

Debreceni Egyetem
Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma
Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar

Állattenyésztéstani Tanszék
Tanszékvezető: Dr. Komlósi István, egyetemi tanár

A HYPOPHYSIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID GÉN POLIMORFIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA PCR-SSCP MÓDSZERREL

Készítette:

Homonai Krisztina

Molekuláris biológia MSc II. évfolyam

Témavezető:

Dr. Czeglédi Levente

egyetemi adjunktus

DEBRECEN

2014

Tartalomjegyzék:

BEVEZETÉS	3
1. TÉMAFELVETÉS	4
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. A PACAP gén szerkezete és előfordulása a szervezetben	5
2.2. PACAP-receptorok a szervezetben.....	7
2.3. A PACAP szerepe a gazdasági állatfajokban	8
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	10
3.1. A felhasznált bioinformatikai eszközök	10
3.2. A szarvasmarhákból származó minták	12
3.3. A polimeráz láncreakció optimalizálása	13
3.4. Agaróz gélelektroforézis.....	14
3.5. Egyszálú konformáció polimorfizmus (SSCP) vizsgálat	14
3.6. PCR termék tisztítása.....	16
3.7. PCR-RFLP vizsgálat.....	17
4. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE	19
4.1. .PCR-SSCP módszer.....	19
4.1.1. A hőmérséklet grádiens PCR optimalizációja	19
4.1.2. SSCP módszerrel kimutatott polimorfizmusok	21
4.2. PCR-RFLP vizsgálat.....	24
4.2.1. A 602_603insT polimorfizmus vizsgálata az 1. exonban	24
4.2.2.A G30909A polimorfizmus vizsgálata az 5. exonban	25
5.KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	27
ÖSSZEFOGLALÁS	29
SZAKIRODALOM JEGYZÉK	31
FÜGGELÉK.....	34
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	37
NYILATKOZAT	38

Bevezetés

A hypophysis adenilát cikláz aktiváló peptidet (PACAP) Miyata és munkatársai 1989-ben juh hypothalamusból izolálták először. Vizsgálataik során észrevették, hogy ez a peptid az adenilát cikláz aktivitását erősen stimulálta. Két formáját írták le (PACAP27 és PACAP38), melyek a szekretin/glükagon/vazoaktív intesztinális peptid család tagjai közé tartoznak (Miyata et al., 1989).

A PACAP egy multifunkciós polipeptid, mely számos szervben megtalálható. Szerkezete evolúciósan konzervált a gerincesekben, amely a peptid fontos élettani szerepére utal.

Az értékmérő tulajdonságokat befolyásoló molekuláris faktorok egy sor jelentőséggel bírnak. Az állati termék-előállítás hatékonyságát befolyásolhatják olyan fehérjék, peptidek azonosítása, melyek például a tej- illetve hústermelésben, vagy az állat fenotípusos tulajdonságaiban szerepet játszanak.

A mai világban a növekvő népesség miatt rohamos ütemben nő az állati tej-és húsfogyasztás. Ezeknek az igényeknek kielégítésére a gazdaságok célja, hogy egyre több tejet és húst állítsanak elő. A molekuláris biológia fejlődésével egyre több tanulmány foglalkozik olyan genetikai polimorfizmusok kimutatásával, melyek pozitív hatással bírnak a szarvasmarha értékmérő tulajdonságaira

Radioimmunoesszés (RIA) vizsgálat során kiderült, hogy a PACAP magas koncentrációban van jelen a kérődző állatok tejében, ezáltal szerepet játszhat az újszülött állat szöveteinek növekedésében és differenciálódásában. Receptora (PAC1-R) megtalálható a tüdőben, így feltételezhetően a tejmirigyek fejlődésére is hatással van (Czeglédi et al., 2011).

Eddigi tanulmányokban a qinchuan szarvasmarha ADCYAP génjének egy olyan aminosav cserét okozó variánsát írták le, ami előnyös asszociációt mutat a testsúllyal, a testhosszal, a marmagassággal, a szív kerülettel és tömegével (Ruijie et al., 2010).

Egy másik tanulmányban bizonyították, hogy a PACAP38 az agyalapi mirigy növekedési hormon felszabadulását is szabályozza. Holstein-fríz tinóknak intravénásan injektálva 3 µg/testtömeg kg koncentráció felett kétszeresére emelte a növekedési hormon szérumkoncentrációját. A PACAP38 a növekedési hormont felszabadító hormonnal és a szomatosztatinnal együtt szabályozza a plazma növekedési hormon szintjét így jelentős hatással bírhat a tejelő szarvasmarha és más kérődzők tejtermelésére, valamint az újszülött borjú fejlődésére egyaránt (Radcliff et al., 2001).

1. Téma felvetés.

Előző tanulmányokban leírták, hogy a rágsálókban a hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) génje olyan tulajdonsággal bír, mely szerepet játszhat az állati termék-előállításban.

Napjainkban még keveset tudunk a PACAP és a receptorát kódoló ADCYAP illetve ADCYAP1R1 gén polimorfizmusairól és azok értékmérő tulajdonságokra gyakorolt lehetséges hatásairól.

Dolgozatunkban a PACAP gén öt exonját vizsgálva kerestünk polimorfizmusokat PCR-SSCP módszerrel. Az 1-es exont két részre, az 5-ös exont pedig öt részre felosztva vizsgáltuk, a 2-es, 3-as és 4-es exont egy-egy egységként kezeltük. A PCR-SSCP során a magyar szürke, magyar tarka, holstein, charolais, angus, gatacko és busa fajtákban kerestünk polimorfizmusokat.

Célunk továbbá az azonosított polimorfizmusok több fajtán, nagyobb állatlétszámon PCR-RFLP módszerrel megvizsgálni.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1 A PACAP gén szerkezete és előfordulása a szervezetben

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet (PACAP) Miyata és munkatársai izolálták 1989-ben birka hypothalamusból. Vizsgálataik során azt vették észre, hogy ez a peptid az adenilát cikláz aktivitását erőlyesen stimulálta hypophysis mellső lebeny sejtjeiben (Miyata et al., 1989).

A PACAP génje az emberben a 18. kromoszómán, p11-es pozícióban található, és 2681 nukleotidból áll.

A szervezetben két, biológiailag aktív formában fordul elő:

- *PACAP-38*: 38 aminosavat tartalmazó peptid, kb. 90%-ban fordul elő a szervezetben.
- *PACAP-27*: 27 aminosavat tartalmaz, ez a peptid kisebb mennyiségben található meg a szervezetben (Uddman et al., 1991).

Szerkezete alapján a peptid a szekretin-családhoz tartozik, legközelebbi rokonával a vasoaktív intestinalis polipeptiddel (VIP) 67%-os szerkezeti hasonlóságot mutat (Uddman et al., 1991).

A peptidek szekvenciája azonos birkában, patkányban és emberben. Az, hogy az aminosavszekvencia így konzerválódott az evolúció során, a peptid fontos élettani szerepére utal (Kimura et al., 1990).

A PACAP előfordulása a szervezetben:

Megjelenését és funkcióját tekintve megtalálható idegi és nem idegi struktúrákban is, többek között az endokrin mirigyekben és a gastrointestinalis tractus teljes hosszában (Uddman et al., 1991).

A PACAP a központi idegrendszeren belül, a legnagyobb arányban a hypothalamusban mutatható ki. PACAP-immunpozitív sejteket írtak le a hypothalamus magno- és parvocellularis rendszerében egyaránt. A hypothalamusban található PACAP-pozitív

idegsejtek axonjai a hypophysis hátsó lebenyében végződnek, ahol a peptid a portalis keringésbe ürül. (Köves et al. 1994)

A perifériás idegrendszerben a spinalis ganglionok kis érzőidegsejtjei, ill. a vegetatív pre- és postganglionaris neuronok tartalmazzak PACAP-ot. A PACAP részt vesz a zsigerek simaizomzatának és mirigyeinek beidegzésében is. Az agyalapi erek, az agyszöveten belüli kisebb artériák, valamint a perifériás szervek ereinek falában is vannak PACAP-pozitív rostok (Köves et al., 1993).

A PACAP funkcióját tekintve igen összetett, így az idegrendszeren kívül is számos szervben, mirigyekben is előfordul:

A hypothalamus után a PACAP a herében és a hypophysisben fordul elő legnagyobb mennyiségben. A humán PACAP gént emberi here cDNS-könyvtárból klónozták, így állapították meg a gén nukleotid-szekvenciáját. A hypophysis mellső lebenyében elsősorban a gonadotrop-sejtek termelik. A PACAP-immunreaktív sejtek a hypophysisben legnagyobb számban a mellső lebeny ún. gonadotrop zónájában vannak. Kettős festést alkalmazva a PACAP-immunreaktivitás sok esetben LH-, ill. FSH-immunreaktivitással együtt mutatható ki (Köves et al., 1998).

A PACAP jelen van a pancreas Langerhans-szigetsejtjeiben is, ahol a PAC1-receptoron keresztül stimulálja a béta-sejtekből a glükóz-függő inzulin felszabadulást.

A PACAP részt vesz az exokrin-mirigyek, például a nyálmirigyek és a bélhám beidegzésében is. A pancreasban mind az exokrin-mirigyek, mind a Langerhans-szigetek körül PACAP-immunpozitív rostok figyelhetők meg (Köves et al., 1998).

2.2. PACAP-receptorok a szervezetben

A PACAP hatását a szervezetben specifikus receptorok közvetítik. A receptornak hét transzmembrán doménje van és egy intracelluláris G-fehérjét kötő domén található rajta. A receptor szerkezete hasonló más, a szekretin-családba tartozó peptidek receptorához: 47%-ban hasonlít a szekretin, míg 38%-ban a glükagon-receptorhoz. A jelenlegi hivatalos álláspont szerint a PACAP-nak három receptora van, melyek affinitása a PACAP-hoz és a VIP-hez különböző (Harmar et al., 1998).

