

Diagnostyka chimeryzmu komórkowego u owiec na podstawie grup krwi i markerów mikrosatelitarnych DNA

TADEUSZ RYCHLIK, ANNA RADKO, BARBARA REJDUCH, URSZULA KACZOR*

Zakład Immuno i Cytogenetyki Instytutu Zootechniki, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

*Katedra Hodowli Owiec i Kóz Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Rychlik T., Radko A., Rejduch B., Kaczor U.

Cell chimerism diagnostics in sheep based on blood groups and DNA microsatellite markers

Summary

Cell chimerism was diagnosed in sheep derived from twin and multiple pregnancies by means of immunogenetic and molecular methods. 294 sheep of the prolific Olkuska, Romanov and White Alpine breeds (83 twin pairs, three litters of triplets and quadruplets, and one litter of septuplets) were investigated. The determination of blood antigens performed in the present study helped to identify erythrocyte chimerism in eight pairs of twins and three of the septuplets. These animals carried the same antigens and showed incomplete blood cell reactions in some test sera. Molecular analysis was applied to those sheep in which erythrocyte chimerism was discovered. Genotypes of DNA microsatellite loci ETH225 and TGLA53 were determined. The analysis also confirmed chimerism in these animals.

Key words: Sheep, blood group, microsatellite DNA polymorphism, cell chimerism

W hodowli zwierząt coraz większego znaczenia nabiera możliwość identyfikacji osobników pochodzących z ciąży bliźniaczych lub mnogich oraz diagnozowania u nich chimeryzmu komórkowego. Zjawisko chimeryzmu charakteryzuje się występowaniem u danego osobnika dwóch (lub kilku) linii komórkowych o różnych założeniach genetycznych. Zjawisko to najczęściej powstaje w wyniku wspólnej cyrkulacji krwi u płodów, których błony są połączone anastomozami (połączenia tętniczo-żyłne). Pierwsze informacje dotyczące pojawienia się anastomoz pomiędzy różnopłciowymi płodami bliźniaczymi u bydła pochodzą z 1916 r. W późniejszym okresie chimeryzm komórkowy zdiagnozowano także u myszy, owiec, kóz oraz świń i koni (4, 5). Chimeryzm można stwierdzić metodami immunogenetycznymi i cytogenetycznymi (2, 3, 8), a ostatnio, dzięki ogromnemu postępowi genetyki molekularnej, również na podstawie analizy markerów mikrosatelitarnych DNA (1, 5).

Celem badań było wykrycie chimeryzmu komórkowego u owiec pochodzących z ciąży bliźniaczych i mnogich przy zastosowaniu metod immunogenetycznych i techniki molekularnej.

Material i metody

Badaniami objęto ogółem 294 owce ras: plenna owca olkuska, romanowska oraz biała alpejska, w tym 83 pary stanowiły bliźnięta, po trzy mioty trojaczek i czworaczek oraz jeden miot siedmioraczek.

Antygeny krwinek czerwonych oznaczono za pomocą 15 własnych standaryzowanych surowic testowych: Aa, Ab, Bb, Bc, Bd, Be, Bf, Bg, Bi, Ca, Cb, Da, Ma, R, O oraz eksperymentalnej surowicy testowej oznaczonej symbolem PLB-17 – wykrywającej antygen z układu grupowego krwi B (6). Wszystkie surowice testowe poddawane były standaryzacji w testach porównawczych organizowanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (ISAG). Antygeny krwinkowe z układów grupowych krwi A, B, C, D, M, R oznaczono testem hemolitycznym, a antygen Da z układu D – testem aglutynacyjnym na mikroplątkach.

