, czynnika transkrypcyjnego Pit-1) wykazano, że podlegają one bezpośrednio wpływom ze strony czynnika temperaturowego i są najwyższe w okresie wiosenno-letnim (Figueroa i in. 1994, Arends i in. 1998, Kausel i in. 1999).

Doświadczenie przeprowadzone w ramach niniejszej pracy trwało łącznie 8 dni, podczas których ryby nie były karmione. Składniki pokarmowe ze względu na swój ogromny wpływ na oś somatotropową mogłyby utrudnić bądź nawet uniemożliwić prawidłową interpretację wpływu temperatury na poziom ekspresji genu *gh* badanych linów ponieważ po zaprzestaniu karmienia stężenie hormonu wzrostu w plazmie krwi rośnie bądź maleje w zależności od gatunku (Duan 1998). Jednakże analizując wyniki innych badań prowadzonych w tym kierunku stwierdzono, że wzrost ten następuje przykładowo po dwóch tygodniach u tilapii mozambijskiej (*Oreochromis mossambicus*), między dwoma a trzema tygodniami u pstrąga tęczowego, po trzech tygodniach u baramundi (*Lates calcarifer*), między dwoma a czteroma tygodniami u suma kanałowego (*Ictalurus punctatus*) oraz między trzema a czteroma tygodniami u kiżucza (*Oncorhynchus kisutch*) (Duan i Plisetskaya 1993, Kakizawa i in. 1995, Matthews i in. 1997, Uchida i in. 2003, Small i Peterson 2005). Inne badania nad pstrągiem tęczowym wskazują na brak wpływu składników pokarmowych na efekt, jaki wywiera temperatura względem stężenia GH w plazmie krwi (Gabillard i in. 2003). Dlatego też z pewną ostrożnością można założyć, że ośmiodniowa głodówka ryb nie miała wpływu na uzyskane wyniki Ct dla mRNA *gh* lina. Ponadto można się pokusić o wniosek, że produkcja GH u osobników doświadczalnych przetrzymywanych w ciemnościach podlegała kontroli głównie ze strony czynnika temperaturowego i była zależna od płci. Ze względu na zachowania linów w środowisku naturalnym (preferencja obszarów zacienionych) interesującym jest, czy istnieje możliwość, aby synteza przysadkowego GH linów podlegała w dużej mierze regulacji ze strony czynnika temperaturowego? Odpowiedzi na to pytanie mogą udzielić w przyszłości badania prowadzone na osobnikach pochodzących ze środowiska naturalnego. Podsumowując tą część rozważań sam wpływ temperatury na aktywność genu hormonu wzrostu w przysadce mózgowej lina jest bezsporny. Natomiast dalszych badań wymaga określenie dokładnej charakterystyki tej zależności.

Przysadka mózgowa uważana jest za główne miejsce, w którym syntetyzowany jest hormon wzrostu. Jednak liczne badania wskazują, że jest on także produkowany w limfocytach T oraz B, szyszynce, mózgu, mięśniu sercowym, nerce głowowej,

jajnikach, jądrach, wyrostkach pylorycznych oraz wątrobie. Powyższe miejsca produkcji mRNA *gh* zostały zlokalizowane podczas prac nad pstrągiem tęczowym oraz doradą, przy użyciu technik łańcuchowej reakcji polimerazy oraz metod immunohistochemicznych (Hattori i in. 1990, Maggiano i in. 1994, Harvey i in.2002, Poppi i in. 2002, Herrero-Turrión i in. 2003). Ponadto Yang i in., (1999**)** dokonali podziału organizmu ryby na miejsca charakteryzujące się wysoką oraz niską aktywnością transkrypcyjną genu hormonu wzrostu. Przysadka mózgowa, mózg, serce oraz skrzela zostały zaklasyfikowane do miejsc gdzie mRNA *gh* jest produkowany w większych ilościach niż w nerce, wyrostkach pylorycznych, gonadach oraz wątrobie. Badania własne, przeprowadzone na próbach wątroby linów doświadczalnych wskazują również, że ilość transkryptu dla hormonu wzrostu jest niska. Dowodem na to są jedynie trzy krzywe amplifikacji dla dwóch samców i jednej samicy oraz ich wysokie (na tle innych badanych prób) wartości Ct. Trudno jest natomiast wnioskować o wpływie temperatury oraz płci na poziom ekspresji genu hormonu wzrostu na podstawie trzech pozytywnych prób. Zastanawiającym jest, jak wyglądałaby aktywność genu hormonu wzrostu w temperaturze oscylującej wokół 5 °C, odzwierciedlającej okres zimowy. Marchant i Peter, (1986) wykazali u osobników karasia złocistego (*Carassius auratus*) przetrzymywanych w tej temperaturze, że SRIF nie wywiera swego inhibicyjnego wpływu na proces produkcji oraz sekrecji GH. Natomiast badania nad doradą dowiodły przeciwnej zależności (Cavari i in. 1993). Reasumując, nieliczne wyniki otrzymane dla prób wątroby okazały się spójne z tymi dla przysadki mózgowej wykazując że, aktywność genu hormonu wzrostu lina była największa w najniższych temperaturach. Brak krzywych amplifikacji w wyższych temperaturach może świadczyć o bardzo niskiej (poniżej progu detekcji) aktywności transkrypcyjnej badanego genu bądź o jej braku.

Na 24 badane próby tkanki mięśniowej (pochodzące od 12 samców i 12 samic) uzyskano 10 wartości Ct, z których 70 % należało do samic, a 30 % do samców. Odwołując się ponownie do badań przeprowadzonych przez Lynn i in. (2009) sytuację taką można swobodnie powiązać z fenomenem SSD rozpatrywanym dla samic lina. Trzy pozytywne wyniki Ct na 12 badanych samców świadczą o niskim poziomie syntezy mRNA *gh* u tej płci. Godnym podkreślenia jest fakt, że ponownie krzywe amplifikacji uzyskano głównie dla prób (7 na 10 pozytywnych) pobranych od ryb przetrzymywanych w temperaturach 10 i 15°C. Z uwagi na fakt, iż dla 10 z 24 prób uzyskano krzywe amplifikacji można wnioskować, że w komórkach mięśniowych lina

dochodzi do ekspresji genu hormonu wzrostu. W dostępnej literaturze brak jest podobnych wyników dla ryb. W badaniach przeprowadzonych nad strzępielem *Epinephelus coioides* sprawdzono obecność transkryptów *gh* w próbach z przysadki mózgowej, mózgu, wątroby, jajników, żołądka, serca, nerki, śledziony oraz mięśni szkieletowych. Po zestawieniu otrzymanych wyników stwierdzono, że w próbach z mięśni, wątroby, nerki, żołądka oraz serca nie uzyskano amplikonu charakterystycznego dla mRNA *gh*. Badania wykonano w oparciu o hybrydyzację typu Northern Blot wspartą przez RT-PCR (Li i in. 2005). Wynik negatywny może być faktycznie efektem braku mRNA *gh* w próbach mięśni bądź też wynikać z niższej czułości użytych technik detekcji zwłaszcza przy analizach, gdzie stężenie badanej matrycy jest krytycznie niskie. Wykorzystane w powyższych badaniach metody badawcze nie charakteryzują się taką czułością jak zastosowana przez autora real-time PCR. Ponadto po zakończeniu reakcji musimy przeprowadzić dodatkowo rozdział elektroforetyczny otrzymanych prób i dopiero wtedy uzyskujemy wynik jakościowy a nie dokładny ilościowy, jak w qPCR (Bustin i in. 2000). Liczbę kopii oraz stężenie mRNA wyliczono na podstawie krzywych standardowych przygotowanych dzięki rozcieńczeniom dziesiętnym EGFP RNA oraz *gh* RNA lina. Obie krzywe standardowe zostały przygotowane poprzez *in vitro* transkrypcję, jednakże jak można było zauważyć nieznacznie różniły się one wartością współczynnika regresji „R", aczkolwiek w obu przypadkach był on wysoki (powyżej 0,95). Należy także zwrócić uwagę na nachylenie krzywych amplifikacji dla obu standardów. W przypadku EGFP RNA po przekroczeniu progu wznosiły się one stromo ku górze, po czym osiągały fazę plateau (fotodetektor nie mierzył dalej fluorescencji). Natomiast przebieg krzywych na podstawie *gh* RNA lina nie zmierzał ku fazie plateau tak stromo i dlatego też parametr R był niższy niż dla pierwszego konstruktu. Nie jest to jednakże błąd, bądź podstawa do odrzucenia uzyskanych wyników stężenia badanych prób. Wynikające różnice mogą mieć przyczynę w tym, że EGFP RNA był przetrzymywany w specjalnym buforze stabilizującym RSB, w przeciwieństwie do *gh* RNA (Hoffmann i in. 2006). Porównując ze sobą wyniki stężenia z wynikami liczby kopii dla każdej z prób jasno widać, że gdy maleje stężenie to wraz z nim spada liczebność kopii mRNA (Tab. 15). Jest to logiczny wniosek, aczkolwiek przy niedbale przygotowanych krzywych standardowych ta zależność nie występuje (Bustin i in. 2005).