A PAC1 két-három nagyságrenddel nagyobb affinitást mutat a PACAP-hoz, mint a VIP-hez. Hat változata ismert. Ezek különböző affinitást mutatnak a PACAP-27 és a PACAP-38 iránt. A VPAC1 a PACAP-ot és a VIP-et azonos affinitással köti. (Nancy et al. 2007) Valójában a VPAC1 azonos a klasszikus VIP-receptorral. A VPAC2-receptoron a PACAP a VIP-pel és a heloderminnel osztozik (Usdin et al., 1994).

A PACAP-receptorok eloszlása függ a receptortípusától. PAC1-receptort lehet kimutatni az agyban, a gerincvelőben, az adenohypophysisben, a mellékvese-velőben és a herében. A VPAC1-receptor a központi idegrendszer mellett megtalálható a tüdőben, a májban, a lépben, a csecsemőmirigyben, a petefészekben és a gastrointestinalis tractusban is (Gottschall et al., 1990).

A PACAP-receptor jelátviteli mechanizmusa:

A PACAP-receptorok G-proteinhez kötött hatásmechanizmussal működnek. A PAC1 a Gs-proteinen keresztül GTP-dependens adenilát-ciklázt aktivál és így növeli az intracelluláris cAMP-szintet, vagy Gq-proteint aktiválva a foszfolipáz C rendszeren keresztül növeli az intracelluláris Ca^{2+} -szintet. Ez történhet azért, hogy az intracelluláris raktárakat üríti ki IP3 közvetítésével, ez egy gyors Ca^{2+} -mobilizáció, vagy a sejtmembrán csatornái nyílnak meg IP4 és DAG közvetítésével, amely egy lassúbb mechanizmus (Ogi et al., 1993).

2.4. A PACAP szerepe gazdasági állatfajokban

A szarvasmarha 24. kromoszómáján található a hypophysis eredetű adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet (PACAP) kódoló gén.

Szarvasmarha esetében a gén 5 exonból áll. Az exonok mérete: 630, 111, 132, 96, és 1668 bp.

A génről két variáns íródik át, a variánsok 176 és 174 aminosavból épülnek fel.

A PACAP eddig leírt szerepe igen sokrétű a szarvasmarhában is, számos olyan mennyiségi tulajdonság kifejeződését befolyásolja közvetetten, melyek alapján az állati termék-előállítás egyik alapvető biológiai markereként értékelhetjük.

A tej különböző biológiai aktivitású fehérjéket és növekedési faktorokat tartalmaz. Ilyenek például a növekedési hormon, az inzulin-szerű, az epidermiális és az idegi eredetű növekedési faktorok, melyek a növekedésben és a differenciálódásban is szerepet játszanak. Egyik biológiai marker lehet például a PACAP is. A PACAP koncentrációja magasabb a tejben, mint a plazmában, feltételezhetően a tejtermelést is serkenti. Radioimmunoesszés (RIA) vizsgálat során kiderült, hogy a PACAP magas koncentrációban van jelen a kérődző állatok tejében, ezáltal szerepet játszhat az újszülött szöveteinek növekedésében és differenciálódásában. Receptora (PAC1-R) megtalálható a tőgyben, így feltételezhetően a tejmirigyek fejlődését is befolyásolja (Czeplédi et al., 2011).

A PACAP in vivo, illetve sejt kultúrában a luteinizáló hormon és a növekedési hormon termelődését is serkenti (Miyata et al., 1989).

A szaporodásban is fontos szerepe van a PACAP-nak, vizsgálatok során nagy mennyiségben a herében volt megtalálható. A nőstény állatokban pedig a petefészekben és a nemi szervek simaizomzatának működésében játszik szerepet (Shioda et al., 1996).

Holstein-fríz tinóknak intravénásan injektálva 3 µg/testtömeg kg koncentráció felett kétszeresére emelte a növekedési hormon szérumkoncentrációját. A PACAP38 a növekedési hormont felszabadító hormonnal és a szomatosztatinnal együtt regulálja a plazma növekedési hormon szintjét így jelentős hatással bírhat a tejelő szarvasmarha és más kérődzők tejtermelésére, valamint az újszülött borjú fejlődésére egyaránt (Ruijie et al., 2011).

Tanulmányok kimutatták, hogy a PACAP gén funkcióját tekintve a juhok esetében is sokrétű. A PACAP hat a központi idegrendszerre, stimulálja a növekedési hormon és a dopamin felszabadulását.

Másrészt az exokrin mirigyekben is megfigyelhető a PACAP hatása, fokozza a hasnyálmirigy termelődését (Takenori et al., 1997).

Csirkékben is végeztek a PACAP hatásával kapcsolatos kísérleteket. Ebben a kísérletben a csirkék viselkedése és a PACAP koncentráció közti összefüggéseit vizsgálták. Azt figyelték meg, hogy PACAP-38 kezelés hatására a csirkék motorikus viselkedése átmenetileg megváltozott, és a társadalmi viselkedésüket jelentősen csökkentette (Hollósy et al., 2004).

3. Anyagok és módszerek

3.1. A felhasznált bioinformatikai eszközök

A szarvasmarha hypophysis adenilát cikláz aktiváló peptid(PACAP vagy ADCYAP1) gén szekvenciáját (1. függelék) az Ensembl adatbázisából töltöttük le (ENSBTAG00000020650) (I1). A PCR-SSCP során használt primereket a Primer3web alkalmazás segítségével terveztük meg (1. táblázat). A primerek tervezésekor figyelembe vettük, hogy az SSCP érzékenysége 500 bázispár termékméret felett jelentősen csökken. A primereket úgy terveztük meg, hogy egy exonon belül a primerek közt átfedés legyen.

Az 1. táblázat tartalmazza a tervezett primerek szekvenciáját, tapadási hőmérsékletét és a keletkező PCR termékek méretét. A T_m a primer optimális tapadási hőmérséklete, ezt az eredményekben bemutatott hőmérséklet grádiens PCR gélek alapján állapítottuk meg.

1. táblázat: A PCR során alkalmazott primerek

Target	Megnevezés	Primer 5'-3' szekvencia	T_m (°C)*	PCR termék mérete (bp)
PACAP exon 1	E1 F1	CGCAACAGTGCAACAAAATA	60	340
	E1 R1	CTGAAGTCCACCGAGAAGAA		
	E1 F2	CTTCTTTCCTTATCACTTCT	60	370
	E1 R2	CCTTGCCATCCAACCTTTAC		
PACAP exon 2	E2 F1	CTCTTTCCCGTCCTCCGCAG	57	151
	E2 R1	CTCGGGCGACTAGCACCTAC		
PACAP exon 3	E3 F1	CCCTCTGGCTACCCGTGCAG	62	170
	E3 R1	CCAGGCTGCACGGCGGTAC		
PACAP exon 4	E4 F1	GCACTTTGCCTCCCTGTTAG	62	137
	E4 R1	TCTTATGCAAACTCTTACCCC		
PACAP exon 5	E5 F1	CGACCCCTCTCCTTGCAG	68	391

	E5 R1	GCATTCTCTAGTGCTTCGT		
	E5 F2	CCTGTGTTCTGTCCCACATG	69	473
	E5 R2	GCCCTAGAGACTCCCTGGGA		
	E5 F3	GATTGCTGAAGGTCTGTCTT	64	339
	E5 R3	TTGCCCTAACCTTGGGATA		
	E5 F4	TGTACTTCCAGGGACCCCAG	68	358
	E5 R4	ACAGTGCGAGAAGGTGGGAA		
	E5 F5	TTTCCTGAAGACTCCTCT	57	363
	E5 R5	GTACTCATACATATGAAGAT		

A PACAP gén öt exonját tíz szakaszra osztottuk fel:

- Az 1. exont két részre osztottuk fel, egy 340 bp és egy 370 bp méretű PCR terméket kaptunk.
- A 2-es exont egy egységként kezeltük, és egy 151 bp méretű PCR termék keletkezett
- 3-as exont egy primerpárral fedtük le, és a PCR termék méret 170 bp lett
- a 4-es exont is egy primerpárral fedtük le, és egy 137 bp méretű PCR terméket kaptuk
- az 5-ös exont öt részre osztottuk fel, a PCR termékek mérete: 391 bp, 473 bp, 339 bp, 358 bp és 363 bp méretű lett.

3.2. A szarvasmarhákból származó minták

Szarvasmarhából izolált DNS rendelkezésünkre állt, illetve vérből izoláltunk DNS-t magyar szürke, magyar tarka, holstein-fríz, charolais, angus, gatacko és busafajtákból.

Vérből DNS izolálás:

1. Eppendorf csőbe 500 µl vérmosó oldatot (pH: 7,6) métrünk, majd a vérmintából 50 µl-t adtunk hozzá.
2. Vortexeltük 30 másodpercen keresztül.
3. Centrifugáltuk: 12000 rpm fordulaton, 2 percig.
4. Felülúszót leöntöttük egy főzőpohárba.
5. 1-4. lépéseket kétszer megismételtük, viszont 50 µl vérmintát már nem adunk az elegyhez.
6. Szárítás papírtörőre fordítva a csöveket, ügyelve arra, hogy a kicsöpögő folyadék ne elegyedjen egymással.
7. Minden mintához 100 µl lízis puffer és 4 µl proteáz hozzáadása.
8. Inkubáció: 37 °C-on 1 órán át, majd az enzim inaktivációja: 95 °C-on 10 percig.
9. Koncentráció mérése NanoDrop 1000 készülékkel, majd tárolás: -20 °C-on.

DNS minták:

1. PCR-SSCP módszer során felhasznált DNS minták: az alábbi fajtákból 5 egyed vizsgálatát végeztük el: magyar szürke, magyar tarka, red angus, és holstein-fríz. A gatacko, busa, charolais és aberdeen angus fajták esetében pedig 4 egyeddel végeztük el a vizsgálatot.
2. PCR-RFLP (1. exon) módszer: 14 egyedet vizsgáltunk az alábbi fajtákból: magyar szürke, magyar tarka, holstein-fríz, charolais, angus. A gatacko és busa fajták esetében 17 egyedet vizsgáltunk.
3. PCR-RFLP (5. exon) módszer: 12 egyedet vizsgáltunk az alábbi fajtákból: magyar szürke, magyar tarka, holstein-fríz, charolais, angus

3.3. A polimeráz láncreakció optimalizálása

A megfelelő primer tapadás hőmérséklet megállapításához hőmérséklet gradiens PCR programot alkalmaztunk a rendelkezésünkre álló Biorad DNA Engine® Thermal Cycler használatával (2. és 3. táblázat). Az optimális primer tapadás hőmérsékletet 1. képen bemutatott hőmérséklet gradiens PCR gélképek alapján határoztuk meg.

