

ELEKTROFOREESI KASUTAMINE VERERAKKUDE ENSÜÜMIDE POLÜMORFISMI UURIMISEL

V. Karus, A. Karus, T. Lepiku

Seni on aretuslikel eesmärkidel kasutatud mitmeid markertunnuseid nagu veregrupid, seerum-valgud jne. Nende abil on võimalik edukalt kontrollida loomade põlvnemisandmeid ja osaliselt ka prognoosida jõudlusnäitajaid, ent nad ei võimalda iseloomustada uuritavate loomade ainevahetusprotsesside iseärasusi. Biokeemiliste ja füsioloogiliste uurimismeetodite rakendamine põllumajanduslikku huvi pakkuvate loomade uurimisel võimaldab saada ulatuslikumat teavet looma organismis toimuvatest protsessidest. Isoensüümspektrid on geneetiliselt määratud tunnused, mis annavad lisainformatsiooni organismis toimuvaid ainevahetusprotsesse mõjutavatest pärilikest omadustest. Isoensüümide uurimisel saadavad teadmised omavad tähtsust loomakasvatuses (potentsiaalsed geneetilised markerid) ja veterinaarias (kasutatavad diagnostilise kriteeriumina). Isoensüümspektrid on otseselt seotud loomade ainevahetuslike protsessidega ja see annab neile olulise eelise teiste potentsiaalsete aretuslike markertunnuste ees. Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida võimalikke elektroforeesil põhinevate meetodite kasutusvõimalusi uute ensüümide olemusega markersüsteemide leidmiseks.

Materjal ja meetoodika

Käesolevas töös uurisime viie ensüümi (sorbitooli dehüdrogenaas – SDH, EC 1.1.1.14.; aspartaadi aminotransferaas – ASAT, EC 2.6.1.1.; superoksiidi dismutaas – SOD, EC 1.1.1.35.; isosidrunhappe dehüdrogenaas – IDH, EC 1.1.1.42.; glütseraldehyüdfosfaadi dehüdrogenaas – GDH, EC 1.1.1.8.) isoensüümide elektroforeetilise lahutamise ja detekteerimise võimalusi, kasutades diskelektroforeesi erinevate kontsentratsioonidega (7,5 %, 10,0 % ja 12,5 %) natiivses polüakrüülamiidgeelis ja isoelektrilist fokuseerimist standardses horisontaalses Ampholine pH 3,5-9,5 geelplaadis (Pharmacia Biotech) ning vertikaalses 5 % polüakrüülamiidgeeli plokis. Eksperimendi planeerimise aluseks võtsime Pasteuri standardmeetoodika (Pasteur *et al.*, 1987). Meetodite võrdlemise käigus uurisime 86 veise vereseerumit, neist 10 äärširi, 30 eesti mustakirjut (emk) ja 46 eesti punast (ep) tõugu ning 32 koera (kokku 6 tõust) vereseerumit. Kuna vereseerumi uurimisel on otseselt geneetiliste mõjutuste kõrval vaja arvestada paljude mittegeneetiliste kõrvalmõjutustega, erütrotsüütide ja leukotsüütide isoensüümspektrite alluvus keskkonnamõjutustele on aga seniste uurimistulemuste põhjal praktiliselt olematu, uurisime täiendavalt isoensüümspektrite tuvastamise võimalusi erütrotsüütides. Kokku hõlmas uurimus 76 lehma (emk ja ep) ja 18 koera täisverd. Tulemuste statistiliseks töötlemiseks kasutasime andmetöötluspaketti Excel 7.0.

Tulemused

Uuritud meetoditest osutus kõikide ensüümide määramisel sobimatuks diskelektroforees 12,5% polüakrüülamiidgeelis. Sõltuvalt katsetingimustest oli 10,0 % ja 7,5 % geelis saavutatud lahutus piisav kvalitatiivse (ja poolkvantitatiivse) hinnangu andmiseks. Isoensüümide lokaliseerimine geelis oli paremini piiritletud 10,0 % geelis, ent isoensüümide suurem kaugus 7,5 % geelis võimaldas anda densitomeetrimisel täpsema poolkvantitatiivse hinnangu. Parim lahutus saavutati isoelektrilisel fokuseerimisel. Standardse horisontaalse Ampholine pH 3,5-9,5 geelplaadi kasutamisel saadi lineaarne pH-gradient, mis lihtsustas isoelektrilise punkti määramist. Vertikaalses geelis saavutati küll hea isoensüümide lahutuvus, kuid geelis tekkinud pH-gradient ei olnud lineaarne. Varasema kogemuse põhjal (SDH ja ALD isoensüümspektrite uurimine veiste vereseerumis) ei saa kvantitatiivset külge isoensüümspektrite uurimisel kõrvale jätta (Karus, 1994) ja see tingib suhteliselt kalli meetoodika kasutamise. Histokeemilised isoensüümide lokaliseerimise määramise meetodid andsid kõikides geelides rahuldavaid tulemusi. Puudusena väärib märkimist tume foon ASAT määramisel, mis muudab teiste ensüümide samaaegse määramise geelis võimatuks. Isoelektrilisel fokuseerimisel kasutatavate amfolüütide tõttu vajatakse IEF-meetodil lahutatud isoensüümide ilmutamiseks suuremat inkubatsiooniaega ja 1,5 korda kontsenteeritumat inkubatsioonipuhvrit. SDH isoensüümspektrid veiste vereseerumis on varem uuritud. Erütrotsüütides sisaldus ainult üks isoensüüm. Koertel oli seerumis neli (langevad kokku veiste maksas leiduvatega) ja erütrotsüütides üks SDH-isoensüüm. ASAT isoensüümspektri densitomeetrimist takistab tume foon. Meetoodika täiustamine jätkub. SOD

