

Antoni BRODAK, Krzysztof KOSTRO

**Identyfikacja polimorfizmu transferyny surowicy krwi u lisów pospolitych
i polarnych**

Identification of Transferrin Polymorphism of Blood Serum in Common and Polar Foxes

Zagadnienia dotyczące polimorfizmu białek surowicy zwierząt, w tym również lisów hodowlanych, stanowią aktualny kierunek badań w genetyce molekularnej oraz immunogenetyce. Balbierz i Nikołajczuk (1) oraz Balbierz i wsp. (2) wykazali przy użyciu elektroforezy w żelu skrobiowym polimorfizm transferyn surowicy lisów polarnych. Stwierdzili oni, że białka tego regionu uwarunkowane są szeregiem alleli składających się z trzech genów Tf^A , Tf^B i Tf^C . Zróznicowanie białek strukturalnych surowicy lisów srebrzystych i polarnych w regionach prealbumin (Pa), albumin (Alb) i transferyn (Tf) opisali Serov i wsp. (8, 9). Ponadto zaobserwowali oni w regionie transferyn w surowicy międzygatunkowych mieszańców (srebrzyste + polarne) dodatkowy prążek migrujący wolniej w polu elektroforetycznym niż znajdujący się w analogicznym regionie prążek u lisów polarnych.

Rozdzielając białka za pomocą jednokierunkowej i dwukierunkowej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym polimorfizm: prealbumin, albumin, postalbumin, pretransferyn i transferyn w surowicy krwi lisów pospolitych i polarnych określili ostatnio Juneja i wsp. (5) oraz Madeyska-Lewandowska i wsp. (7).

Celem pracy było określenie polimorfizmu transferyn surowicy rozdzielonych za pomocą cienkowarstwowej elektroforezy poziomej w żelu poliakrylamidowym u lisów pospolitych i polarnych.

MATERIAŁ I METODY

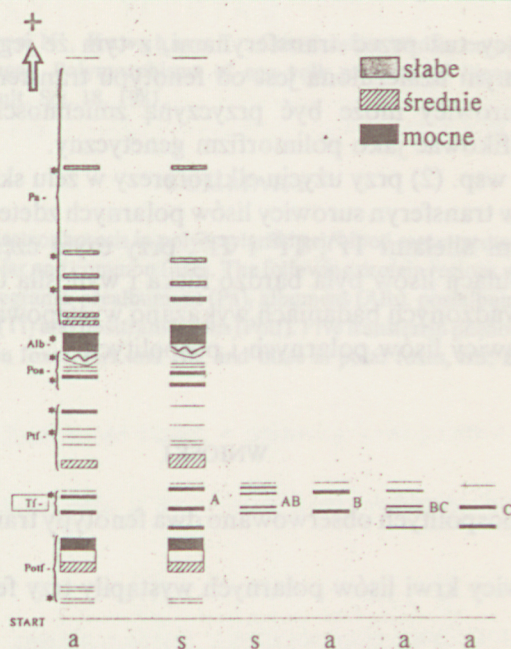
Do badań użyto 17 samic i 14 dorosłych samców oraz 80 sztuk ich potomstwa w wieku 3 mies. Pochodziły one z ferm wolnych od chorób zakaźnych i inwazyjnych. Z żyły dostopowej do próbek

pobierano do badań krew, z której po oddzieleniu skrzepu uzyskiwano osocze. Do rozdzielania elektroforetycznego używano zarówno świeżej surowicy (1–3 godz. po pobraniu krwi), jak również zamrożonej i przechowywanej w -20°C przez dwa miesiące. Białka surowicy rozdzielono za pomocą poziomej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym wg metody Gahne i wsp. (3) z zastosowaniem własnych modyfikacji opisanych w pracy Głuchowskiego i wsp. (4). Modyfikacje te polegały na zmniejszeniu grubości płyty żelu z 1,2 mm do 0,6 mm oraz zastosowaniu własnego sposobu konserwacji płyt po elektroforezie, co pozwoliło na przechowywanie oryginalnych elektroforegramów. Z każdej próbki surowicy wykonano po 4 elektroforegramy, które barwiono barwnikiem Commasie Brilliant Blue R-250. Dwa elektroforegramy wykonywano na surowicy świeżej 1–3 godz. po pobraniu i dwa z surowicy zamrożonej. Z uzyskanych elektroforegramów wykonano schematyczny rysunek. Zgodność rozszczepień fenotypów otrzymanych i oczekiwanych w potomstwie weryfikowano testem χ^2 .