Reasumując, przyjęta metoda real-time PCR z dwoma zestawami krzywych standardowych okazała się w porównaniu do dotychczas stosowanych bardziej czuła

w detekcji i kwantyfikacji ekspresji genu hormonu wzrostu. Pozwoliło to na stwierdzenie aktywności genu *gh* w tkance mięśniowej, która dotychczas nie była uważana za takie miejsce, w którym następuje transkrypcja mRNA *gh.*

Oprócz analizy poziomu genu hormonu wzrostu niniejsza praca miała na celu określenie zmian stężeń hormonu wzrostu (GH) oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu typu I (IGF-I) w hepatocytach oraz plazmie krwi w oparciu o kompetycyjny test ELISA. Przed sekrecją dojrzałego białka do krwioobiegu mRNA ulega translacji, po czym po jej zakończeniu może być ponownie wykorzystany w kolejnej rundzie tego procesu. Dlatego też na podstawie ilości mRNA nie można określić dokładnego stężenia białka we krwi. Ponadto po przeprowadzeniu translacji łańcuchy peptydowe ulegają obróbkom posttranslacyjnym, podczas których powstaje dojrzałe białko. W zależności od rodzaju oraz przeznaczenia białka mogą one ulegać specyficznemu fałdowaniu, proteolitycznemu rozszczepieniu, modyfikacjom chemicznym (przyłączenie grup chemicznych do aminokwasów) bądź wycinaniu intein. Po wprowadzeniu wszystkich koniecznych modyfikacji białko przyjmuje formę dojrzałą (Brown 1999, Lodish i in. 2007). Dodatkowo na ostateczny poziom białek wpływa wiele czynników działających antagonistycznie (Benedet i in. 2010). W przypadku hormonu wzrostu dojrzałe białko wydzielane jest z komórek somatotropowych na zasadzie egzocytozy. Następnie hormon poprzez dyfuzję przemieszcza się w kierunku błon podstawnych, które wraz z komórkami gwiaździstymi tworzą usieciowaną strukturę. Dokładny mechanizm procesu dyfuzji oraz wydzielenia hormonu do krwioobiegu nie jest znany. Uważa się, że u karasia pospolitego sekrecja tego hormonu jest regulowana stężeniem tlenku azotu produkowanym z L-argininy w przysadce przez enzym syntazę tlenku azotu (Uretsky i Chang 2000). Ponadto dzięki badaniom nad sekrecją GH *in vivo* i *in vitro* okazało się, że hormon w układzie krążenia musi podlegać dodatkowym modyfikacjom strukturalnym. Podejrzewa się także, że może on się łączyć z białkami transportowymi podobnymi do tych, jakie występują u ludzi (Carmignac i in. 1993, Holloway i in. 1996). Nadal jednak nie ma informacji na temat istnienia takich białek u ryb. Dlatego w celu poznania rzeczywistego potencjału wzrostowego ryby koniecznym jest przebadanie możliwie wszystkich znanych wskaźników mogących charakteryzować możliwości wzrostowe osobnika. W omawianej pracy wybrano jako takie wskaźniki stężenia GH i IGF-I w hepatocytach i plazmie krwi.

Analizując uzyskane wyniki stężeń dla hormonu wzrostu, można zauważyć, że jego stężenie w plazmie krwi oraz komórkach wątroby osiągnęło maksymalną wartość

w temperaturze 20 ºC. Stężenie GH w plazmie krwi niezależnie u obu płci zostało także potwierdzone analizą statystyczną. Podobnie jak w przypadku drugiego badanego białka (IGF-I), wyniki uzyskane dla temperatury 20^{o}C wskazują na najwyższe możliwości wzrostowe ryb. Wynika to z wielkości uzyskanych stężeń IGF-I. Podobne zależności otrzymano w trakcie badań nad doradą (Pérez-Sánchez i in. 1994**)**. Według autorów w wodzie o temperaturze 20^{o}C, stężenie hormonu wzrostu było największe, gdyż receptory dla GH nie przyjęły jeszcze prawidłowej konformacji przestrzennej. Zmiany konformacyjne w budowie receptorów uważane są za jeden ze sposobów kontrolowania osi somatotropowej. W przypadku GH krąży on we krwi i nie może poprzez GHR aktywować kaskady czynników wewnątrzkomórkowych. Stan taki u organizmów określany jest mianem GH oporności komórek które posiadają GHR (Sumpter i in. 1991, Gray i in. 1992). Konsekwencją tejże oporności jest niskie stężenie IGF-I w plazmie krwi, wynikające z braku aktywacji GHR a tym samym transdukcji sygnału warunkującego transkrypcję genu dla tego białka. Odwrotną zależność dla dorady zaobserwowano, gdy temperatura wody oscylowała wokół 25 °C (Pérez-Sánchez i in. 1994**)**. Inne interesujące wyniki badań nad rybą *Rhabdosargus sarba* przedstawili Dane i Woo (2006). Wykazali oni, że wzrost temperatury z 12 do 25 ºC spowodował 1,6 krotne zmniejszenie ilości transkryptu mRNA *gh* oraz 1,8 krotne obniżenie stężenia GH w plazmie krwi tej ryby. Wyjaśnieniem stanu, w którym stężenie GH w wyższych temperaturach spada jest to, że GHR przyjmuje właściwą konformację przestrzenną do związania GH. Dzięki temu wiąże on GH z krwioobiegu, co automatycznie powoduje spadek jego stężenia w plazmie krwi. Związanie GH powoduje aktywację GHR oraz transdukcję sygnału we wnętrzu komórki do inicjacji transkrypcji genu insulinopodobnego czynnika wzrostu typu I, czego następstwem jest zwiększające się stężenie IGF-I w plazmie krwi w miarę wzrostu temperatury. Jednocześnie w hepatocytach maleje stężenie IGF-I, ponieważ jest on wydzielany do krwioobiegu Takiej zależności nie stwierdzono w omawianej pracy. Pérez-Sánchez i in. **(**1994**)** zauważyli także istotną zależność między tempem wzrostu mierzonym wskaźnikiem SGR a stężeniami GH i IGF-I w plazmie krwi. SGR było najmniejsze w momencie, gdy stężenie GH w plazmie krwi było najwyższe i odwrotnie, jeśli stężenie GH było niskie a IGF-I wysokie to przyrost osobników był największy. Ponadto zależność wartości SGR od stężenia GH i IGF była identyczna, jak współczynnika PER, czyli przyrostu masy ciała na 1 kg spożytego białka. Oba współczynniki w temperaturze 25 °C, czyli w okresie najwyższego stężenia IGF-I, osiągały największe wartości. Jak

można zauważyć, najwyższe wartości stężenia IGF-I, a nie GH, znajdowały się w plazmie krwi kiedy tempo wzrostu było największe (Deane i Woo 2009, Pérez-Sánchez i in. 1994, Marchant i Peter 1986). Inną przyczyną spadku GH w plazmie krwi (oprócz związania go w GHR) jest mechanizm kontroli sprawowany w obrębie dużej pętli. Wzrastające stężenie IGF-I powoduje zahamowanie syntezy i sekrecji GH poprzez aktywację SRIF (somatostatyny) (Canosa i in. 2007). Istnieją także dowody na to, że wzrastająca temperatura stymuluje transkrypcję genu kodującego czynnik GABA (kwas gamma-aminomasłowy), który następnie hamuje wydzielanie GH z przysadki mózgowej (Fraser i in. 2002).

Przebieg krzywych (Ryc. 60 i 61) obrazujących zależność między stężeniem GH w hepatocytach i plazmie krwi a temperaturą wody w akwarium jest praktycznie identyczny. Wskazują one, że ilość hormonu wzrostu w temperaturze 20°C była największa. Jednakże wyliczone ze wzoru stężenia, na podstawie których stworzono wykres, są bardzo niskie a różnice między nimi nieznaczne. Obraz taki może wynikać z faktu, że hormon wzrostu związany z receptorem nie może się już przyłączyć do przeciwciała użytego w teście ELISA. Należy w tym miejscu podkreślić, iż wybór kompetycyjnego testu ELISA był słuszny. Wynika to z faktu przebiegu omawianych tu krzywych (GH *vs* temperatura, hepatocyty), które swym przebiegiem przypominały te wykreślone dla stężenia GH w plazmie krwi, a wyliczone wartości stężeń były na granicy standardu bądź poniżej. Zatem, dzięki wysokiej czułości testu oraz ekstrapolowaniu wartości stężeń na podstawie przekształconego wzoru możliwym było wykazanie tak subtelnych zmian stężeń GH w wątrobie.

Interesującym jest także to, że stężenie obu białek u samic, było zawsze wyższe niż u samców niezależnie od wariantu temperaturowego. Stan taki jest zbieżny z wcześniej opisywanym dla mRNA *gh* w próbach wątroby samic i znajduje odzwierciedlenie w fenomenie SSD opisanym wielokrotnie dla lina (Milkau 1921, Müller 1961, Kennedy i Fitzmaurice 1970, Wang i in. 2006a**).** Literatura naukowa dostarcza wielu przykładów gdzie poziom GH lub IGF-I był zależny od płci badanego osobnika.

