

# TEADUSTÖÖD

## VEISE EMBRÜOTE SUGUPOOLE MÄÄRAMINE FARMITINGIMUSTES ENNE SIIRDAMIST

Ü. Jaakma, P. Bredbacka, J. Peippo, I. Mürsepp

**SUMMARY:** Sex determination of embryos before the transfer offers certain economic benefit to the dairy industry: higher proportion of female progeny provides better selection for herd replacement and higher rate of genetic improvement. Recently, a simple and accurate method of bovine embryo sexing based on amplification and detection of Y-chromosomal DNA (PCR), was developed in the Agricultural Research Centre of Finland. The purpose of the study was to evaluate the accuracy of the developed sexing method under field conditions in Estonia and determine the viability of fresh and frozen-thawed biopsied embryos.

Day 7 embryos were obtained from donor cows superovulated with FSH. Compacted morulae and early blastocysts of excellent or good quality were biopsied manually with a microblade in a 100–200 µl drop of PBS supplemented with polyvinylpyrrolidone (PVP). Biopsy size was 10–25% of the total embryo cell mass. The biopsy was transferred to the reaction tube where the cells were lysed and DNA amplification performed according to Bredbacka *et al.*, 1995. Finally, the tubes were observed under UV light. Pink fluorescence indicated the presence of a male sample in a tube.

The biopsied embryos were stored in PBS supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) at room temperature until transfer or freezing. The embryos were frozen in 1.5M ethylene glycol in PBS using a standard controlled freezing technique. Synchronized virgin heifers were used as embryo transfer recipients.

Of 72 embryos biopsied for sexing, 39 (54.2%) were diagnosed as females and 33 (45.8%) as males. Transfer of 24 fresh embryos resulted in 66.7% pregnancy rate on Day 60 and birth of 14 calves (58.3%). Thirteen of them were correctly sexed (93.3%). One error was probably caused by biopsy loss during the transfer into the reaction tube.

Six of 14 frozen female embryos were classified as transferable after thawing (42.9%). Following the transfer of them into 6 recipients, 1 female calf was born (16.7%).

These results demonstrate high accuracy of the present sex determination method under farm conditions. The manual biopsy and the identification of sex by detection of tube fluorescence allowed to decrease the time needed for diagnosis. The viability of fresh biopsied embryos was good as indicated by high pregnancy and calving rates. Nevertheless, survival and pregnancy rates of frozen/thawed biopsied embryos was poor. Further studies are necessary to clarify the conditions for the successful storage of biopsied embryos.

**Key words:** bovine, embryo, sexing, PCR, freezing, calving rate.

Embrüote sugupoole määramine enne siirdamist on olnud loomakasvatajate ja aretajate sooviks sellest ajast peale, kui embrüosiirdamine jõudis praktikasse. Piimakarjakasvatajad on huvitatud peamiselt lehmvasikatest, et oleks võimalik teostada intensiivsemat valikut karja järelkasvu hulgas ja selle abil tõsta järgmise põlvkonna geneetilist potentsiaali. Lihaveiste kasvatajad eelistaksid aga lihatoodangu suurendamiseks pullvasikaid. Embrüo soo määramiseks on kasutatud mitmeid erinevaid meetodeid, nagu tsütogeneetilist analüüsi (King *et al.*, 1979; Winterberger-Torres, Popescu, 1980; Betteridge *et al.*, 1981), Y-kromosoomi spetsiifilise antigeeni (Wachtel, 1984; White *et al.*, 1987) ja X-kromosoomiga seotud ensüümi aktiivsuste määramist (Williams, 1986). Need meetodid osutusid aga praktikale kõlbmatuiks väikese täpsuse ja töömahukuse tõttu. 1980. aastatel õnnestus veise Y-kromosoomile spetsiifilise DNA järjestuse identifitseerimine (Leonard *et al.*, 1987; Ellis, Harpold, 1993) ja töötati välja DNA amplifikatsiooni meetod, mis põhineb polümeraasi ahelreaktsioonil (polymerase chain reaction, PCR; Mullis *et al.*, 1986). Need kaks avastust saidki aluseks põhimõtteliselt uuele,

