

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Triin Kitsemets

## **Suguselektiooni analüüs FISH meetodiga**

Magistritöö

Juhendajad: prof. Ants Kurg PhD  
Ott Scheler PhD

TARTU 2015

## **SISUKORD**

LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1. Spermide selekteerimise meetodid	7
1.1.1. Modifitseeritud swim-up meetod	7
1.1.2. Albumiini gradiendi meetod	8
1.1.3. Tihedusgradiendis tsentriguugimise meetod	9
1.1.4. Immunoloogiline meetod	10
1.1.5. Läbivoolu tsütomeetria	10
2. FISH kui sperma suguselektiooni järelkontrolli meetod	12
2.1 FISH'i eelised teiste suguselektiooni meetodite ees	13
2.2 Fluorestsents märgisega proovide valmistamine	14
3. EKSPERIMENTAALNE OSA	18
3.1 Töö eesmärgid	18
4. Materjal ja meetodika	19
4.1 Töös kasutatud proovid ja nende disain	20
4.2. Kromosoomi proovide valmistamine	23
4.3. Sperma preparaatide valmistamine	24
4.4. Katsed	27
5. TULEMUSED	31
5.1 FISH protokoll ja märkimise optimeerimine	31
5.2 Kromosoomi proovide katsetamine	32
5.3 Eesti Maaülikooli spermakõrred	35
ARUTELU	39
KOKKUVÕTE	44

Summary	45
KASUTATUD KIRJANDUS	46
LISAD	53
LISA 1. Kasutatud praimerid	53
LISA 2. PCR programm	55
LISA 3. Suguselekteritud ja suguselekteerimata spermakõrte info	56
LISA 4. Spermide fikseerimiseks kasutatud lahused	56
LIHTLITSENTS	57

## LÜHENDID

aa-dUTP	5-(3-aminoallüül)-2'-desoksüüridiin 5'-trifosfaat
BAC	bakteri kunstlik kromosoom ( <i>bacterial artificial chromosome</i> )
DMSO	dimetüülsulfoksiid
FISH	fluorestsents <i>in situ</i> hübridisatsioon
FITC	fluorestsein-isotiotsüanaat
g	suhteline tsentrifugaaljõud
ISH	<i>in situ</i> hübridisatsioon
PSA	proovi spetsiifiline aktiivsusanäitaja
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
CPP	rakku penetreeruvad peptiidid ( <i>cell penetrating peptides</i> )
Cy3	tsüaniinvärv 3
Cy5	tsüaniinvärv 5
YAC	pärmseente kunstlik kromosoom ( <i>yeast artificial chromosome</i> )

## SISSEJUHATUS

Loomapidajatele on suguseleksioon oluline sest, see võimaldab neil saada soovitud soost kariloomi ning vähendada majanduslikult mitte nii väärtuslike loomade arvukust. Selline aretusstrateegia annab piimakarjakasvatajatele võimaluse suurendada emasloomade hulka, vähendada pullide osakaalu karjas ning suurendada selle kaudu majanduslikku sissetulekut. Kariloomade puhul kasutatakse soo järgi selekteeritud spermat ka loomade geneetiliste omaduste parandamiseks ning soovitud tunnuste levitamiseks üle kogu kariloomade populatsiooni. Kõrge väärtusega emasloomade väljastamine soo järgi selekteeritud spermaga aitab suurendada järglaste hulka ning vähendab vajadust uute kariloomade ostmiseks. Kõrge geneetilise väärtusega isasloomad on vajalikud esivanemana kunstliku seemenduse programmides. Aastaid on uuritud erinevaid võimalusi, kuidas määrata järglaste sugu enne *in vitro* viljastamist. Selle läbiviimiseks on mitmeid erinevaid meetodeid, nagu läbivoolu tsütomeetria, tihedusgradiendi meetod, immunoloogilistel erinevustel põhinevad sorteerimismeetodid. Tänapäeval kasutatakse spermide suguseleksiooniks peamiselt ainult läbivoolutsütomeetrit. Selle tehnoloogia abil sorteeritakse sperme küll suure puhtusega, kuid siiski vajab selliselt spermide sorteerimine ka kordusanalüüsi, mis kinnitaks esialgse suguseleksiooni kvaliteeti. Sperma sortimistulemuse hindamiseks on mitmeid võimalusi, nagu kiire kordusanalüüs läbivoolutsütomeetria abil, fluorestsents *in situ* hübridisatsioon ja reaalaaja PCR.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on anda kirjandusel põhinev ülevaade suguseleksioonist ja selle järelkontrolliks kasutatavast fluorestsents *in situ* hübridisatsiooni meetodist. Töö eksperimentaalne osa on jaotatud kaheks, millest esimene kirjeldab, kuidas valmistada fluorestsents *in situ* meetodi jaoks erineva pikkusega fluorestsentsmärgisega proove. Teises osas selgitatakse Eesti näite põhjal, kuidas on võimalik kasutada fluorestseeruva märgisega sugukromosoomide spetsiifilisi proove suguseleksiooni kordusanalüüsi läbiviimiseks.

## 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Aastaid on uuritud erinevaid võimalusi, kuidas läbi viia imetajate spermide suguselekteerimist. Ajaloost on teada, et esimestena uurisid spermide sorteerimist Kreeka filosoofid aastal 500 a. eKr. (Betteridge, 1984). Anaxagoras (u. 500 eKr – 428 eKr) püstitas hüpoteesi, et mehed on vastutavad järglaste soo määramise eest ning oli esimene, kes andis mehe mõlemale testisele spetsiifilise ülesande. Tema hüpoteesi kohaselt määrasid poisslapse sünni paremast testisest pärit spermid ja tüdrukute vasaku testise spermid. Selline arvamus kestis kuni 18. sajandini, millest alates on üritatud välja töötada meetodit, mis võimaldaks efektiivselt suguselekteerida nii inimeste kui ka loomade sperme (Sills *et al.*, 1998).

