

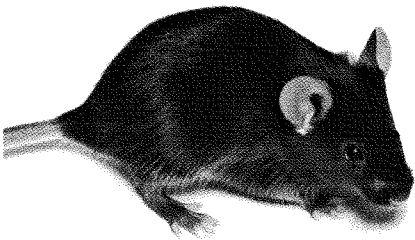


Staartknippen overbodig?

Een onderzoek in het kader van verfijning van technieken voor het verzamelen van weefsel toegepast bij het genotyperen van transgene muizen.

Jürgen Sijbesma¹, Miriam van der Meer²

*1 Departement Dier, Wetenschap en Maatschappij, Universiteit Utrecht
2 Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium (GDL), Universiteit Utrecht*



Onder transgenese wordt verstaan het aanbrengen van een verandering in het genetisch materiaal met behulp van diverse technieken, zodanig dat deze veranderingen aan het nageslacht doorgegeven kunnen worden (1).

Inleiding

De eerste experimenten met transgene dieren dateren uit 1980. Sindsdien worden in tal van experimenten transgene dieren gebruikt (1,2). In 2005 zijn in Nederland 81.608 transgene dieren (13,3% van het totaal aantal gebruikte proefdieren) gebruikt voor diverse dierproeven. Daarvan zijn 97,4% muizen (3). Bij het vervaardigen van transgene muizen moet in een bepaald stadium aangetoond worden of de nakomelingen werkelijk genetisch gemodificeerd zijn. Dit gebeurt door middel van genotypering: een proces waarin het genetisch materiaal wordt bepaald en gecontroleerd op aanwezigheid van de modificatie door middel van DNA verkregen uit een weefselmonster.

De staartknip is een techniek om weefsel te verzamelen voor het genotyperen. De ingreep staat ter discussie omdat er steeds meer overtuiging bestaat dat de ingreep ongerief veroorzaakt bij muizen. Ook zijn er steeds meer alternatieven beschikbaar, zoals oorknip, die mogelijk minder ongerief veroorzaken en die dezelfde of betere resultaten opleveren wat betreft het genotyperen.

Het onderzoek richt zich op verfijning van verzameltechnieken van weefsel toegepast bij het genotyperen van muizen. Naar aanleiding van een enquête en literatuur zal een voorstel voor een richtlijn opgesteld worden die zal aangeven welke verzameltechnieken gebruikt kunnen worden en in welke situatie.

Verzameltechnieken

Voor het bepalen van het genotype is DNA-materiaal nodig dat verkregen wordt uit weefselmonsters. Er kan onderscheid gemaakt worden in twee typen technieken om weefsel te verzamelen: invasieve- en non-invasieve methoden (4,5).

Invasieve methoden

Bij deze methode is het aannemelijk dat muizen direct ongerief ondervinden van de ingreep. Voorbeelden van invasieve methoden zijn:

staartknip

Hierbij wordt de staartpunt afgezet door middel van een ingreep kort voor of tijdens het spenen. Het voordeel van staartknippen is, dat het voldoende DNA oplevert voor PCR en Southern blot.

Nadelen van staartknippen zijn: het levert ongerief op voor muizen en het levert minder schoon materiaal op (4,5,6,7,8).

oorknip

Een stuk weefsel van ongeveer 2 mm wordt verkregen uit het oor van de muis door middel van een knip met een schaar (oorknip) of een ponstang (oorpunch).

Het grote voordeel van de oorknip is de mogelijkheid om muizen hier tevens mee te kunnen merken. DNA verkregen van de oorknip levert schoner materiaal op en de methode is beter reproduceerbaar. Ook levert de ingreep mogelijk minder ongerief op voor muizen (4,5,6,7,8).

bloed

Bloed kan verkregen worden door bijvoorbeeld de staartvene aan te prikken. Er is in verhouding veel bloed nodig omdat maar 0,1% van de bloedcellen DNA bevat (6).

Het afnemen van bloed is eenvoudig te herhalen en veroorzaakt minimale stress. De herhalingen zijn wel aan beperkingen gebonden. In het gdl geldt als richtlijn maximaal 8 ml/kg lichaamsgewicht bloedafname per twee weken (4,5,9).

Non-invasieve methoden

Bij deze methoden ondervinden muizen geen ongerief van de ingreep. Wel ondervinden ze ongerief in de vorm van oppakken, fixeren en hanteren. Voorbeelden van non-invasieve methoden zijn:

speeksel

Een swab of een plastic pipet wordt langs de binnenkant van de wang gehaald om speeksel te verzamelen. Nadelen van de methode zijn de beperkte

hoeveelheid verkregen DNA-materiaal en het ongerief veroorzaakt bij het hanteren en openen van het bekje (4,5,6,7,10).

haar

Met een tang wordt aan de ventrale zijde van de muis haar geplukt.