Badania przeprowadzone nad karasiem złocistym (*Carassius auratus*), pstrągiem tęczowym bądź łososiem atlantyckim (*Salmo salar*) potwierdziły, że samice mają wyższy poziom GH we krwi (Marchant i Peter 1986, Björnsson i in. 1994, Holloway i Leatherland 1998). Natomiast odwrotny stan, gdzie samce charakteryzują się wyższym poziomem GH we krwi stwierdzono w badaniach nad halibutem

atlantyckim (*Hippoglossus hippoglossus*). Różnica w poziomie GH miedzy płciami została u nich określona na jeden rząd wielkości (Einarsdóttir i in. 2002).W innych badaniach nad poziomem IGF-I stwierdzono, że u krzyżówki skalników ♀*Morone chrysops* × ♂*Morone saxatilis* poziom tego białka był nieznacznie wyższy u samców niż u samic (Davis i McEntire 2010). Natomiast wyższe stężenie IGF-I u samic potwierdzono u kiżucza, pstrąga tęczowego oraz sterleta (*Acipenser ruthenus*) (Fukada i in. 2003, Wuertz i in. 2007, Tymchuk i in. 2009).

Jak wskazują powyższe przykłady, charakterystyczny poziom GH bądź IGF-I nie jest jedynie przypisany do danej płci w obrębie gatunku. Istnieje wysokie prawdopodobieństwo, że poziom badanych białek w plazmie i hepatocytach linów jest ściśle powiązany z czynnikami ze strony osi gonadotropowej. Szczególnie było to widoczne na podstawie badań nad sterletem, gdzie obie płcie na powierzchni gonad miały porównywalną ilość receptorów dla IGF-I. Istotna różnica występowała natomiast w poziomie mRNA *igf-I,* który u samic był znacznie wyższy. Zwiększony poziom powyższego transkryptu u samic sugeruje silną współzależność między IGF-I a rozwojem gonad, w który zaangażowanych jest wiele hormonów gonadotropowych (Wuertz i in. 2007). Shearer oraz Swanson (2000) przeprowadzili pomiar mRNA *igf-I u* samców czawyczy (*Oncorhynchus tshawytscha*) i stwierdzili ogromny wpływ hormonów: luteinizującego (LH) oraz folikulotropowego (FSH) na aktywność genu kodującego IGF-I. Autorzy porównali aktywność tego genu w okresie przed oraz w momencie okresu dojrzewania samców. Nie można natomiast tych wyników odnieść do aktywności genów u samic, gdyż niestety nie były one ujęte w tych badaniach. Rozważany był natomiast wpływ FSH na poziom IGF-I u samicy pstrąga tęczowego. Stwierdzono mianowicie, że FSH wydzielany w trakcie okresu dojrzewania samic powoduje istotne zwiększenie stężenia IGF-I, który wpływał stymulująco na ich tempo wzrostu (Taylor i in. 2008).

Na podstawie powyższych zależności można wnioskować, że samice wielu gatunków ryb wykazują szybsze tempo wzrostu i jest to związane z okresem dojrzewania. Podczas tego okresu produkcja hormonów warunkujących rozwój gonad i przygotowanie osobnika do okresu tarła wpływa symulująco na funkcjonowanie osi somatotropowej. Ponadto, jak to zostało wskazane, hormony płciowe wywierają swój efekt stymulacyjny zarówno na samice, jak i na samce. Jednakże efekt, jaki wywiera dany hormon płciowy na tempo wzrostu w obrębie płci danego gatunku, jest indywidualny. Względem badanego lina można zasugerować, że konieczne są kolejne

badania w kierunku współzależności, jakie występują między czynnikami osi somatotropowej oraz gonadotropowej. Interesującym jest fakt, że już w 1927 roku Nordquist udowodnił, że od drugiego roku samice lina rosną szybciej niż samce. Dlatego też zestawiając wyniki tej obserwacji z aspektami biologii i fizjologii lina można stwierdzić iż okres dojrzewania musi mieć istotny wpływ szczególnie na tempo wzrostu samic lina.

Wyniki uzyskane dla samic oraz samców wskazują, że wpływ temperatury na ich tempo wzrostu jest statystycznie nieistotny. Wynika to najprawdopodobniej z faktu niskiej liczebności wybranych osobników do badań. Aby temu zaradzić należałoby w przyszłości wykonać badania masowe dysponując liczną grupą osobników. Wiąże się to jednak z dużymi nakładami finansowymi, których wymagają analizy oraz z zapleczem (stawy, baseny), gdzie osobniki przetrzymywane byłyby w kontrolowanych warunkach. Wykonane badania rozważały jeden z wielu czynników, które wpływają na potencjał wzrostowy ryb. Trudno, więc oczekiwać że poprzez przeprowadzenie badań w skali mikro (akwaria) uzyska się jednoznaczne wyniki na podstawie, których będzie można prowadzić udaną selekcję osobników. Jednakże choć wyniki dla płci nie były statystycznie istotne to wskazują na możliwą wyższą aktywność genu hormonu wzrostu u samic.

Przeprowadzone badania w trakcie, których zastosowano dwie odmienne metody pozwoliły na ocenę ich przydatności względem zamierzonego celu selekcyjnego. Pomimo, iż real-time PCR jest techniką bardzo czułą to poziom mRNA *gh* nie dostarczył przydatnych informacji do planowanych prac selekcyjnych. Gdyby jednak zastosować tą metodę do pomiaru IGF-I, który jest czynnikiem bezpośrednio odzwierciedlającym tempo wzrostu możliwe, że okazała by się ona bardziej przydatna. Pomimo, iż największą liczbę krzywych amplifikacji uzyskano w próbach z przysadki mózgowej, to jednak wiązało się to z uśmierceniem ryby w celu jej wypreparowania. Ta cecha tej metody kłóci się z założeniem prac selekcyjnych, gdyż uśmierca się badane osobniki. Możliwym rozwiązaniem mogłyby być biopsje komórek wątroby bądź mięśni ale na podstawie analiz tych prób nie uzyskano rezultatów dla kompletu badanych prób. Co więcej wyniki pozytywne okazały się statystycznie nieistotne.

Wręcz przeciwnie wygląda sytuacja w przypadku drugiej z użytych metod. Kompetycyjny test ELISA umożliwił pomiar stężenia GH i IGF-I w plazmie krwi i hepatocytach. Przy braku statystycznie istotnych wyników dla pomiaru stężeń w hepatocytach, pomiary wykonane w plazmie są statycznie istotne. Wyniki stężeń dla

plazmy krwi pozwoliły na wysunięcie wniosku, że osobniki lina niezależnie od płci charakteryzowały się największym stężeniem badanych białek w plazmie krwi, gdy temperatura wody miała 20 ºC. Dlatego, uznano tą temperaturę za taką, w której badane liny wykazują najwyższy potencjał wzrostowy. Dodatkowo można stwierdzić, że w tej temperaturze produkcja IGF-I w wątrobie przebiega wprost proporcjonalnie do stężenia GH w plazmie krwi. Podsumowując zastosowany test ELISA może zapewnić prowadzenie prac selekcyjnych przyżyciowo, ponieważ pobór krwi z żyły ogonowej można przeprowadzić w sposób nie stwarzający zagrożenia życia dla badanego osobnika.

Analizując strukturę przestrzenną białka możemy stwierdzić, iż ze względu na swa strukturę należy do nadrodziny ligandów hematopoetycznych. Zawiera ono 4 helisy oznaczone jako a, b, c, d biegnące w układzie góra-góra-dół-dół, poczynając od N-końca peptydu. W pętlach łączących helisy znajdują się także minihelisy (Bazan 1990, Chen i in. 1994). Występujące w badanym białku reszty cysteinowe w pozycjach Cys 71, Cys 145, Cys 183, Cys 200 oraz Cys 208 odpowiadają układowi w sekwencji peptydowej zdefiniowanej dla karpiowatych. Cztery z nich są prawdopodobnie zaangażowane w tworzenie mostków dwusiarczkowych pomiędzy dużą helisą na N-końcu a małą na C-końcu. Ponadto w sekwencji białka karpiowatych, jak i obecnie rozważanej, znajdują się dwa charakterystyczne miejsca N-glikozylacji (Fine i in. 1993). Sekwencja peptydowa hormonu wzrostu lina wykazuje również szereg podobieństw względem gatunków ryb należących do rzędu sumowatych oraz kąsaczowatych. Aczkolwiek, różnice te wynikają jedynie z rozmieszczenia charakterystycznych reszt aminokwasowych. Możliwe zatem, że model białka dla tych organizmów byłby konformacyjnie odmienny (Anathy i in. 2001, Pinheiro i in. 2008). Ponadto na podstawie analiz sekwencji mRNA *gh* stwierdzono, że lin jest z filogenetycznego punktu widzenia zaliczany do rodziny karpiowatych, co nie jest żadnym odkryciem. Natomiast bardzo interesującym jest fakt, że w obrębie tej rodziny mRNA genu hormonu wzrostu lina najbardziej jest zbliżone do mRNA *gh* tołpygi białej, pstrej i leszcza chińskiego, które to gatunki naturalnie nie występują w wodach Polski.