Suguselekteeritud sperme kasutatakse hetkel ainult põllumajanduses, kuid sellisest spermide sortimisest oleks kasu ka meditsiini valdkonnas. Suguselekteerimine aitaks inimeste puhul ära hoida X-liiteliste haiguste edasikandumise poisslastele (Deech, 1998; Julez, 2014). Veisekasvatuses on suguselekteerimine oluline, sest selle abil on võimalik kasvatada rohkem piima- või lihakarja ning suurendada põllumeeste majanduslikku sissetulekut (Seidel, 2003). Spermide suguselekteerimiseks on võimalik kasutada väga erinevaid tehnoloogiaid. Siiani on aga kõige paremaid tulemusi andnud DNA koguse erinevusel põhinev suguselekteerimine.

Juba 1979. aastal kirjutas Morruzi oma töös, et imetajate sugukromosoomid on DNA sisalduse poolest erinevad. X-kromosoom on suurem ja sisaldab seetõttu rohkem DNA'd kui Y-kromosoomiga sperm (Moruzzi, 1979). Pulli X- ja Y- kromosoomis oleva DNA vaheline erinevus on ligikaudu 4% (Johnson ja Welch, 1999). Järgnevas alapeatükis on välja toodud näited meetoditest, mille abil on võimalik sperme suguselekteerida. Spermide sorteerimiseks kasutatavad tehnoloogiad põhinevad: 1) spermide massi ja liikuvuse erinevusel, 2) erinevatel immunoloogilistel omadustel ja 3) DNA koguse erinevusel.

**Tabel 1.** Spermide erinevused (Espinosa-Cervantes ja Córdova-Izquierdo, 2012 järgi).

	<b>X-kromosoomiga sperm</b>	<b>Y-kromosoomiga sperm</b>	<b>Sorteerimismeetod</b>
<b>DNA hulk</b>	Rohkem	Vähem	Läbivoolutsütomeeter
<b>Suurus</b>	Suurem	Väiksem	Percolli™ meetod
<b>Liikumiskiirus</b>	Aeglasem	Kiirem	Swim-up, albumiini gradiendi meetod

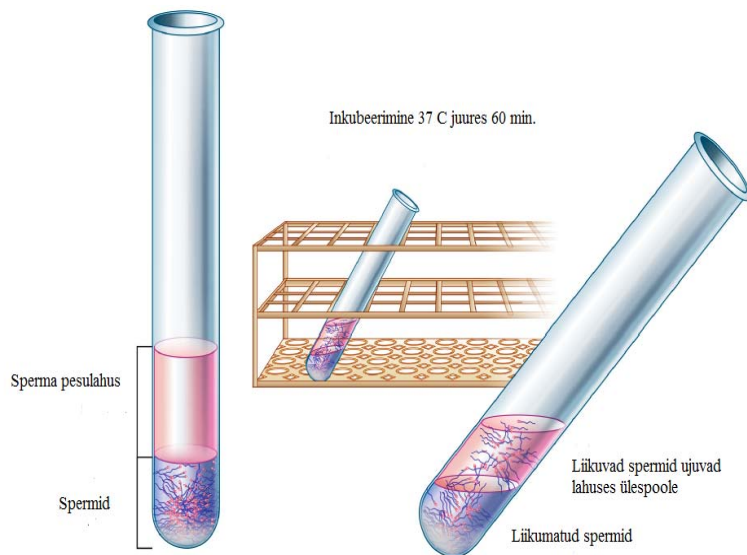
## **1.1 Spermide selekteerimise meetodid**

### **1.1.1 Modifitseeritud swim-up meetod**

Swim-up meetod põhineb X- ja Y-kromosoomiga spermide erineval liikumiskiirusel (Tabel 1). Y-kromosoom on väiksem ja sisaldab vähem DNA'd, mistõttu ujub Y-kromosoomiga sperm kiiremini ülemisesse kihti kui suure X-kromosoomiga sperm (Check *et al.*, 1994).

Puhastatud rakud pannakse tuubi, kaetakse lahusega ja inkubeeritakse (joonis 1). Pärast inkubeerimist eemaldatakse ülemine kiht, mida kasutatakse *in vitro* katsetes (Henkel ja Schill, 2003).

Õnnestunud suguselektsioonist swim-up meetodit abil on kirjutanud oma töös näiteks Check *et al.*, aastal 1994. Ebaõnnestunud suguselekteerimisest selle meetodi järgi on kirjutanud aga näiteks Han *et al.*, aastal 1993 ja De Jonge *et al.*, aastal 1997.



**Joonis 1. Swim-up meetod** (Beydola *et al.*, 2013 järgi). Puhastatud rakud pannakse tuubi ning nende peale asetatakse sperma pesulahus. Pärast inkubeerimist eemaldatakse ülemine kiht, mille rakke kasutatakse *in vitro* katsetes.