DNA-tehnoloogial põhinevale sugupoole määramise meetodile, mis seisneb embrüotest raku-proovi (biopsia) võtmises ja selles Y-kromosoomi kindlakstegemises PCR-reaktsiooni teel (Schröder *et al.*, 1990; Herr *et al.*, 1990). Alates 1990. aastast läbiviidud katsed on tõestanud, et see meetod on tundlik, efektiivne ja täpne ning värskete embrüote puhul ei vähenda oluliselt lehmade tiinestumist (Thibier, Nibart, 1995). Meetodi puudusteks võib pidada vajadust spetsiaalse kalli aparatuuri järele, embrüo biopseerimisega seotud probleeme ja analüüsiks kuluvat aega.

Soome Põllumajandusuuringute Keskuses on välja töötatud lihtne ja täpne PCR-l põhinev embrüote sugupoole määramise meetod, mille puhul ei ole vajalik kasutada keerulist ja kallist mikromanipulatsiooniparaati biopsia saamiseks ega ka aeganõudvat elektroforeesi PCR-reaktsiooni produkti identifitseerimiseks (Bredbacka *et al.*, 1995). Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli selle meetodi efektiivsuse väljaselgitamine töötamisel vahetult farmitingimustes ja biopseeritud embrüote eluvõime hindamine siirdamistulemuste põhjal.

## Materjal ja meetodika

Doonorlehmadele süstiti superovulatsiooni esilekutsumiseks folliikuleid stimuleerivat hormooni (FSH-P, Schering Co., USA). Doonorite ja retsipientide (mullikate) innatsükliid sünkroniseeriti kloprostenooliga (Oestrophan, Slovakkia). Embrüod eraldati doonori emakast 7. päeval pärast seemendust mittekirurgilisel meetodil. Katseks valiti morfoloogiliste tunnuste järgi väga head ja head kompaktsed moorulad ja blastotsüstid. Nendelt võeti biopsia käsitsi, mikromanipulaatoreid kasutamata (Bredbacka, 1991), jälgides ja suunates mikroskalpelli liikumist stereomikroskoobi abil (suurendus 100×). Biopseeritav embrüo paiknes Petri tassi kaanel 100...200 µl fosfaatpuhvri (PBS) tilgas, millele oli lisatud 4 mg/ml polüvinüül-pürrolidooni (PVP) embrüo ja rakuproovi kleepumise vältimiseks. Biopsia moodustas 10...25% embrüote rakumassist. Blastotsüstide puhul jälgiti, et idusõlme rakud jääksid vigastamata. Mikroskalpelli pesti pärast iga biopsia võtmist hoolikalt etanoolis, destilleeritud vees ja PBS-s, et vältida kontaminatsiooni eelmisest embrüost pärineva DNA-ga. Biopsia pipeteeriti 1 µl-s PBS+PVP lahuses Eppendorfi tuubi, mis sisaldas 9 µl lüüsi- ja puhvrit (Dynazyme buffer, 3,75 mmol MgCl<sub>2</sub>, 125 µmol iga dNTP-d, 1,5 µg proteinaas K-d) kaetuna 25 µl mineraalõliga. Biopseeritud embrüod säilitati uuriklaasil lahuses, mis koosnes fosfaatpuhvrist ja 10% veise loote vereseerumist (FCS). Aurumise vältimiseks asetati uuriklaasid niiske filterpaberiga varustatud klaasist Petri tassi ja neid hoiti toatemperatuuril kuni analüüsitulemuste selgumiseni.

