

Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej Wydziału Zootechnicznego AR
i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Antoni BRODACKI, Krzysztof KOSTRO

Badania porównawcze białek surowicy krwi rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym u młodych i dorosłych lisów

Comparative Studies of Blood Serum Protein Separated in Polyacrylamide Gel in Young and Old Foxes

Badania nad polimorfizmem genetycznym białek surowicy wymagają znajomości zmian w ich składzie ilościowym i jakościowym zachodzących w czasie ontogenezy, jak również w różnych stanach fizjologicznych zwierząt. Kamiński i Balbierz (10) wykazali zróżnicowanie białek strukturalnych surowicy lisów srebrzystych i polarnych tak w obrębie jednego, jak i pomiędzy badanymi gatunkami. Ilościowe różnice we frakcjach białkowych surowicy lisów w zależności od wieku opisał Bierestow (4). Natomiast Stanisławska (15) stwierdziła zmiany w intensywności zabarwienia prążków poszczególnych esteraz surowicy lisów polarnych w zależności od ich stanu fizjologicznego. Polimorfizm genetyczny białek surowicy dorosłych lisów hodowlanych opisali Balbierz i wsp. (1, 2, 3), Madejska-Lewandowska i Brzozowski (11) oraz Serow i wsp. (13, 14). Cytowani autorzy rozdzielając białka surowicy lisów w żelu skrobiowym uzyskali jedynie kilka frakcji. Juneja i wsp. (9) oraz Brodacki i Kostro (5, 6) wykazali, że elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w porównaniu z elektroforezą w żelu skrobiowym jest metodą bardziej czułą i pozwala na przeprowadzenie szczegółowej analizy białek surowicy lisów.

Celem pracy było porównanie białek surowicy rozdzielonych za pomocą cienkowarstwowej elektroforezy poziomej w żelu poliakrylamidowym u młodych i dorosłych lisów polarnych oraz pospolitych.

MATERIAL I METODY

Do badań użyto 11 samic i 12 dorosłych samców oraz 10 samic i 15 samców w wieku 3 miesięcy lisów pospolitych, a także 7 samic i 3 dorosłe samce oraz 5 samic i 6 samców w wieku 3 miesięcy lisów polarnych. Zwierzęta były żywione tradycyjnie według zalecanych norm oraz miały stały dostęp do wody. Karma zawierała odpowiednie dodatki witaminowo-mineralne. Pochodziły one z ferm wolnych od chorób zakaźnych i inwazyjnych. Badania przeprowadzono po odsadzeniu lisów, tj. w pierwszej połowie sierpnia. Krew do badań pobierano z żyły dostopowej do heparinizowanych kapilar, z których po odwirowaniu elementów morfotycznych uzyskiwano osocze.

Białka osocza rozdzielono za pomocą poziomej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym według