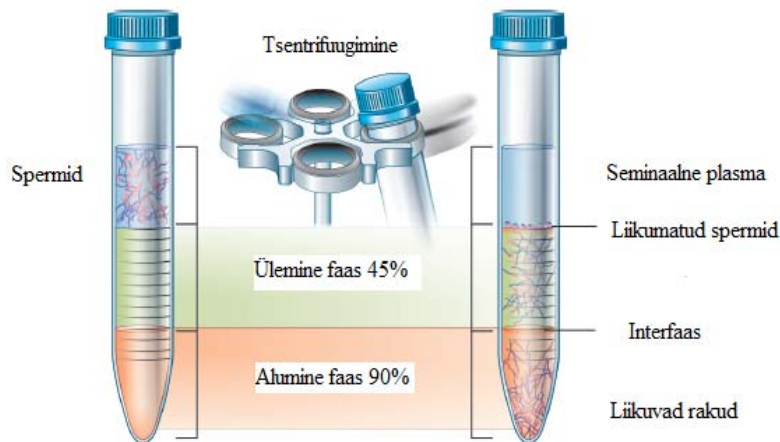
### 1.1.2 Albumiini gradiendi meetod

Albumiini gradiendi meetodi töötasid välja Ericsson *et al.*, aastal 1973. Meetod põhineb sugukromosoomide settimiskiiruse erinevusel: Y-kromosoomiga sperm on väiksem ja ujub võrreldes X-kromosoomiga spermist kiiremini. Kui spermid asetada albumiini gradiendi pinnale, siis Y-kromosoomiga spermid liiguvad kiiremini läbi erineva tihedusega gradiendi kihtide. Aastal 1973 väitsid Ericssoni *et al.*, oma töös, et selle meetodiga on võimalik eristada Y-kromosoomiga sperme kuni 85% ulatuses X-kromosoomiga spermidest, kuid korduskatsed, mis on tehtud teiste teadlaste poolt ei ole seda tulemust kinnitanud (Brandriff *et al.*, 1986 ja Flaherty *et al.*, 1997).

### 1.1.3 Tihedusgradiendis tsentrifuugimise meetod

Tihedusgradiendis tsentrifuugimisel selekteeritakse sperme vastavalt nende erinevale tihedusele. Selle meetodi puhul valmistatakse erineva tihedusega lahustest gradient (joonis 2). Tuubi alumises fraktsioonis on kõrge tihedusega lahus ning ülemises kihis väiksema tihedusega lahus. Gradiendi pinnale asetatakse sperma ning fuugitakse. Pärast tsentrifuugimist paikneb iga sperm sellises gradiendi kihis, mis vastab tema tihedusele. Meetod põhineb sugukromosoomide suuruse erinevusel: X-kromosoomiga sperm on suurem kui Y-kromosoomiga sperm ja seetõttu ka raskem, mistõttu settib X-kromosoomiga sperm alumisesse fraktsiooni. Kergem Y-kromosoomiga sperm jääb aga ülemisesse kihti. Suguselektoerimiseks kasutatakse tavaliselt 3...12 kihilist gradienti (Check *et al.*, 1994; Check *et al.*, 2000).

Edukast suguselektsioonist Percolli™ tiheduse gradiendi abil on kirjutanud oma töödes näiteks Andersen ja Byskov (1997) ning Kobayashi *et al.*, 2004. Percolli™ tihedusgradiendi meetodi ebaõnnestunud suguselektsioonist on kirjutanud Samura *et al.*, (1997), Lin *et al.*, (1998), Wang *et al.*, (1994) jt.



**Joonis 2. Tihedusgradiendi meetod** (Beydola *et al.*, 2013 järgi). Alumine ja ülemine gradient asetatakse üksteise peale selliselt, et kõige ülemiseks kihiks jääks spermalahus. Seejärel tsentrifuugitakse, et eraldada X- ja Y-kromosoomiga spermid teineteisest.

### 1.1.4 Immunoloogiline meetod

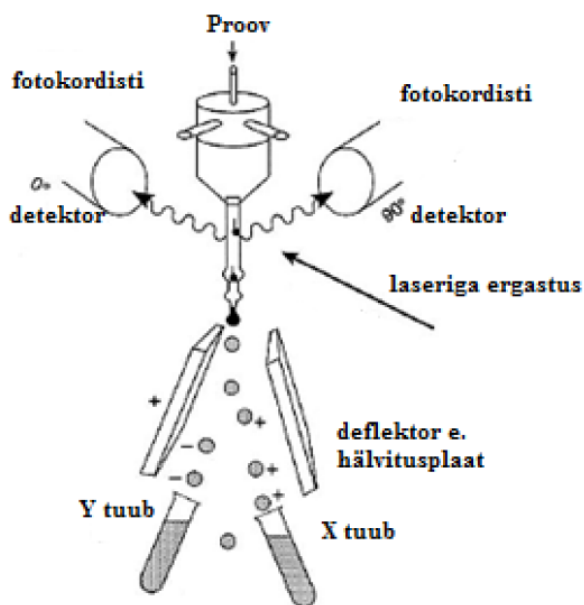
Immunoloogilised meetodid põhinevad ideel, et kui oleks võimalik spermide pinnalt eraldada selline valk, mis on spetsiifiline ainult X- või Y-kromosoomiga spermile, siis oleks võimalik selle vastu tekitada spetsiifilisi antikehasid ning nende abil läbi viia suguselektsiooni.

Imetajate soo määramiseks on tehtud erinevaid immunoloogilisi katseid (Howes *et al.*, 1997, Sang *et al.*, 2011). Esimene sellealane töö (Goldberg *et al.*, 1971) keskendus H-Y antigeenile, mis arvati olevat kodeeritud Y-kromosoomi poolt. Kuigi H-Y antigeeni avastamise algusaastatel arvati, et seda meetodit oleks võimalik kasutada pulli spermide suguselekterimiseks (Ali *et al.*, 1990), siis hilisemad katsed teiste autorite poolt on viidanud selle meetodi ebaefektiivsusele (Hendriksen *et al.*, 1993).