2. táblázat: a hőmérséklet gradiens PCR-hoz használt reakcióelegy összetétele

Összetevő	Végkoncentráció
10X DreamTaq® puffer (Thermo Scientific)	1X
dNTP mix (Fermentas)	200 µM
MgCl ₂ oldat (Promega)	4 mM
Forward primer (Sigma)	0,15 µM
Reverse primer (Sigma)	0,15 µM
DreamTaq® DNS polimeráz (Thermo Scientific)	0,5 U
DNS	10 ng

3. táblázat: a hőmérséklet gradiens PCR körülményei

Szakasz	Hőmérséklet (°C)	Időtartam (perc)	Ciklusszám
Kezdeti denaturáció	95	2	1
Denaturáció	95	0,5	35
Primer tapadás	57-69	0,5	
Lánchosszabbítás	72	1	
Végső lánchosszabbítás	72	5	1

A megfelelő primer tapadás hőmérséklet kiválasztásához hőmérséklet gradiens PCR programot alkalmaztunk (3. táblázat), DNA Engine® Thermal Cycler (Biorad) segítségével. A hőmérséklet gradiens PCR során alkalmazott hőmérsékleteket a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: hőmérséklet gradiens PCR hőmérsékletei:

#	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
°C	57	58,1	59	60,4	62,2	64,2	68,1	69

3.4. Agaróz gélelektroforézis

A felszaporított PCR termékeket az alábbi összetételű agaróz gélben választottuk el:

- 2% (m/v) agaróz (SeaKem® LE agaróz, Lonza)
- 1X tris-ecetsav-EDTA puffer (AccuGENE™ 50X TAE puffer, Lonza)
- 1X DNS festék (GelRed™ 10000X, Biotium).

Az elektroforézishez Wide Mini-Sub® Cell GT (Biorad) készüléket használtuk, erre PowerPac™ Basic (Biorad) tápegységgel 10 V/cm állandó feszültséget kapcsoltunk 60 percig. A kapott DNS mintázatokat UV fény segítségével tettük láthatóvá (UVIpro Silver), és számítógép segítségével dokumentáltuk. Az agaróz gélelektroforézis eredményei az 1. képen láthatóak.

3.5. Egyszálú konformáció polimorfizmus (SSCP) vizsgálat

A módszer elve a következő: a polimeráz láncreakció segítségével szelektívenfelszaporított duplaszálú DNS molekulákat magas hőmérsékleten (90-97 °C között)denaturáló szer (formamid) jelenlétébenegyszálúsítjuk. A nem denaturáló gélelektroforézis soránaz egyszálú DNS molekula intramolekuláris hidrogénhidak kialakulása közbenháromdimenziós szerkezetet (konformációt) vesz fel. A kialakuló szerkezet az egyszálú DNShosszától és bázissorrendjétől egyaránt függ, mivel a DNS molekulát két, egymást kiegészítő,de szekvenciájában eltérő szál építi fel, ezért mindkét szál eltérő konformációt vesz fel. Ha aPCR termékek egy része mutációt tartalmaz (heterozigóta minta), négy különböző egyszálú DNS jöhet létre denaturáció után, amik ezt követően négy különböző konformációt vehetnek fel. A kialakultkonformerek háromdimenziós szerkezete méretben és alakban is eltérhet, emiatt különbözősebességgel vándorolhatnak a poliakrilamid gélben (Orita et. al., 1989).

A módszer előnye, hogy speciálisműszert és vegyszereket nem igényel, valamint egyszerűen kivitelezhető.

Hátránya, hogy nemad felvilágosítást a mutáció pontos helyéről, csupán a jelenlétéről.

5 táblázat: az SSCP vizsgálat során használt poliakrilamid gél összetétele

Poliakrilamid gél	Térfogat	Végkoncentráció
40% (m/v) 49:1 akrilamid:bisz-akrilamid arányú oldat (Sigma)	20 ml	10 T% 2 C% (49:1)
5X TBE (445 mM tris-bórsav, 10 mM EDTA, pH: 8.3; Sigma)	9,6 ml	0,6 X
glicerín (Sigma)	4 ml	5% (v/v)
10%-os ammónium-perszulfát oldat (Sigma)	800 µl	0,1% (v/v)
TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin; Sigma)	80 µl	0,1% (v/v)
ddH ₂ O	kiegészítés 80 ml-re	

A PCR termékek egyszálúsítása formamid oldattal

A 9 µl formamid tartalmú töltőoldathoz (95% (v/v) formamid (Sigma), 5% (v/v) brómfenol kék/xilén cianol (Sigma)) 1 µl PCR terméket adtunk. Az elegyet 95 °C-on 5 percig denaturáltuk (egyszálúsítás), majd azonnal jégre helyeztük. A formamid és az alacsony hőmérséklet megakadályozza a komplementer szálak összekapcsolódását. A poliakrilamid gélelektroforézist a PROTEAN® II xi Cell (Biorad) elektroforézis készülékkel végeztük. Az elektroforézis állandó hőmérsékletét, a folyadék keringtető termosztát biztosította (VWR 1160S). A 160x200x0,75 mm formátumú poliakrilamid gélre PowerPac™ Universal (Biorad) tápegység segítségével minden esetben 20V/cm állandó feszültséget kapcsoltunk. Az elektroforézis időtartama az E2 F1-R1; E3 F1-R1 és az E4 F1-R1 primerpárok által kijelölt termék esetén 5 óra az E1 F1-R1; E1 F2-R2; E5 F1-R1; E5 F2-R2; E5 F3-R3; E5 F4-R4; E5 F5-R5 esetén 10 óra volt.

A poliakrilamid gélelektroforézist követően a DNS sávokat ezüsfestéssel tettük láthatóvá, mivel az interkalálódó festékek az egyszálú DNS-t nem festik (Benbouza et al., 2006). A módszer érzékenysége: 1 pg DNS/mm².

Az ezüstoffestés lépései:

1. Fixálás: 10%(v/v) etanol (VWR), 0,5%(v/v) ecetsav (Sigma)

Az 500 ml végtérfogatú fixáló oldat tartalma: 50 ml abszolút etanol, 2,5 ml ecetsav, kiegészítjük 500 ml-re desztillált vízzel. A gél 5 percig rázógépen, a fixáló oldatban tartottuk, majd desztillált vízzel mostuk.

2. Festés: 0,15%(m/v) AgNO_3 (Sigma), 750 μl 37%(v/v)-os formaldehid (Sigma)

Az 500 ml végtérfogatú festőoldat tartalma: 75 ml 1% (m/v)-os AgNO_3 oldat, 750 μl 37%(v/v) formaldehid, kiegészítettük 500 ml-re desztillált vízzel. A gél 7 percig rázógépen, a festő oldatban tartottuk, majd 500 ml desztillált vízzel 15 másodpercig mostuk.

3. Előhívás: 1,5%(v/v) NaOH (VWR), 1,2 ml 37%(v/v)-os formaldehid (Sigma)

A 600 ml végtérfogatú előhívó oldat tartalma: 60 ml 15%-os NaOH oldat, 1,2 ml 37%(v/v) formaldehid, kiegészítettük 600 ml-re desztillált vízzel. 100 ml előhívó oldatot öntöttünk a gélre, a kicsapódott ezüstöt tartalmazó oldatot leöntöttük. A gél 3-5 percig rázógépen, az előhívó oldatban tartottuk, amíg a DNS sávok kontrasztját a háttérhez képest már megfelelőnek ítéltük.

4. Leállítás: 10%(v/v) abszolút etanol (VWR), 0,5%(v/v) ecetsav (Sigma)

Az 500 ml végtérfogatú fixáló oldat tartalma: 50 ml abszolút etanol, 2,5 ml ecetsav, kiegészítettük 500 ml-re desztillált vízzel. A gél 2 percig rázógépen, a leállító oldatban tartottuk.

A leállítást követően a géleket lapolvasó és számítógép segítségével dokumentáltuk.

3.6. PCR termék tisztítása

A DNS szekvenáláshoz a PCR termékeket tisztítani kell, mivel a PCR reakcióelegyben maradt dNTP-k és a primerek megzavarhatják a szekvenálási reakciót.

A tisztítást a PCR Advanced PCR Clean UpTM (Viogene) kittel végeztük a gyártó utasításai szerint. A tisztított PCR termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük, a minták koncentrációját NanoDrop[®] ND-1000 (Thermo Scientific) spektrofotométer

segítségével határoztuk meg, azok koncentrációját egységesen 5 ng/μl-re állítottuk be. A minták szekvenálását a Eurofins MWG Operon végezte.

3.7. PCR-RFLP vizsgálat

PCR-RFLP vizsgálat során az 1. és az 5. exonban lévő polimorfizmust vizsgáltuk a szarvasmarha fajtákban. A mintákban lévő általunk használt DNS szakaszt PCR-reakció során felszorzoztuk (6. és 7. táblázat), majd agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

A PCR termékeket ezután a különböző exonok vizsgálatához megfelelő restrikciós endonukleázzal emésztettük. Agaróz gélelektroforézissel tettük láthatóvá az eredményeket.

6. táblázat: A PCR reakció során összeállított elegy összetétele

Összetevő	Végkoncentráció
10x Dream Taq puffer	1X
dNTP	200μM
MgCl ₂	4mM
R primer (PACAP_E5R1)	0,15 μM
F primer (PACAP_E5F1)	0,15 μM
Dream Taq polimer	0,05 U/μl
DNS templát	0,5 ng/ μl

7. táblázat: PCR reakció lépései

Lépések sorrendje	Hőmérséklet	Időtartam (perc:másodperc)
1.	95 °C	1:30
2.	95 °C	0:30
3.	63 °C	0:30
4.	72 °C	0:30
5.	72 °C	5:00
6.	20 °C	∞

A felszaporított PCR termékeket agaróz gélben választottuk el, melynek az összetétele:

- 1% (m/v) agaróz (SeaKem® LE agaróz, Lonza)
- 1X tris-ecetsav-EDTA puffer (AccuGENE™ 50X TAE puffer, Lonza)
- 1X DNS festék (GelRed™ 10000X, Biotium)

Az elektroforézishez Wide Mini-Sub® Cell GT (Biorad) készüléket használtunk, erre PowerPac™ Basic (Biorad) tápegységgel 10 V/cm állandó feszültséget kapcsoltunk 60 percig. A kapott DNS mintázatokat UV fény segítségével tettük láthatóvá (UVIpro Silver), és számítógép segítségével dokumentáltuk.

