

ANALIZA OBRAZU ELEKTROFORETYCZNEGO SUROWICY KLINICZNIE ZDROWYCH KONI Z ZASTOSOWANIEM DWÓCH TYPÓW NOŚNIKA AGAROWEGO

Anna Silecka, Danuta Czernomysy-Furowicz, Karol Fijałkowski

Akademia Rolnicza w Szczecinie

Streszczenie. Rozdział elektroforetyczny 14 surowic pochodzących od klinicznie zdrowych koni rasy Standardbred przeprowadzono na dwóch typach nośnika. Na Protein Gel 100 wyodrębniono 8 frakcji. Średnie stężenie frakcji wynosiło: albuminowa – $30,45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a_1 – $2,65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a_{2a} – $4,47 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a_{2b} – $3,04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a_{2c} – $6,76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, b_1 – $8,68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, b_2 – $3,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, g – $9,43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Natomiast na Hydrogel HR wyróżniono 9 frakcji. Średnie stężenie tych frakcji wynosiło: albuminowa – $31,34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a_1 – $2,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a_{2a} – $2,34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, (w tym: a_{2aa} – $0,95 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ i a_{2ab} – $1,47 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), a_{2b} – $5,07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a_{2c} – $4,49 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, b_1 – $7,30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, b_2 – $3,85 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, g – $10,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Do pomiaru stężenia białka całkowitego, którego średnia wartość wynosiła $68,61 \pm 11,07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, zastosowano metodę Lowryego dostosowaną do parametrów czytnika El_x800 (Bio-Tek Instruments INC., Universal Microplate Reader). Stosunek albumin do globulin wynosił kolejno $0,80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ i $0,84 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Ponadto oznaczono w rozdziale elektroforetycznym lokalizację a_1 – antytrypsyny za pomocą zestawu do immunofiksacji (GEL IFE Cormay) oraz Polyclonal Rabbit Anti-Human Alpha – 1 Antitrypsin (DakoCytomation).

Słowa kluczowe: albumina, białko całkowite, elektroforeza, frakcja surowicy, globuliny, proteinogram

WSTĘP

Elektroforeza strefowa w żelu agarowym jest jedną z najbardziej popularnych metod separacji białek surowicy. Dzięki rozdzielności uwidocznione zostają frakcje: homogenna albuminowa oraz heterogenne globulinowe. Monitoring zmian zachodzących w stosunku ilościowym tychże frakcji, jak i pomiędzy poszczególnymi frakcjami globulinowymi dostarcza istotnych informacji diagnostycznych [Bigoszewski i in. 2001]. Zaburzenia w proporcji składu, jak i zmiany w poziomie poszczególnych białek informują o nieprawidłowej funkcji narządów (wątroba, nerki) lub nawet całych układów (układ immunologiczny). Stężenie białka całkowitego, podobnie jak stężenie poszczególnych frakcji białkowych jest bardzo ważnym wskaźnikiem stanu fizjologicznego, w jakim znajdują się zwierzęta.

Adres do korespondencji – Corresponding author: mgr inż. Anna Silecka, Katedra Immunologii i Mikrobiologii, Akademia Rolnicza w Szczecinie, ul. Doktora Judyma 24, 71-466 Szczecin, e-mail: a.silecka@wp.pl

Zatem, ocena zdrowotności zwierząt, na podstawie wymienionych parametrów, jest pomocna zarówno w profilaktyce, jak i terapii zwierząt oraz umożliwia zminimalizowanie strat ekonomicznych [Kostro i in. 2003].

Ze względu na brak standaryzacji rozdział elektroforetyczny surowicy w żelu agarozowym nie znalazł tak szerokiego zastosowania w medycynie weterynaryjnej, jak w ludzkiej. W surowicy ludzkiej standardowo uzyskuje się 6 frakcji białek: frakcja albuminowa oraz globulinowe (a_1 , a_2 , b_1 , b_2 , g) [Tomaszewski 1993]. W przypadku surowicy zwierzęcej ilość frakcji jest różna. Zmienność ta obserwowana jest zarówno pomiędzy gatunkami jak i w obrębie gatunku. W przypadku surowicy świń wyróżnia się od 5 do 7 frakcji białkowych [Scheunert i Trautmann 1987] psa od 6 do 7, a konia nawet od 5 do 10 [Coffman 1969, Osbaldiston 1972, Kristensen i Firth 1977, Halliwell 1989].

