

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 14

Issue 1

Gödöllő
2018

EGY-SEJT PCR BEÁLLÍTÁSA SERTÉSEN PREIMPLANTÁCIÓS GENETIKAI DIAGNÓZIS CÉLJÁBÓL

Fábián Renáta^{1,2}, Pintér Tímea¹, Magyar Andrea^{1,2,3}, Bodó Szilárd^{1,2,3}

¹ Szent István Egyetem, 2100 Gödöllő, Páter Károly út 1.

²NAIK, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, 2100. Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u.4.

³NAIK, Állattenyésztési, Takarmányozási és Húsipari Kutatóintézet, 2053. Herceghalom, Gesztenyés út 1.

fabian.renata@abc.naik.hu

Received – Érkezett: 14. 02. 2018.

Accepted – Elfogadva: 02.07. 2018.

Összefoglalás

Az utóbbi évtizedben az új reprodukciós technikák fejlesztésének és alkalmazásának hatására jelentősen megemelkedett a sertés ágazat termelékenysége. A preimplantációs genetikai diagnózis (PGD) és embriótranszfer segítségével meghatározott ivarú utódokból álló almok állíthatók elő. Az embriókon végzett biopszia révén kinyert sejtek ivarának meghatározása után a kívánt nemű embriók ültethetők recipiens állatokba. Kísérleteinkben egy sertés PGD módszert kívántunk kifejleszteni *in vitro* létrehozott embriókból embrióbiopsziával kinyert sejteken.

Munkánk során az ivarspecifikus PCR-hez pozitív kontrollként a mindkét nemre jellemző sertés mitokondriális 12S rRNS génszekvenciát választottuk, míg az Y kromoszóma kimutatására a sertés hím-specifikus ismétlődő szekvenciát alkalmaztuk a duplex PCR során. Vágóhídról származó petefészkekből kinyert petesejteket használtunk a PCR beállításához, hogy elérjük az embrió ivarának meghatározáshoz szükséges detektálási érzékenységet (6pg/μl DNS). A keletkezett PCR termékek 2%-os agaróz gélen futtatva jól elkülöníthetőek: nőtény esetében egy, hímekek esetében két sáv detektálható. A sikeres beállítást követően a PGD módszereként *in vitro* fertilizációval előállított 8-sejtes embriókat biopsziáztunk és egy-sejt PCR segítségével megállapítottuk a nemüket.

Kulcsszavak: PGD, ivarmeghatározás, egy-sejt PCR

Pig sex determination using single-cell PCR for preimplantation genetic diagnosis

Abstract

In the last decades productivity of pig breeding has increased significantly, due to the development and application of new reproductive technologies. Sex preselection of livestock progeny can be created by using preimplantation genetic diagnosis (PGD) and embryo transfer. After determining the sex of the blastomeres with a single-cell analysis obtained by embryo biopsy, the sexed embryos could be transfer into recipient females. The aim of our experiments was to develop a pig PGD from a single-cell obtained by embryo biopsy from *in vitro* produced embryos.

In our study a duplex PCR for amplification of both sexes was applied. Two different specific primer sets were used, one as a positive control common to both sexes the pig mitochondrial 12S rRNA multicopy gene sequence and the other was a pig male-specific repeat sequence to detect the

presence of Y chromosome. The PCR was developed using oocytes recovered from the ovaries to reach the necessary sensitivity of determine embryo sex from a single cell (6pg/ μ l DNA). The PCR products were easily distinguishable using agarose gel electrophoresis. At the samples originated from females a single band and at the males samples double bands were detectable. After the successful sets of the single-cell PCR as a method of PGD we biopsied 8-cell embryos, which were produced by in vitro fertilization and the sex of the embryos were determined.