7. WNIOSKI

1. Metoda izolacji całkowitego RNA z użyciem Trizolu® jest odpowiednia do badań nad zmianami w aktywności genów poprzez określenie poziomu mRNA.
2. Gen kodujący hormon wzrostu u lina zbudowany jest z pięciu egzonów oddzielonych czterema intronami i jest typowy dla innych ryb w obrębie rodziny karpiowatych.
3. Poprzez skład nukleotydowy mRNA *gh* lin wykazuje największe filogenetyczne podobieństwo do chińskich przedstawicieli karpiowatych: tołpygi białej, pstrej i leszcza chińskiego.
4. Temperatura wody istotnie wpływa na aktywność transkrypcyjną genu hormonu wzrostu lina.
5. Metoda real-time PCR zastosowana do określenia poziomu mRNA *gh* lina nie nadaje się do prowadzenia prac selekcyjnych.
6. Metoda kompetycyjnego testu ELISA zastosowana do oznaczenia stężeń GH i IGF-I w hepatocytach i plazmie krwi umożliwia określenie optymalnej temperatury dla wzrostu linów.
7. Metoda kompetycyjnego testu ELISA zastosowana do oznaczenia stężeń GH i IGF-I w hepatocytach i plazmie krwi umożliwia określenie osobniczego potencjału wzrostowego a co za tym idzie selekcję stada ukierunkowaną na przyspieszenie tempa wzrostu.
8. W temperaturze 20 ºC badane liny wykazały największy potencjał wzrostowy mierzony stężeniami GH i IGF-I.

8. PIŚMIENNICTWO

1. Ágústsson T., Ebbeson L.O.E., Bjőrnsson B. T. 2000. Dopaminergic innervation of the rainbow trout pituitary and stimulatory effect of dopamine on growth hormone secretion *in vitro*. Comparative Physiology and Biochemistry. 127A:355–364.
2. Altındağ A., Yiğit S., Ahıska S. 1998. The growth features of tench (*Tinca tinca* L., 1758) in the Kesikköprü Dam Lake. Turkish Journal of Zoology. 22: 311-318.
3. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology. 215: 403-410.
4. Anathy V., Venugopal T., Koteeswaran R., Pandian T.J., Mathavan S. 2001. Cloning, sequencing and expression of cDNA encoding growth hormone from Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*). Journal of Biosciences. 26: 315-324.
5. Arends R.J., Vermeer H., Martens G.J., Leunissen J.A.,Wendelaar Bonga S.E., Flik G. 1998. Cloning and expression of two proopiomelanocortin mRNAs in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). Molecular Cell Endocrinology. 143: 23–31.
6. Arlinghaus R., Wirth M., Rennert B. 2003. Digestibility measurements in juvenile tench (*Tinca tinca* L.) by using a continuous filtration device for fish faeces. Journal of Applied Ichthyology. 19:152–156.
7. Aronheim A., Engelberg D., Li N., al-Alawi N., Schlessinger J., Karin M. 1994. Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. Cell. 78(6): 949–961.
8. Atwell S., Ultsch M., De Vos A.M., Wells J.A. 1997. Structural plasticity in a remodeled protein-protein interface. Science. 278 (5340):1125-8.
9. Baumbach W.R., Bingham B. 1995. One class of growth hormone (GH) receptor and binding protein messenger ribonucleic acid in rat liver, GHR1, is sexually dimorphic and regulated by GH. Endocrinology 136: 749-760.
10. Bazan J.F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 87, 6934-6938.
11. Benedet S., Andersson E., Mittelholzer C., Taranger G.L., Björnsson B.T. 2010**.** Pituitary and plasma growth hormone dynamics during sexual maturation of female Atlantic salmon. General and Comparative Endocrinology. 167(1): 77-85.

12. Billard R. Flajshans M. 1995. The current state of research and culture of tench, *Tinca tinca* Linnaeus (1758). Concluding remarks on the workshop. Polish Archives of Hydrobiology. 42: 219–225.
13. Björnsson B.T., Johansson V., Benedet S., Einarsdottir I.E., Hildahl J., Agustsson T., Jönsson E. 2002. Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanism and mode of actions. Fish Physiology and Biochemistry. 27: 227–242.
14. Björnsson B.Th., Taranger G.L., Hansen T., Stefansson S.O., Haux C. 1994. The interrelation between photoperiod, growth hormone, and sexual maturation of adult Atlantic salmon (*Salmo salar*). General and Comparative Endocrinology. 93: 70–81.
15. Blom N., Sicheritz-Ponten T., Gupta R., Gammeltoft S., Brunak S. 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. Proteomics. 4(6):1633-1649.
16. Boeuf G., Boujard D., Person-Le Ruyet J. 1999. Control of the somatic growth in turbot. Journal of Fish Biology. 55: 128–147.
17. Bolliet V., Aranda A., Boujard T. 2001. Demand-feeding rhythm in rainbow trout and European catWsh. Synchronisation by photoperiod and food availability. Physiology and Behavior. 73: 625–633.
18. Breton B., Horoszewicz L., Bieniarz K., Epler P. 1980b. Temperature and reproduction in tench: Effect of a rise in the annual temperature regime on gonadotropin level, gametogenesis and spawning. ll. The female. Reproduction Nutrition Development. 20: 1011–1024.
19. Breton B., Horoszewicz L., Billard R. and Bieniarz K., 1980a. Temperature and reproduction in tench: Effect of a rise in the annual temperature regime on gonadotropin level, gametogenesis and spawning. l. The male. Reproduction Nutrition Development. 20: 105–118.
20. Brown T.A. 1999. Genomes. BIOS Scientific Publishers Limited. North Yorkshire.
21. Bustin S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology. 25:169–193.
22. Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective**.** Journal of Molecular Endocrinology. 34:597-601.
23. Bustin S.A.[red.] 2004. A-Z of Quantitative PCR. International University Line. La Jolla.

24. Butler A.A., Le Roith D. 2001. Control of growth by the somatropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles, Annual Review of Physiology. 63: 141–164.
25. Canosa L.F., Chang J.P., Peter R.E. 2007. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. General and Comparative Endocrinology. 151: 1–26.
26. Canosa L.F., Peter R.E. 2005. Pre-pro-somatostatin-III may have cortistatin-like functions in fish. Annals of the New York Academy of Sciences.1040: 253–256.
27. Canosa L.F., Peter R.E. 2006. Neuropeptide control of growth hormone surge during ovulation in goldfish. Journal of Experimental Zoology. 305A: 115.
28. Carmignac D.F., Gabrielsson B.G., Robinson I.C.A.F. 1993. Growth hormone binding protein in the rat: effects of gonadal steroids. Endocrinology. 133, 2445-2452.
29. Castillo J., Ammendrup-Johnsen I., Codina M., Navarro I., Gutiérrez J. 2006. IGF-I and insulin receptor signal transduction in trout muscle cells. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 290: R1683–R1690.
30. Cavari B., Funkenstein B., Chen T.T., Powers D.A. 1993. Recombinant growth hormones. W: Muir J. F., Roberts R. J. (wyd.), Recent Advances in Aquaculture IV. 119 - 129. Blackwells Scientific Publications, Oxford.
31. Celada J.D., Aguilera A., Carral J.M., Sa´ez-Royuela M., Melendre P.M. 2008. Rearing tench (*Tinca tinca* L.) larvae on live feed (Artemia) and on two transition schedules from live to dry diets. Journal of Applied Ichthyology. 24: 595–600.
32. Celada J.D., Carral J.M., Rodríguez R., Sáez-Royuela M., Aguilera A., Melendre P.M., Martín J. 2007. Tench (*Tinca tinca* L.) larvae rearing under controlled conditions: density and basic supply of Artemia nauplii as the sole food. Aquaculture International. 15:489–495.
33. Chen T.T., Marsh A., Shamblott M.J., Chan K.M., Tang Y.L., Cheng C.M., Yang B.Y., 1994. Structure and evolution of fish growth hormone and insulin-like growth factor genes. Fish Physiology. XIII: 179–209.
34. Chevassus B., Quillet E., Krieg F., Hollebecq M. G., Mambrini M., Faure A., Labbe L., Hiseux J. P., Vandeputte M. 2004. Enhanced individual selection for selecting fast growing fish: the "PROSPER" method, with application on brown trout (*Salmo trutta fario*). Genetics Selection Evolution. 36: 643-661.
35. Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry. 162: 156-159.

36. Clackson T., Ultsch M.H., Wells J.A., de Vos A.M., 1998. Structural and functional analysis of the 1:1 growth hormone:receptor complex reveals the molecular basis for receptor affinity. Journal of Molecular Biology. 277: 1111-1128.
37. Crick F. 1988. The genetic code. What mad pursuit: a personal view of scientific discovery. New York: Basic Books. s. 89–101.
38. Davis K.B., McEntire M. 2010. Influence of reproductive status, sex hormones and temperature on plasma IGF-I concentrations in sunshine bass (*Morone chrysops*×*Morone saxatilis*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A. doi:10.1016/j.cbpa.2010.05.011.
39. Deane E.E., Woo N.Y.S. 2005. Upregulation of the somatotropic axis is correlated with increased G6PDH expression in black sea bream adapted to iso-osmotic salinity. Annals of the New York Academy of Sciences 1040: 293–296.
40. Deane E.E., Woo N.Y.S. 2006. Molecular cloning of growth hormone from silver sea bream: effects of abiotic and biotic stress on transcriptional and translational expression. Biochemical and Biophysical Research Communications. 342: 1077–1082.
41. Deane E.E., Woo N.Y.S. 2009. Modulation of fish growth hormone levels by salinity, temperature, pollutants and aquaculture related stress: a review. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 19:1, 97-120.
42. Devlin R.H., Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture 208: 191–364.
43. Duan C. 1998. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. Journal of Nutrition. 128: 306S–314S.
44. Duan C., Plisetskaya E. M., 1993. Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I mRNA expression in salmon tissues. Journal of Endocrinology. 139: 243–252.
45. Eilertson C.D., Sheridan M.A. 1993. Differential-effects of somatostatin-14 and somatostatin-25 on carbohydrate and lipid-metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology. 92: 62–70.
46. Einarsdóttir I.E., Sakata S., Björnsson B.Th. 2002. Atlantic halibut growth hormone: structure and plasma levels of sexually mature males and females during photoperiod-regulated annual cycles. General and Comparative Endocrinology. 127: 94–104.
47. Eswar N., Marti-Renom M.A., Webb B., Madhusudhan M.S., Eramian D., Shen M., Pieper U., Sali A. 2006. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. Current Protocols in Bioinformatics. John Wiley & Sons, Inc. 15: 5.6.1-5.6.30.