A szarvasmarha minták restrikciós emésztése az 1. exon esetében:

SspI hasító helye (mutánsban hasít, „vad”-ban nem):

```
5'...AAT▼ATT...3'
3'...TTA▲TAA...5'
```

Az emésztéshez felhasznált anyagok az 1. exon esetében:

- SspI. restrikciós enzim
- G puffer
- desztillált víz
- PCR termék

A mintákat összeállítva emésztettük a DNS-t 37°C-on 3 órán keresztül, melyet denaturáló lépés követett 65°C-on 20 percen át PCR gépben.

A szarvasmarha minták restrikciós emésztése az 5. exon esetében:

A TseI.enzim hasítóhelye:

```
5'...G▼CGGC...3'
3'...CGWC▲G...5'
```

Az emésztéshez felhasznált anyagok az 5. exon esetében:

- TseI. restrikciós enzim
- CutSmart puffer
- desztillált víz
- PCR termék (PACAP 5. exon első 391 bp)

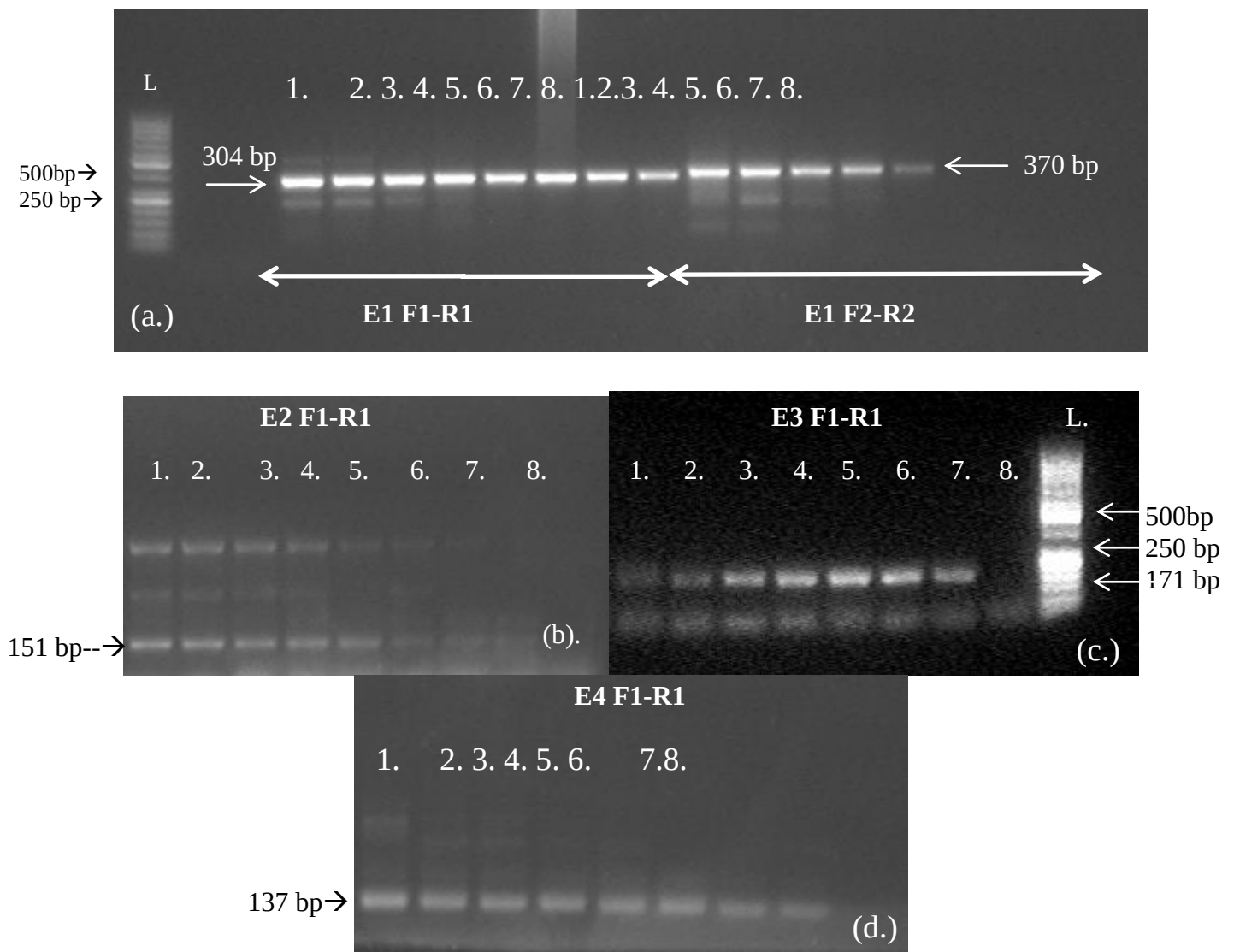
Ezt követően agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük az emésztést.

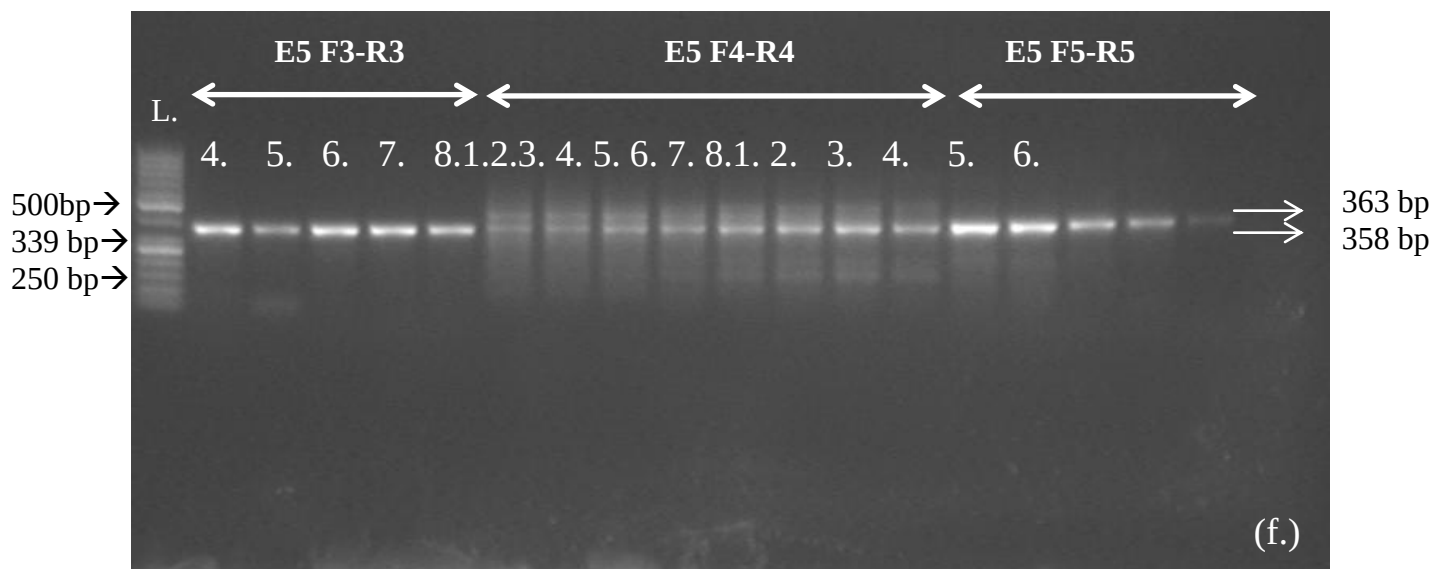
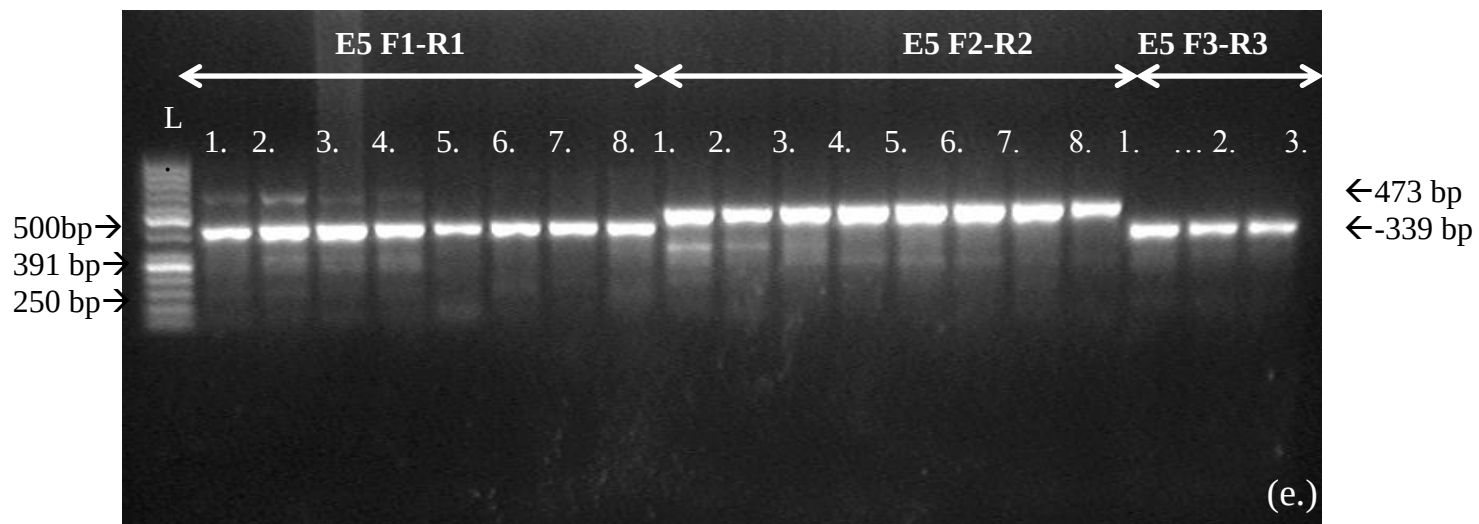
4. Eredmények és azok értékelése

4.1.PCR-SSCP módszer

4.1.1. A hőmérséklet grádiens PCR optimalizációja

1. kép: a hőmérsékletgradiens PCR agaróz géleképei:





L.: GeneRuler™ 50 bp DNS létra (Thermo Scientific)

Az 1. az, b, c, d, e, f képeken a hőmérséklet grádiens PCR agaróz gélelektroforézis képei láthatóak. A primer tapadási hőmérsékletnél azt a hőmérsékletet vettük figyelembe, ahol a sáv erősen látható és melléktermék nem keletkezett.