Voordelen van de haartechniek zijn: het is een snelle en eenvoudige methode en de bron is ongelimiteerd.

Nadelen zijn de grote kans op kruisbesmetting (haren van soortgenoten kunnen rond zweven en de bron vervuilen) en de beperkte hoeveelheid DNA die uit het monster wordt verkregen (4,5,6,7,11).

rectum epitheelcellen

Met een plastic voorwerp wordt aan de binnenkant van de rectum geschrapt. Op deze manier worden epitheelcellen verkregen die voorbereid worden voor de analyse.

Voordeel van deze methode is dat er betrekkelijk veel epitheelcellen te verzamelen zijn. Verder is het een snelle, pijnloze en betrouwbare methode. Een groot nadeel is de kans op beschadiging van de rectum (4,5,6,7,9).

feces

Muizen laten vaak feces vallen bij het oppakken en hanteren.

Voordelen van deze methode zijn: het hanteren kan gecombineerd worden met andere ingrepen. Ook levert de feces-methode nauwelijks ongerief op. Verder is de kans op kruisbesmetting vrijwel nul.

De feces bevatten echter een beperkte hoeveelheid DNA-materiaal voor de analyse (4,5,6,7,9,12).

Analyse

Het weefsel wordt na het verzamelen ingevroren om verval van het DNA te voorkomen.

Om aan te geven of de modificatie die is aangebracht succesvol is doorgegeven aan de nakomelingen, moet het DNA-materiaal uit het weefsel geanalyseerd worden. Dit gebeurt door een PCR en/of een Southern blot.

PCR

PCR is een vermeerderingstechniek die in staat is om een gewenste DNA-sequentie te selecteren uit een massa DNA-moleculen en deze ontelbare malen te vermenigvuldigen.

Bij PCR moet vooraf bekend zijn waar de modificatie in het genetisch materiaal zit.

Voor de analyse zijn enkele nanogrammen (ng) DNA nodig (13,14).

Southern blot

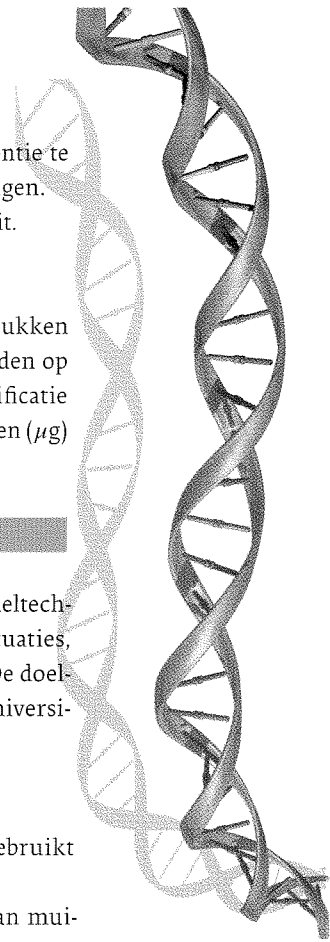
Southern blot is een analysemethode waarbij het DNA op specifieke plaatsen in stukken wordt geknipt door restrictie enzymen en de stukken van elkaar gescheiden worden op basis van grootte door elektroforese. Vooraf hoeft niet bekend te zijn waar de modificatie heeft plaats gevonden. Voor Southern blot is minimaal tussen de 5-15 microgrammen (μg) DNA nodig voor een analyse (13,14).