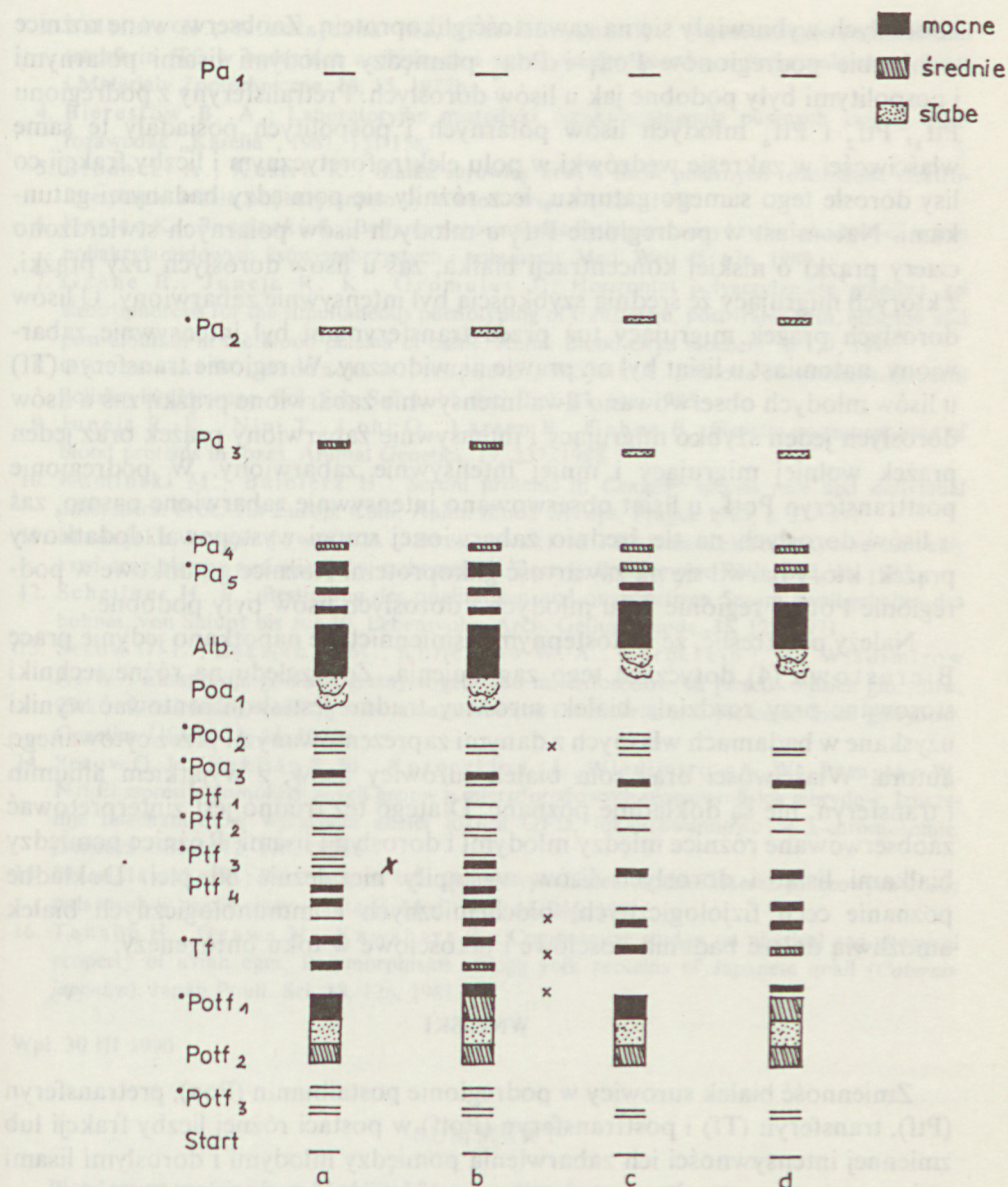
metody Gahne i wsp. (7) z zastosowaniem własnej modyfikacji, opisanej w pracy Głuchowskiego i wsp. (8), która pozwalała na przechowywanie oryginalnych elektroforegramów. Żel do elektroforezy przygotowywano mieszając roztwory A, B, C, D w następujących stosunkach ilościowych: 3:2:2:1. Roztwór A zawierał 40 g akrylamidu, 1 g bisakrylamidu i 84 ml H_2O destyl., roztwór B — 91 g Tris rozpuszczonego w 500 ml H_2O destyl., 21 g kwasu cytrynowego rozpuszczonego w 500 ml H_2O destyl., 300 μ l Temedu i 100 μ l 2-merkaptoetanolu, roztwór C — 200 g nadszarczanu amonu rozpuszczonego w 100 ml H_2O destyl. oraz składnik D — H_2O destyl. Żel o szerokości 160 mm zawierający 12% akrylamid oraz żel o szerokości 40 mm zawierający 4% akrylamid polimeryzowano przez 1 h między szklanymi płytami ustawionymi pionowo. Bufor do elektroforezy o pH 9,0 składał się z 16 g Tris i 4 g kwasu borskiego uzupełnionych H_2O destyl. do 2 l. Skrawki bibuły nasączone surowicą nanoszono na 4% żel znajdujący się od strony anody. Skrawki te po 10 min. elektroforezy usuwano. Elektroforezę przeprowadzono prądem stałym o natężeniu 60 mA przez 4 h.