A 9. táblázatban ismertetett hőmérsékletek közül választottuk ki a megfelelő primer tapadási hőmérsékletet az exonokban:

- az 1. exont két primerpárral fedtük le, és mindkét primerpár tapadási hőmérséklete 60 C° lett
- a 2. exon esetében 57 C° volt az ideális
- a 3 és 4. exon esetében a 62 C°-ot választottuk
- az 5. exont 5 primerpárral fedtük le, és az alábbi primer tapadási hőmérsékleteket választottuk: 68 C°, 69 C°, 64 C°, 68 C°, 57 C°.

4.1.2. SSCP módszerrel kimutatott polimorfizmusok

PCR-SSCP módszer során felhasznált DNS minták: az alábbi fajtákból 5 egyed vizsgálatát végeztük el: magyar szürke, magyar tarka, red angus, és holstein-fríz. A gatacko, busa, charolais és aberdeen angus fajták esetében pedig 4 egyeddel végeztük el.

A PCR-SSCP során az 5 exont 10 szakaszra osztottuk fel. A PCR-SSCP módszer a PACAP gén 1. és 4. exonjában 1-1 polimorfizmust mutatott ki. A különböző polimorfizmusok által létrehozott egyes egyszálú DNS konformerek eltérő mobilitással vándorolnak a poliakrilamid gélelektroforézis során. A módszer nem ad információt a polimorfizmus pontos helyéről, csupán a jelenlétéről. A polimorfizmusok típusának (tranzíció, transzverzió, inzerció, delécio) és pontos pozíciójának megállapításához a minták DNS szekvenálására volt szükség.

2. kép: a PACAP gén 1. exonjában PCR-SSCP módszerrel kimutatott polimorfizmus és az általa létrehozott elméleti genotípus



A 2. képen látható különböző konformációváltozások az AA és BB homozigóta, illetve az AB heterozigóta esetén. A polimorfizmus hatására az egyszálú DNS konformerek eltérő mobilitással vándorolnak a poliakrilamid gélelektroforézis során, ezért különböztethetők meg a genotípusok egymástól.

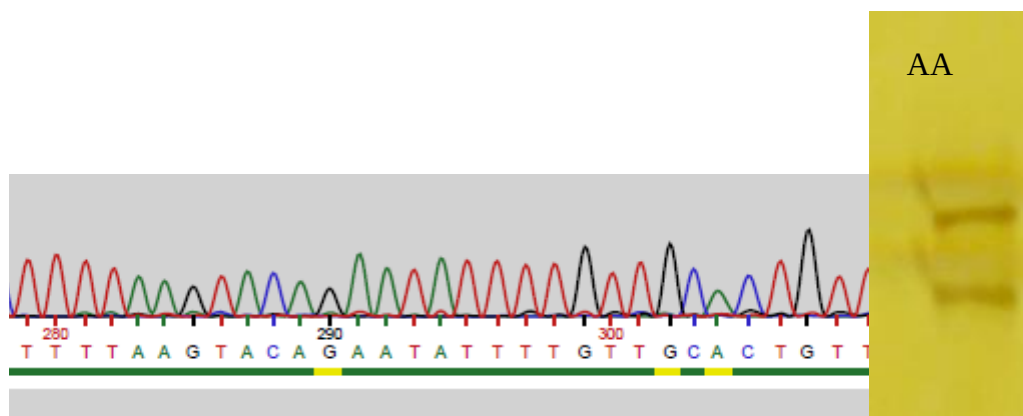
3.kép:a PACAP gén a 4. exonjában PCR-SSCP módszerrel kimutatott polimorfizmus és az általa létrehozott elméleti genotípus



A minták szekvenálását követően az 1. exonban a602_603insTpolimorfizmust kaptuk eredményül.

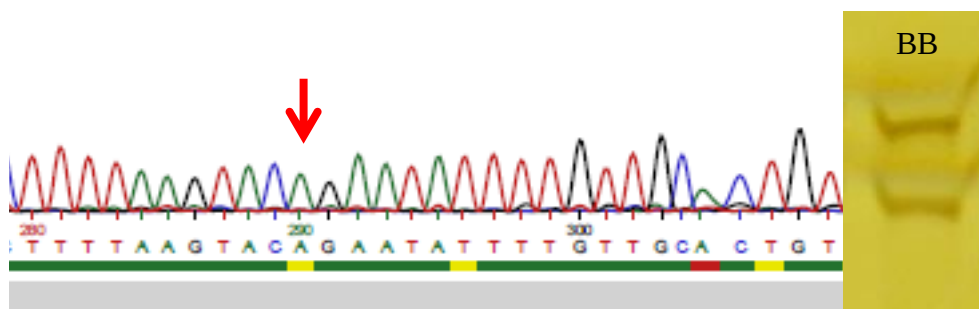
AA genotípus esetén nem volt jelen, míg a BB genotípus esetén megjelent ez a polimorfizmus.

4. kép: az 1.exon szekvenálás eredménye AA genotípus esetében



Az 5. képen a piros nyíl jelöli a 602_603insT SNP-t. Mivel a polimorfizmus az 1. exon elején található, a forward szálon a szekvenálás nem adott eredményt, de a reverz szálon kimutatható volt a polimorfizmus. Ez esetben az adenin helyett timin inzercióról beszélhetünk (A-T).

5. kép: a BB genotípusú homozigóta minta szekvenogramja



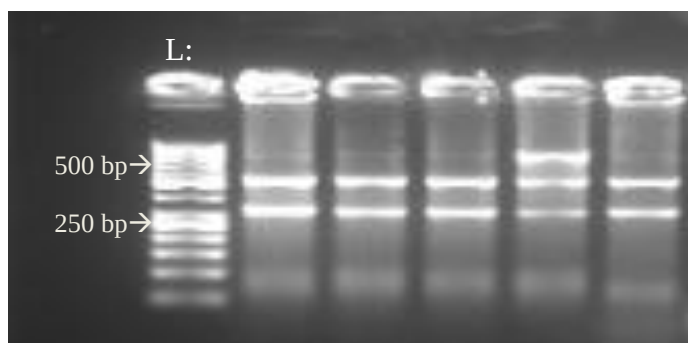
A 4. exon esetében a vizsgált mintáknál azonos volt a DNS szekvencia, nem volt jelen polimorfizmus. Ugyanaz a genotípus különböző konformereket eredményezett.

4.2. PCR-RFLP vizsgálat

4.2.1.A602_603insTpolimorfizmus RFLP vizsgálata

A 602_603insT polimorfizmus hatására egy új restrikciós hasító hely jelent meg a génben, mely az SspI restrikciós endonukleázzal emészthető, ami a 865 bp méretű PCR terméket egy 545 bp méretűre és egy 320 bp méretűre hasítja.

4. kép: Restrikciós emésztés után elvégzett agaróz gélekép



A 4. képen a különböző szarvasmarha fajtákból izolált DNS minták PCR-RFLP módszerrel megemésztett minták láthatóak.

Az L. pozícióban GeneRuler™ 1000 bp DNS létra (Thermo Scientific) látható.

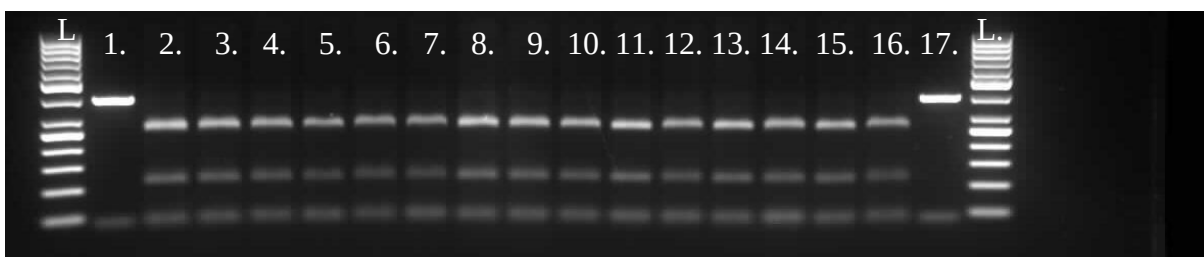
Az emésztést követően a homozigóta mutánsokban a 865 bp-os terméket az enzim egy 545 bp és 320 bp méretű fragmentekre hasítja. Heterozigóta mintáknálemésztett 545 és 320 bp méretű fragment keletkezett, illetve egy emésztetlen 865 bp termék is megjelent, míg a vad típus esetén egy emésztetlen 865 bp méretű termék jelent meg.

PCR-RFLP vizsgálat során az alábbi eredményeket kaptuk az 1. exon esetében:

- Magyar szürke: 11 db homozigóta mutáns, 3 db heterozigóta mutáns
- Magyar tarka: 7 db homozigóta mutáns, 6 db heterozigóta mutáns és 1 db vad típus
- Charolais: 8 db homozigóta mutáns, 4 db heterozigóta mutáns és 2 db vad típus
- Holstein-fríz: 6db homozigóta mutáns
- Angus: 8 db homozigóta mutáns, 1 db heterozigóta mutáns
- Gatacko: 18 db heterozigóta mutáns
- Busa: 12 db homozigóta mutáns, 3 db heterozigóta mutáns és 2 db vad típus jelent meg.