Kontrowersje dotyczące zarówno liczby frakcji jak i miejsca ich usytuowania, wynikają zazwyczaj ze stosowania nośników o odmiennych właściwościach fizykochemicznych (rodzaj i gęstość żelu) lub różnic w parametrach prowadzonej elektroforezy (czas i napięcie).

Celem pracy było ustalenie obrazu elektroforetycznego surowicy zdrowych koni na dwóch typach nośnika.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły surowice 14 koni rasy Standardbred. Krew na skrzep pobierano od zdrowych, prawidłowo rozwijających się, półtorarocznych zwierząt. Konie utrzymywane były w tych samych warunkach i jednakowo żywione.

W surowicach określono stężenie białka całkowitego, oznaczono wielkość, ilość i ruchliwość frakcji elektroforetycznych oraz ustalono lokalizację a_1 – antytrypsyny. Do pomiaru stężenia białka całkowitego zastosowano metodę Lowryego dostosowaną do parametrów czytnika EL_x800 (Bio-Tek Instruments INC., Universal Microplate reader). Odczyt przeprowadzono przy użyciu mikropłytek (bioMérieux, Round Base Plates M220 24A; 123x81 mm) w formacie 96. Do utworzenia krzywej kalibracyjnej, jako wzorca białkowego, użyto roztworu krystalicznej albuminy bydlęcej – BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma®). Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono na dwóch żelach: Protein Gel 100, (Cormay) – 20 min przy napięciu 100 V i na żelu o wyższej rozdzielczości Hydragel HR (Sebia) – 40 min przy napięciu 80 V. Do identyfikacji a_1 – antytrypsyny posłużył zestaw GEL IFE (Cormay) oraz Polyclonal Rabbit Anti-Human Alpha – 1 Antitrypsin (DakoCytomation). Rozdział prowadzono przez 25 min przy napięciu 100 V.

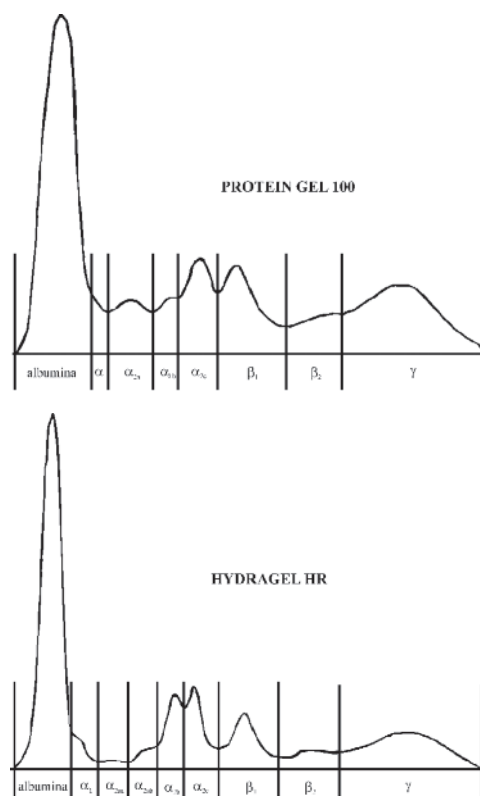
Odczyt densytometryczny dokonano przy użyciu aparatu DS-3 (Cormay). Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o test *t*-Studenta przy poziomie istotności $p < 0,05$. Obliczeń dokonywano przy użyciu programu Statistica®.

WYNIKI I DYSKUSJA

Analizując proteinogramy surowicy końskiej, niektórzy autorzy [Osobaldiston 1972] nie wyróżniają lub nie nazywają „ramienia” pojawiającego się po katodalej stronie frakcji albu-

minowej, podczas gdy inni nazywają je frakcją a_1 [Kirk i in. 1975, Green i in. 1982], bądź a_{1a} [Massip i in. 1974]. Z powodu tej niezgodności autorzy opisujący „ramię” jako frakcję a_1 , kolejną frakcję określają mianem a_2 , która według autorów nie wyodrębniających „ramienia” jest frakcją a_1 . Warto podkreślić, że wartości, które przyjmuje frakcja albuminowa będą wyższe w pracach zaliczających do niej „ramię” [Green i in. 1982]. Dzięki immunofiksacji udowodniono w niniejszej pracy, iż owo zawsze mniej lub bardziej widoczne „ramię” jest reprezentowane głównie przez białko a_1 – antytypsynę, zatem powinno stanowić osobną frakcję – a_1 .