Methoden

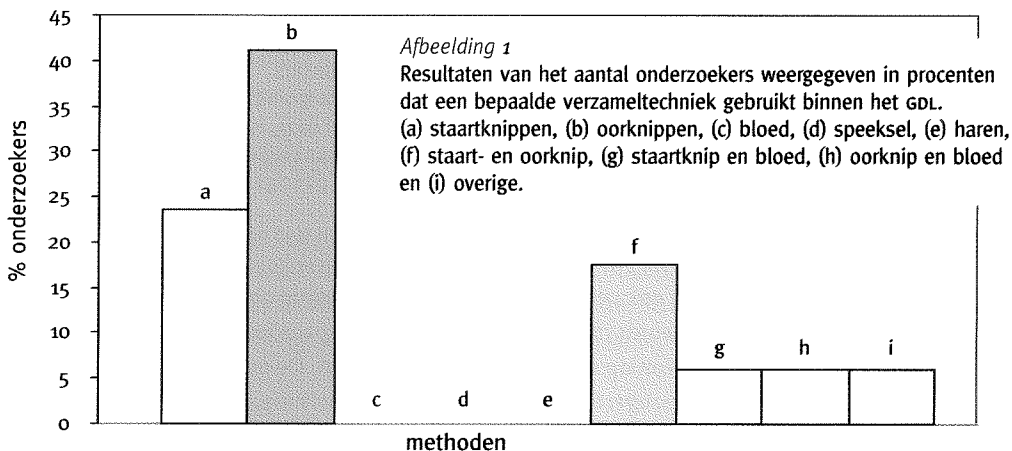
Om een voorstel voor een richtlijn op te kunnen stellen die aangeeft welke verzameltechnieken gebruikt kunnen worden als alternatief voor staartknippen en in welke situaties, moet een aantal vragen beantwoord worden. Hiervoor is een enquête opgesteld. De doelgroep van de enquête bestaat uit onderzoekers van de Universiteit Utrecht en het Universitair Medisch Centrum Utrecht die met transgene muizen werken.

Centraal in de enquête staan de vragen:

- Welke methode van monsternamen voor genotypering van de muizen wordt gebruikt en wat zijn de argumenten voor het gebruik van juist deze methode?
- Kan staartknippen als verzameltechniek van weefsel voor het genotypen van muizen vervangen worden door de oorknip?
- Op welke manier (leeftijd, pijnbestrijding) kan het veronderstelde ongerief van muizen bij staartknippen verminderd worden?



Gebruikte genotyperingsmethoden binnen het GDL



Verder gaat de enquête in op details rondom de gebruikte methode zoals de leeftijd waarop het monster genomen wordt, de analysetechniek die na de monsternamen toegepast wordt en het doel van het genotypen.

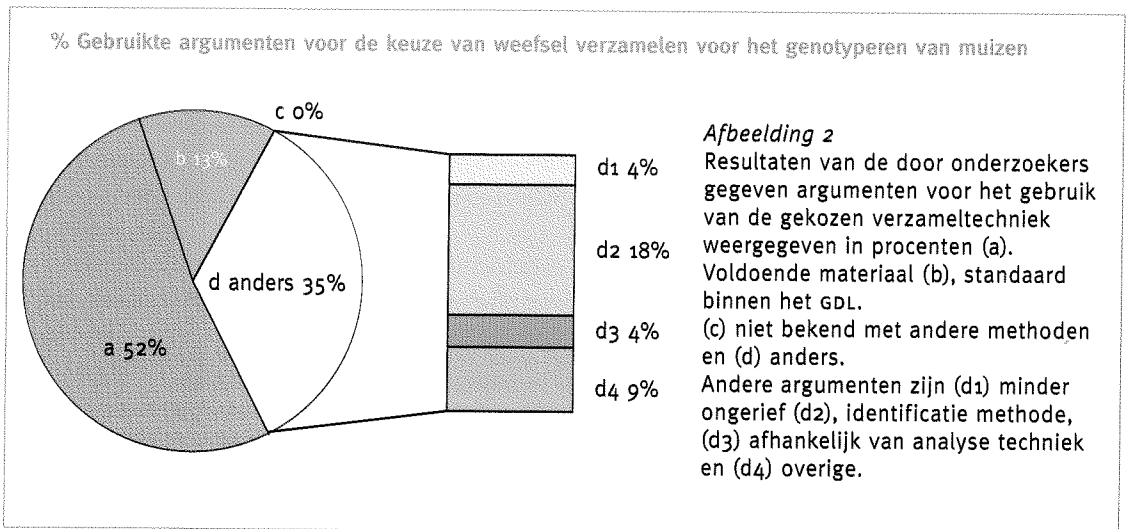
Het tweede deel van de enquête gaat dieper in op het staartknippen zelf. Er wordt gevraagd naar de grootte van het monster, gebruik van anesthesie en analgesie, eventuele nazorg, de frequentie van het knippen en de identificatie.

Resultaten

De meest gebruikte verzamelmethode (Afb. 1) zijn de oorknip (41%) en staartknip (23%). Speeksel en haren worden niet gebruikt binnen het GDL. Staartknip en de combinatie oor- en staartknip worden in 18% van de gevallen toegepast. Bloed wordt alleen gebruikt als methode in combinatie met oor- (6%) of staartknip (6%). Onder overigen valt het genotypen met weefsel van nier, milt en lever (6%).