4.2.1. A G3909A polimorfizmus vizsgálata PCR-RFLP módszerrel

5. kép: A G3909A polimorfizmus vizsgálata



Az 5. képen a PCR-RFLP reakció után elvégzett agaróz gélekép látható. Az L-pozícióban egy 50 bp-os DNS létra található, az 1. és 17. helyen pozitív kontroll minta, ami nem volt enzimmel kezelve. A 2-4. pozícióban magyar szürke, az 5-7. pozícióban magyar tarka, 8-10. pozícióban holstein, 11-13. pozícióban charolais és a 14-16. pozícióban pedig angus minták találhatóak.

A felszaporított 391 bp-os szakaszt a TseI. enzim a mutáció jelenlétében 251 és 140 bp-os fragmentekre vágja, míg a mutáció hiányában 33, 107 és 251 bp-os fragmentekre hasítja.

Az emésztést követően agaróz gélen elválasztott sávok esetében a mutáció nélküli fragmentek jelentek meg, vagyis a kiválasztott 5 fajta esetén, nem rokon egyedeket vizsgálva, minden fajtából 12 egyedet véletlenszerűen kiválasztva, nem lehetett kimutatni a polimorfizmus jelenlétét.

5. Következtetések és javaslatok

Kísérleteink során először hőmérséklet grádiens PCR során megállapítottuk a primer tapadásának legoptimálisabb hőmérsékletét. Itt azt vettük figyelembe, hogy a gélképen lévő sáv jól látható legyen és melléktermék ne jelenjen meg.

A PCR reakció után SSCP módszerrel kerestünk polimorfizmusokat a PACAP gén öt exonjában. Eredményeink alapján az 1-es és 4. exonban volt kimutatható polimorfizmus. Mivel az SSCP módszer a mutáció pontos helyét nem adja meg, ezért a PCR termék tisztítása után a terméket szekvenáltattuk.

A DNS szekvenálás eredménye egy polimorfizmust mutatott ki:

- Az 1. exonban előzőleg PCR-SSCP módszerrel meghatározott 602_603insTpolimorfizmus.
- a 4. exonban nem volt jelen polimorfizmus, mivel a szekvencia azonos volt minden vizsgált mintában, az SSCP módszer során csak a konformerek elkülönültek. Ugyanaz a genotípus különböző konformereket eredményezett.

Az 5. exonban kimutatott SNP már előzőleg ismert tanulmányokból a G3909A polimorfizmus.

További célunk volt még, hogy az 1-es és 5-ös exonban lévő mutációkat PCR-RFLP módszerrel az alábbi szarvasmarha fajtákban azonosítsuk: magyar szürke, magyar tarka, holstein, charolais, angus, gatacko és busa.

A602_603insT polimorfizmus hatására egy új restrikciós hasító hely jelent meg a génben, mely az SspI restrikciós endonukleázzal emészthető. Az emésztést követően a homozigóta mutánsokban a 865 bp-os terméket az enzim egy 545 bp és 320 bp méretű fragmentekre hasítja. Heterozigóta mintáknálemésztett 545 és 320 bp méretű fragment keletkezett, illetve egy emésztetlen 865 bp termék is megjelent, míg a vad típus esetén egy emésztetlen 865 bp méretű termék jelent meg.

Az 5. exonban kimutatott G3909A polimorfizmus a TseI. restrikciós endonukleázzal kimutatható. A mutáció jelenlétében 251 és 140 bp-os fragmentekre vágja, míg a mutáció hiányában 33, 107 és 251 bp-os fragmentekre hasítja. Az emésztést követően agaróz gélen elválasztott sávok esetében a mutáció nélküli fragmentek jelentek meg, vagyis a kiválasztott 5 fajta esetén, nem rokon egyedeket vizsgálva, minden fajtából 12 egyedet véletlenszerűen kiválasztva, nem lehetett kimutatni a polimorfizmus jelenlétét.

Összefoglalás

A mai világban a növekvő népesség miatt rohamos ütemben nő az állati tej-és húsfogyasztás. Ezen igények kielégítéséhez növelni kell az előállított hús és tej mennyiségét. A molekuláris biológia fejlődésével egyre több tanulmány foglalkozik olyan genetikai polimorfizmusok kimutatásával, melyek pozitív hatással bírnak a szarvasmarha értékmérő tulajdonságaira

A hypophysis adenilát cikláz aktiváló peptidet (PACAP) 1989-ben juh hypothalamusból izolálták először. Két formáját írták le (PACAP27 és PACAP38), melyek a szekretin/glükagon/vasoaktív intestinalis peptid család tagjai közé tartoznak.

Eddigi tanulmányokban a qinchuan szarvasmarha ADCYAP génjének egy olyan aminosav cserét okozó variánsát írták le, ami előnyös asszociációt mutat a testhosszal, a marmagassággal, a testsúllyal, a szív kerülettel és tömegével.

Napjainkban még keveset tudunk a PACAP és a receptorát kódoló ADCYAP illetve ADCYAP1R1 gén polimorfizmusairól és azok értékmérő tulajdonságokra gyakorolt lehetséges hatásairól.

Dolgozatunkban a PACAP gén öt exonját vizsgálva kerestünk polimorfizmusokat PCR-SSCP módszerrel. A PCR-SSCP során az öt exont tíz szakaszra osztottuk fel.

Célunk továbbá az volt, hogy az azonosított polimorfizmusokat a magyar szürke, magyar tarka, holstein, charolais, angus, gatacko és busa fajtákban PCR-RFLP módszerrel megvizsgáljuk.

Vizsgálataink során a DNS izolálás után PCR reakcióval felsokszoroztuk az általunk kiválasztott DNS szakaszt, majd SSCP módszerrel polimorfizmusokat kerestünk. Az 1-es és 4-es exonban 1-1 konformerek közötti eltérést detektáltunk. Mivel a polimorfizmus pontos helyéről az SSCP nem ad felvilágosítást, ezért a PCR termék tisztítása után a mintákat szekvenáltattuk.

A szekvenálás eredményeképpen egy polimorfizmus volt kimutatható:

Az 602_603insT polimorfizmus mutatható ki az 1. exonban. A 602_603insT hatására egy új restrikciós hasító hely jelent meg a génben, mely az SspI restrikciós endonukleázzal emészthető.

A 4. exonban nem volt jelen polimorfizmus, mivel a szekvencia azonos volt minden vizsgált mintában, az SSCP módszer során csak a konformerek elkülönültek.

Az 5-ös exonban lévő G3909A polimorfizmust eddigi tanulmányokban vizsgálták, és azt találták, hogy ez az SNP előnyös asszociációt mutat a testhosszal és a tömeggel. Öt szarvasmarha fajtában vizsgáltuk RFLP módszerrel ezt az SNP-t. Az általunk vizsgált fajtákban nem lehetett kimutatni a polimorfizmus jelenlétét.

Szakirodalom jegyzék

BENBOUZA, H. - JACQUEMIN, J-M. - BAUDOIN, J-P. - MERGEAI, G. (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 10, 77-81.

CZEGLÉDI L.-TAMÁS, A.-BÖRZSI, R.-BAGOLY, T.-KISS, P.-HORVÁTH, G.-BRUBEL, R.-NÉMETH, J.-SZALONTAI, B.- SZABADFI K.-JÁVOR, A.-REGLŐDI, D.-HELYES, ZS. (2011): Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. *General and comparative endocrinology*. 172, 115-119.

GOTTSCHALL, P. E.-TATSUNO, I.-MIYATA, A.-ARIMURA A.(1990) Characterization and distribution of binding sites for the hypothalamic peptide, PACAP. *Endocrinology*. 127, 272-277.

HARMAR, A. J.-ARIMURA, A.-GOZES, I. (1998) International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacological Reviews*. 50, 265-270.

HOLLÓSY, T.-JOZSA, R.-JAKAB B.-NÉMETH J.-LENGVÁRI I.-REGLŐDI D. (2004) Effects of in ovo treatment with PACAP antagonist on general activity, motor and social behavior of chickens. *Elsevier*. 123, 99-106.

KIMURA, C.-OHKUBO, S.-OGI, K.(1990) A novel peptide wich stimulates adenylate cyclase: molecular cloning and characterization of the ovine and human cDNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 166, 81-89.

KÖVES, K.-GÖRCS, T. J.-KAUSZ, M.(1994) Present status of knowledge about the distribution and colocalization of PACAP in the forebrain, *Acta Biology*. 45, 297-321.

KÖVES, K.-ARIMURA, A.-VÍGH, S.(1993) Immunohistochemical localization of PACAP in the ovine digestive system. *Pept*.14, 449-455.

- KÖVES, K.-KÁNTOR, O.-SCAMMELL, J. G. (1998) PACAP colocalizes with luteinizing and follicle-stimulating hormone immunoreactivities in the anterior lobe of the pituitary gland. *Peptides*. 19, 1069-1072.
- MIYATA, A.-ARIMURA, A.-DAHL, R. R. (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in the pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 164, 567-574.
- NANCY M.-SHERWOOD-BRUCE A.-ADAMY, EMMA R.- ISAAC- SHENG WU-ERICA A.- FRADINGER (2007) Knocked down and out: PACAP in development, reproduction and feeding peptides. *Elsevier*. 28, 1680-1687.
- OGI, K.-MIYAMOTO, Y.-MASUDA, Y.(1993) Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human PACAP receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 196, 1511-1521.
- ORITA, M. - SUZUKI, Y. - SEKIYA, T. - HAYASHI, K. (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 5, 874-879.
- UDDMAN, R.-LUTS, A.-ARIMURA, A.(1991) Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP), a new vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like peptide in the respiratory tract. *Cell and Tissue Research*. 265, 291-297.
- USDIN, T. B.-BONNER, T. I.-MEZEY, E.(1994)Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology*. 135, 2662-2680.
- RADCLIFF, R-LOOKINGLAND, K.-CHAPIN, L.-TUCKER, H.(2001) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces secretion of growth hormone in cattle. *Domestic animal endocrinology*. 21, 187-196.
- RUIJIE, H.-LINSEN, Z.-HONGBAO, W.-XIObI, Z.-LINSHEN, G.-XIANLIN, Z. (2010) Effect of G3909A mutation in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene (PACAP) on the partial growth traits in Qinchuan cattle. *Journal of Agricultural Biotechnology*. 18, 719-724.
- SHIODA,S.-NAKAI, Y.-NAKAJO, S.-NAKAYA, K.-ARIMUARA, (1996): Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its type I receptors in the rat

ovary: immunohistochemistry and in situ hybridization. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 805: 677–683.