Uzyskane elektroforegramy utrwalono w 12,5% kwasie octowym przez 30 min., a następnie barwiono barwnikiem Commasie Brilliant Blue R-250 na obecność białek oraz metodą opisaną przez Schellnera (12) na zawartość glikoprotein. Tło żelu odbarwiano w mieszaninie: kwasu octowego 160 ml, alkoholu metylowego 600 ml i H_2O destyl. 2240 ml przez 48 h. Modyfikacja metody prezentowanej w pracy Gahne i wsp. (7) polegała na zmniejszeniu grubości żelu z 1,2 mm do około 0,75 mm, przez co uzyskano lepsze chłodzenie i dokładniejsze rozdziały elektroforetyczne. Ponadto zastosowano odmienny sposób konserwacji płyt po elektroforezie. Po odbarwieniu tła żelu płyty zanurzano w 60-70% alkoholu na 30 min., a następnie przenoszono je do 96% alkoholu i trzymano przez następne 30 min. W obecności alkoholu płyta uległa odwodnieniu, równomiernie kurczyła się i stawała się twarda. Ten sposób konserwacji pozwala na przechowywanie oryginalnych elektroforegramów.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Elektroforegramy białek surowicy krwi rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym młodych i dorosłych lisów pospolitych oraz polarnych przedstawiono na fot. 1 oraz schematycznie na ryc. 1. Białka surowicy badanych lisów rozdzielono na 30-35 prążków, które zgodnie z nazewnictwem wprowadzonym przez Gahne i wsp. (7) u ssaków oraz Tanaabe i wsp. (16) u ptaków zakwalifikowano do następujących regionów i podregionów: prealbuminy (Pa_1 , Pa_2 , Pa_3 , Pa_4 , Pa_5), albuminy (Alb), postalbuminy (Poa_1 , Poa_2 , Poa_3), pretransferyny (Ptf_1 , Ptf_2 , Ptf_3 , Ptf_4), transferyny (Tf) i posttransferyny ($Potf_1$, $Potf_2$, $Potf_3$). Różnice między białkami strukturalnymi surowicy dorosłych lisów polarnych i pospolitych zaznaczono na ryc. 1, zaś ich szczegółową charakterystykę przedstawiono w poprzednich publikacjach (5, 6).

Przy analizowaniu elektroforegramów zaobserwowano, że białka surowicy młodych lisów z regionów prealbumin i albumin migrowały w polu elektroforetycznym, podobnie jak lisów dorosłych tego samego gatunku. Stwierdzone różnice gatunkowe w tych regionach białek pomiędzy młodymi lisami polarnymi i pospolitymi były identyczne jak u lisów dorosłych. Białka podregionu Pa_2 , Pa_4 i Pa_5 wybarwiały się na zawartość glikoprotein. W podregionie postalbumin Poa_2 u młodych lisów występowały cztery intensywnie zabarwione prążki, zaś u dorosłych polarnych i pospolitych tylko dwa wolniej migrujące i mniej intensywnie zabarwione prążki. Białka tego podregionu tak u lisów młodych, jak



Ryc. 1. Schemat elektroforegramów białek osocza: a — młodych lisów polarnych, b — dorosłych lisów polarnych, c — młodych lisów pospolitych, d — dorosłych lisów pospolitych, kropka — różnice pomiędzy dorosłymi lisami polarnymi i pospolitymi, x — różnice pomiędzy lisami młodymi i dorosłymi w obrębie badanego gatunku

A scheme of electrophoretogram of serum proteins: a — young polar foxes, b — full-grown polar foxes, c — young common foxes, d — full-grown common foxes, point — differences between full-grown polar and common foxes, x — differences between young and full-grown foxes within the examined species

i dorosłych wybarwiały się na zawartość glikoprotein. Zaobserwowane różnice w obrębie podregionów Poa_1 i Poa_3 pomiędzy młodymi lisami polarnymi i pospolitymi były podobne jak u lisów dorosłych. Pretransferyny z podregionu Ptf_1 , Ptf_2 i Ptf_4 młodych lisów polarnych i pospolitych posiadały te same właściwości w zakresie wędrówki w polu elektroforetycznym i liczby frakcji co lisy dorosłe tego samego gatunku, lecz różniły się pomiędzy badanymi gatunkami. Natomiast w podregionie Ptf_3 u młodych lisów polarnych stwierdzono cztery prążki o niskiej koncentracji białka, zaś u lisów dorosłych trzy prążki, z których migrujący ze średnią szybkością był intensywnie zabarwiony. U lisów dorosłych prążek migrujący tuż przed transferynami był intensywnie zabarwiony, natomiast u lisiąt był on prawie niewidoczny. W regionie transferyn (Tf) u lisów młodych obserwowano dwa intensywnie zabarwione prążki, zaś u lisów dorosłych jeden szybko migrujący i intensywnie zabarwiony prążek oraz jeden prążek wolniej migrujący i mniej intensywnie zabarwiony. W podregionie posttransferyn $Potf_1$ u lisiąt obserwowano intensywnie zabarwione pasmo, zaś u lisów dorosłych na tle średnio zabarwionej smugi występował dodatkowy prążek, który barwił się na zawartość glikoprotein. Różnice gatunkowe w podregionie $Potf_3$ i regionie Tf u młodych i dorosłych lisów były podobne.