48. Falcón J., Besseau L., Fazzari D., Attia J., Gaildrat P., Beauchaud M., Boeuf G. 2003. Melatonin modulates secretion of growth hormone and prolactin by trout pituitary glands and cells in culture, Endocrinology 144: 4648–4658.
49. Figueroa J., Hernandez J., Krauskopf M. 1995. Expresión génica de hormona de crecimiento (GH) de carpa (*C. carpio*) durante aclimatización y aclimatación. Noticiero de Biología. 3: 151.
50. Figueroa J., Molina A., Alvarez M., Villanueva J., Reyes A., Leon G., Krauskopf M. 1994. Prolactin gene expression and changes of prolactin pituitary level during the seasonal acclimatization of the carp. Comparative Biochemistry and Physiology. 108B: 551–560.
51. Fine M., Sakal E., Vashdi D., Daniel V., Levanon A., and Lipshitz O. 1993. Recombinant carp (*Cyprinus carpio*) growth hormone: Expression, purification, and determination of biological activity *in vitro* and *in vivo*. General and Comparative Endocrinology. 89:51-61.
52. Fjalestad K.T., Gjedrem T., Gjerde B. 1993. Genetic improvement of disease resistance in fish: an overview. Aquaculture. 111: 65–74.
53. Flajshans M., Kocour M., Gela D., Piackova V. 2004. The first results on relationships among amphimictic diploid, diploid gynogenic and triploid tench, *Tinca tinca* L. under communal testing. Aquaculture International. 12 (1):103–118.
54. Flajshans M., Kohlmann K., Rab P. 2007. Autotriploid tench *Tinca tinca* (L.) larvae obtained by fertilization of eggs previously subjected to post - ovulatory ageing *in vitro* and/or *in vivo*. Journal of Fish Biology. 71: 868-876.
55. Flajshans M., Linhart O. and Kvasnicka P. 1993. Genetic studies of tench (*Tinca tinca* L.). Induced triploidy and tetraploidy and first performance data. Aquaculture. 113: 301–312.
56. Fleige S., Pfaffl M.W. 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. Molecular Aspects of Medicine. 27: 126-139.
57. Florini J.R., Ewton D.Z., Coolican S.A. 1996. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. Endocrinology Review. 17: 481–517.
58. Fraser E.J., Bosma P.T., Trudeau V.L., Docherty K. 2002. The effect of water temperature on the GABAergic and reproductive systems in female and male goldfish (*Carassius auratus*). General and Comparative Endocrinology. 125: 163–175.
59. Fruchtman S., Gift B., Howes B., Borski R. 2001. Insulin-like growth factor-I augments prolactin and inhibits growth hormone release through distinct as well as overlapping

cellular signaling pathways. Comparative Biochemistry and Physiology. 129B: 237–242.

60. Fukada H., Dickey J.T., Pierce A.L., Hodges N., Hara A., Swanson P., Dickhoff W.W. 2003. Gene expression levels of growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I in gonads of maturing coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Fish Physiology and Biochemistry. 28: 335–336.
61. Gabillard J.C., Duval H., Cauty C., Rescan P.Y., Weil C., Le Bail P.Y. 2003. Differential expression of the two GH genes during embryonic development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation with the IGFs system. Molecular Reproduction and Development. 64: 32–40.
62. Gela D., Flajshans M., Kocour M., Rodina M., Linhart O. 2006. Tench (*Tinca tinca*) broodstock management in breeding station under conditions of pond culture: a review. Aquaculture International. 14: 195-203.
63. Gélineau A., Boujard T. 2001. Oral administration of cholecystokinin receptor antagonists increase feed intake in rainbow trout. Journal of Fish Biology. 58: 716–724.
64. Ginalski K., Elofsson A., Fischer D., Rychlewski L. 2003. 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions. Bioinformatics. 19:1015-1018.
65. Gomelsky B. 2003. Chromosome setmanipulation and sex control in common carp: a review. Aquatic of Living Resources. 16:408–415.
66. Govers R., Broeke T., van Kerkhof P., Schwartz A.L., Strous G.J. 1999. Identification of a novel ubiquitin conjugation motif, required for ligand-induced internalization of the growth hormone receptor. European Molecular Biology Organization J: 18.
67. Grabowska J., Witkowski A., Kotusz J. 2008. Inwazyjne gatunki ryb w polskich wodach - zagrożenie dla rodzimej ichtiofauny. Użytkownik Rybacki-Nowa Rzeczywistość. PZW 2008. s. 90 – 96.
68. Gray E.S., Kelley K.M., Law S., Tsai R., Young G., Bern H.A. 1992. Regulation of hepatic growth hormone receptors in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). General and Comparative Endocrinology. 88: 243–252.
69. Guex N., Peitsch M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. Electrophoresis. 18: 2714-2723.
70. Gupta R., Brunak S. 2002. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. Pacific Symposium on Biocomputing. 310-22.
71. Guziur J., Białowąs H., Milczarzewicz W. 2003. Rybactwo stawowe. Oficyna Wydawnicza Hoża.Warszawa.

72. Haidle L,. Janssen J.E., Gharbi K., Moghadam H.K., Ferguson M.M., Danzmann R.G. 2008. Determination of quantitative trait loci (QTL) for early maturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Marine Biotechnology. 10(5): 579-92.
73. Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41: 95–98.
74. Harvey S., Murphy A.E., Hull K.L., Luna M., Arámburo C. 2002. Testicular growth hormone (GH) and GH mRNA. Growth Hormone and IGF-1. Research. 12: 262.
75. Hattori N., Shimatsu, A., Sugita M., Kumagi S., Immura H. 1990. Immunoreactive growth hormone (GH) secretion by human lymphocytes: Augmented release by exogenous GH. Biochemical and Biophysical Research Communications. 168: 396-401.
76. Herrero-Turrión M.J., Rodríguez R.E., Velasco A., Aijón J., González-Sarmiento R., Lara J. M. 2003. Growth hormone expression in ontogenic development in gilthead sea bream. Cell and Tissue Research. 313:81-91.
77. Hoffmann B., Depner K., Schirrmeier H., Beer M. 2006. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. Journal of Virological Methods. 136, 200–209.
78. Holloway A. C., Leatherland J. F. 1997. The influence of reproductive status on the stimulatory action of N-methyl-d,l-aspartate on growth hormone secretion, in vitro in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, Fish Physiology and Biochemistry. 16: 411–418.
79. Holloway A.C. 1996. Influence of gonadal steroid hormones on factors controlling growth hormone secretion in rainbow trout. PhD thesis, University of Guelph, Canada.
80. Holloway A.C., Leatherland J.F. 1998. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion in teleost fishes with emphasis on the involvement of gonadal sex steroids. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 8: 409–429.
81. Horoszewicz L., Bieniarz K., Epler P. 1981. Effect of different thermal regimes on reproductive cycles of tench *Tinca tinca* (L.). Part IV. Duration and temperature of spawnings. Polish Archives of Hydrobiology. 28: 207–216.
82. Jeanmougin F., Thompson J.D., Gouy M., Higgins D.G., Gibson T.J. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. Trends in Biochemical Sciences. 23: 403-405.
83. Jomain J.B., Tallet E., Broutin I., Hoos S., van Agthoven J., Ducruix A., Kelly P.A., Kragelund B.B., England P., Goffin V. 2007. Structural and thermodynamic bases for the design of pure prolactin receptor antagonists: X-ray structure of Del1-9-G129R-hPRL. Journal of Biological Chemistry. 282 (45): 33118-33131.