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Elektroforegramy białek surowicy krwi rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym lisów pospolitych i polarnych przedstawiono schematycznie na ryc. 1. Jak wynika z zawartych w niej danych, białka surowicy rozdzielono na 30–35 prążków, które zgodnie z mianownictwem wprowadzonym przez Gahne i wsp. (3) u ssaków oraz Tanabe i wsp. (10) u ptaków zakwalifikowano do następujących regionów i podregionów: prealbuminy ($\text{Pa}_1, \text{Pa}_2, \text{Pa}_3, \text{Pa}_4, \text{Pa}_5$), albuminy (Alb), postalbuminy ($\text{Poa}_1, \text{Poa}_2, \text{Poa}_3$), pretransferyny ($\text{Ptf}_1, \text{Ptf}_2, \text{Ptf}_3, \text{Ptf}_4$), transferyny (Tf) i posttransferyny ($\text{Potf}_1, \text{Potf}_2, \text{Potf}_3$). Różnice pomiędzy białkami strukturalnymi surowicy dorosłych lisów polarnych i pospolitych zaznaczono na ryc. 1, zaś ich szczegółową charakterystykę przedstawiono w poprzedniej publikacji (6). W tej pracy przedstawiono wyniki dotyczące polimorfizmu transferyn. W regionie transferyn u lisów pospolitych obserwowano dwa szybko migrujące prążki określone jako fenotyp AA lub cztery prążki jako fenotyp AB. Natomiast u lisów polarnych stwierdzono trzy fenotypy: BB, CC i BC. W fenotypie BB obserwowano dwa szybko migrujące prążki, przy czym pierwszy migrował z prędkością drugiego prążka z fenotypu AB surowicy lisów pospolitych. Z kolei w fenotypie CC stwierdzono dwa prążki migrujące wolno, z tym że pierwszy migrował szybciej niż ostatni w fenotypie BB. W fenotypie BC występowały cztery prążki, przy czym odległość między pierwszym a drugim oraz między trzecim a czwartym była znacznie większa niż między drugim a trzecim (ryc. 1).

W badanej populacji lisów stwierdzono pięć fenotypów transferyn, w tym dwa u lisów pospolitych AA i AB oraz trzy u polarnych BB, BC i CC. Stwierdzone w badaniach własnych fenotypy transferyn odpowiadają prawdopodobnie fenotypom DD, DF, FF, FS i SS przedstawionym w pracy June i wsp. (5). Pomimo że nie wykonano elektroforezy porównawczej, podstawą do wyciągnięcia takiego wniosku jest fakt, iż uzyskano prawie identyczny względem siebie układ prążków w poszczególnych fenotypach oraz podobnie jak cytowani



Ryc. 1 Elektroforegram białek surowicy krwi lisów
Blood serum protein electrophoregram in foxes

s – lisy polarne, a – lisy srebrzyste, * – regiony, w których występują różnice między lisami polarnymi i srebrzystymi

autorzy w badaniach własnych rzadko obserwowano fenotyp AB będący odpowiednikiem DF. Wystąpił on tylko u dwóch rudych dzikich lisów spośród 45 badanych lisów pospolitych. Warto podkreślić, że gdy do rozdzielu elektroforetycznego użyto świeżej niemrożonej surowicy, w fenotypie AB zaobserwowano nieco inny układ prążków niż prezentowany na elektroforegramach Junei i wsp. (5). W fenotypie oznaczonym symbolem DF w pracy tych autorów odległość między prążkami była jednakowa. Natomiast w badaniach własnych stwierdzono, że odległość pomiędzy 1 i 2 prążkiem oraz 3 i 4 w fenotypie AB była mniejsza niż odległość między 2 a 3. Zaobserwowane różnice mogły nasywać podejrzenie, że u lisów rudych dzikich występuje dodatkowy allel warunkujący w formie homozygotycznej fenotyp o nieco mniejszej szybkości migracji niż AA, a większej niż BB. Wykonany porównawczo elektroforetyczny rozdział plazmy uprzednio zamrożonej w -20°C i przechowywanej przez 2 miesiące wykazał, że odległości pomiędzy prążkami transferyn w fenotypie AB są równe. Na podstawie danych można stwierdzić, iż pod wpływem mrożenia i przechowywania plazmy następują zmiany w intensywności zabarwienia poszczególnych prążków transferyn. Wolno migrujące prążki w każdym z fenotypów stają się mniej intensywnie zabarwione lub prawie niewidoczne. Z kolei intensywnemu zabarwieniu ulega prążek szybko migrujący. Podobnie intensywnie zabarwia się

prążek migrujący tuż przed transferynami, z tym że jego wędrówka w polu elektroforetycznym uzależniona jest od fenotypu transferyn. Mrożenie i przechowywanie surowicy może być przyczyną zmienności, którą pomyłkowo można zakwalifikować jako polimorfizm genetyczny.

Balbierz i wsp. (2) przy użyciu elektroforezy w żelu skrobiowym stwierdzili sześć fenotypów transferyn surowicy lisów polarnych zdeterminowanych trzema kodominującymi allelami Tf^A , Tf^B i Tf^C , przy czym częstotliwość allelu Tf^C w badanej populacji lisów była bardzo niska i wynosiła 0,055.

W przeprowadzonych badaniach wykazano występowanie pięciu fenotypów transferyn surowicy lisów polarnych i pospolitych.