Do ustalenia genotypów w 2 mikrosatelitarnych loci ETH225 i TGLA53 u badanych osobników zastosowano zautomatyzowaną technikę analizy wielkości fragmentów DNA (automated DNA sizing technology). Na bazie wyizolowanego genomowego DNA amplifikację (powielenie) sekwencji z 2 mikrosatelitarnych loci wykonano metodą PCR. Do przeprowadzenia reakcji PCR użyto 2 par sekwencji starterowych, jeden z każdej pary starterów znakowany był na końcu 5' fluorescencyjnym barwnikiem NED i JOE:

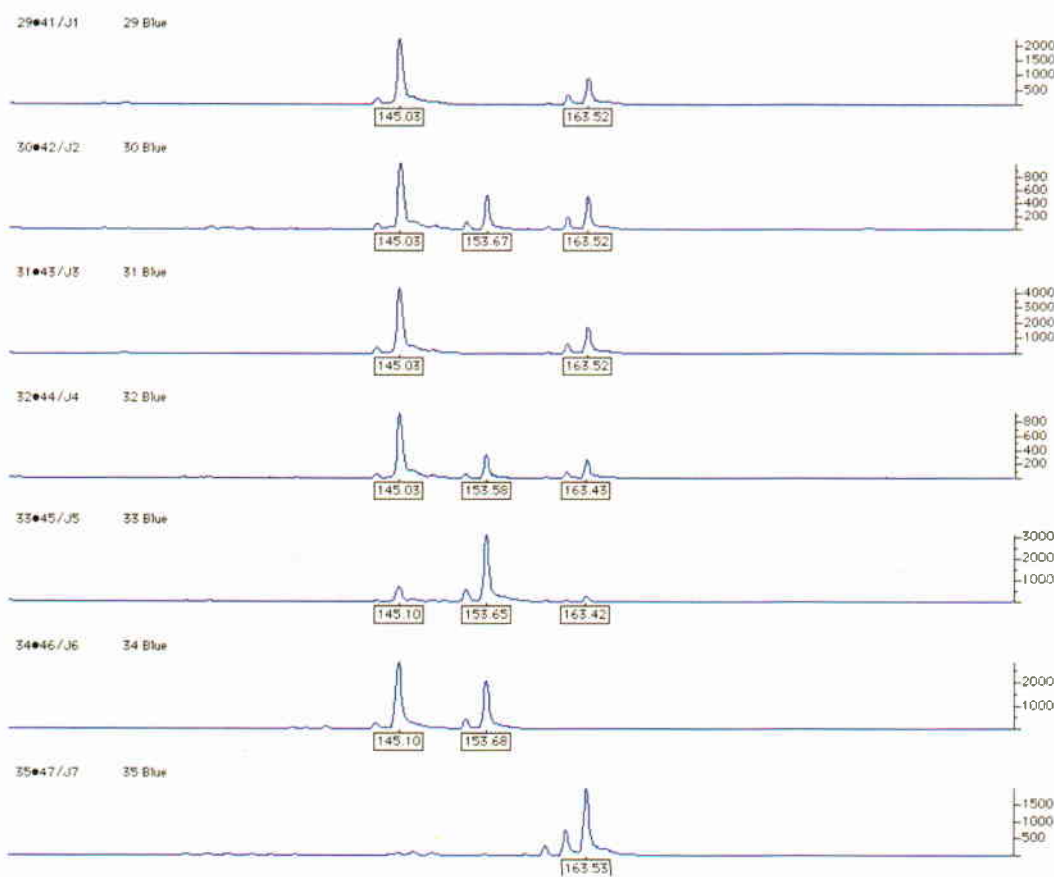
ETH225: Starter A (5'-3') GATCACCTTGCCACTATTTCCT