84. Julenius K., Molgaard A., Gupta R., Brunak S. 2005. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. Glycobiology. 15(2): 153–164.
85. Kah O., Anglade I., LepreÃtre E., Dubourg P., de Monbrison D. 1993. The reproductive brain in fish. Fish Physiology and Biochemistry. 11: 85-98.
86. Kaján L, Rychlewski L. 2007. Evaluation of 3D-Jury on CASP7 models. BMC Bioinformatics. 8: 304.
87. Kakizawa S., Kaneko T., Hasegawa S., Hirano T. 1995. Effects of feeding, fasting, background adaptation, acute stress and exhaustive exercise on the plasma somatolactin concentrations in rainbow trout. General and Comparative Endocrinology. 98: 137–146.
88. Kamler E, Myszkowski L, Kamiński R, Korwin-Kossakowski M, Wolnicki J. 2006. Does overfeeding affect tench *Tinca tinca* (L.) juveniles? Aquaculture International. 14: 99–111.
89. Kato M. 1995. Withdrawal of somatostatin augments L-type Ca2+ current in primary cultured rat somatotrophs. Journal of Neuroendocrinology. 7: 855–859.
90. Kato M., Sakuma Y. 1997. Regulation by growth hormone-releasing hormone and somatostatin of a Na+ current in the primary cultured rat somatotroph. Endocrinology. 138: 5096–5100.
91. Kause A., Ritola O., Paananen T. 2004. Breeding for improved appearance of large rainbow trout in two production environments. Aquaculture Research. 35: 924–930.
92. Kausel G., Vera M.I., San Martin R., Figueroa J., Molina A., Muller M., Martial J., Krauskopf M. 1999. Transcription factor Pit-1 expression is modulated upon seasonal acclimatization of eurythermal ectotherms: Identification of two Pit-1 genes in the carp. Journal of Cellular Biochemistry. 75: 598-609.
93. Kennedy M., Fitzmaurice P. 1970. The biology of the tench *Tinca tinca* (L.) in Irish waters. Proceedings of the Royal Irish Academy. 69: 31-82.
94. Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolvolution. 16: 111-120.
95. Knauer R., Lehle L. 1999. The oligosaccharyltransferase complex from yeast. Biochimica Biophysica Acta. 1426: 259-273.
96. Kohlmann K., Kersten P. 2006. Microsatellite loci in tench: isolation and variability in a test population. Aquaculture International 14: 3-7.

97. Kohlmann K., Kersten P., Flajšhans M. 2007. Comparison of microsatellite variability in wild and cultured tench (*Tinca tinca*). Aquaculture. 272S1: S147–S151
98. Kopchick J.J., Andry J.M. 2000. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. Molecular Genetics and Metabolism. 71: 293-314.
99. Kozak M. 1987. An analysis of 50-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic Acids Research. 15: 8125–8148.
100. Krzykawski S., Keszka S., Więcaszek B., Antoszek A. 1999. Systematyka kręgłoustych i ryb : przewodnik do ćwiczeń. Wydawnictwo Akademii. Szczecin.
101. LeRoith D., Werner H., Beitner-Johnson D., Roberts C.T. 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor -I receptor. Endocrinology Reviews. 16: 143–163.
102. Li J., Smyth P., Cahill S., Denning K., Flavin R., Aherne S., Pirotta M., Guenther S.M., O'Leary J.J., Sheils O. 2008. Improved RNA quality and TaqMan Pre-amplification method (PreAmp) to enhance expression analysis from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) materials. BMC Biotechnology. 8: 10.
103. Li W.S., Chen D., Wong A.O., Lin H.R. 2005. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). General and Comparative Endocrinology. 144 78–89.
104. Linhart O., Kvasnicka P., Flajshans M., Kasal A., Rab P., Palecek J., Slechta V., Hamackova J., Prokes M. 1995. Genetic studies with tench, *Tinca tinca* L.: induced meiotic gynogenesis and sex reversal. Aquaculture. 132: 239–251.
105. Lirski A. 2007. Trendy w polskiej akwakulturze. Magazyn Przemysłu Rybnego nr 4 (58) 58-59.
106. Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Bretscher A. 2007. Molecular cell biology. Macmillan Publishers Limited. Basingstoke.
107. Lüthy R., Bowie J., Eisenberg D. 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. Nature. 356(6364): 283–85.
108. Lynn S.G., Powell K.A., Westneat D.F., Shepherd B. S. 2009. Seasonal and sex-specific mRNA levels of key endocrine genes in adult yellow perch (*Perca flavescens*) from Lake Erie. Marine Biotechnology (NY). 11(2): 210-22.
109. Maggiano N., Piantelli M., Ricci R., Larocca L. M., Capelli A., Ranelletti F. O. 1994. Detection of growth hormone-producing cells in human thymus by immunohistochemistry and nonradioactive in situ hybridization. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 42:1349-1354.

110. Mair G.C., Abucay J.S., Skibinski D.O. F., Abella T.A., Beardmore J.A. 1997. Genetic manipulation of sex ratio for the largescale production of all-male tilapia, *Oreochromis niloticus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 54: 396–404.
111. Marchant T.A, Peter R.E. 1986. Seasonal variations in body growth rates and circulating levels of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus*. Journal of Experimental Zoology. 237: 231–239.
112. Marino J.H., Cook P., Miller K.S. 2003. Accurate and statistically verified quantification of relative mRNA abundances using SYBR Green I and real-time RT-PCR. Journal of Immunological Methods. 283: 291-306.
113. Matthews S.J., Kinhult A.K., Hoeben P., Sara V.R., Anderson T.A. 1997. Nutritional regulation of insulin-like growth factor I mRNA expression in barramundi, *Lates calcarifer*. Journal of Molecular Endocrinology. 18: 273–276.
114. Meuwissen T.H.E., Sonesson A.K. 2004. Genotype-assisted optimum contribution selection to maximise selection response over a specified time period. Genetic Research. 84: 109–116.
115. Meyer D.J., Campbell G.S., Cochran B.H., Argetsinger L.S., Larner A.C., Finbloom D.S., Carter-Su C., Schwartz J. 1994. Growth hormone induces a DNA binding factor related to the interferon-stimulated 91-kDa transcription factor. Journal of Biological Chemistry. 269(7): 4701–4704.
116. Milkau V., 1921. Die Resultate der Quolsdorfer Schleienzucht, ein Ansporn für die Forellenzucht. Fischerei-Zeitung (Neudamm). 24: 261–263
117. Mommsen T.P. 2001. Paradigms of growth in fish, Comparative Biochemistry and Physiology. 129B: 207–219.
118. Montero M., Yon L., Rousseau K., Fournier A., Dufour S. Vaudry H. 1988. Distribution, characterization, and growth hormone releasing activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the European eel, *Anguilla Anguilla*. Endocrinology. 139: 4300–4310.
119. Moutoussamy S., Kelly P.A., Finidori J. 1998. Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signaling. European Journal of Biochemistry. 5: 1-11.
120. Müller W. 1961. Schlechtes Schleienwachstum bei intensiver Karpfenteichwirtschaft. Deutsche Fischereizeitung. 8: 256
121. Nakae J., Kido Y., Accili D. 2001. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. Endocrinology Review. 22: 818–835.

122. Nielsen E.E., Hansen M.M., Mensberg K.-L.D. 1998. Improved primer sequences for the mitochondrial ND1, ND3/4 and ND5/6 segments in salmonid fishes. Application to RFLP analysis of Atlantic salmon. Journal of Fish Biology. 53, 216-220.
123. Noga E.J. 2000. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. Iowa State University Press. Ames.
124. Nordquist M. 1927. Experiments concerning growth rate and yield potential of two different tench strains. Skrifter Utgifna af Soedra Sveriges Fiskenfoerening. 3: 82–104.
125. Overturf K.D. Bullock LaPatra S., Hardy R. 2004. Genetic selection and molecular analysis of domesticated rainbow trout for enhanced growth on alternative diet sources. Environmental Biology of Fishes. 69: 409–418.
126. Parker D.B., Power M.E., Swanson P., Rivier J. Sherwood N.M. 1997. Exon skipping in the gene encoding pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in salmon alters the expression of two hormones that stimulate growth hormone release. Endocrinology. 138: 414–423.
127. Parrizas M., Plisetskaya E.M., Planas J., Gutierrez J. 1995. Abundant insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor binding in fish skeletal muscle. General and Comparative Endocrinology. 98: 16–25.
128. Paul S., Pramanick K., Kundu S., Bandyopadhyay A., Mukherjee D. 2009. Involvement of PI3 kinase and MAP kinase in IGF-I- and insulin-induced oocyte maturation in *Cyprinus carpio*. Molecular Cell Endocrinology. 309(1-2): 93-100.
129. Peng C., Humphries S., Peter R.E., Rivier J. E., Blomqvist A.G., Larhammar D. 1993. Actions of goldfish neuropeptide Y on the secretion of growth hormone and gonadotropin-II in female goldfish. General and Comparative Endocrinology. 90: 306–317.
130. Peng C., Peter R.E. 1997. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion and growth in fish. Zoological Studies. 36: 79–89.
131. Pérez-Sánchez J., Marti-Palanca H., Le Bail P.Y. 1994. Seasonal changes in circulating growth hormone (GH), hepatic GH-binding protein and plasma insulin-like growth factor-1 immunoreactivty in a marine fish, gilthead sea bream, *Sparus aurata*. Fish Physiology and Biochemistry. 13: 199–208.
132. Peter R.E., Yu K.L. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 7: 173–197.