PCR-reaktsioon teostati vastavalt Bredbacka *et al.* (1995) poolt varem avaldatud metoodikale, mis lühidalt seisnes järgmises. Tuube inkubeeriti 10...15 min 37 °C juures ja seejärel inaktiveeriti puhvris olev proteinaas K 10 min jooksul 98 °C juures. Seejärel tuubid jahutati ja lisati 15 µl PCR-puhvrit, mis sisaldas Dynazyme puhvris 1...20 pmol kumbagi Y-kromosoomile spetsiifilist oligonukleotiidset praimerit, 12,5 µg etiidiumbromiidi ja 1,5 U Dynazyme polümeraasi (Finnzymes). Teostati kokku 50 PCR-tsükli. Lõpuks uuriti reaktsioonituube ultravioletvalguses, kus Y-kromosoomi olemasolule viitas lahuse roosa fluorestsents.

Biopseeritud embrüod pesti üks kord PBS+10% FCS lahuses. Emasembrüod laaditi 0,25 ml seemenduskõrtesse ja siirati doonoritega samasse innatsükli järku viidud mullikatele ühekaupa kollakehaga ipsilateraalsesse emakasarve. Isasembrüod ja ka osa emasembrüotest sügavkülmutati programmjuhtimisega külmutis Minicool, kasutades krüoprotektorina 1,5M etüleenglükooli (EG). Ühe kuu möödudes sügavkülmutatud emasembrüod sulatati ja siirati pärast morfoloogilise kvaliteedi hindamist ühekaupa sünkroniseeritud innaga mullikatele. Loomade tiinestumist kontrolliti 60 päeva pärast siirdamist rektaalselt ning sugupoole määramise täpsust hinnati poegimisjärgselt vasikate soo järgi.

## Uurimistulemused

Kokku teostati sugupoole määramine PCR-reaktsiooni abil 72 embrüol. Neist 39 (54,2%) osutusid emas- ja 33 (45,8%) isasembrüoteks. Enamikul embrüotest (67/72, 93,0%) taastus pärast biopseerimist normaalne morfoloogiline struktuur ja nad olid kõlblikud siirdamiseks või sügavkülmutuseks. Ajavahemik embrüote emakast isoleerimisest kuni siirdamiseni või külmutuseni moodustas 4...7 tundi. Sellest kulus embrüo biopseerimiseks 5...10 minutit ja PCR-reaktsiooni teostamiseks ning produkti identifitseerimiseks 2,5 tundi. Värskest siirati 24

biopseeritud embrüot, millest 16 (66,7%) andsid tiinuse. Sündis 14 vasikat (58,3% siiratud embrüote arvust), üks tiinus lõppes 6. kuul abordiga ja teine surnultsünniga. Viimasel juhul puuduvad andmed vasika soo kohta. Ühel elusalt sündinud vasikal erines tegelik sugu embrüol enne siirdamist kindlaksmääratust: PCR-reaktsiooni abil diagnoositud emasembrüo siirdamise järel sündis tegelikult pullvasikas. Seega oli määramise täpsus 93,3%.

Neliteist sügavkülmutatud emasembrüot sulatati ühe kuu pärast. Mikroskoobiga uurimisel oli kõigil embrüotel näha lüüsunud ja omavahelise kontakti kaotanud rakke rõngana ümber kompaktse keskme. Kuus embrüot (42,9%) hinnati ühe tunni möödumisel morfoloogiliselt siirdamiskõlblikeks ja viidi retsipientide emakasse. Vaid üks retsipient tiinestus (16,7%) ja tõi ilmale lehmvasika.

## Arutelu

Uurimistulemused näitasid, et käsitsi teostatud biopseerimine on kiire ja ei kahjusta oluliselt embrüote eluvõimet. Seda tõestab nii embrüote morfoloogilise struktuuri taastumine pärast biopseerimist (93,0% embrüotest) kui ka värskete biopseeritud embrüote siirdamise järel saadud kõrge tiinestumine (66,7%), mis on võrdne värskete kõrge kvaliteediga intaktsete embrüote siirdamistulemusega. Käsitsi biopseerimine on võrreldes mikromanipulaatori abil juhitava mikroskalpelli kasutamisega tehniliselt tunduvalt lihtsam ja kiirem, kuna 1) mikromanipulaatoriga varustatud mikroskoop on transporditav ainult lahtimonteeritult ja selle töökorda seadmine farmis on aeganõudev, 2) mikroskalpelli puhastamiseks biopseerimiste vahepeal on vaja instrument üles tõsta sobivast tööasendist ja 3) mikroskalpelli purunemisel nõuab uue instrumendi väljareguleerimine lisaega (Bredbacka *et al.*, 1995). Peab siiski märkima, et käsitsi biopseerimise eeldab embrüoloogi suuri kogemusi, et embrüote vigastused oleksid minimaalsed ja biopsia ei läheks kaduma.