Om de gekozen methode te beargumenteren zijn er meerdere antwoorden gegeven. In 52% van de gevallen wordt 'levert voldoende materiaal op' gegeven als argument (Afb. 2). Alle onderzoekers die staartknippen toepassen en de helft van de oorknippers geven dit als argument 'Niet bekend met andere methoden' wordt niet als argument gebruikt.

'Anders' wordt in 35% van de gevallen als argument gebruikt. Het gaat hier om: 'levert minder ongerief op' (d1), 'gelijk een identificatiemethode' (d2), 'afhankelijk van analysetechniek' (d3) en 'overige' (d4).



De onderzoekers wordt ook gevraagd naar de leeftijd waarop oor- en/of staartknip wordt genomen. De oorknip wordt in 64% van de gevallen op speenleeftijd (21 dagen) genomen en in 27% van de gevallen op een leeftijd van vier dagen. De overige 9% van de oorknip wordt genomen op een jongere of oudere leeftijd. De staartknip wordt in 38% van de gevallen op speenleeftijd genomen en in 24% van de gevallen op een leeftijd van veertien dagen. In de overige gevallen wordt de staartknip genomen op een jongere/oudere leeftijd of wanneer de muizen gedood zijn.

Na de monsternamen wordt in 70% van de gevallen het genotype geanalyseerd met behulp van een PCR. Het gaat om een standaard PCR-techniek met verschillende primers en enzymen (taq's). In 54% van de gevallen is oorknip de verzamelmethode. Staartknip is in 23% van de gevallen de bron van het weefselmonster geweest. In 8% is zowel de staart- als oorknip de bron voor de PCR geweest.

Southern blot wordt alleen gebruikt in combinatie met een PCR. Zowel staart- als oorknip zijn hier de bron van het weefselmonster. Overige opties zijn PCR in combinatie met ELISA- of FACS-kleuring of Spot blot. Uit de enquête blijkt dat er voor een PCR gemiddeld 2,2 μg nodig is en voor een Southern blot gemiddeld 6 μg .

- + De grootte van de staartknip is in 75% van de gevallen 5 mm of korter.
- + Anesthesie en analgesie wordt in geen van de gevallen toegepast. Argumenten hiervoor zijn dat toedienen van anesthesie/analgesie meer ongerief veroorzaakt dan de staartknip en dat muizen niets van de ingreep zouden merken.
- + Nazorg vindt in 75% van de gevallen plaats: bloedingen worden gestelpt met behulp van een tissue. In het verleden werd de staart dichtgebrand.
- + Een herhalingsknip komt alleen voor als de muis al dood is.
- + In alle gevallen worden de muizen uitwendig geïdentificeerd met behulp van een oorknip.
- + In de laatste vraag wordt verzocht de keuze voor staartknip nader toe te lichten ondanks de aanwezigheid van andere methoden. Het meest voorkomende argument is de hoeveelheid DNA die nodig is voor het bepalen van het genotype.
- + Andere verzameltechnieken leveren te weinig DNA-materiaal op om te kunnen genotypen in combinatie met zowel PCR als Southern blot.
- + Een ander argument dat gegeven wordt, is dat DNA afkomstig uit een oor minder schoon is dan uit een staart. Verder wordt als argument gegeven dat muizen niets van de ingreep zouden merken.

De resultaten van enquête en de informatie uit de literatuur spreken elkaar tegen op drie punten.

Hoeveelheid verkregen DNA is voldoende/onvoldoende

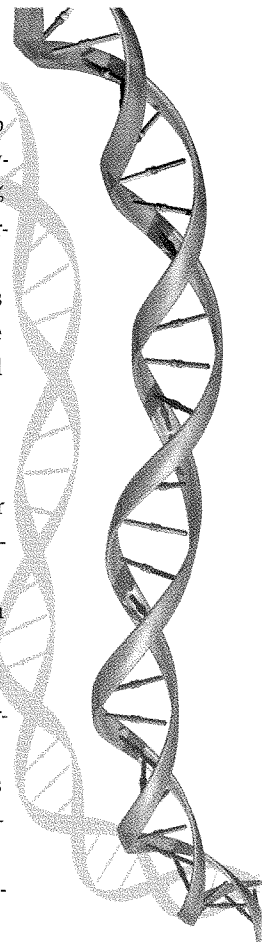
Uit navraag en de literatuur blijkt dat oorknippen tussen de 1 en 6 μg DNA-materiaal oplevert, terwijl voor een PCR enkele nanogrammen (ng) nodig zijn. Staartknippen levert 5 tot 15 μg op. Dit weerlegt het argument dat een oorknip te weinig DNA oplevert om een PCR uit te voeren (4,7,8,14).