Starter B (5'-3') NED-ACATGACAGCCAGCTGCTACT

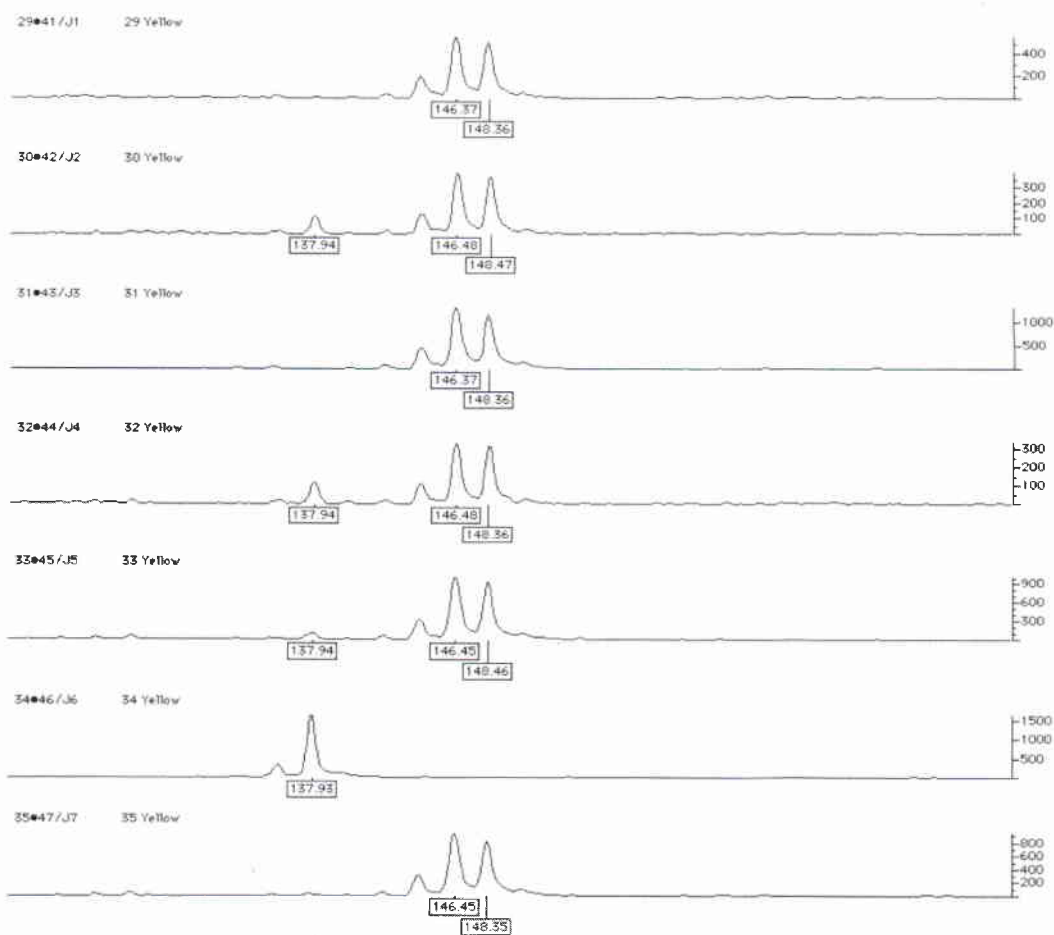
TGLA53: Starter A (5'-3') GCTTTCAGAAATAGTTTG-CATTCA

Starter B (5'-3') JOE-ATCTTCACATGATATTACAG-CAGA

Mieszaninę reakcyjną poddano procesowi termicznemu: 15 min. wstępnej denaturacji genomowego DNA w temp.



Ryc. 1. Genotypy siedmioraczków owczych w locus TGLA53 w programie Genotyper 2.0



Ryc. 2. Genotypy siedmioraczków owczych w locus ETH225 w programie Genotyper 2.0

95°C, następnie 31 cykli obejmujących denaturację w temp. 94°C przez 45 sek., przyłączenie starterów do matrycy w temp. 61°C w ciągu 45 sek., wydłużanie starterów w 72°C przez 1 min. i końcowe wydłużanie starterów w temp. 72°C w czasie 60 min.

Produkty PCR wraz ze standardem długości DNA – GeneScan 350-ROX poddawano rozdzielności elektroforetycznej w 4% denaturującym żelu poliakrylamidowym w laserowym sekwenatorze ABI PRISM 377 produkcji firmy Applied Biosystems. Wyniki rozdzielności elektroforetycznej analizowano przy pomocy programu komputerowego GeneScan 2.1., natomiast wielkości zidentyfikowanych alleli określono w programie Genotyper 2.0.