Käesolevat meetodit kasutades kulus embrüote sugupoole määramiseks 2,5 tundi, mis on tunduvalt vähem kui varem avaldatud meetodikes. Nii on Thibier ja Nibart (1995) kirjeldanud Prantsusmaal 1990. aastast peale kasutatud meetodit, mille puhul sugupoole määramiseks kulub 3,5 tundi. Autorid kasutasid PCR-produkti identifitseerimiseks elektroforeesi, mille teostamine nõuab lisaega. Ligi 3000 embrüo sugupoole määramise efektiivsus oli 95% ja täpsus 98%. Meie kasutasime PCR-produkti identifitseerimiseks reaktsioonituubis etiidiumbromiidi ja DNA kaksikahela seostumisel tekkivat tugevat fluorestsentsi, mis on ultravioletvalguses silmaga hästi nähtav. Ainult ühel juhul 72 analüüsist (1,8%) tekkisid raskused reaktsioonitulemuse interpreteerimisel. Ühel juhul osutus ebaõigeks määramistulemus, mille põhjuseks oli arvatavasti biopsia kaotamiseks pipeteerimise käigus. Nagu näitavad ka varasemad uuringud (Thibier, Nibart, 1995), on biopsia kaotamine üheks peamiseks vigade põhjuseks sugupoole määramisel, millega tuleb tõsiselt arvestada. Bredbacka *et al.* (1995) soovivad pipeteerida biopsia tuubi mikroskoobi all, veendumaks, et see jõuab reaktsioonisegusse.

Määratud sugupoolega embrüote eluvõime pärast külmutamist ja sulatamist osutus väga madalaks: kokku neljateistkümnest külmutatud embrüost olid pärast sulatamist siirdamiskõlblikud kuus ja nende siirdamise järel saadi ainult üks vasikas. Embrüote uurimisel mikroskoobiga pärast sulatamist täheldati lüüsunud rakkude esinemist ümber kompaktse keskme. Seega, biopseerimise ja külmutamise tagajärjel kokku kaotasid embrüod märkimisväärse hulga rakke, mis võis viia eluvõime olulise languseni. Me ei selgitanud käesolevas katses, kas lüüsunud rakud pärinevad embrüo idusõlmest või trofektodermist. On teada, et just embrüo idusõlme rakuarvu vähenemine kahandab oluliselt embrüote eluvõimet (Bredbacka *et al.*, 1991). Biopseeritud embrüoid hoiti enne külmutamist 4...6 h Dulbecco fosfaatpuhvri ja veise loote-seerumi lahuses. Inkubatsiooniaeg enne külmutamist oli vajalik, et vigastatud rakustruktuurid jõuaksid taastuda. Viimasel ajal on aga selgunud, et meie uuringutes kasutatud lihtne toitkeskkond ei ole biopseeritud või poolitatud embrüote taastumiseks enne külmutamist küllaldane. J. Hasler (suulised andmed) kasutas biopseeritud embrüote hoidmiseks enne külmutamisprotseduuri ViGro toitelahust, mille puhul on tõestatud, et see stimuleerib rakkude jagunemist ka toatemperatuuril, ning saavutas embrüote siirdamisel pärast sulatamist 56,3% tiinestumise. Seega, sugupoole määramise eesmärgil biopseeritud embrüote eluvõime parandamiseks pärast külmutamist tuleks uuringuid jätkata, vähendades biopsia suurust ja parandades embrüo taastumistingimusi enne külmutamist.