DNA van een oorknip is wel/niet minder schoon

Uit navraag en de literatuur blijkt dat oorknip schoner DNA oplevert door de aanwezigheid van kraakbeen. Bot uit de staartknip vervuilt het monster en de analyse waardoor het DNA-patroon vervaagt. Ook ligt de concentratie DNA-materiaal bij kraakbeen hoger dan bij bot (6,8,14).

Ongerief

Het derde punt waarop de enquête en de literatuur elkaar tegenspreken is of muizen ongerief ondervinden van de staartknip. Als argumenten worden gegeven dat er niet aan pijnbestrijding wordt gedaan omdat de muizen er niets van zouden merken en omdat het



toedienen van anesthesie en analgesie meer ongerief zou veroorzaken dan het staartknippen. Dit is onder andere het geval met methoxyfluraan en diethylether (15).

De toedieningsvorm en de soort anesthesie en analgesie is van belang voor een goede pijnbestrijding.

Een minimaal belastende toedieningsvorm (een lokaal aangebracht analgeticum zoals Emla[®]-crème) levert enkel slechts ongerief op in de vorm van oppakken (16). Of dit middel effectief is om pijn/ongerief als gevolg van staartknippen te verminderen dient nog nader onderzocht te worden.

De staartbeentjes lopen door tot in het uiterste puntje van de staart (17). Het ossificeren (verbenen) van de staartbeentjes is voltooid op een leeftijd van twee weken. De staartbeentjes zijn omringd door het sterk geïnnerveerde (van zenuwen voorzien) periost (beenvlies). Daarom is het aannemelijke dat snijden door beide structuren acute pijnprikkels veroorzaakt (4,5).

Bij oorknippen en staartknippen op een leeftijd jonger dan twee weken wordt het kraakbeen doorboord of gesneden. Ook hier is het aannemelijk dat dit pijnprikkels op levert. Het is echter niet duidelijk of dit in dezelfde mate gebeurt als bij snijden door bot (4,5). Naast het periost is ook de huid sterk geïnnerveerd. Verder lopen tot in het puntje van de staart zenuwen, pezen, venen en arteriën. Naast de acute pijn van het doorsnijden van zenuwen ontstaat er ook pijn door ontstekingsreacties (16).

Staartknippen kan ook chronische pijn veroorzaken. Het doorsnijden van zenuwen zorgt in combinatie met temperatuurverschillen en mechanische druk voor hyperalgesie (toename van pijnprikkels) (4,17,19).

Daarnaast speelt de staart van een muis een rol bij zijn thermoregulatie. Verwijdering van een groot stuk staart veroorzaakt ongerief omdat de muis problemen krijgt met het in stand houden van diens lichaamstemperatuur (20). Verder maakt de staart onderdeel uit van het gedragsrepertoire van de muis. Verwijdering van een deel van de staart kan gedragsstoornissen veroorzaken. De lange termijn effecten hiervan zijn onbekend. Ook speelt de staart een rol bij het in balans blijven.