Należy podkreślić, że w dostępnym piśmiennictwie napotkano jedynie pracę Bierestowa (4) dotyczącą tego zagadnienia. Ze względu na różne techniki stosowane przy rozdziale białek surowicy trudno jest skonfrontować wyniki uzyskane w badaniach własnych z danymi zaprezentowanymi przez cytowanego autora. Właściwości oraz rola białek surowicy lisów, z wyjątkiem albumin i transferyn, nie są dokładnie poznane. Dlatego też trudno jest zinterpretować zaobserwowane różnice między młodymi i dorosłymi lisami. Różnice pomiędzy białkami lisiąt i dorosłych lisów wystąpiły niezależnie od płci. Dokładne poznanie cech fizjologicznych, biochemicznych i immunologicznych białek umożliwi dalsze badania ilościowe i jakościowe w toku ontogenezy.

WNIOSKI

Zmienność białek surowicy w podregionie postalbumin (Poa), pretransferyn (Ptf), transferyn (Tf) i posttransferyn ($Potf$) w postaci różnej liczby frakcji lub zmiennej intensywności ich zabarwienia pomiędzy młodymi i dorosłymi lisami związana jest z rozwojem ontogenetycznym zwierząt.

PIŚMIENNICTWO

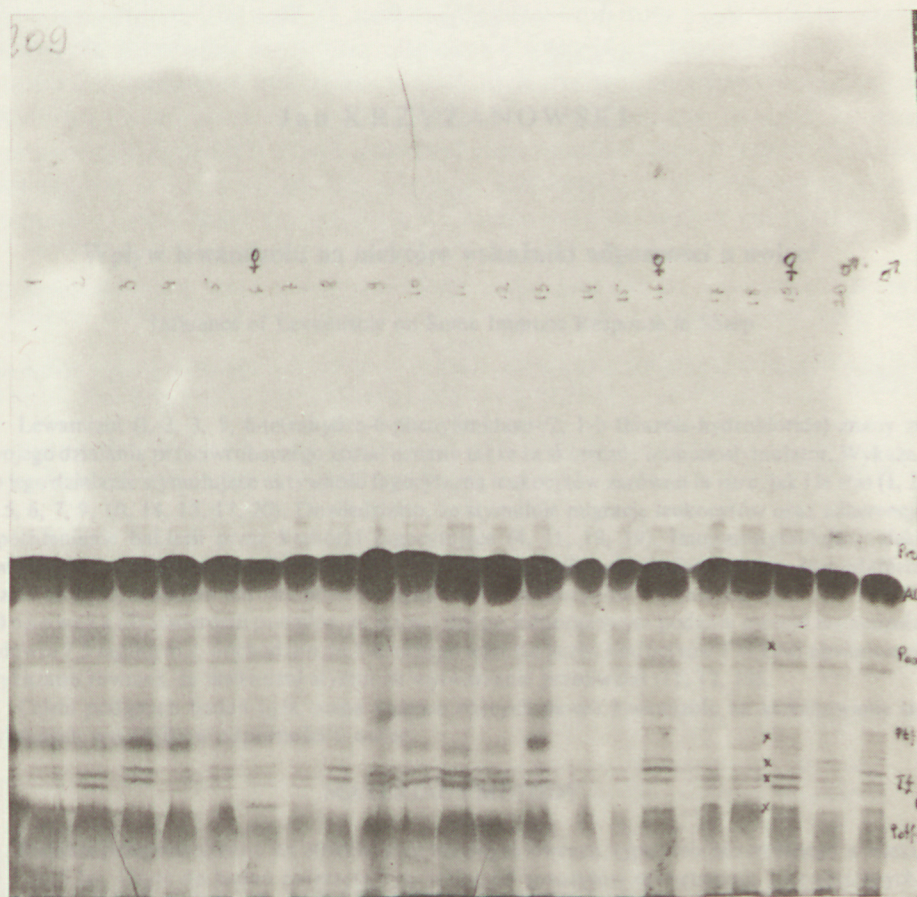
1. Balbierz H., Nikołajczuk M.: Further immunogenetic investigations of bridging foxes. XIIth European Conference on Animal Blood Groups Biochemical Polymorphism, Budapest 1972, 673-578.
2. Balbierz H., Nikołajczuk M., Pisański W.: Immunogenetyczna charakterystyka lisów polarnych. Prace i Materiały Zootechniczne, 13, 7, 1977a.