WNIOSKI

1. U lisów pospolitych obserwowano dwa fenotypy transferyn surowicy krwi A i AB.
2. W surowicy krwi lisów polarnych wystąpiły trzy fenotypy transferyn B, BC i C.

PIŚMIENNICTWO

1. Balbierz H., Nikołajczuk M.: Further immunogenetic investigations of breeding foxes. Proceeding of the XIIth European Conference of Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphisms, Budapest, 1972.
2. Balbierz H., Nikołajczuk M., Pisański W.: An immunogenetic characteristic of polar foxes. Prace i Materiały Zootechniczne, 13, 1977.
3. Gahne B., Juneja R. K., Grolmus J.: Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoreses for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrin, albumin and post-albumin in the blood plasma of cattle. Animal Blood Groups and Biochemical Genetics, 8, 1977.
4. Głuchowski W., Brodacki A., Rupeć Z., Wójcik A.: Metoda utwardzania płyt żelu poliakrylamidowego. Pol. Soc. Sci. Lubl. Sec. Biol., 27, 1985.
5. Juneja R. K., Niini T., Lohi O., Larsen B., Gahne B.: Genetic polymorphism of plasma alpha1B-glycoprotein and transferrin in arctic and silver foxes. Anim. Genet., 19, 1988.
6. Kostrok K., Brodacki A.: Comparative studies of blood serum protein separated in polyacrylamide gel in silver and polar foxes. Med. Wet. nr 11-12, 1989.
7. Madeyska-Lewandowska A., Christian M., Zdunkiewicz T.: Blood protein polymorphism in polish foxes. Norwegian Journal of Agricultural Sciences, nr 9, 1992.
8. Serov O. L., Zakijan S. M., Korochkin L. I., Vladimirov A. V., Pomytko V. N.: Expression of homologous genes in intergeneric arctic fox-common fox hybrids (*Alopex lagopus* + *Vulpes vulpes*). II. Electrophoretic analysis of prealbumin, albumin and transferrins in arctic fox-common fox hybrids. Genetika USSR, 1976. (In Russian with English summary).
9. Serov O. L., Zakijan S. M., Khlebodarova T. M., Korochkin L. I.: Allelic expression in intergeneric fox hybrids (*Alopex lagopus* + *Vulpes vulpes*). I. Comparative electrophoretic studies on blood enzymes and protein in arctic and silver foxes. Biochemical Genetics, 14, 1976.

10. Tanabe H., Ogawa N., Kawahara T.: Comparative studies on physical and chemical property of avian eggs. Polymorphisms of egg volk proteins of Japanese quail (*Coturnix japonica*). Japan Poult. Sci. 18, 1981.

SUMMARY

Using a horizontal electrophoresis in polyacrylamid gel, blood serum proteins were separated in 31 adult and 80 young polar and common foxes. The following protein regions were distinguished on the obtained electrophoregrams: prealbumens (Pa), albumens (Alb), postalbumens (Poa), pretransferrins (Ptf), transferrins (Tf) and posttransferrins (Potf). Five transferrin phenotypes were found out including two in common foxes, AA and Ab, and three in polar foxes, BB, BC and CC.

Zmienność białek w surowicy krwi psotów

Changeability of Blood Serum Proteins in Wolves Dogs

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac dotyczących elektroforetycznego rozdzielania białek surowicy krwi u psotów. Są natomiast prace dotyczące genetycznego polimorfizmu białek u lisów polarnych i pospolitych (9) oraz psów (7).

Rozdzielając białka w żelu skrobiowym Bałbierz i Nikolajczuk (3) oraz Bałbierz i wsp. (2) u lisów polarnych stwierdzili genetyczny polimorfizm transferyny uwarunkowany segregacją alleli zlożonym z trzech genów Tf^a , Tf^b i Tf^c . Zróżnicowanie białek strukturalnych i enzymatycznych w surowicy krwi i wybranych narządach lisów polarnych i pospolitych przedstawił Serov i wsp. (10, 11).

Przy użyciu elektroforezy poziomej w żelu poliakrylamidowym białka surowicy krwi u lisów polarnych, pospolitych oraz u niedźwiedzi niepolarnych i pospolitych oraz u psów badał Joneja i wsp. (6). Stwierdził on u niedźwiedzi dwóch białek u lisów oraz pięciu białek u psów (7).

Celem badań było określenie zmienności białek rozdziałanych za pomocą elektroforezy poziomej w żelu poliakrylamidowym w surowicy krwi psotów.

MATERIAL I METODY

Krew do badań pobierano od 150 sztuk 6-7-miesięcznych psotów, domowych i kłusów po odcięciu składowych polimorfizmów surowicy.

Krew surowicę rozdzielano w porcję elektrolitów przy użyciu żelu poliakrylamidowego w buforze Tris + Glna, barwienie o pH 7 według metody (Ciechanowski 1961) z użyciem roztworu (5). Celom porównawczym białek surowicy psotów polarnych i pospolitych białek surowicy lisów pospolitych i polarnych.