Keywords: PGD, sex determination, single-cell PCR

Irodalmi áttekintés

Meghatározott ivarú utódok létrehozása az állattenyésztés számára egy hasznos módszer lehet a termelékenység növelése érdekében. Jelenleg két megbízható módszer áll rendelkezésre az utódok ivarának befolyásolására. Az egyik az áramlásos citometria segítségével történő sperma szexálás (Johnson és mtsai, 2005), a másik az embrióbiopsziával kinyert sejteken történő embrió szexálás egy-sejt PCR segítségével (Tavares és mtsai, 2016). Az áramlásos citometriával történő spermaszelektálásnak, bár a gyakorlat számára könnyebben kivitelezhető és szarvasmarha tenyésztésben már elterjedt, manapság több korlátja is ismert (Torner és mtsai, 2013; Pozzi és mtsai, 2014). Többek között az eljárás időigényes (óránként kevés sejt szelektálható), a szelektált spermiumok alacsonyabb termékenységet mutatnak és a fejlődő embriók esetében korai embrióelhalást gyakrabban figyeltek meg. Ezzel szemben a preimplantációs genetikai diagnózis módszere (hatékony egy-sejt PCR technikával alkalmazva az embrió ivarmeghatározására) egy megbízhatóbb és egyéb preimplantációs diagnosztikával egy időben végezhető, de embrióültetést igénylő beavatkozás.

A preimplantációs genetikai diagnózis (PGD) a prenatalis diagnosztika legkorábbi formája, melyre a termékenyüléstől a blasztociszta állapotig van lehetőség. A PGD-t a humán asszisztált reprodukciós eljárások során genetikai rendellenességek szűrésére alkalmazzák. Haszonállatoknál az embrionális sejt mintavétel az ivar meghatározás mellett alkalmazható teljes genom alapú szelekcióra és embrió transzfert megelőző prognosztizált tenyészérték meghatározásra (Habib és mtsai, 2014). A módszer lényege, hogy a beágyazódás előtti embrióból biopsziával történik mintavétel, ezen elvégzik a genetikai vizsgálatot, majd az embriókat szelektálják az eredmény alapján és *in vitro* tenyésztik visszaültetésig, vagy lefagyasztják. A PGD három embriófejlődési állapotban hajtható végre. A legkorábbi a petesejt poláris test biopsziája, melynek hátránya, hogy csak az anyai genetikai állományról kapunk információkat. Blasztomer biopsziánál egy 8-16-sejtes embrió egy-két sejtjét, blasztomerjét távolítják el, ez a blasztomer alkalmazható a további analízishez. A trofektoderma biopsziánál a blasztociszta fejlődési stádiumú embrióból történik 4-10 sejt mintavétele, így előnye, hogy már több sejt áll a rendelkezésre a további vizsgálatokhoz (Kahraman és mtsai, 2015). A kinyert minta többféleképpen is vizsgálható, kromoszóma festéssel, FISH-sel vagy egy-sejt PCR-rel. A gyorsaság, költséghatékonyság, érzékenység és specifitás miatt a PCR alapú technikák rutinszerű használata terjedt el a gyakorlatban (Bredbacka, 2001). Az egy-sejtből történő analízisnél korlátozott mennyiségű (7-8 pg) templát DNS áll rendelkezésre a diagnosztikához, így általában egy megnövelt érzékenységű, nested, illetve az ivar kimutatására gyakran multiplex PCR eljárást alkalmaznak. Előbbinél két egymást követő PCR ciklusban az érzékenység és a specifikusság is növelhető, így felerősítve a target szekvenciákat, utóbbinál egyszerre több, lókuszt-specifikus primer párt használva amplifikálható a kívánt szekvencia. (Fu és mtsai, 2007).

Vizsgálataink során sertés embriók nemének meghatározására alkalmas PGD módszert dolgoztunk ki. Kísérleteinkben embrióbiopsziát végeztünk *in vitro* fertilizációval előállított 8-sejtes sertés embriókon, beállítottunk egy megfelelő érzékenységű egy-sejt multiplex PCR módszert, és igazoltuk, hogy a módszerünk megfelelő hatékonyságú a gyakorlati munka számára.

Anyag és módszer

DNS kinyerés

Vizsgálatainkhoz fenol-kloroformos extrakcióval izoláltunk vágóhídról származó nőstény petefészek és méh, valamint hím mellékhere mintákból genomi DNS-t. Ezt a DNS-t alkalmaztuk hígítási sor készítéséhez a PCR beállításakor és a későbbiekben kontroll mintaként. Szintén vágóhídról származó petefészekből nyertünk ki petesejteket hegyes végű szikepenge segítségével. A petesejteket a zona pellucida eltávolítását (savas vagy lézeres) követően arra használtuk, hogy az egy-sejtre jellemző DNS mennyiség vizsgálatához *in vivo* modellünk legyen. A petesejteket egyedileg számozott 2 µl PCR vizet tartalmazó PCR csövekbe helyeztük és a DNS-t két lépésben történő fagyasztással és 10 perces 98°C-on történő inkubálással tártuk fel. Ezt a DNS feltárási módot alkalmaztuk a nyolc-sejtes embriókból üvegkapillárisal izolált blasztomereknél, illetve a biopsziával kinyert sejteken is. A PCR reakciót is ugyanezekben a csövekben közvetlenül végeztük.