W wykonanym rozdziale w żelu Protein Gel 100 wyodrębniono, u wszystkich badanych zwierząt, osiem frakcji (albumina, a_1 , a_{2a} , a_{2b} , a_{2c} , b_1 , b_2 , g), natomiast w żelu Hydrigel HR stwierdzono obecność dziewiętej frakcji, powstałej w wyniku rozdzielania białek migrujących w strefie a_{2a} (rys. 1). Corbell sądził, że owe różnice w ilości frakcji nie są związane z rasą [Corbell 1974]. Z kolei, Kristensen i współpracownicy obserwowali pojawienie się dodatkowego pików u wszystkich badanych koni rasy Tennessee Walking Horse, nie stwierdzili go nigdy u koni czystej krwi arabskiej, natomiast u pozostałych badanych ras występował on ze zmienną częstotliwością [Kristensen i Firth 1977]. U wszystkich 14 przebadanych w niniejszej pracy koni należących do tej samej rasy Standardbred stwierdzono obecność dodatkowego pików we frakcji a_{2a} .



Rys. 1. Proteinogramy
Fig. 1. Proteinograms

Poszczególne frakcje na obu żelach wykazywały zbliżone wartości, z wyjątkiem frakcji α_2 oraz β_1 (tab. 1). Odnotowano wyższe wartości frakcji α_{2a} i β_1 w przypadku Protein Gel 100 oraz frakcji α_{2b} w przypadku Hydragel HR. Ponieważ, badania elektroforetyczne przeprowadzone zostały w tym samym czasie, z zachowaniem tych samych warunków, przy użyciu tych samych próbek surowicy, rozbieżności te przypisane zostały rodzajowi i czułości użytego nośnika.

W porównaniu z wartościami uzyskanymi przez Kristensena (tab. 2), stwierdzono przede wszystkim, wyższe średnie stężenie albuminy oraz frakcji α_{2b} (tab. 1). Mimo że, zaobserwowane różnice w przypadku albuminy nie są relatywnie duże i nie przekraczają 25%, to w przypadku frakcji α_{2b} są dwukrotnie większe. Rozbieżności w stężeniach poszczególnych frakcji mogą mieć także i w tym przypadku związek z rodzajem użytego nośnika, gdyż Kristensen dokonywał rozdziałów na octanie celulozy.

Tabela 1. Wartości badanych parametrów u kłusaków Standardbred na dwóch nośnikach, $g \cdot L^{-1}$

Table 1. Values of analyzed parameters in Standardbred horses according to two types of agarose carrier, $g \cdot L^{-1}$

Parametry Parameters	Rodzaj nośnika Type of carrier	
	N = 14	
	Protein Gel 100	Hydragel HR
TP	68,61 ± 11,07 (54,85 – 89,70)	
A/G	0,80 ± 0,08 (0,65 – 0,95)	0,84 ± 0,08 (0,71 – 0,97)
Albumina Albumin	30,45 ± 5,02 (23,08 – 38,86)	31,34 ± 5,07 (22,85 – 40,43)
α_1	2,65 ± 0,67 (1,72 – 3,75)	2,10 ± 0,42 (1,28 – 2,63)
α_2	–	–
α_{2a}, α_{2b}	–	–
α_{2a}	4,47 ± 0,88 (3,12 – 6,53)	2,34 ± 0,68 (1,20 – 3,53)
α_{2aa}	–	0,95 ± 0,30 (0,44 – 1,45)
α_{2ab}	–	1,47 ± 0,34 (0,91 – 2,08)
α_{2b}	3,04 ± 1,09 (1,4 – 4,59)	5,07 ± 0,94 (3,35 – 6,79)
α_{2c}	6,76 ± 1,47 (5,13 – 10,25)	6,49 ± 1,21 (4,90 – 9,55)
β_1	8,68 ± 2,02 (4,40 – 13,16)	7,30 ± 1,02 (5,70 – 8,64)
β_2	3,15 ± 0,86 (2,22 – 4,87)	3,85 ± 1,51 (2,16 – 7,14)
γ	9,43 ± 1,97 (6,4 – 12,67)	10,06 ± 2,34 (6,75 – 14,40)

TP – białko całkowite; A/G – stosunek frakcji albuminowej do frakcji globulinowej; N – liczba osobników w grupie badanej; () – wartości minimalne i maksymalne; ± – odchylenie standardowe. TP – total protein; A/G – albumin/ globulin ratio; N – number of animals in research group; () – minimal and maximal values; ± – standard deviation.