133. Peterson B.C., Bilodeau-Bourgeois A.L., Small B.C. 2009. Response of the somatotropic axis to alterations in feed intake of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Comparative Biochemistry and Physiology. 153 (4): 457-463.
134. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. 2004. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. Journal of Computational Chemistry. 13:1605-12.
135. Pinheiro J.S., Wolff J.L.C., Araújo R.C., Hilsdorf A.W.S. 2008. Molecular cloning and sequence analysis of growth hormone cDNA of Neotropical freshwater fish Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Genetics and Molecular Biology. 31: 381-384.
136. Pombo C.M., Zalvide J., Gaylinn B.D., Dieguez C. 2000. Growth hormonereleasing hormone stimulates mitogen-activated protein kinase. Endocrinology. 141, 2113–2119.
137. Poppi L., Dixit V. D., Baratta M., Giustina C., Parvizi N. 2002. Growth hormone secretagogue (GHS) analogue, hexarelin stimulates GH from peripheral lymphocytes. Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes. 110: 343–347.
138. Pozios K. C., Ding J., Degger B., Upton Z., Duan C. 2001. IGFs stimulate zebra fish cell proliferation by activating MAP kinase and PI3-kinase-signaling pathways. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 280: R1230–R1239.
139. Quirós M., Alvariño J.M.R. 2000. Growth and survival of tench larvae fed under different feeding strategies. Journal Applied Ichthyology. 16: 32–35.
140. Reddy P.K., Leatherland J.F. 1994. Does the time of feeding affect the diurnal rhythms of plasma hormone and glucose concentration and hepatic glycogen content of rainbow trout? Fish Physiology and Biochemistry. 13: 133–140.
141. Reinecke M., Björn T.B., Walton W.D., Stephen D.M., Isabel No., Deborah M., Joaquim G. 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. General and Comparative Endocrinology. 142: 20–24.
142. Rennert B., Kohlmann K., Hack H. 2003. A performance test with five different strains of tench (*Tinca tinca* L.) under controlled warm water conditions. Journal of Applied Ichthyology. 19(3): 161–164.
143. Riley L.G., Richman III N.H., Hirano T., Grau G. 2002. Activation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis by treatment with 17α-methyltestosterone and seawater rearing in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. General and Comparative Endocrinology. 127: 285–292.

144. Rousseau K., Le Belle N., Pichavant K., Marchelidon J., Chow B.K.C., Boeuf G., Dufour S. 2001. Pituitary growth hormone secretion in the turbot, a phylogenetically recent teleost, is regulated by a species-specific pattern of neuropeptides. Neuroendocrinology. 74: 375–385.
145. Rozen S., Skaletsky H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S., Misener S. (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ. s. 365-386.
146. Saitoh K., Sado T., Mayden R. L., Hanzawa N., Nakamura K., Nishida M., Miya M. 2006. Mitogenomic evolution and interrelationships of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): the first evidence toward resolution of higher-level relationships of the world's largest freshwater fish clade based on 59 whole mitogenome sequences. Journal of Molecular Evolution. 63: 826-841.
147. Sakamoto T., McCormick S.D. 2006. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. General and Comparative Endocrinology. 147: 24–30.
148. Sambrook J., Russell D. W. 2006. The Condensed Protocols From Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
149. Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M.C. 2003. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. Nucleic Acids Research. 31(13): 3381–3385.
150. Šestáková I., Kouřil J., Faina R., Vachta R. 1989. Age dependence of tench (*Tinca tinca* L.) larvae on food selectivity in experimental conditions. Bul VÚRH Vodnany. 25(3):3–11.
151. Šestáková I., Kouřil J., Vachta R. 1988. The effect of the size of early fry of tench (*Tinca tinca* L.) on food preferences in experimental conditions. Bul VÚRH Vodnany. 24(3):3–39.
152. Shearer K.D., Swanson P. 2000. The effect of whole body lipid on early sexual maturation of 1+ age male Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture 190: 343–367.
153. Sheridan M.A., Kittilson J.D. 2004. The role of somatostatins in the regulation of metabolism in fish. Comparative and Biochemical Physiology. 138B: 323–330.
154. Shimizu M., Swanson P., Dickhoff W.W. 1999. Free and protein-bound insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in plasma of coho salmon *Oncorhynchus kisutch.* General and Comparative Endocrinology. 113: 398–405.

155. Sims S.M., Lussier B.T., Kraicer J. 1991. Somatostatin activates an inwardly rectifying K+ conductance in freshly dispersed rat somatotrophs. Journal of Physiology. 441: 615–637.
156. Skrzypczak A., Mamcarz A. 2006. Changes in commercially exploited populations of tench, *Tinca tinca* (L.) in lakes of Northeastern Poland. Aquaculture International. 14:179–193.
157. Small B.C., Nonneman D. 2001. Sequence and expression of a cDNA encoding both pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and growth hormone-releasing hormone-like peptide in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). General and Comparative Endocrinology. 122: 354–363.
158. Small B.C., Peterson B.C. 2005. Establishment of a time-resolved Xuoroimmunoassay for measuring plasma insulin-like growth factor I in fish. Effect of fasting on plasma concentrations and tissue mRNA expression of IGF-I and growth hormone in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Domestic Animal Endocrinology. 28: 202–215.
159. Starmach K. 1951. Chów linów w stawach. Państwowe wydawnictwo rolnicze i leśne. Warszawa.
160. Stewart C.E., Rotwein P. 1996. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. Physiology Review. 76: 1005–1026.
161. Sumpter J.P. 1992. Control of growth of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*. Aquaculture. 100: 299–320.
162. Sumpter J.P., Le Bail P.Y., Pickering A.D., Pottinger T.G., Carragher J.F. 1991. The effect of starvation on plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology. 83: 94-102.
163. Sundstrom M., Lundqvist T., Rodin J., Giebel L.B., Milligan D., Norstedt G. 1996. Crystal structure of an antagonist mutant of human growth hormone, G120R, in complex with its receptor at 2.9 A resolution. Journal of Biological Chemistry. 271(50): 32197-203.
164. Szczerbowski J.A. [red.] 2008. Rybactwo śródlądowe. Instytut Rybactwa Śródlądowego. Olsztyn.
165. Takeda K., Akira S. 2000. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. Cytokine Growth Factor Reviews. 11:199-207.

166. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. 24:1596-1599.

167. Taylor J.F., Porter M.J.R., Bromage N.R., Migaud H. 2008. Relationships between environmental changes, maturity, growth rate and plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female rainbow trout. General and Comparative Endocrinology. 155: 257-270.

168. The Sequence Manipulation Siute, 2010. http://www.bioinformatics.org. 19.07.2010

169. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. 22: 4673–4680.

170. Trudeau V.L., Kah O., Chang J.P., Sloley B.D., Dubourg P., Fraser E.J., Peter R.E. 2000. The inhibitory effects of (gamma)-aminobutyric acid (GABA) on growth hormone secretion in the goldfish are modulated by sex steroids. Journal of Experimental Biology. 203: 1477–1485.

171. Tymchuk W.E., Beckman B., Devlin R.H. 2009. Altered Expression of Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor I Axis Hormones in Domesticated Fish. Endocrinology. 150(4): 1809 - 1816.

172. Uchida K., Kajimura S., Riley L. G., Hirano T., Aida K., Grau E.G. 2003. Effects of fasting on growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. 134: 429–439.

173. Unniappan S., Peter RE., 2005. Structure, distribution and physiological functions of ghrelin in fish. Comparative Biochemistry and Physiology. 140A: 396–408.

174. Uretsky A.D., Chang J.P. 2000. Evidence that nitric oxide is involved in the regulation of growth hormone secretion in goldfish. General and Comparative Endocrinology. 118: 461–470.

175. VanderKuur J., Allevato G., Billestrup N., Norstedt G., Carter-Su C. 1995. Growth hormone-promoted tyrosyl phosphorylation of SHC proteins and SHC association with Grb2. Journal of Biological Chemistry. 270 (13): 7587–93.

176. Vaughan J.M., Rivier J., Spiess J., Peng C., Chang J.P., Peter R.E., Vale W. 1992. Isolation and characterization of hypothalamic growth-hormone releasing factor from common carp, *Cyprinus carpio*. Neuroendocrinology. 56: 539–549.

177. Vojtek A.B., Der C.J. 1998. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. Journal of Biological Chemistry. 273: 19925-8.
178. Volkoff H., Canosa L.F., Unniappan S., Cerdá-Reverter J.M., Bernier N., Kelly S.P., Peter R.E. 2005. Neuropeptides and the control of food intake in fish. General and Comparative Endocrinology. 142: 3–19.
179. Volkoff H., Peyon P., Lin X., Peter R.E. 2000. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a brain bombesin/gastrin-releasing peptide-like peptide goldfish. Peptides. 21: 630–648.
180. Walter E. 1927. Die Schleienzucht. Anweisung zur Zucht und Pflege der Schleie in Teichen, Tümpeln und Seen. J. Neumann, Neudamm. p. 105.
181. Wang J., Liu H., Min W. 2006b. Induced meiotic gynogenesis in tench, *Tinca tinca* (L.) using irradiated heterogenic sperm. Aquacultre International. 14: 35–42.
182. Wang J., Min W., Guan M., Gong L., Ren J., Huang Z., Zheng H., Zhang J., Liu H., Han Y. 2006a. Tench farming in China: present status and future prospects. Aquaculture International. 14:205-208.
183. Waters M. J. 1999. The growth hormone receptor. W: Kostyo J.L., Goodman H.M. (Eds.), Handbook of Physiology. Hormonal Control of Growth. vol. V. Oxford University Press, New York. p. 397–444.
184. Woelfle J., Chia D. J., Rotwein P. 2003. Mechanisms of growth hormone (GH) action. Identification of conserved STAT5 binding sites that mediate GH-induced insulin-like growth factor-I gene activation. Journal of Biological Chemistry. 278: 51261–51266.
185. Wolnicki J., Korwin-Kossakowski M. 1993. Survival and growth of larval and juvenile tench, *Tinca tinca* L., fed different diets under controlled conditions. Aquaculture and Fisheries Management. 24: 707–713.
186. Wolnicki J., Myszkowski L., Kamiński R. 2003. Effect of supplementation of a dry feed with natural food on growth, condition and size distribution of juvenile tench *Tinca tinca* (L.). Journal of Applied Ichthyology. 19: 157–160.
187. Wolnicki J., Myszkowski L., Korwin-Kossakowski M., Kamiński R., Stanny L.A. 2006. Effects of different diets on juvenile tench *Tinca tinca* (L.) reared under controlled conditions. Aquaculture International. 14: 89–98.
188. Wong A.O.L., Chang J.P., Peter R.E. 1993. Characterization of D1 receptors mediating dopamine-stimulated growth hormone release from pituitary cells of the goldfish, *Carassius auratus.* Endocrinology. 133: 577–584.

