



Store programmer

HAVBRUK - En næring i vekst

Faktaark

www.forskningsradet.no/havbruk

 Norges forskningsråd

Sekvensering av stress-responsive gener hos torsk

Prosjekt: Stress genes in the Atlantic Cod *Gadus morhua*: EST sequencing and microarray production

For å kunne måle hvordan ulike former for stress påvirker genekspresjon hos en art, må en kjenne nukleotid-sekvensene til de genene som skal undersøkes. Dette gjøres ofte ved å sekvensere deler av de uttrykte genene, såkalte expressed sequenced tags (EST). EST er normalt 300-1000 nukleotider lange. Når en har sekvensert deler av genene, kan disse brukes til å studere genekspresjon i individer som har blitt utsatt for miljøstress med metoder som real-time PCR og microarray. Målet med dette prosjektet var derfor å sekvensere et antall stressresponsive gener hos Atlantisk torsk til brukt i genekspresjonsanalyser hos denne viktige arten for Norge.

Bakgrunn og mål:

Hovedmålet med prosjektet var å sekvensere en del av de mest sentrale stress-responsive genene hos torsk og bruke disse i genekspresjonsanalyser i pågående og planlagte prosjekter. Dette ble oppnådd via 4 delmål beskrevet under.

Delmål:

1. Isolere RNA fra ulike vev fra torsk som har blitt eksponert for miljøgifter eller miljøstress og hvor målgenene er oppregulerte og derfor lettere å sekvensere.
2. Lage et begrenset antall cDNA biblioteker fra viktige detoksifiseringsvev som lever, gjelle og hodenyre.
3. Sekvensere ca. 15.000 EST's fra disse cDNA bibliotekene og analysere disse sekvensene mot kjente sekvenser i Genbanken med BLAST for å finne ut hvilke proteiner de koder for.
4. Bruke kloner for disse annoterte genene og lage et småskala cDNA microarray som skal brukes i videre forskning på hvordan ulike typer miljøstress påvirker transkripsjonen av stressresponsive gener i torsk.

Resultater:

Totalt ble ca. 16.000 EST's sekvensert fra 4 cDNA biblioteker laget fra lever (2), gjelle og hodenyre fra torsk som hadde blitt eksponert for ulike miljøgifter som PCB, PAH og tungmetaller (Cu og Cd). Det meste av sekvenseringsarbeidet ble outsourcet til USA og Kina. Computational Biology Unit (CBU) ved Universitetet i Bergen utviklet i samarbeid med Havforskningsinstituttet og NIFES en pipeline for automatisk genannotering av våre sekvenserte gener. Det ble kjørt BLAST mot



(foto Pål A. Olsvik)

3 Genbank databaser; BLAST(X) (translatert protein), BLAST(N) (nukleotider) og BLAST(N) (EST's). Med våre 16.000 EST's fant vi ca. 1.000 contig's, som består av mer enn en EST, og 10.000 singletons, noe som representerer ca. 11.000 unike gensekvenser. Mange av de stressresponsive genene vi søkte etter, ble sekvensert. Det var blant annet EST's som koder for cytochrome P450- (CYP) og heat shock proteiner (HSP) samt proteiner involvert i apoptose og oksidativt stress.

I september 2006 ble de første cDNA arrayene printet ved Norwegian Microarray Consortium i Oslo. Dette arrayet inneholder totalt ca. 750 kloner. Av disse har vi definert ca. 450 som stressresponsive gener, ca. 90 som immunogener, ca. 80 som metabolisme-gener og ca. 70 som referansegener (housekeeping gener). En liste som viser disse genene er lagt på prosjektets internettside <http://www.codstress.olsvik.info/Results.html>

Vi har i tillegg også etablert en rekke real-time RT-PCR assays for genekspressjonsstudier i torsk, blant annet anti-oksidantgener som superoxide dismutase, catalase, glutathione-peroxidase og glutathione reductase, generelle stressgener som HSP27, HSP70, HSP90, CYP1A og metallothionein isoformer, ubiquitin, flere apoptosegener som caspaser og p53 og mange referansegener.

Nytteverdi:

Microarrayet vil bli brukt i flere pågående og planlagte prosjekter ved NIFES og av våre samarbeidspartnere i årene som kommer. Det vil forhåpentligvis bidra til å utvide vår biologiske kunnskap om torsken og hvordan denne viktige arten for Norge, responderer på ulike miljøgifter og annet stress påført fisken i forbindelse med oppdrett.

159197/120	Ansvarlig: Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning	01.01.2004 - 01.07.2006
Prosjektleder: Pål A. Olsvik Kontaktperson: Pål A. Olsvik, NIFES Adresse: Postboks 2029 Nordnes, 5817 Bergen Telefon: 55 90 51 54 E-mail: pal.olsvik@nifes.no		
Lenker: www.codgen.olsvik.info www.nifes.no Samarbeidende institusjoner: Havforskningsinstituttet, Universitetet i Bergen, NIVA, NTNU, Göteborg University – Department of Zoology		