TAKENORI, O.-KAZUYUKI, O.-YOSHIJI, H.-HITOSHI, M.-SEIYU, K.(1997) PACAP stimulates pancreatic exocrine secretion via the vagal cholinergic nerves in sheep. *Elsevier*. 72, 147-153.

I1:http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Summary?g=ENSBTAG00000020650;r=24:36114521-36121103letöltve:2014.04.22

FÜGGELÉK

1. függelék

A szarvasmarha (*Bos taurus*) PACAP (ADCYAP1) gén referencia szekvenciája. Ensembl azonosító: ENSBTAG00000020650. Az exonokat pirossal jelöltük.

>chromosome:UMD3.1:24:36113921:36121703:1

TTTCTTTCTAATCTATAACTCTAATCAATTCCACTCAGAGCCAGACTGTCAACCACAGCC
AGACTCATTAGCGATTTACTGAAAATCCTCCAAGATTTCCCTTTAGAAACAAAACGACTT
CCACATTTAATTGTCTATCTAAAAGAACATAGGCAAGAAATTAGGAGATCTAAATTAAAT
TTATTAATAGGAGAGCTTGATGGTGCTTTAATTCCAGAGCCCAGAGCGCTGATTGCTGGG
GCTTGATGAAAAAGCAAAAAGAAAACAAGAGAGACGTAATTAAAAACATTTTTTTTTTTTT
TTACCATTCTCAAGATTCTATGAATTCTTTACCCATCCTTGAGAAGTGGGTAAAACCTGAA
AACCATCGAGGTAATTAAACTCCTTTAAATTGTACAGTATGAGTGAAAGGTGTTTATGAG
AAGTCGATGACTCCGGATCTTATCCAGGAGGACAGCAGAGGATAGTTAATATGTTCCCTTG
AGGGACTAGGATGCTGACGTCTTTTCTGATACCCGATCATTACGTGACTGAAAAA
AAAAAAGGAAGTCATTCCACGTATAAAAAATCGGAGCGCAACAGTGCAACAAAATA
TCTGTACTTAAAAGGCCACAGGCAGACAGATGTTGACAAGAAAGTCTCTTTTGAAACCAC
GTTTCGGATAGATTTCTGCTAACTGCCCAGATAAATAGGAGCAGAGGGCTGGTCACCTCTG
TAATAACCACCGGCAGCAGTAGAAGAAACCGCAGCTTCAGACGCAGCCAGAGAGACTTCT
GAGCAGCGAAGGCGCTTGCTGCTGAGCTGCTGGCCGGGCGGCTGACCCAGACGCCGA
CTTCGCTGAGGCCCTCTCTCTTTCTCTCTCTCTCTCTTTGCTTCTTTCCCTTATCATTCT
TTCTTCTCGGTGGACTTCAGGCCACTTTGTCTCCCACCCACACTCAGCTCGTCGCCCTCCT
CCGTCTTCTCTCCATCTCTCCCCCTCGCCCCCTTCTCTCGGTGTCACGCTCCGTCCTA
GTTCCGAGCGTCGTCAAACCTTTGAACAGAATAACAGGACTCAGCAAACAAGTCCTCCAG
CTCCTCCCGCGGCTCCGGCTCGTTCCTGCGGCTCCTGCTCAGACGCTAACGCCAAACGGC
GATGACTCTTGGGTGTGACTGCAGCGCACAACTTGGAGAAGCCCTTTGCCCGCCGTC
TACTTGGCAGCAAACCTCTCTTGGCAGCGGTAAAGAGTTGGATGGCAAGGAGGGAAAAAA
ATCTTACCAAACAACCTCACCTGGTTGCTAATTCTTTTGCTGGCTTCGGGGTACGAGTTAG
CTTTTCTGGGCGCCAGCTCTGGCGAGTTACTGGGCACTGGATAGATACAGGCGTATTTTC
TAACTATAACGAGAAGGAAGTGCGGGGCGAGCCGGCTTGTTGTTAAGCAGGATTCAACC
CTGGGAGTCGGAGGGGAGCTCCGGGCTCCCCAGTTTCGAGGAGTTTCTAGGGGGTCCGG
GGTGGGGGTGGTGGAAGGCCAGGGGCGTTGGGACTGCTGCGTGATCTCTTTCCCGTCCTG
CGCAG**AATGACCATGTGTAGCGGAGCGAGGCTGGCCCTGCTCGTTTACGGGATACTGATG**
CACAGCAGCGTCTACGGCTCACCTGCCGCTCCGGACTCCGGTTCCCGGGGATCAGGTAG
GTGCTAGCCGCCCAGCGGAGCGGAGGCCGGGACTTGTCGTCCCCCCCCGACCCCTCCTCG
CGGTCCGCCCTCCTGCGGTTCTCGGTCCGGCTACTGCCGTCTCCCCATGCGCCCTCCTG
CGCCGCCACACAGCCTGGGTCCGGTCGCCCTTTCACCTTGGGGGATCTGGGCCGGACTCCTCC
CGGGCTCGGCGCCCCCTCCCCAGCTCGCCACAGCCCCGGGGTCCCGGGTGGAGCGAGCGC
ACCTCGAACCTGCCGAAGAAACCTCCCCCTCCCCCAGCCCCCTCCCCGGGGCAGGGCCCGG
ATTCTTAGCTCGACTTCCGAGAACTTTGGCTCCCGCAGCCAGGTTGGGGGGTTGAGAGTG
ATGCTCCCGTGGAAGTTGGCTTTGTTACGGCTTGTCTAGGCTATCGGGGCGGGGTCTCCC
CCCCCTCTCCCTAGCTCTCCCCATCACCTCAGTTCGAATTCTTTCCACTGGAAGAGCTTTC
TCTCAAGCGATAGGTTTTCCAGTTGCTTTTAGAGTCTTGGGGAGGGGGAGTGCTGGCCGG
GTAGAGTTGAGAAGCGATTTGTGAGAAGGGAACAAAGATGGGAGGGGGAGACACAGATG
AAACGGATGCAAAGGAGGGAAGAAAGCCAGCTGGCAGGCAGTACTGGGAGGGTAGCCCT
GCCCCCCCCAGGCTGCAGTAACCTGCTCTTTTTTTTTTCCCCCTTCTCTTCTCCTCTT
AATTCCTGGTTTTCTAATCGGTGCGTGCTGCCCGGGTCTCCGCCGAGCCCCAGAGTCCC
GGGCTGTGAGTGGGCGAGTGGAAGCTCGCAGCGCGGCTCAGCATCCGCGCTCCACGGCG
CACCCGGCTCCGGGAGGCGAGGAGCGCGGCTTCTGCCCCGAAAGCTGCTCCTCCGAGCCG
CGACCAAGAGCGATTTCTCAGAAGTCGCTGACCACTGATTTGGCCGGAGAGATGGGTTC
TGGCTTCGGTATTAGGATTTACGATCTGGGCACGGAGTAGGGGTGGAGGTGCCAGAAA
GACCTGGAGACTCCGGGCAGCGGGGCCAGGGCTGAGAGGCGCGTCGCCAGGAAAGGCTG