Literatuur

- 1 Van Zutphen, L.F.M., Baumans, V. en Beynen, A.C., 2003, *Handboek Proefdierkunde, Proefdieren, dierproeven, alternatieven en ethiek*, Elsevier gezondheidszorg, Maarssen, vierde druk.
- 2 Van der Meer, M., 2001, *Transgenesis and animal welfare, Implications of transgenic procedures for the well-being of laboratory mouse*, Universiteit Utrecht, Proefschrift, Utrecht.
- 3 Voedsel en Waren Autoriteit, 2005, *Zo doende 2004, Jaaroverzicht van de Voedsel en Waren Autoriteit over dierproeven en proefdieren*, Voedsel en Waren Autoriteit, Jaarverslag 2004, Den Haag.
- 4 Boschert, B., et al., 2003, *Refinement and reduction in production of genetically modified mice*, Laboratory Animals, Volume 37, Suppl., 1.
- 5 Maconochie, M., 2005, *Moving from tail tip to ear notching for genotyping, report welfare group meeting*, University of Sussex.
- 6 Schneider, MR. en Wolf, E., 2005, *Genotyping of transgenic mice: old principles and recent developments*, Analytical Biochemistry, Volume 344, Issue 1.
- 7 *Guidelines for Biopsy Procedures to Facilitate Identification and DNA-Based*
- 8 *Molecular Genotyping of Rodents*, Emory University's Institutional Animal Care and Use Committee, Emory University, <http://www.emory.edu/IACUC>, (h) 9 januari 2006.
- 9 M. Breuer, Nederlandse Kanker Instituut, Amsterdam, 12 oktober 2006.
- 10 Lahm, H., et al., 1998, *Identification of transgenic mice by direct PCR analysis of lysates of epithelial cells obtained from the inner surface of the rectum*, Transgenic Research, Volume 7, nummer 2.
- 11 Meldgaard, M., et al., 2004, *Non-invasive method for sampling and extraction of mouse DNA for PCR*, Laboratory Animals, Volume 38, nummer 4.
- 12 Schmitteckert, E.M., et al., 1998, *DNA detection in hair of transgenic mice-simple technique minimizing the distress on the animals*, Laboratory Animals, Volume 33.
- 13 Broome, R.L., et al., 1999, *Non-invasive transgenic mouse genotyping using stool analysis*, FEBS Letters, Volume 462, Issues 1-2
- 14 Griffiths, A.J.F., et al., 2000, *An Introduction to Genetic Analysis*, W.H. Freeman and Company, New York, Seventh Edition.
- 15 M. Hoekman, Universiteit Utrecht, Utrecht 23 november 2006.
- 16 Arras, M., et al., 2006, *Should laboratory mice be anesthetized for tail biopsy?*, Laboratory Animals, Volume 41.
- 17 L. Hellebrekers, Universiteit Utrecht, Utrecht 4 december 2006.
- 18 Popesko, P., et al., 1990, *Anatomy of Small Laboratory Animals*, volume 2: rat; mouse, hamster, Wolfe publishing ltd, London.
- 19 Zhou, M., 1998, *NMDA receptor-dependent long term hyperalgesia after tail amputation in mice*, European Journal of Pharmacology, Volume 349, Issues 2-3.
- 20 Jochems, A.A.F.en Joosten, F.W.M.G., 2003, *Zakwoordenboek der Geneeskunde*, Elsevier gezondheidszorg, Doetinchem, zeventwintigste druk.
- 21 Baumans, V., et al., 2006, *Tail vein puncture in the rat: a real vena puncture?*, not published yet.

Voorstel voor een richtlijn

- 1 Gebruik te allen tijde scherpe en schone instrumenten.
- 1 Gebruik oorknip als verzameltechniek van weefsel wanneer er wordt gekozen voor PCR als analysemethode.
- 1 PCR volstaat als analysemethode wanneer alleen aangetoond hoeft te worden of een genetische modificatie aanwezig is of niet. PCR wordt sensitiever en specifiek bij een juiste primer keuze en het gebruik van optimalisatiekits.
- 1 Gebruik staartknip alleen als verzameltechniek wanneer wordt gekozen voor Southern blot als analysemethode.
- 1 Southern blot is onder andere noodzakelijk bij het volgen van een ontwikkeling in het genoom na een modificatie in de eerste generaties (F1 en F2) nakomelingen. Ook is Southern blot nodig om te achterhalen of en waar een transgen zich heeft geïntegreerd na een micro-injectie. Verder wordt de methode gebruikt als controlemiddel op de PCR.
- 1 Voer maximaal twee knipjes uit per oor op een leeftijd tussen 14 en 21 dagen.
- 1 Voer een staartknip uit op speenleeftijd (21 dagen) met een thermisch mes.
- 1 Knip niet meer dan 5 millimeter van de staart en voorkom herhalingsknippen.
- 1 Gebruik bij zowel staart- als oorknippen een lokaal analgeticum zoals Emla[®]-crème. De werkzaamheid dient nog wel onderzocht te worden.
- 1 Geef het analgeticum voldoende tijd om in te werken.
- 1 Wanneer PCR wordt gebruikt als snelle screening in combinatie met Southern blot als controle analyse, knip dan alleen staarten van de muizen die positief (bevatten mogelijk de genetische modificatie) zijn bevonden.
- 1 Blijf op de hoogte van nieuwe diervriendelijke ontwikkelingen op het gebied van transgenese en genotyperen waarbij minder DNA/weefselmateriaal nodig is om een analyse van het genotype uit te kunnen voeren. Keuze voor een techniek dient niet gebaseerd te zijn op het argument dat die in het verleden altijd al gebruikt werd.