X- ja Y-kromosoomiga spermide spetsiifiliste valkude määramine põhineb ideel, et X- ja Y- kromosoomid ekspresseerivad erinevaid geene, mistõttu võivad X- ja Y-kromosoomiga spermid sünteesida erinevaid pinnavalke. Aastal 1996 tegid Hendriksen jt. katse metssea spermidega, et uurida, kas selline erinevus X- ja Y-kromosoomiga spermide vahel tõesti esineb. Kasutades läbivoolutsütomeetrit, sorteeriti spermid X ja Y populatsioonidesse puhtusega ~90%. Spermi pinnalt määrati ligikaudu 1000 valku, kuid ühtki erinevust X- ja Y-spermidelt eraldatud valkude vahel ei leitud. Seega võib katsetulemustest järeldada, et sellist erinevust X- ja Y-kromosoomiga spermide vahel siiski ei esine (Hendriksen *et al.*, 1996).

### 1.1.5 Lävivoolu tsütomeetria

Lävivoolu tsütomeetria on meetod, mis kasutab X- ja Y-kromoomiga spermide sorteerimiseks DNA koguse erinevust. Spermides olev DNA hulk määratakse kasutades fluorestseeruvat värvi Hoechst 33342, mis tungib läbi spermi membraani ja seondub DNA-ga. Meetod põhinebki DNA'ga seonduva värvi (Hoechst 33342) koguse mõõtmisel. X-kromosoom sisaldab rohkem DNA'd kui Y-kromosoomiga sperm, mistõttu on X-kromosoomiga spermiga seondunud rohkem värvi ning seetõttu fluorestseerub X-kromosoomiga sperm eredamalt. Lävivoolutsütomeetriga mõõtmisel liiguvad spermid ükshaaval läbi laserkiire. Fluorestsents, mis rakust kiiratakse pärast selle ergastamist, on võrdeline rakus oleva DNA kogusega. Pärast laseriga ergastamist saavad spermid elektrilaengu ning sorter jaotab spermid laengu (positiivne, negatiivne, laenguta) põhjal tuubidesse (Seidel, 2007)



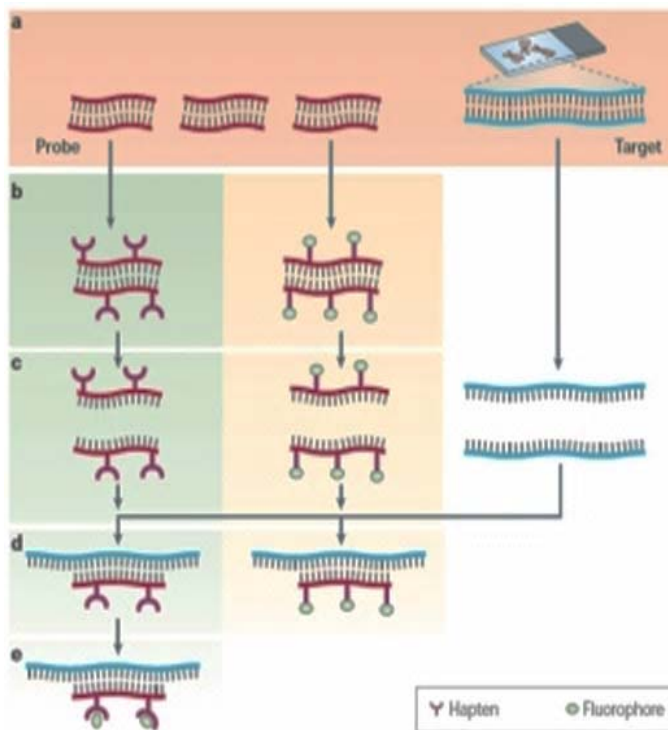
**Joonis 3.** Lävivoolutsütomeeter (Cran ja Johnson, 1996 järgi). Joonisel on kirjeldatud lävivoolutsütomeetri tööpõhimõtte rakkude sorteerimiseks vastavalt DNA-ga seondunud värvi poolt kiiratavale fluorestsentssignaalile.

Läbivoolutsütomeetria on hetkel ainus efektiivne meetod, mis sorteerib sperme kuni 90% täpsusega (Johnson ja Welch, 1999). Selle meetodi abil suguselekteeritud sperme on kasutatud nii inimese (Fugger *et al.*, 1998), jäneste (Johnson *et al.*, 1989), lammaste (de Graaf *et al.*, 2007), sigade (Rath *et al.*, 1997), lehmade (Hamano *et al.*, 1999) ja hobuste (Balo da Silva *et al.*, 2013) kunstlikuks viljastamiseks.

Kuigi läbivoolutsütomeetria on efektiivne sorteerimise meetod on sellel siiski mitmeid puuduseid: 1) sorteerimiseks kasutatakse DNA'ga seonduvat värvi (Hoechst 33342), mis võib olla mutageenne ja mis kantakse viljastamisel edasi arenevasse embrüosse ja 2) sperme selekteeritakse kasutades laserkiirt, mis võib kahjustada DNA'd (Parrilla *et al.*, 2004). Lisaks sellele toimub spermide sorteerimine ühekaupa, mis muudab antud meetodi väga aeglaseks, et koguda kokku viljastamiseks vajaminev spermadoos.

## 2. FISH kui sperma suguselektsiooni järelkontrolli meetod

Esimese ISH eksperimendi viisid läbi Gall ja Pardue aastal 1969 kasutades radioaktiivseid määrgiseid. Aastatega on see meetod palju arenenud ning tänapäeval kasutatakse ISH eksperimentides radioaktiivsete määrgiste asemel fluorestsents määrgisega proove, mis on ohutumad, stabiilsemad ja kergemini detekteeritavad (Rudkin ja Stollar, 1977).