Tabela 2. Wartości badanych parametrów u zdrowych koni uzyskane przez różnych autorów, g·L⁻¹

Table 2. Values of analyzed parameters in clinically healthy horses according to different authors, g·L⁻¹

PP AA RR AA M EE TT RE YR S	Wartości wg Values according to	Kristensen i Firth 1977	Coffman 1969	Massip i Fumière 1974	Kirk i in. 1975	Osbaldiston 1972	Matthews 1982
	Rodzaj nośnika Type of carrier	A	CA	CA	CA	CA	CA
	N	50	20	98	14	62	8
TP		66,4 ± 6,4 (54 – 82)	70 (60 – 77)	61 ± 0,7	75,3 ± 1,6 (65,0 – 85,5)	73	64,7 ± 2,8
A/G		–	–	–	–	–	–
Albumina Albumin		23,9 ± 2,7 (18,1 – 30,1)	33 (29 – 38)	27,6 ± 0,8	27 ± 0,6 (23,1 – 31,2)	30 (28 – 33)	31,4 ± 2,4
α ₁		2,9 ± 0,8 (1,4 – 4,5)	–	2,5 ± 0,2	3,0 ± 0,2 (1,7 – 4,6)	–	–
α ₂		–	10 (7 – 13)	–	–	10 (6,6 – 11,5)	–
α _{2a} , α _{2b}		–	–	1,7 ± 0,1	2,1 ± 0,2 (1,4 – 4,3)	–	1,9 ± 0,26
α _{2a}		3,3 ± 0,9 (1,5 – 5,1)	–	–	–	–	–
α _{2aa}		1,7 ± 0,4 (0,8 – 2,6)	–	–	–	–	–
α _{2ab}		2,3 ± 0,3 (1,7 – 2,9)	–	–	–	–	–
α _{2b}		2,4 ± 0,8 (1,0 – 3,9)	–	–	–	–	–
α _{2c}		7,0 ± 2,3 (3,0 – 13,5)	–	8,1 ± 0,4	8,2 ± 0,8 (5,9 – 15,9)	–	6,5 ± 1,3
β ₁		10,1 ± 2,8 (4,7 – 16,3)	8 (6 – 12)	8,1 ± 0,4	12,7 ± 1,1 (6,9 – 23,5)	10 (7,0 – 14,4)	9,2 ± 3,0
β ₂		5,5 ± 2,1 (2,1 – 11,3)	6 (4 – 12)	4,7 ± 0,3	8,2 ± 0,6 (5,5 – 12,0)	8,0 (5,5 – 11,6)	5,7 ± 1,1
γ		11,5 ± 2,8 (6,1 – 18,3)	12 (9 – 15)	8,2 ± 0,5	14,1 ± 0,6 (11,6 – 18,4)	15 (10,4 – 18,1)	10 ± 1,4

TP – białko całkowite; A/G – stosunek frakcji albuminowej do frakcji globulinowej; A – żel agarozowy; CA – octan celulozy; N – liczba osobników w grupie badanej; () – wartości minimalne i maksymalne; ± – odchylenie standardowe.

TP – total protein; A/G – albumin/globulin ratio; A – agarose gel; CA – cellulose acetate; N – number of animals in research group; () – minimal and maximal values; ± – standard deviation.

WNIOSKI

Elektroforeza białek surowicy w żelu agarozowym jest podstawowym testem diagnostycznym obrazującym zmiany zachodzące pomiędzy stężeniem poszczególnych frakcji oraz stanowi podstawę do dalszej analizy poszczególnych białek ostrej fazy.