isoensüümspektris oli koertel (nii seerumis kui erütrotsüütides) neli isoensüümi, veistel üks või kaks. IDH vajab eraldi uurimist, kuna katsetulemustest ilmnes ühe (arvatavasti geneetiliselt põhjustatud) isoensüümi olemasolu loomal, kelle emapoolset genotüüpi pole säilinud. 1997. a. jätkub töö MDH, GDH, SDH, IDH, ASAT, (+ALAT) ja SOD isoensüümspektrite iseloomustamiseks erütrotsüütides ja leukotsüütides suurema valimiga, sh. geneetiliselt seotud loomadega.

Tööd toetab Eesti Teadusfond, grant 1837.

Kirjandus

- Harris H., Hopkinson D. A. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. – Amsterdam: North-Holland Publishing Co., 1976.
- Karus A. Activity and multiplicity of serum aldolase and sorbitol dehydrogenase in the first lactation. – Arch.Tierz., 37, 6, p. 605...609, 1994.
- Karus: Карус А. Л. О методах выявления изоферментов при помощи ИЭФ и в нативном блоке ПААГ — Молекулярно-генетические маркеры животных. - Киев: Аграрна Наука, с. 30. 1996
- Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J., Britton-Davidjan J. Practical isozyme genetics. – Chichester Ellis Horwood Ltd., 1987.
- Richardson B. J., Baverstock P. R., Adams M. Allozyme Electrophoresis: Handbook for Animal Systematics and Population Studies. – Sidney, Acad. Press, 1986.

Electrophoresis used in blood cell enzyme polymorphism study

V. Karus, A. Karus, T. Lepiku

Summary

At present a lot of the genetic markers, such as blood groups, protein polymorphic forms e.c. are used to solve the questions concerning animal breeding. Enzymes are very prospective study objects for acquiring of knowledge about processes in an animal organism. The enzymes, which have multiple molecular forms are of great interest to us. Isoenzyme spectra, genetically determined factors, give additionally information about the animal metabolic status. Knowledge of the investigation into isoenzymes is of the importance to animal husbandry (as potential genetic markers) and to veterinary medicine (as diagnostic criterion). Isoenzyme spectra are directly linked with the metabolic processes and therefore comparing with the other potential genetic markers they are more favourable for animal breeding. Recently we studied SDH and ALD isoenzyme spectra in blood serum, but there are many nongenetical influences on the isoenzyme spectra in serum. It is more prospective to investigate isoenzyme spectra in blood cells. In this study we investigated the methods for determination of isoenzyme spectra SDH, ASAT, SOD, IDH and GDH in serum and erythrocytes. We used native 7,5 %, 10,0 % and 12,5 % PAGE electrophoresis and isoelectrical focusing in standard horizontal Ampholine pH 3.5-9.5 gels (Pharmacia Biotech) and vertical 5 % PAGE. The best results were obtained by isoelectrical focusing. The standard horizontal Ampholine pH 3.5-9.5 gel (Pharmacia Biotech), was preferred because a linear gradient of pH in the gel, although, resolution of isoenzymes was sufficient in native 7.5 % and 10.0 % PAGE. Histochemical methods for enzyme determination gave satisfactory results. Dark background was obtained only by ASAT staining, and it makes impossible to detect the other enzymes in the same gel. Staining after IEF needed 1.5-times more concentrated staining puffer and at longer staining time. One SDH isoenzyme was in cattle and dog erythrocytes, and four were in dog serum. SOD isoenzyme spectrum contains four forms in a dog (both in erythrocytes and serum) and one or two in cattle. Recently an unknown IDH isoenzyme was detected in one cow serum and erythrocytes, but there was no mother-side genotype left. The studies will be continued with a larger number of (including genetically related) animals.