**Joonis 4. FISH meetodi tööpõhimõte** (Speicher ja Carter, 2005 järgi). **a)** FISH eksperimendi põhilised osad: proov ja sihtmärkjärjestus; **b)** proovi valmistamine; **c)** proovi ja sihtmärkjärjestuse DNA denaturatsioon kasutades kuumusega või alusega töötlust selleks, et nende vahele saaksid hübridisatsiooni etapis tekkida uued vesiniksidemed; **d)** hübridisatsiooni etapp, mille jooksul tomub proovi seondumine komplementaarsuse põhimõttel oma sihtmärkpiirkonnaga; **e)** täiendav hübridisatsiooni etapp selleks, et liita hapteenimolekuliga fluorestsents märgisega antikeha (vt. ptk. fluorestsents märgisega proovide valmistamine).

Hübridisatsioonipõhiste meetodite idee seisneb selles, et teadaolevale DNA järjestusele on võimalik hübridiseerida sellega komplementaarne proov, mis aitab tuvastada spetsiifilisi piirkondi DNAs (joonisel 4a-d). FISH proovide märgistamise jaoks kasutatakse kas nick-translatsiooni, random primed märgistamist või PCR'i. Nick-translatsiooni puudus võrreldes teiste meetoditega on see, et selle jaoks on vaja suhteliselt suurt DNA algkogust (tavaliselt 2 µg), mis võib olla probleemiks kui töötatakse haruldaste DNA proovidega. Sellisel juhul kasutatakse PCR'iga proovide märgistamist (Redon *et al.*, 2009).

## **2.1 FISH'i eelised teiste suguselektsiooni meetodite ees**

Spermide suguselekterimise tulemusi on võimalik hinnata nelja erineva tehnoloogia abil: 1) läbivoolu tsütomeetria kasutades kiire kordusanalüüs (Welch ja Johnson, 1999); 2) PCR'iga (Maleki *et al.*, 2013); 3) FISH'iga (Kawarasaki *et al.*, 1998) ja 4) embrüo biopsia abil, millele järgneb suguselektsioon PCR'i (Chen *et al.*, 1999) või FISH'iga (Kobayashi *et al.*, 1998). Sellealaseid töid, mis kinnitavad FISH'i ja PCR'i eeliseid läbivoolu tsütomeetria ees on tehtud mitmeid (Kawarasaki *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2011). Näiteks analüüsisid Kawarasaki jt. oma töös metssea sperme kasutades nii FISH'i kui läbivoolutsütomeetrit ning leidsid, et mõlemad tehnoloogiad on võimelised spermat suguselektsiooni tulemusi analüüsima ühesuguse puhtusega (Kawarasaki *et al.*, 1998).

Läbivoolutsütomeetriga kordusanalüüsi peamine eelis FISH'i ja PCR'i ees on kordusanalüüsi kiirus. Läbivoolutsütomeetria vajab aga kordusanalüüsiks palju rakke (umbes 50 000 sperm), mistõttu on see meetod ebasobiv kui soovitakse töötada haruldaste proovidega. Lisaks kasutatakse läbivoolutsütomeetriga kordusanalüüsi puhul sama tehnoloogiat, mida esimesel sorteerimise korralgi. Läbivoolutsütomeetria puuduseid aitab

täiendada PCR. PCR'iga suguselekteerimise tugevaks küljeks on see, et kordusanalüüsiks vajaminev rakkude hulk ei ole suur (piisab ka näiteks ainult 100 rakust). Selline vähene rakkude hulk kordusanalüüsiks on eriti oluline juhul, kui analüüsiks kasutatakse sperme, mis on väga väärtuslikud või mida on võimalik kasutada ainult teatud piiratud koguses. FISH tehnoloogia on olnud mitmeid aastaid eelistatud suguselekteerimise kordusanalüüsi läbiviimiseks sest, 1) kasutatakse kromosoomi spetsiifilisi proove, mistõttu on võimalik sellega läbi viia mitu erinevat analüüsi samaaegselt; 2) on selle abil võimalik kiiresti kokku lugeda suures koguses sperme ühe eksperimendi kohta. Peamine puudus FISH meetodi puhul on aga pikk hübriidiseerimise aeg (sageli kuni 16 tundi) (Welch ja Johnson, 1999).

## **2.2 Fluorestensts märgisega proovide valmistamine**

Proovide valmistamise tehnoloogia sõltub sellest, millise pikkusega proove soovitakse disainida. Pikemad proovid on sageli üle 500 aluse pikad ning neid saab valmistada kahel erineval viisil. Esimene võimalus on kasutada kloonimist. Seda eelistatakse juhul kui uuritav DNA järjestus on teadmata. Teine võimalus on proovide valmistamiseks kasutada PCR'i, mis võimaldab proove üheaegselt nii amplifitseerida kui ka märgistada. Lisaks pikkadele proovidele on võimalik valmistada ka lühemaid proove ehk oligonukleotiidproove, mis on sageli kuni 18-30 aluspaari pikkused (Aquino de Muro, 2005). Nii pikkade kui lühikeste järjestustega proovide kasutamisel on omad eelised ja puudused. Mõlema proovi eelised ja puudused on välja toodud tabelis 2 ning pikemalt on nende üle arutletud arutelu osas.

**Tabel 2.** Pikkade ja lühikeste proovide eelised ja puudused.<sup>1</sup>

	<b>Pikad proovid</b>	<b>Lühikesed proovid</b>
<b>Spetsiifilisus</b>	Vähem spetsiifiline	Spetsiifilisem
<b>Elusrakkudesse viimine</b>	Raskem	Lihtsam
<b>Hübriidatsiooniks vajaminev aeg</b>	Pikk	Lühike
<b>Seondumise tugevus sihtmärkpüürkonnaga</b>	Tugev	Nõrk

Proovide märgistamiseks kasutatakse kas otsest või kaudset meetodit (joonis 5). Otsese märgistamise puhul viiakse fluorestsentsmärgisega nukleotiidid sünteesi käigus DNA ahelasse (joonis 5a). Selliselt märgistatud proove on võimalik pärast hübridiseerimist kohe mikroskoobiga detekteerida.