Stosując Hydrigel HR w obrazie elektroforetycznym surowicy koni rasy Standardbred, można wyodrębnić 9 frakcji – albuminową, α₁, α_{2a} (α_{2aa} i α_{2ab}), α_{2b}, α_{2c}, β₁, β₂, γ. Zatem

zastosowanie tego nośnika umożliwia większą precyzję rozdziału, a tym samym uzyskanie dokładniejszych wyników. Jednak rozdział frakcji na dwie podfrakcje a_{2aa} i a_{2ab} ma niewielkie znaczenie diagnostyczne i najczęściej uzyskanie tylko jednego pików we frakcji a_{2a} jest wystarczające. Dlatego, biorąc pod uwagę częstsze i bardziej ekonomiczne zastosowanie Protein Gel 100, określenie wzorca podziału frakcji dla tego nośnika wydaje się szczególnie istotne.

PIŚMIENNICTWO

- Bigoszewski M., Rychlik A., Depta A., 2001. Białka ostrej fazy u zwierząt. *Med. Weter.* (3), 57.
- Coffman J.R., 1969. Clinical application of serum protein electrophoresis in the horse. 14th Ann. Meeting Am. Assoc. Equine Practitioners, Philadelphia, 265–279, (b.d.).
- Corbell E., 1974. Tipo Eletroforetico Maggiore – Ponte Beta-Gamma“ (TEM-PBG) in Medicina Veterinaria, *Clin. Vet.* 97, 277–284.
- Scheunert A., Trautmann A., 1987. Blut und Lymphe, Lehrbuch der Veterinar-Physiologie. Verlag Paul Parey, Berlin–Hamburg.
- Green S.A., Jenkins S.J., Clark P.A., 1982. A comparison of chemical and electrophoretic methods of serum protein determinations in clinically normal domestic animals of various ages. *Cornell Vet.* 72, 416–426.
- Halliwell R.E.W., 1989. *Veterinary Clinical Immunology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia–London–Toronto–Montreal–Sydney–Tokyo, 162–165.
- Kirk G.R., Hutcheson D.P., Neate S., 1975. Electrophoretic pattern of serum protein in clinically normal horses and ponies with laminitis. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 70, 337–339.
- Kostro K., Luft-Deptuła D., Gliński Z., Miazga A., 2003. Rola białek ostrej fazy w patologii zwierząt. *Życie Wet.* 78 (1), 19–25.
- Kristensen F., Firth E.C., 1977. Analysis of serum proteins and cerebrospinal fluid in clinically normal horses using agarose electrophoresis. *Am. J. Vet. Res.* 38, 1089–1092.
- Massip A., Fumière I., 1974. Analyse électrophorétique des protéines du serum sanguin de chevaux adultes normaux ages de quatre à dix ans. *Ann. Méd. Vét.* 118, 221–229.
- Matthews A.G., 1982. Serum electrophoresis in horses and ponies. *Equine Vet. J.* 14, 322–324.
- Osbaldiston G.W., 1972. Serum protein fraction in domestic animals. *Br. Vet. J.* 128, 386–393.
- Tomaszewski J.J., 1993 Diagnostyka laboratoryjna. PZWL, 44–45.

SERUM ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF CLINICALLY HEALTHY HORSES USING TWO TYPES OF AGAROSE CARRIER

Abstract. The electrophoresis of 14 sera taken from clinically healthy Standardbred horses was performed by means of two types of agarose gel. Eight fractions were obtained with Protein Gel 100 (Cormay). The mean concentration for each fraction was as follows: albumin – $30.45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a_1 – $2.65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a_{2a} – $4.47 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a_{2b} – $3.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a_{2c} – $6.76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, b_1 – $8.68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, b_2 – $3.15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, g – $9.43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Whereas, using Hydrogel HR nine fractions were acquired, whose mean con-

centrations were: albumin – $31.34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a_1 – $2.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a_{2a} – $2.34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, (consisting of: a_{2aa} – $0.95 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and a_{2ab} – $1.47 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), a_{2b} – $5.07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a_{2c} – $4.49 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, b_1 – $7.30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, b_2 – $3.85 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, g – $10.06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. In order to measure total protein concentration (mean value: $68.61 \pm 11.07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), Lowry's method, adjusted to microplate reader EL_x800 (Bio-Tek Instruments INC., Universal Microplate Reader), was employed. Albumin/ globulin ratio equals $0.80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $0.84 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Furthermore, α_1 -antitrypsin localization in proteinogram was determined by the immunofixation kit (GEL IFE Cormay) and Polyclonal Rabbit Anti-Human Alpha – 1 Antitrypsin (DakoCytomation).

Key words: albumin, electrophoresis, globulin, proteinogram, serum fraction, total protein

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 26.02.2008