3. Balbierz H., Nikolaiczuk M., Gut-Koryzna W.: Wykorzystanie polimorfizmu transferin (Tf) w badaniach rodzinnych i wskazywaniu ojcostwa u lisów polarnych. *Prace i Materiały Zootechniczne*, 13, 15, 1977b.
4. Bierestow B. A.: Laboratorijne metodyki ocenki sostojanija pusznyh zwierz. *Pietrozawodak „Karelia”*, 1981, 151-158.
5. Brodacki A., Kostro K.: Białka surowicy krwi u lisów polarnych rozdzielone elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym. *Med. Wet.* 47, 224, 1991.
6. Kostro K., Brodacki A.: Badania porównawcze białek surowicy krwi rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym lisów srebrzystych i polarnych. *Med. Wet.* 45, 626, 1989.
7. Gahne B., Juneja R. K., Gromulus J.: Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrin, albumin and post-albumin in the blood plasma of cattle. *Anim. Blood Grps biochem.* 8, 127, 1977.
8. Głuchowski W., Brodacki A., Rupeć Z., Wójcik A.: Metoda utwardzania płyt żelu poliakrylamidowego. *Pol. Soc. Sci. Lubl. Sec. Biol.* 27, 141, 1985.
9. Juneja R. K., Nini T., Lohi O., Larsen B., Gahne B.: Genetic polymorphisms of blood proteins in foxes. *Animal Genetics*, 19, 237, 1988.
10. Kamiński M., Balbierz H.: Serum proteins in *Canidae*: species race and individual differences. *Proc. 9th Europ. Conf. Anim. Blood Groups*, Prague 1965, s. 337-341.
11. Madejska-Lewandowska A., Brzozowski M.: Badania elektroforetyczne surowicy krwi oraz plazmy nasienia lisów srebrzystych. *Zeszyty Problemowe PNR*, 302, 41, 1983.
12. Schellner H. P.: Bestimmung des qualitativen und quantitativen Serum eiveibgehaltes des huhnes, von Shlups bis zur 30. Lebensvohe. *Arch. Geflugelkunde*, 35, 128, 1971.
13. Serow O. L., Zakijan S. M., Kuliczkow W. A., Koroczkin L. I., Władirow A. W.: Ekspresija gomnologicznych genow u mierzdorodowych piescowo-lisich gibrydow. Elektroforeticeskij analiz prealbumina, albumina i transferinow u piescowo-lisich gibrydow. *Genetica USSR*, 11, 44, 1976a.
14. Serow O. L., Zakijan S. M., Koroczkin L. I., Władirow A. W., Pomytko W. N.: Ekspresija gomologicznych genow u mierzdorodowych piescowo-lisich gibrydow. Izuczenije miechanizmow wyrażenia allelei lokusa GPD, lokalizowanowo w x-chromosomie. *Genetica USSR*, 12, 110, 1976b.
15. Stanisławska B.: Rozdziały na żelu skrobiowym białek osocza i esteraz osoczowych u lisic polarnych w czasie ciąży i laktacji. *Med. Wet.* 44, 246, 1981.
16. Tanabe H., Ogawa N., Kawahara T.: Comparative studies on physical and chemical property of avian eggs. Polymorphisms of egg yolk proteins of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Japan Poult. Sci.* 18, 126, 1981.

Wpł. 30 III 1990

SUMMARY

Blood serum proteins from 23 old and 25 young silver foxes as well as 10 old and 11 young polar foxes were separated by horizontal polyacrylamide gel electrophoresis. In obtained electrophoregrams the following protein regions were differentiated: prealbumina (Pa), albumina (Alb), postalbumins (Poa), pretransferrins (PtF), transferrins (Tf) and posttransferrins (PotF). There was found differentiation of structural proteins of young and old foxes in the subregion of postalbumine Poa_2 , pretransferrin PtF_3 , transferrins Tf and posttransferrin $PotF_1$. The differentiation suggests that proteins of these regions are characterized by variability resulting from ontogeny of foxes.



Fot. 1. Fotografia elektroforegramów białek surowicy młodych i dorosłych lisów pospolitych i polarnych: nr 6, 16, 19 — dorosłe samice; nr 20, 21 — dorosłe samce; pozostałe elektroforegramy — młode lisy

Phot. 1. Photograph of electrophoregrams of serum protein of young and full-grown common and polar foxes: nos. 6, 16, 19 — full-grown females; nos. 20, 21 — full-grown males; other electrophoregrams — young foxes