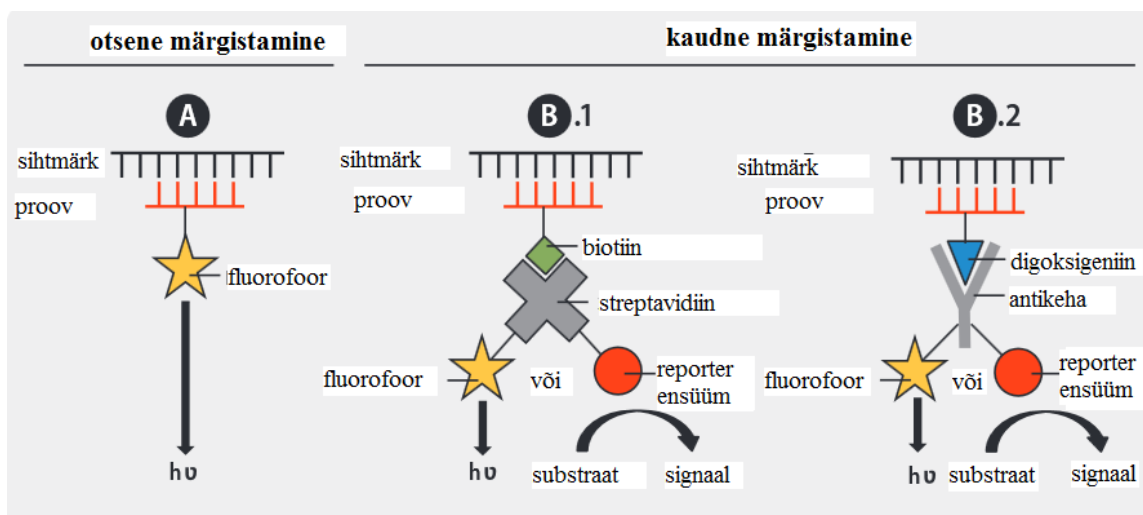
Kaudne märgistamine aga tähendab, et nukleiinhappejärjestusele lisatakse sünteesi käigus hapteenitaolisi retseptormolekule (näiteks biotiin, digoksigeniin), mida on vaja pärast hübridiseerimise etappi veel märgistada fluorofooriga konjugeeritud antikehaga ning alles seejärel on võimalik asuda tulemusi analüüsima. Retseptormolekulide lisamiseks nukleiinhappejärjestusele kasutatakse sageli näiteks nick-translatsiooni. Biotiiniga proove detekteeritakse pärast hübridiseerimist fluorokroomiga konjugeeritud steptavidiiniga (joonis 5 B.1). Digoksigeniini detekteerimise jaoks kasutatakse digoksigeniini vastast antikeha (joonis 5 B.2). Kaudne märgistamine sobib väikeste proovide jaoks (1 kbp kuni

---

<sup>1</sup> [www.genedetect.com/insitu.htm](http://www.genedetect.com/insitu.htm)

mõni tuhat kbp). Suuremate (BAC, YAC) proovide puhul märgistatakse proov kasutades otsest märgistamist (Morrison *et al.*, 2002).

Mõlemal märgistamise tehnoloogial on omad eelised. Kui proov märgistada otse meetodi abil, siis on võimalik FISH eksperiment kiiremini läbi viia ning pärast hübridiseerimist tulemusi kohe fluorestsents mikroskoobiga analüüsida. Kaudse märgistamise korral aga lisandub veel lisa hübridisatsiooni etapp, kuid selle abil on võimalik saada suurema tugevusega fluorestsentssignaal võrreldes otseste märgistamisega.

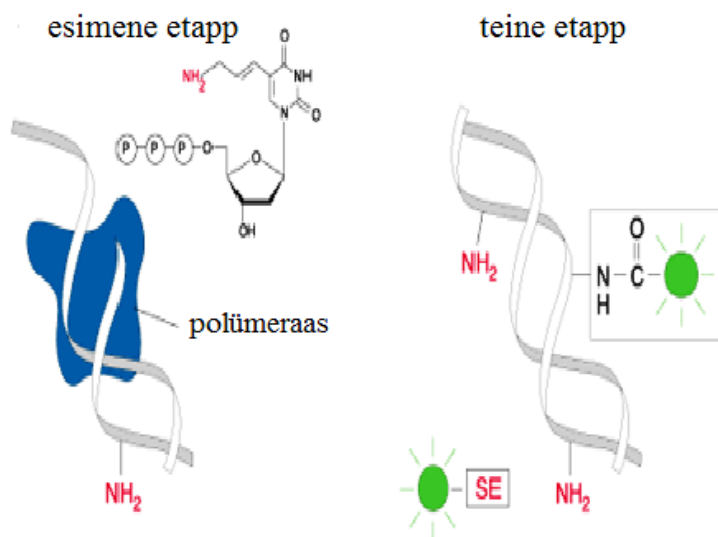


**Joonis 5. Proovide märgistamise viisid.** Joonisel **A)** on kujutatud **otsene märgistamine**, joonisel **B.1)** ja **B.2)** **kaudne märgistamine**. Kaudne märgistamine võib toimuda kasutades retseptormolekuli (biiotiini) ning selle detekteerimist fluorokroomiga konjugeeritud streptavidiiniga (**B.1)** või kasutades reaktsiooni digoksigeniini/antkeha (**B.2**). Sellist tüüpi kaudse märgistamise kasutamine aitab suurendada fluorestsentsi signaali.<sup>2</sup>