←1. exon

←2. exon

GGTGTGGGGCGGGGTCGCTGGTGTGCTTGCCCTTGCCCCCTACCTCTCCAGGGATGGAGGAA
 AGGCGAGGGGAGGAACGAATGTGACGGATCCACTTAAAGAGCGCTACTTGCCCTGGGCGGC
 TTTCCGAGTCTCTCCAGAGGCAGAAAGCGAGGGGGTTTTGTTTATTACCCGCCCTCTCCC
 GTCCTCTATCAGGGATTGAGGCTGTGGGCAAGGGCGACTGGGAGATCTTTGGCTTTTCGGT
 GCCCTATTGATCCTTTCCCTTTGCCTCGGGGTTGAGACGTTGTCCCGCCGCCCGGCCACC
 ACTAGCCGATTAGCGCTAACTGCCGACTTACTGGACTTAAAAGCCCTATTTACCCCCAG
 CTATTTTCAAAGTCCCGTGTGCCTGGTACTTTCTCCGGGCAAGACGCACCGGAGGGCACG
 GGCACGCCACGGAATGAGCCGTTGCCAAACAGGCTAAGTTTAGGGGCATCTATTATTCAT
 GTTCTTGCCAGATCCTCTCCCGCCCGAAATAGAAGCCGGAGGTTCTCCGTGACCTACATC
 TGCGCCGGGAAGGGCTCCCTGGGCTCGGAGGCTGGGTGGGGTGGTTGCCCCCGGACT
 CCCCAGCCATCCACCCCTCTGGCTCCAGGCTCTCCCATCCGGTCTCGGTTGGCCGG
 CAGTTCTCTCCCAGGGCTTTCCCGTCTCCGCCCCCGCTGCTTGTGCGGGAGGCTCAAG
 AGCCAGGCCGGGGTAGGAGAGGTCTCCCCGGCGGCCAGGTGTGCGAGGTCGGCAGAGA
 CGTCTGGGCTTTCCAGTGGCCGTTGAGGCCGTGGCCCCCGCAGGGCGACCCCTCGCCCC
 GAGAGGAGGGATGGGAATTTCTCTTGGGTGTCGTTTCTCTCCTACCCCTGTCTTAGAA
 GAGACAGTTCTCCGAGGGGCGCCTTTTGGAAGAAGGAGCATCGTGAGAGCCTCTATGGGT
 CTTTGGGTCTCGCAGAGGCGGGGAAGGACCTACTGACCACTCCTGCCCTCTGGCTACC
 CCTGCAG**GCCGGAGAACGAGGTGTACGACGAGGACGGAAACCCGAGCAGGACTTCTACG**
ATTTCGAGTCTCCGGGCGTGGGGAGCCCCGCTCCGCGCTGCGCGATGCCTACGCGCTCT
ACTACCCCGCGGAGGAAAGGTACCGCCGCGCAGCCGGGCACTGGGAGGGAGAAAGGGCA
 GGGGATGGTTCATCGAGTAGGTGCTTTTTTCATAAAAACCTCCAGTCTTTCTTCTCCCG
 GCTGGTCCCCACGAGAGTGAAAGTTAGGAGCGGGCCGTTTGTGTGGACAGGAGGGCCGC
 ATGGGGACCAAAAGGTCTGCGGCCAAGGAGCGGCAGTGAGTGCGCGCCCCGGCCGGTT
 CCACACCTGAGGTCTGGGAGGGCAGGACGAACTCTGGTTCTTGGCACTCACGGGAACAT
 CCAAAGAGTTATTCCCTAGTGCTTCCGGAGGGCTGGGGGGCAAGCGTGACTAGCGGGGG
 ACCTGGGGCTGCCACTTGGGCAGTGACCCCCGGGCGCGCACTTTGCCCTCCCTGTTAG**AGA**
TGTGCGCCACGGGATCCTTAATAAGGCCCTACCGCAAAGTGCTGGACCAGCCGTCCGCCAG
GAGATACCTGCAGACGCTCATGGCCAAGGGCTTGGGGTAAGAGTTTGCAAAGAGTTAAT
 CGGCGCGTGATGGCGCGCACGCGCGCACGCGCCGCGCGGGTGTGTGTGCCGGTGCGCAC
 TGGGAGGCTGGGCTGCTTCTACGTCTTTCGTGTCAGTGCGGGCCGAGGGTGCGTCTGCG
 CTGACAGGGCTTACAGGCCAGCCCCCTGCCACAGGCTAAGGTTTAGGTACCGTGCCAGAA
 GTTTGGCCAGAGAGCTCGGGAATGAGGCGAGGAGGGGAGCGGGCAGGAAAATCGGGATGT
 CTGATCCGTTTTGAATAAAAAATAATAATAATAAGTGGTCCCCCTCTCCAGACCAT
 CAAAACCTTCAAGTTTCTTGGGACGATTTACTTTTTCTTTCCCCACATTTCTTTCACTGT
 TAAATTCAAATCGAAATAAAACAAATCCTCAAATTTGGACACCTAAGGAAGCAAACAGTTT
 TTGCTCGTGCCAGACAAACCAAAGCACAGGATTTGCGGGAGCTTCTGTACCAGAAGGC
 AATGTTTTAATAGAGCCCATGGGACACCAGAATACGTTTTCCGCACTGAATAATTCATGT
 GATGAAAAGTATTGCCTGCAGCCTGTCGACTTGTATTATTATCACGTTTTTCACTTAGC
 GCGTAGGAGAGCGGTGCTCCCCCTGACTGGGAATTGCGGAATCGATGTAACTCCACGG
 CAACAGCCAACGGGAAATTCAGGGCTCTTTGGTGCTTTTCTCTCTGCGTGGGTGGGGGCG
 TCCGGGAACGGTTAGGACAATTGAGCGCAAAAGCACTGATGGTCCGACCTGAGAGGGCAG
 CGTTTGGAGAGGGGTTAGGGTTAAATCGCTTGCGTTTGGCCCCGGACCTCTTCCCAGGTC
 CATCCTATAAGGACTTGGCGCCCCGAGATCTTTGATGGGGAGGGAGTAGCGAGGGTTACC
 ATCGCTGCCCTCCCTGCGACTGCTCCCTGACCGGGCAGGGTGGCGTGCTGGGCGCGGAGA
 GCTCGCGCCCTCCCCGAAGATTCCCTCGTTGGGTGCGGTCTGCCGTGCTACCCCGCGTC
 TACTCACCGGATGCCTCCCGCCCCGCCACCTCTTCCGACCCCTCTCCTTGCAG**TGGGA**
CCCCGGGCGGCAGCGCGGACGACTCGGAGCCGCTCTCCAAGCGCCACTCGGACGGCA
TCTTCACTGACAGCTACAGCCGCTACCGGAAACAAATGGCTGTTAAGAAATACTTGGCTG
CTGTTCTAGGGAAAAGGTATAAAACAAAGGGTTAAAAACAAAGGACGGCGAATACCGTATT
TGTAGCGACGAGTTGCCAGCTATCCTGTGTATACGGCCCTGACACAATGAGAAGTCGTTT
TTCCCAACTGACTGAACTGTCATTGCTCCTGTGTTCTGTCCACATGTATTTATGTATGA
AGTCAAGCCATTAAATGAATATTTTGATAATAATATTGTTTTTCTTTTTTACGAAGCACTA
GAGAATGCACAGATATACTTTGTGGACCAATTATTGATATTGACATATATATTACGAATA
TATAAGAGTATATATATATATATATAAAAGTATAATAGAGAGCCGTTCATACAGTGTG
CACAAGGATTGAAGATTGCGCTGAGCTGTTTGTTTTTATATAAAATAAATAGAAAAATAG
ACAATCATTGTTTTGAATATTACTCTATTTTTGTAAACTGGAATTAAAAGGATAGTATT
TTTATCCACGATAGGCTGAAGATATTAATCCTGACCAATTTGCTACTGTACATAAACAGT
GATGCCCTGCTCCAGGGACTTTGAGGTAATGATTTGGGAGGATTGCTGAAGGTCGTCTT
TCCCAGGGAGTCTCTAGGGCAGGCTGCTTCAATCCCAGCTGAACTCAACTGAGGCTCTGT

←3. exon

←4. exon

←5. exon

CTACCCCTTGCTGGGTGGCAATGCCAATACTTCCGCTTTCTTTGATTCTATTTTTATGTG
TATTTGTCTCTCTTCAGACTCTCAGCCCACAAGGAAATTCTCCTGATAAAACAACAGCTG
GATCTAAATTGTGCTTCTCCCAGAATTCATACTACTCCCTGGGGGAGGAGTTGGGGGAC
TGTACAGAGAAGAGAGACTTGAATAGGAAGCTCTCTTTTCTGTACTTCCAGGGACCCAG
TATCCCAAGGTTAGGGCAATTGGAACAAAGTGGGACTATTGGAAAAGGCAGAGCATAAGG
CAGTAGGGGGAGGACCCTGGAGAGGGACTGGCTGCAGGCAGCCCCAGCCTGGGGGC'TGGC
GGTAAGCCCAAGTCCCACCATAGGTCCCTTGCTGCTGACTTTGGGCGCTGGGTATTGGA
AATGGATGCAAAGTACAATGTGTTTTCTCCAGTGCTATCCATGCTGCTCATGTTGTGAA
ATGGCCAGGATCCTCCCCTTTGAACCCCTGCTGTGTAGGAGCCTCCCTGTTCTTCCGTGGT
TTTCCTGAAGACTCCTCTTCCACCTTCTCGCACTGTTTAAGTACTGTTTGCCGTTTTT
TATTCACCTCTCTTAACTTGTGAATGCTTCTTTTCCCTGTTGATTGATGCTAGCACTTA
TTGTAAAGTGTAGGAACCCCTGTGTGGTTACCACTAAGTAATTATGCACATATATATGAAT
CTTTTGTCTTCTGTTGATTGAGTTTGTAGGTAAATGTATTTTTCTACATTTATGGCTTA
TTGCTTAGTAAAAATTTATTTTCATAAAACCAACCTTTGTGATATTAGAATGTGTAGTGTT
ACATGTTGCTCAGTTGTACTAACTGATAAAATCATTTAACCCCATCTTCATATGTATGAG
TACTATCTTGTATTTGTGGTCAAGAGTGAGGTAAGCAAGCTTCAACAGGCCCTGAGAATG
TCCCCTTGATTTCTTCTTGCTACAGAAAGCATGTCTGTCTGTTTCCCTGTCAATTTCTT
GAACCTGTCAGGTAATCTCTATAACAAAAGAAACCTTCACCCAGCAACCAGATCAAGCAA
CAGCAGGCAAACCAGCCAGCCAAACTCCCCAAATTTCAGGCACAAGTTCTTTTGAAAAAC
ACACAAAAAATAAACAGGAAAAGATTAAACATTAGCATGTCAAGGACCTTTCCTTTTCCT
TTACGGATTTGATCAGTATGGAGTCATAAATCAAAGAAAACAGACTTGGATTTGCATTCC
CCAGGCGGGATGGATGCTGCCCCGAGATCACGTTGCAGACAGTGAAAGCACAGAGGCCTT
CGATCTGGGCCTCAGTCTGTGTACGGAATCAATCTTCTTTAATTCTGCAGTCTCCTCG
GGCAATGTGACACAGGATGGGGTTTGCAGCTTCAGTGCCTTTCTTCGCCTTTTAAATTGC
CACGATTACAGATGGCTATTTAGTGCCCTACAATGCTGCAA

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek **Dr. Czeglédi Leventének** az Állattenyésztési Tanszék egyetemi adjunktusának segítőkész munkáját, és kiváló ötleteit és tapasztalatait. Köszönöm a kísérletek megtervezésében és az eredmények kiértékelésében nyújtott segítségét.

Továbbá köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Jávor András** intézetvezető egyetemi tanárnak, aki lehetőséget biztosított a kísérletes munkám elvégzésére az Állatgenetikai Laboratóriumban.

Köszönetet szeretnék mondani **Csikós Ádám, Simon Ádám és Tisza Ákos** PhD hallgatóknak, amiért elsajátíthattam tőlük a munkám során alkalmazott laboratóriumi módszereket.

Nyilatkozat

NYILATKOZAT

Homonai Krisztina
.....büntetőjogi és fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem és aláírással igazolom, hogy a diplomadolgozat saját munkám eredménye. A felhasznált irodalmat korrekt módon kezeltem, a diplomamunkára vonatkozó jogszabályokat betartottam.

Homonai Krisztina
.....

Aláírás

Születési idő: *1990.12.29.*