PCR amplifikáció

Az ivarmeghatározáshoz pozitív kontrollként a mindkét nemre jellemző sertés mitokondriális 12S génszekvenciát (SUS12S) választottuk, míg az Y kromoszóma kimutatására sertés hím-specifikus ismétlődő szekvenciát (SUSYb) alkalmaztunk a duplex PCR során (*1. táblázat*).

1. táblázat. Az ivarmeghatározás során felhasznált primerek

NÉV	SZEKVENCIA	HOSSZ
SUSYB F.	5'-GTGGCAATGGGATGGTTATC-3'	235 bp.
SUSYB R.	5'-AATCCTCCTCAGCCAAGGTT-3'	
SUS12S F.	5'-CCTCCTCAAGCATGTAGT-3'	75 bp.
SUS12S R.	5'-GTTACGACTTGTCTCTTCGTGCA-3'	

Table 1. Primers used for sex PCR

A PCR programnál a templát kezdeti denaturálása 94°C-on 15 percig tart, ezt 38 ciklus követi, a templát denaturáció 94°C-on 15 másodpercig, primer annealing 58°C-on 25 másodpercig, elongáció 72°C-on 20 másodpercig és a végső lánchosszabbítás 72°C-on 10 percig tart. A PCR terméket 2%-os agaróz gélen futtattuk.

In vitro embrió előállítás

A vágóhídról származó petefészekből M199 oldatban nyertük és válogattuk ki a petesejteket. A megfelelő minőségű petesejteket Nunc 4 lyukú tenyésztő edénybe, PMSG és hCG hormonkiegészítést tartalmazó NCSU37-IVM1 maturációs médiumba helyeztük 22 órára 38,5°C hőmérsékletű termosztátba, 5%-os CO₂ és 5%-os O₂ tartalom mellett. Az első 22 óra leteltével

NCSU37-IVM2 oldatba helyeztük át a petesejteket. A P-FM termékenyítő oldatban végzett fertilizációhoz mélyhűtött, mellékhere eredetű spermiumokat használtunk $1 \cdot 10^5$ /ml koncentrációban. A fertilizáció után a kumulusz sejteket pipettázással távolítottuk el, majd 2 napig NCSU37-PYR-LAC- IVC1 médiumban tenyésztettük *in vitro* az embriókat, $38,5^\circ\text{C}$ -on, 5% CO_2 és 5% O_2 mellett. Második napon a két illetve 4 -sejtes állapotot elérő embriókat NCSU37-GLU-IVC2 médiumba helyeztük és tovább tenyésztettük 8-sejtes állapotig, amikor elvégeztük az embrió blasztomerekre történő szétosztását illetve az embrió biopsziát.

Blasztomer izoláció

Az *in vitro* tenyésztett nyolc-sejtes embriókat a zona pellucida eltávolítása előtt Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes PBS oldatban inkubáltuk annak érdekében, hogy fellazítsuk a kapcsolatot a blasztomerek között. Az inkubálást követően a zona pellucidát pronázos emésztéssel vagy lézerrel távolítottuk el az embriók körül. Petesejtek esetében nem szükséges Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes PBS oldatban inkubálni, de az eredményes DNS feltárás érdekében a zona pellucidát a petesejtek körül is eltávolítottuk pronázos emésztéssel vagy lézerrel. Az embriókat kis átmérőjű üvegapplárisal történő fel-le mozgatással szedtük blasztomerekre, és egy-vagy két blasztomert helyeztünk a PCR csövekbe.

Embrióbiopszia

A 8-sejtes embriókat a sejt-sejt közötti kapcsolatok fellazítása érdekében Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes PBS oldatban inkubáltuk a beavatkozást megelőzően 20 percen keresztül. A mikromanipuláció során a zona pellucidán egy XY Clone lézerberendezés segítségével létrehozott nyíláson keresztül, egy $30 \mu\text{m}$ átmérőjű üvegapillárisal távolítottuk el a blasztomereket egy holder kapillárisal rögzített embrióból Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes PBS oldatban, Olympus IMT-2 inverz mikroszkópra szerelt Narishige illetve Eppendorf mikromanipulátorok segítségével.