## Kokkuvõte

Soome Põllumajandusuuringute Keskuses väljatöötatud embrüote sugupoolte määramise PCR-meetod osutus farmitingimustes rakendamisel täpselt (93,3%) ning võrreldes varem kirjeldatud meetoditega ka lihtsamaks ja kiiremaks, kuna embrüo biopsia võeti käsitsi ning elektroforees asendati fluorestseeruva reaktsiooniproducti identifitseerimisega UV-valguses. Värske biopseeritud embrüote eluvõime oli väga hea – 66,7% retsipientidest tiinestus. Vähem kui pooled biopseeritud embrüotest olid morfoloogiliste tunnuste järgi normaalsed pärast külmutamist ja sulatamist ning ainult üks kuest siiratud embrüost andis tiinuse.

Seega, testitud embrüote sugupoolte määramise meetod on farmis efektiivne ja täpne, kuid sobib kasutamiseks vaid siis, kui embrüod on võimalik siirata värskeina, s.o. samal päeval. Sugupoolte määramise eesmärgil biopseeritud embrüote pikemaajaline säilitamine sügavkülmutamise teel vajab edasisi uuringuid.

## Kirjandus

- Betteridge K. J., Hare W. C. D., Singh E. L. Approaches to sex selection in farm animals. – In: Brackett B. G., Seidel G. E., Jr., Seidel S. M. (eds.). *New Technologies in Animal Breeding*. Academic Press. New York, London, p. 109...125, 1981.
- Bredbacka P. Biopsy of morulae and blastocysts. – *Reprod. Dom. Anim.*, vol. 26, p. 82...84, 1991.
- Bredbacka P., Kankanpää A., Peippo J. PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol. – *Theriogenology*, vol. 44, p. 167...176, 1995.
- Ellis S. B., Harpold M. M. Nucleic acid probes for prenatal sexing. Intern. Appl. Published under the Patent Cooperative Treaty (PCT) Word Intellectual Property Organization. Publication No Wo 86/O7095, 1993.
- Hasler J. *Suulised andmed*, 1998.
- Herr C. M., Matthaei K. I., Bradley M. P., Reed K. C. Rapid, accurate sexing of livestock embryos. In: Hill W. G., Thompson R., Woolliams J. A.(eds), *Proceedings of the 4<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Vol. XVI, Edinburgh, p. 334...343, 1990.
- King W. A., Linares T., Gustavsson I., Bane A. A method for preparation of chromosomes from bovine zygotes and blastocysts. – *Vet. Sci. Commun.*, vol. 3, p. 51...56, 1979.
- Leonard M., Kirszenbaum M., Cotinot C., Chesne P., Heyman Y., Stinnakre M. G., Bishop C., Delouis C., Vaiman M., Fellous M. Sexing bovine embryos using Y chromosome specific DNA. – *Theriogenology*, vol. 27, p. 248, 1987.
- Mullis K., Faloona T., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. – *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, vol. 51, p. 263...273, 1986.
- Schröder A., Miller J. R., Thomsen P. D., Roschlau K., Avery B., Poulsen P., Schmidt M., Schwerin M. Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction. – *Animal Biotechnology*, p. 121...133, 1990.
- Thibier M., Nibart M. The sexing of bovine embryos in the field. – *Theriogenology*, vol. 43, p. 71...80, 1995.
- Wachtel S. S. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. – *Theriogenology*, vol. 21, p. 18...28, 1984.
- White K. L., Anderson G. B., Bondurant R. H. Expression of a male-specific factor on various stages of preimplantation bovine embryos. – *Theriogenology*, vol. 37, p. 867...873, 1987.
- Williams T. J. A technique for sexing of mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase. – *Theriogenology*, vol. 25, p. 733...739, 1986.
- Winterberger-Torres S., Popescu C. P. Transfer of cow blastocysts after sexing. – *Theriogenology*, vol. 14, p. 309...318, 1980.