Wyniki i omówienie

Powstawanie anastomoz u owiec szacuje się średnio na 10%, natomiast u bydła aż na około 98% ciąży bliźniaczych (3), biorąc jednak pod uwagę, że ciąży mnogie występują u bydła bardzo rzadko, poniżej 2%, a u owiec od 40% nawet do 100% (w zależności od rasy), w konsekwencji częstość chimeryzmu u tych gatunków kształtuje się na podobnym poziomie.

Chimeryzm komórkowy w obrębie erytrocytów można określić na podstawie wyników serologicznych, badając grupy krwi. Każde z bliźniąt, u których wystąpił chimeryzm erytrocytarny, posiada krwinki o cechach antygenowych warunkowanych genetycznie przez własny organizm oraz krwinki o ce-

Tab. 1. Grupy krwi i loci mikrosatelitarne na przykładzie siedmioraczków owczych, u których 3 osobniki (J2, J4 i J5) wykazują chimeryzm komórkowy

Badany osobnik	Grupy krwi						Loci mikrosatelitarne	
							ETH225	TGLA53
J1	Aa	Bb	Cb		Ma	R	146/148	145/163
J2	Aa	Bb Bi [±]	Cb [±]	Da	Ma [±]	R [±]	138/146/148	145/153/163
J3	Aa	Bb Bi	Cb	Da	Ma	R	146/148	145/163
J4	Aa	Bb Bi [±]	Cb [±]	Da	Ma [±]	R [±]	138/146/148	145/153/163
J5	Aa	Bb Bi [±]	Cb [±]	Da	Ma [±]	R [±]	138/146/148	145/153/163
J6	Aa	Bb	Cb	Da	Ma	R	138/138	145/153
J7	Aa	Bb	Cb	Da	Ma	R	146/148	163/163
Matka		Bb	Cb	Da	Ma	0	138/146	153/163
Ojciec	Aa	Bb Bi	Cb	Da	Ma	R	138/148	145/163

Objaśnienie: ± – reakcja niekompletna

chach antygenowych współbliźniaka. W przypadku, kiedy dany antygen występuje tylko na jednym z dwu typów erytrocytów, reakcje z korespondującymi reagentami testowymi są niepełne. Każdy z takich osobników będzie przekazywał potomstwu wyłącznie te cechy antygenowe, które są u niego uwarunkowane genetycznie (8).

Wykonane w badaniach własnych oznaczenia składu antygenowego krwi u owiec z ciąży bliźniaczych i mnogich pozwoliły wykryć przypadki chimeryzmu erytrocytarnego u ośmiu par bliźniąt i trzech osobników pochodzących z ciąży mnogiej. W tab. 1. przedstawiono przykład chimeryzmu erytrocytarnego wykrytego u trzech osobników z miotu siedmioraczków olkuskiej owcy pełnej. Identyczne cechy antygenowe oraz niepełne wyniki reakcji krwinek z niektórymi surowicami testowymi wskazują, że osobniki te posiadały dwie populacje erytrocytów różniące się antygenami Bi, Cb, Ma, R.

Osobniki z miotu siedmioraczków, u których stwierdzono chimeryzm erytrocytarny poddano również analizie molekularnej. Analiza dwóch loci mikrosatelitarnych potwierdziła występowanie chimeryzmu komórkowego u tych osobników. W badanych loci zaobserwowano po trzy allele, o długościach: 138, 146 i 148 pz w locus ETH225 oraz o długościach: 145, 153 i 163 pz w TGLA53, u osobników oznaczonych symbolami J2, J4 i J5 (tab. 1). Podobnie jak w przypadku antygenów erytrocytarnych, u osobnika z chimeryzmem komórkowym występują dwa allele wynikające z założeń genetycznych danego osobnika oraz trzeci allel pochodzący od współbliźniaka (ryc. 1 i 2).