<sup>2</sup><https://www.lifetechnologies.com/ee/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/nucleic-acid-detection-and-genomics-technology/labeling-oligonucleotides-and-nucleic-acids.html>

<sup>3</sup>[https://www.jenabioscience.com/images/741d0cd7d0/bro\\_FluorescentProbes\\_WEB.pdf](https://www.jenabioscience.com/images/741d0cd7d0/bro_FluorescentProbes_WEB.pdf)

Otsene märgistamine võib olla nii ühe- kui kaheetapiline. Üheetapiline märgistamine toimub PCR'i käigus. Kaheetapilise märgistamise puhul aga pärast PCR'i. Kaheetapilise märgistamise jaoks kasutatakse aminoallüül-dUTP'd, mis lisatakse PCR'i käigus nukleiinhappeahelasse. Esimeses etapis asendatakse üks nukleotiid neljast (tavaliselt tümidiin) osaliselt aminoallüül-dUTP'ga. Teises etapis toimub sünteesitud järjestuse märgistamine kasutades fluorofoore. Sellist tüüpi märgistamise eelis võrreldes otsese märgistamise meetodiga on see, et aminoallüül-modifitseeritud nukleotiididel puuduvad kogukad värvirühmad, mistõttu saab DNA polümeraas nad sünteesi käigus kergesti ahelasse liita. Selline proovi märgistamise meetod sobib näiteks FISH proovide valmistamiseks ja ka microarray põhiste eksperimentide läbiviimiseks.<sup>3</sup>



**Joonis 6.** Aminoallüül-dUTP'ga märgistamine. Esimeses etapis toimub ensümaatilisel aminoallüül-UTP lisamine. Teises etapis toimub amiinrühma märgistamine kasutades reaktiivset värvi või hapteni molekuli.<sup>3</sup>

Proove on võimalik märgistada kasutades radioaktiivset või mitteradioaktiivset märgistamist. Radioaktiivse märgistamise puhul märgistatakse proovid kasutades radioaktiivseid isotoope (näiteks <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H) ning nende detekteerimiseks kasutatakse

<sup>3</sup> [https://www.jenabioscience.com/images/741d0cd7d0/bro\\_FluorescentProbes\\_WEB.pdf](https://www.jenabioscience.com/images/741d0cd7d0/bro_FluorescentProbes_WEB.pdf)

autoradiograafiat. Radioaktiivne märgistamine on eelistatud peamiselt oma täpsuse ja lihtsuse poolest. Näiteks võimaldab radioaktiivne märgistamine märgistada üksikuid aatomeid ning selle abil määrata nende liikumist (Sugiura *et al.*, 2014). Selline märgistamise tüüp ei ole tänapäeval aga enam nii populaarne kui aastaid tagasi, sest radioaktiivne märgistamine on kallis ja küsimusi on tekitanud ka märgistamise ohutus. Võrreldes radioaktiivsete märgistega on mitteradioaktiivsete märgiste kasutamisel mitmeid eeliseid:

- nad on ohutumad;
- proovid on stabiilsemad;
- signaali detekteerimiseks kulub vähem aega;
- märgised seonduvad paremini (Aquino de Muro, 2005).