189. Wong A.O.L., Zhou H., Jiang Y., Ko W.K.W. 2006. Feedback regulation of growth hormone synthesis and secretion in fish and the emerging concept of intrapituitary feedback loop. Comparative and Biochemical Physiology. A144: 284–305.
190. Wood A.W., Duan C.M., Bern H.A. 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. International Review of Cytology. 243A: 215–285.
191. Wren A.M., Small C.J., Fribbens C.V., Neary N.M., Ward H.L., Seal L.J., Ghatei M.A., Bloom S.R. 2002. The hypothalamic mechanisms of the hypophysiotropic action ghrelin. Neuroendocrinology. 76: 316–324.
192. Wuertz S., Gessner J., Kirschbaum F., Kloas W. 2007. Expression of IGF-I and IGF-I receptor in male and female sterlet, *Acipenser ruthenus*—evidence for an important role in gonad maturation. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology.147: 223 230.
193. Xiao D., Chu M.M.S., Lee E.K.Y., Lin H.R., Wong A.O.L. 2002. Regulation of growth hormone release in common carp pituitary cells by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: signal transduction involves cAMP- and calcium-dependent mechanisms. Neuroendocrinology. 76: 325–338.
194. Yang B.Y., Greene M., Chen T.T. 1999. Early embryonic expression of the growth hormone family protein genes in the developing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Molecular Reproduction and Development. 53: 127–134.
195. Youson J.H., La-Mahrouki A.A., Amemiya Y., Graham L.C., Montpetit C.J., Irwin D.M. 2006. The fish endocrine pancreas: research update and future directions in ontogenetic and phylogenetic development. General and Comparative Endocrinology. 148: 105–115.
196. Yunker W.K., Chang J.P. 2004. Somatostain-14 actions on dopamine- and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide evoked Ca2+ signals and growth hormone secretion. Journal of Neuroendocrinology. 16: 684–694.
197. Zhou J., Li W., Kamei H., Duan C. 2008. Duplication of the IGFBP-2 gene in teleost fish: Protein structure and functionality conservation and gene expression divergence. Public Library of Science. 3: e3926.

9. STRESZCZENIE

Gatunkiem ryby, który od zarania polskiego rybactwa jest obecny w gospodarstwach rybackich, jest lin (*Tinca tinca*). Ryba ta, w dawnych czasach szczególnie ceniona ze względu na walory smakowe, z biegiem czasu straciła zainteresowanie ze względu na niskie tempo wzrostu. Dlatego też ogólnym celem pracy było określenie możliwości zastosowania dwóch metod biologii molekularnej (real-time PCR oraz kompetycyjnego testu ELISA) w badaniach służących określeniu potencjału wzrostowego lina. Szczegółowymi celami były natomiast:

- określenie struktury genu hormonu wzrostu lina wraz z określeniem pokrewieństwa względem innych gatunków ryb,
- określenie struktury trzeciorzędowej białka hormonu wzrostu z zaznaczeniem potencjalnych miejsc zaangażowanych w wiązanie z receptorem GH,
- określenie przydatności metody real-time PCR w określaniu możliwości wzrostowych lina,
- określenie przydatności kompetycyjnej odmiany testu ELISA w określaniu możliwości wzrostowych lina,
- określenie wpływu temperatury oraz płci na potencjał wzrostowy lina.

Na potrzeby badań stworzono układ doświadczalny, który składał się z 5 akwariów, w których temperatura wody była utrzymywana odpowiednio na poziomie 10, 15, 20, 25 oraz 30 °C. Przed wprowadzaniem osobników do układu przebadano je pod względem zróżnicowania genetycznego, gdyż jednym z podstawowych założeń była homogenność genetyczna. Równolegle na innej grupie ryb przetestowano dwie odmienne metody izolacji całkowitego RNA, z których wybrano tą z wykorzystaniem odczynnika Trizol ®.

Wykorzystując wspomnianą metodę izolacji, do pomiaru ilości mRNA *gh* lina wybrano real-time PCR. Ilość transkryptów genu *gh* oceniano w próbach z przysadki mózgowej, skrawków wątroby oraz skrawków tkanki mięśniowej w oparciu o krzywe standardowe przygotowane na podstawie rozcieńczeń dziesiętnych dwóch konstruktów RNA. Natomiast pomiar stężenia hormonu wzrostu oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu typu I w próbach hepatocytów oraz plazmie krwi wykonano na podstawie kompetycyjnego testu ELISA. Ponadto po zdefiniowaniu pierwszej kompletnej struktury genu hormonu wzrostu przygotowano na jej podstawie model przestrzenny białka hormonu wzrostu.

Analizując wyniki stwierdzono, że przyjęta metoda real-time PCR z dwoma zestawami krzywych standardowych okazała się wysoce czuła w detekcji mRNA *gh* lina. Stwierdzono dzięki tej metodzie, że ilość produkowanego mRNA *gh* była zależna od zmian temperaturowych. Jednakże nie znalazła ona zastosowania pod kątem prowadzenia prac selekcyjnych. Interesującym jest to, że stężenie białek GH i IGF-I u samic, było zawsze wyższe niż u samców, niezależnie od wariantu temperaturowego. Analizując uzyskane wyniki stężeń dla hormonu wzrostu, zauważono, że jego stężenie w plazmie krwi oraz komórkach wątroby osiągnęło maksymalną wartość w temperaturze 20 ºC. W przypadku stężenia GH w plazmie krwi niezależnie u obu płci zależność powyższą potwierdzono analizą statystyczną. Podobnie w przypadku drugiego badanego białka (IGF-I), wyniki uzyskane dla temperatury 20^{o}C wskazują na najwyższe możliwości wzrostowe ryb.

W badaniach nad sekwencją nukleotydową genu hormonu wzrostu stwierdzono na podstawie mRNA *gh*, że lin jest najbardziej zbliżony filogenetycznie do tołpygi białej, pstrej i leszcza chińskiego, które to gatunki naturalnie nie występują w wodach Polski.

10. SUMMARY

Tench (*Tinca tinca*) is a fish species present in Polish fisheries since the very beginning of fish culture. In former times this fish was in the centre of attention due to its meat taste, but as the time goes on tench has lost interest because of low growth rate.

Concerning the above problem, the general aim of this thesis was to evaluate the possibilities of using real-time PCR and competitive ELISA assay in testing tench growth potential. More specifically, the particular aims were:

- determination of growth hormone gene sequence with following estimation of similarity to other fish species,
- determination of tertiary structure of growth hormone protein with description of potential binding sites to GH receptor,
- verification of usefulness of real-time PCR assay in testing tench growth rate,
- verification of usefulness of competitive ELISA method for evaluation of tench growth potential,
- determination of the optimal water temperature and tench sex against tench growth rate.

In order to verify the influence of temperature and sex on tench growth rate five experimental tanks with water temperatures 10, 15, 20, 25 and 30°C have been used. A group of fish selected for this experiment has been verified according to their genetic homogeneity by means of PCR-RFLP. In parallel with the experiment, another group of tench was used to compare different methods of total RNA isolation, from which Trizol® method was chosen.

After RNA isolation with Trizol® method, mRNA of tench growth hormone in samples from pituitary, muscle and liver has been measured by means of real-time PCR. Amount and concentration of transcripts in isolated samples were calculated using two RNA standard curves. Concentration of growth hormone and insulin-like growth factor type I in hepatocytes and blood serum were measured by competitive ELISA method. Moreover, after description of the first sequence of growth hormone gene, the tertiary structure of this protein has been created.

Analysis of the results revealed that real-time PCR assay with two sets of standard curves has been very useful in estimation of concentration and copy number of

tench mRNA *gh*. Additionally, this method provided evidence that amount of tench *gh* mRNA strictly depends on water temperature. Nevertheless, real-time PCR is not recommended as a appropriate method for fish selection programs.

What is *interesting is that* the research showed that the concentrations of growth hormone and insulin-like growth factor were higher in females than males in spite of the temperature. Moreover, the concentration of growth hormone in blood plasma was the highest at 20 ºC and this was confirmed by statistical analyses for both sexes. This result is similar to the level of IGF-I concentration at 20 ºC and this suggest that this temperature is the best for fish growth.

Analysis of mRNA *gh* of tench revealed that this fish is much more phylogenetically related to Asian fish species, bighead carp, silver carp and wuchang bream, than to Polish representatives of Cyprinidae family.