Eredmények és értékelés

Az ivar meghatározására az Y kromoszóma-specifikus ismétlődő szekvenciát (235 bázispár) és az esetleges DNS mennyiségi és feltárásai hibák kiküszöbölésére a mindkét kromozómán megtalálható mitokondriális génszekvenciát (75 bázispár) választottuk. Első lépésként gradiens PCR-rel optimalizáltuk a primer tapadási hőmérsékletet (1. ábra), ez alapján az 58°C -os hőmérsékletet választottuk ki a további munka számára. Ezt követően nőstény és hím DNS hígítási soron (10 ng/ μl , 5 ng/ μl , 1 ng/ μl , 0,5 ng/ μl) csökkentettük a detektálási érzékenységet (2. ábra). A legkisebb, 0,5 ng/ μl hígításon is sikerült jelet detektálnunk nőstény és hím minta esetében is.

1. ábra: Gradiens PCR nőstény (N) és hím (H) mintákkal

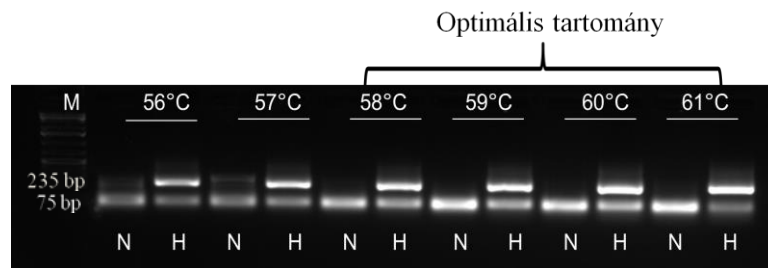


Figure 1: Gradient PCR with female (N) and male (H) samples

2. ábra: PCR hígítási soron

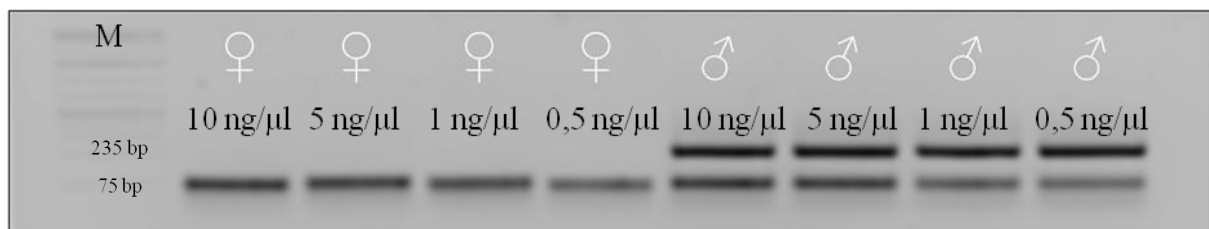


Figure 2: PCR with dilution line

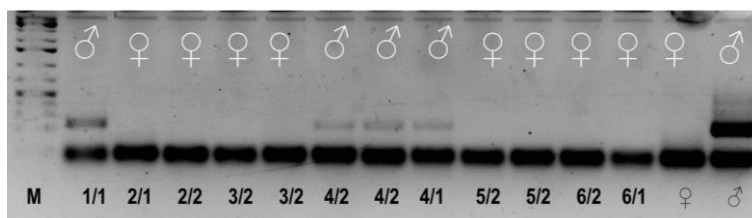
Az egy-sejtre jellemző DNS mennyiség (7-8 pg) vizsgálatához az előzőleg 2 μ l PCR vízben a felhasználásig -20°C-on tárolt zona pellucida mentes petesejteket használtunk a PCR reakció során (3. ábra). A PCR során minden petesejtnél sikerült egyetlen, az X kromoszómára jellemző 75 bázispáros jelet kapnunk.