Wykorzystanie w praktyce wyników analiz immunogenetycznych czy molekularnych pozwala uzyskać bardziej efektywny postęp hodowlany. Stosowanie na szeroką skalę inseminacji u bydła i rozwoju tej metody u owiec i kóz stwarza warunki do przekazywania i rozprzestrzeniania wśród pokoleń potomnych cech

często niepożądanych z punktu widzenia hodowli. W związku z tym istotne jest dalsze prowadzenie badań mających na celu szybką i precyzyjną identyfikację chimeryzmu komórkowego, którego nosicielstwo związane jest z niepłodnością samic (frymartyny) oraz z możliwością obniżenia parametrów jakości nasienia samców – reprodaktorów (7).

Piśmiennictwo

1. Fritz-Hirni H., Muntwyler J., Glowatzki-Mullis M. L.: Parentage testing with microsatellites in cattle: pitfall twins. Abstr. XXVIIIth Inter. Conf. Anim. Genet., University of Minnesota. 2000, s. 94.
2. Jonsson G., Gustavsson I.: Blood cell chimerism in one of a three triplet lambs, J. Hered. 1969, 60, 175.
3. Rejduch B., Słota E., Kwaczyńska A., Danielak-Czech B., Kozubska-Sobocińska A.: Application of immunogenetic and cytogenetic methods in diagnosis of cell chimerism in cattle. Roczn. Nauk. Zoot. 1998, 25, 17-24.
4. Rejduch B.: Zjawisko chimeryzmu komórkowego XX/XY u zwierząt z rodziny Bovidae. Roczn. Nauk. Zoot. Rozprawy Habilitacyjne. 2001, 14, 1-61.
5. Rejduch B., Słota E., Janik A., Ząbek T.: Identification of blood cell chimerism in bovine heterosexual twins using blood groups, karyotype and DNA microsatellite polymorphism analyses. Ann. Anim. Sci. 2001, 2, 13-18.
6. Rychlik T., Duniec M. J.: Further studies on identification and inheritance of the PLB-25/1 antigen from the blood group system B in sheep. Roczn. Nauk. Zoot. 1998, 25, 51-57.
7. Rynkiewicz-Szatowska I.: Reproductive performance of XX/XY chimeric rams. Proc. 10th Europ. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim., Utrecht 1992, s. 213-217.
8. Słota E., Żur F., Duniec M.: Badania immunogenetyczne i cytogenetyczne owiec pochodzących z ciąży bliźniaczych i mnogich. Roczn. Nauk. Zoot. 1985, 12, 23-28.

Adres autora: dr inż. Tadeusz Rychlik, ul. Grota Roweckiego 19/38, 30-348 Kraków; e-mail: trychlik@izoo.krakow.pl

MCGORUM B. C., ANDERSON R. A.: Biomarkery ekspozycji na związki cyjanowe u koni z gorączką pastwiskową. (Biomarkers of exposure to cyanogens in horses with grass sickness). Vet. Rec. 151, 442-445, 2003 (15)

Celem potwierdzenia hipotezy odnośnie roli glukozydów cyjanowych występujących w koniczynie białej (*Trifolium repens*) w powstaniu gorączki pastwiskowej u koni określono ogólny poziom związków cyjanowych oraz ich głównych metabolitów w krwi i płazmie. Spośród 43 zdrowych koni 12 wypasano na pastwiskach, na których wystąpiła gorączka pastwiskowa. U koni zdrowych wypasanych na pastwisku, na którym występowała u koni gorączka pastwiskowa, poziom cyjanu we krwi, tiocyjaniu w płazmie krwi i w moczu był wyższy niż u koni zdrowych z chowu alkierzowego. Chore konie nie kontaktowały się uprzednio ze związkami cyjanu. Mogły one jednak otrzymywać pokarm zawierający wyższe stężenie tych związków, zanim wystąpiła u nich utrata łaknienia.