

Oocyta transzplantáció, és mikromanipuláció zebradánió (*Danio rerio*) oocytákon

Csenki Zsolt¹, Andreas Zaucker^{2,3}, Kovács Balázs⁴, Lefler Kinga Katalin¹, Hegyi Árpád¹, Müller Tamás¹, Kovács Róbert¹, Yavor Hadzhiev^{2,3}, Urbányi Béla¹, Müller Ferenc^{2,3}, Váradi László¹

¹ Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási tanszék, Gödöllő

² Institute of Toxicology and Genetics Forschungszentrum, Karlsruhe

³ Department of Medical and Molecular Genetics Division of Reproductive and Child Health Institute of Biomedical Research, University of Birmingham, Birmingham

⁴ Szent István Egyetem, Környezetipari Regionális Egyetemi Tudásközpont, Gödöllő

A TÉMA AKTUALITÁSA

Az emlősöknél széleskörűen elterjedt és hatékony petesejt manipulációs módszerek (transzgen injektálás, mélyhűtéses tárolás) a halikrákon az ikra magas szikartalmú és vastag ikrahéj nem, vagy nehezen alkalmazhatók. Új lehetőségeket nyújthatnak a korai fejlődési állapotú oocytákon végezhető módszerek. Sikeres oocyta transzplantáció alkalmazásával, kiküszöbölhetők az ikrák felépítéséből adódó sajátosságok, könnyen vizsgálhatóak lehetnek az oocytában illetve az ikrában lezajló folyamatok, az anyai hatások.

CÉLKITŰZÉSEK

Eddigi vizsgálatunk során már sikerült egyértelműen bizonyítanunk, hogy a bejuttatott oocyták beépülnek a recipiens petefészkekbe, és ott életben maradnak, egy részük tovább is fejlődik.

Kísérleteink célkitűzése ezért az volt, hogy fiatal fejlődési állapotú (szikfelhalmazás előtti, de még jól látható sejtmaggal rendelkező) oocyták "nevelő"-anyába juttatása után, nyerhető-e termékenyítésre alkalmas ikrák, illetve lehetséges-e mikroinjektálni az oocytákat, valamint a különböző bejuttatott nukleinsavak (DNS, mRNS) működnek-e az oocytában.

MÓDSZEREK

Vizsgálataink során zebradánió (*Danio rerio*) fajon végeztünk intraszepikus átültetéseket. Egy alkalommal átlagosan 100 db szikfelhalmazódás előtti transzgenikus (β -aktin YFP) zebradánió anyáktól származó oocytát transzplantáltunk a nevelőanyákba. A transzplantált anyákat hetenként szaporítottuk, majd fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk az embriókat, a termékenyülés utáni második napon.

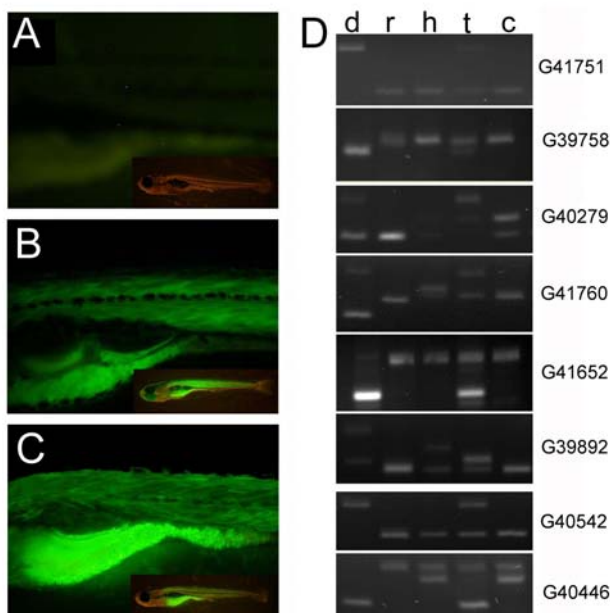
A szülőpároktól, az YFP aktivitást mutató utódokból illetve féltestvéreikből DNS-t izoláltunk, majd 50 általunk választott zebradánió specifikus mikroszatellit primerrel vizsgáltuk a közöttük fenálló rokonsági fokokat. A 8 legnagyobb különbséget mutató primer adatai a következő táblázatban találhatóak:

Marker name ^a	Genomic position ^{a,b}			F primer ^a	F primer length ^a	R primer ^a	R primer length ^a	product ^a
	chr	CM ^b	bp ^c					
G41751 ^d	9 ^e	23.5 ^e	3189495 ^e	ATTGTGCCCTTGAGTGAGGCT ^a	20 ^a	GAGGTGACTGCAACCGATT ^a	20 ^a	117-251 ^a
G39758 ^d	9 ^e	80.7 ^e	49740810 ^e	TTGAGCTGTGAACAAGCCAC ^a	20 ^a	CCTCTTCACTTGCCATCCAT ^a	20 ^a	101-159 ^a
G40279 ^d	10 ^e	81.3 ^e	35313739 ^e	CCGCACTGTGTCAGCAGAAAT ^a	19 ^a	GCCTCTTGTGTTGACCTTTC ^a	20 ^a	97-160 ^a
G41760 ^d	11 ^e	36.8 ^e	9285133 ^e	ACCAACCTGAGGGAGTTT ^a	20 ^a	CCTTCTACCCTATGAATG ^a	20 ^a	111-149 ^a
G41652 ^d	16 ^e	71.9 ^e	45196237 ^e	CTGGCACTGTGGTTACCATG ^a	20 ^a	AGCTGTGCTTGTGATGAACG ^a	20 ^a	131-173 ^a
G39892 ^d	17 ^e	81.0 ^e	50474095 ^e	ATCCAGCAGAACACCAACC ^a	20 ^a	TGAAACACTCTGTGGGACAC ^a	20 ^a	199-239 ^a
G40542 ^d	18 ^e	64.2 ^e	43897912 ^e	GAAACCCGTGAAGGTTTGA ^a	20 ^a	CTTGAACAGAGCAGAGTTCAGA ^a	22 ^a	153-217 ^a
G40446 ^d	21 ^e	123.7 ^e	43639841 ^e	TTACTCTGCTGCGGACACC ^a	20 ^a	GCCGTGCTGCAATAGGTAGT ^a	20 ^a	80-148 ^a

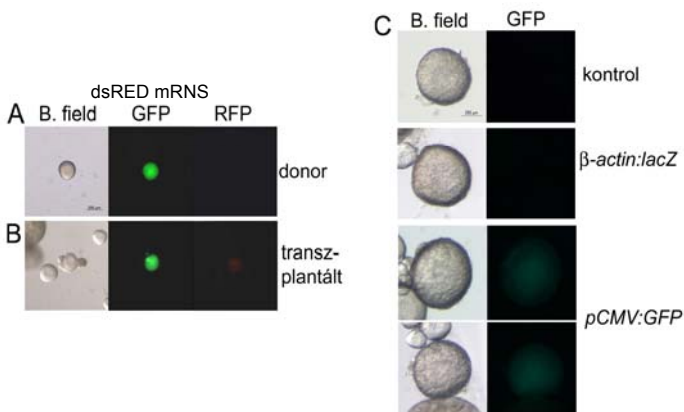
A mikromanipulációhoz II-III-as fejlődési stádiumú transzgenikus oocytákat használtunk, melyeket különböző riporter nukleinsavakkal injektáltunk. Az injektálás után az oocytákat nevelő anyákba ültettük (dsRed mRNS), vagy Petri-csészében Zebrafish Ringer oldatban inkubáltuk (p β -aktin:lacZ, pCMV:GFP). A következő napon fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk a petefészkekben, illetve a Petri-csészében inkubált oocytákat.

EREDMÉNYEK I

A kísérletek során összesen 4 transzgenikus oocytából származó embriókat találtunk a transzplantált anyák embriói között, melyek a transzplantálást követő 3. illetve 4. héten lerakott ikrák között voltak. Fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgálva a transzplantált oocytából származó egyed nem mutatott különbséget a pozitív kontrol egyedtől (A- kontrol nem transzgenikus ivadékok, B- transzplantált oocytából származó ivadékok, C- kontrol transzgenikus ivadékok). A donor (d) és a recipiens (r) anyától, a termékenyítésben résztvevő hímtől (h), a transzplantált oocytából származó ivadéktól (t), illetve a recipiens anyája saját oocytáiból származó ivadéktól (c) DNS mintát vettünk, majd mikroszatellit módszer segítségével vizsgáltuk a közöttük lévő rokonsági fokokat. Ennek az eredménye a D jelű képsoron látható. A vizsgálat egyértelműen igazolja, hogy valóban transzplantált oocytából származott a B jelzésű ivadék. A képsoron csak a 8 legnagyobb különbséget mutató fragmentmintázat látható. A vizsgált 50 mikroszatellit közül, egyik sem mutatott ezzel ellentétes eredményt.



EREDMÉNYEK II



Az oocyták mikroinjektálása sikerrel elvégezhető. A bejuttatott riporter nukleinsavak aktivitást mutattak a kezelt oocyták egy részében. Fluoreszcens mikroszkópos felvételeken mind a dsRED mRNS-sel (A,B), mind a pCMV:GFP (C) génnel mikroinjektált oocytákban látható volt az adott nukleinsav aktivitásának nyoma, mely a kontrol oocytákban nem volt jelen.

Az egyes kísérletek részletes eredményei az alábbi táblázatban láthatók:

Oocyta injektálás transzplantáció nélkül	Injektált oocyták száma	Riporter aktivitás	
		Oocyták száma	%
nem injektált kontrol	60	0	0,0
β actin lacZ	60	0	0,0
pCMV:GFP	60	4	6,7
Transzplantált, injektált oocyták	Injektált oocyták száma	Türelő YFP+ oocyták száma	RFP aktivitás Oocyták száma %
dsRED mRNA	81	7	1, 9,1
dsRED mRNA	82	9	1, 11,1
dsRED mRNA	108	15	0, 0,0
dsRED mRNA	61	11	1, 9,1
dsRED mRNA	84	14	3, 21,4
dsRED mRNA	61	2	0, 0,0
dsRED mRNA (összes)	477	58	6, 10,3