3. ábra: PCR petesejtekkel



Figure 3: PCR with oocytes

A petesejtekkel történő egy-sejt PCR beállítását követően az *in vitro* fertilizációval előállított embriókból származó blasztomerekkel teszteltük az egy-sejt PCR pontosságát (4. ábra). Hat embrióot osztottunk blasztomerekre, egy embrióból egy-vagy két blasztomert helyeztünk egyszerre egy PCR csőbe. Az egy embrióból származó blasztomereknél ugyanazt a nemet kaptuk és minden blasztomer esetében sikerült jelet detektálnunk.

4. ábra: PCR 8-sejtes embriókból származó blasztomerekkel

4. Figure PCR with blastomeres from 8-cell stage embryos

Ezt követően embrióbopsziával nyertünk ki egy-két blasztomert 23 darab 8-sejtes állapotig *in vitro* tenyésztett embrióból (5. ábra). A PCR eredménye alapján 5 nőstény és 17 hím embriót diagnosztizáltunk. Egy embrióból származó mintánál nem sikerült meghatározni a nemét.

5. ábra: PCR embrióból biopsziával izolált blasztomerekkel

5. Figure: PCR with blastomeres isolated from embryos by embryo biopsy

Következtetések és javaslatok

Munkánk során beállítottuk egy-sejt szintjén az ivarmeghatározást sertés embriókon. Az embrió biopszia révén izolált sejtekből 95%-os hatékonysággal sikerült ivart meghatározni. A PCR termék könnyen megkülönböztethető agaróz gélelektroforézis segítségével, nőstény mintánál egyetlen 75 bp-os termék detektálható, míg hím mintánál egy 75 bp és 235 bp méretű terméket kapunk.

Az embrió ivarának meghatározása mellett, az eljárás alkalmazható egyéb, a tenyésztő által meghatározott génszekvenciák és allélok kimutatására az általunk is alkalmazott preimplantációs genetikai diagnózis módszerét követve. A módszer hasznos eszköz lehet olyan kutatás során, amikor csak azonos nemű utódokból álló almot kívánunk létrehozni.

Irodalomjegyzék

- Bredbacka, P.* (2001): Progress on methods of gene detection in preimplantation embryos. *Theriogenology*, 55: 23–34.
- Fu, Q., Zhang, M., Qin, W. S., Lu, Y. Q., Zheng, H. Y., Meng, B., Lu, S. S., Lu, K. H.* (2007): Cloning the swamp buffalo SRY gene for embryo sexing with multiplex-nested PCR. *Theriogenology*, 68: 1211–1218.
- Habib, A. S. S., Christian, V., Mehdi, S., Dominic, G., Éric, F., Béatrice, M., Jacques, C., Patrick, B., Claude, R.* (2014): Impact of whole-genome amplification on the reliability of pre-transfer cattle embryo breeding value estimates. *BMC Genomics*, 15:889.
- Johnson, L. A., Rath, D., Vazquez, J. M., Maxwell, W. M. C., Dobrinsky, J. R.* (2005): Preselection of sex of offspring in swine for production: current status of the process and its application. *Theriogenology*, 63: 615–624.
- Kahraman, S., Beyazyürek, Ç., Avni Taç, H., Pirkevi, C., Cetinkaya, M., Gülüm, N.* (2015): Recent advances in preimplantation genetic diagnosis. *Advances in Genomics and Genetics*, 5: 189-203.
- Pozzi, A., Previtali, C., Lukaj, A., Galli, A., Bongioni, G., Puglisi, R.* (2014): High-resolution melt analysis does not reveal mutagenic risk in sexed sperm and in vitro-derived bovine embryos. *Animal Genetics*, 45: 473–478.
- Tavares, K.C.S., Carneiro, I.S., Rios, D.B., Feltrin, C., Ribeiro, A.K.C., Gaudêncio-Neto, S., Martins, L.T., Aguiar, L.H., Lazzarotto, C.R., Calderón, C.E.M., Lopes, F.E.M., Teixeir, L.P.R., Bertolini, M., Bertolini, L.R.* (2016): A fast and simple method for the polymerase chain reaction-based sexing of livestock embryos. *Genet. Mol. Res.* 15 (1)
- Torner, E., Bussalleu, E., Briza, M. D., Gutierrez-Adan, A., Bonet S.* (2013): Sex determination of porcine embryos using a new developed duplex polymerase chain reaction procedure based on the amplification of repetitive sequences. *Reproduction, Fertility and Development*, 25: 417–425.