### **3. EKSPERIMENTAALNE OSA**

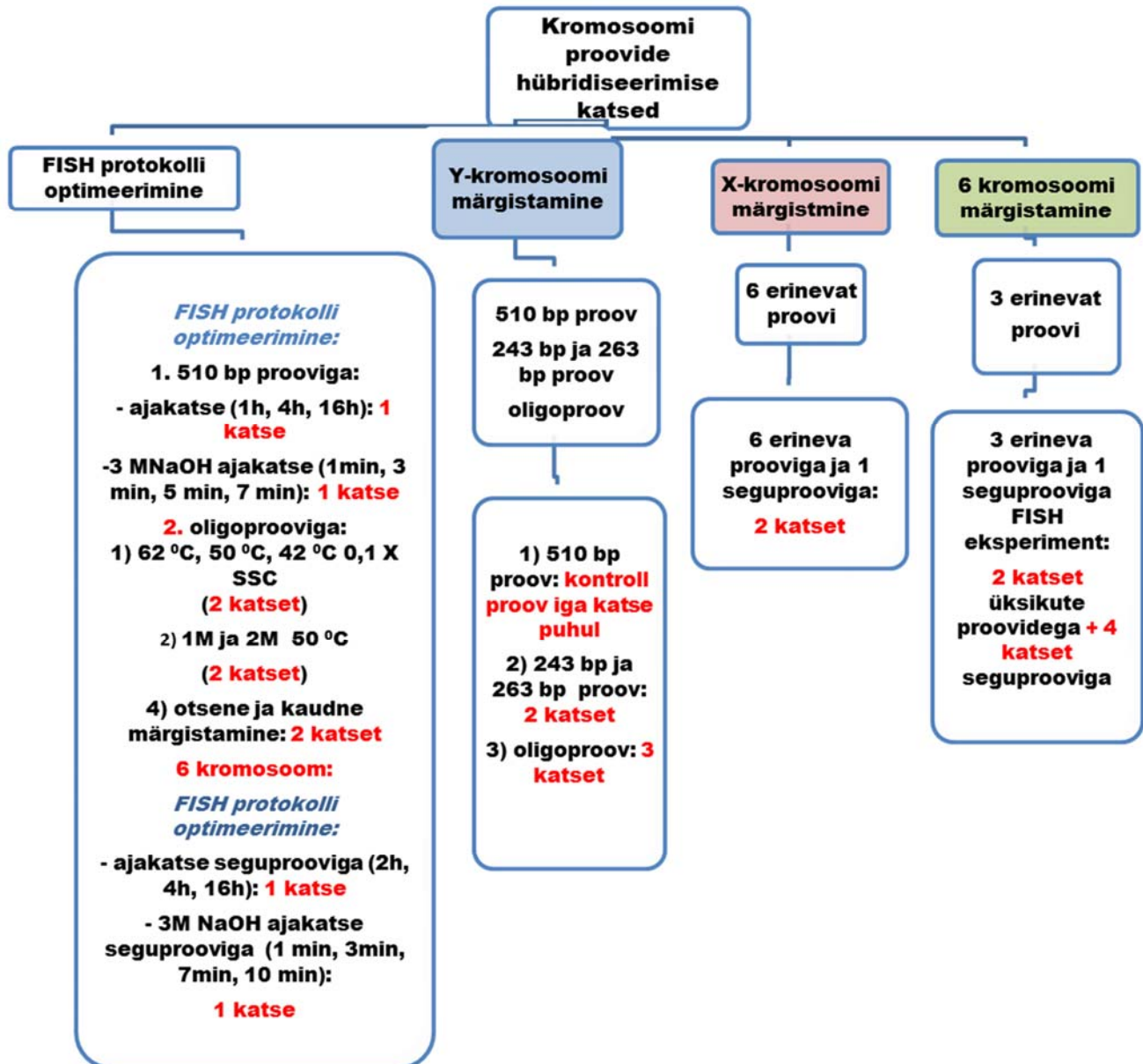
#### **3.1 Töö eesmärgid**

Käesoleval magistritöö praktilisel osal on kaks eesmärki:

Esiteks valmistada pulli X- ja Y-kromosoomi kindlatele piirkondadele seonduvad proovid, mida oleks võimalik kasutada nii värskel spermal kui ka külmutatud spermal suguselekterimise analüüsimiseks.

Teiseks analüüsida X- ja Y-kromosoomi spetsiifiliste proovide abil Eesti Maaülikoolist pärit eelnevalt suguselekteritud spermakõrsi.

## 4. Materjal ja meetodika



Joonis 7. Magistritöö katseplaan, milles on kirjeldatud kogu eksperimentaalse töö käik

#### 4.1 Töös kasutatud proovid ja nende disain

Spermide sorteerimise jaoks kasutati pikki nukleiinhappeproove, mille pikkus ulatus kuni 510 aluspaarini kui ka lühikesi ~20 nukleotiidi pikkuseid oligoproove. Järgnevalt on seletatud, kuidas valmistati pikad ja lühikesed proovid.

Genoomse DNA eraldamise jaoks vajaminev veri pärines Eesti Maaülikoolist ning seda hoiti kuni kasutamiseni -20°C juures. Pulli verest eraldati PCR-i jaoks vajaminev DNA kasutades High Pure PCR Template Preparation Kitti (Roche Diagnostics, Germany). Y-, X- ja 6. kromosoomi järjestuste amplifitseerimiseks kasutati PCR'i reaktsiooni. Reaktsioonisegu maht oli 20 µl. Amplifitseerimiseks kasutatud praimerid on esitatud lisas (tabel 3). PCR'i reaktsioonid viidi läbi PCR'i masinas (MJ Research PTC-200 Thermal Cycler), kasutades programmi, mis on toodud lisas 2.

**Tabel 3.** PCR'i segu komponendid ja nende kontsentratsioonid.

Komponent	Komponendi lõppkontsentratsioon	Kogus 1-le reaktsioonile (µl)
PCR reaktsioonipuhver	1x	2
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	1,2
1:2 dNTP mix		3
F praimer	0,25 µM	1
R praimer	0,25 µM	1
Märklaud-DNA	100 ng	
Taq polümeraas (FirePol)		0,3
ddH <sub>2</sub> O		

PCR-i reaktsiooni jaoks kasutati 1:2 dNTP mix'i, milles oli 2 mM dATP, dCTP, dGTP ja 1,3 mM dTTP (Thermo Fischer Scientific) ja 0,66 mM dUTP (Thermo Fischer Scientific). PCR-i produkte kontrolliti agarosgeel-elektroforeesil. 1,5% agarosgeeli valmistamisel kasutati 0,5-kordset TBE puhvrit ja agarosiooni (Naxo OÜ, Tartu, Eesti). DNA visualiseerimiseks lisati geelile etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,5 µg/ml. Markerina kasutati 50 bp GeneRuler DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific).

PCR produktid puhastati enne märgistamist kasutades NucleoSpin RNA Clean-Up kit'i PCR-i puhastuskitti (Macherey-Nagel, Düren, Germany) ja jälgiti tootja poolt kaasa antud protokoll. Puhastatud PCR-i produktide puhtust hinnati kasutades NanoDropi ja selle programmi „Nucleic acid“, et määrata DNA kontsentratsiooni. Pärast kontsentratsiooni mõõtmist kuivatati puhastatud PCR'i produktid kasutades vaakumkuivatit.

### **Fluorestseeruva märgise lisamine aminoallüülrühmale**

DNA märgistamine toimus kombineerides t' Hoen *et al.*, ja Dirsch *et al.*, poolt avaldatud protokolle.

- Vaakumkuivatatud DNA lahustamiseks kasutati 4,5 µl 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9,0), mida kuumutati eelnevalt 15 minutit 60°C juures.
- Üks tuub Cy3 ja Cy5 monoreaktiivset fluorestsentsmärgist (GE Healthcare) lahustati 45 µl-s 100% DMSO-s ja 4,5 µl-s 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9,0). Seejärel inkubeeriti 1 tund pimedas, segades tuubi iga 15 minuti järel.
- Seondumata värvi kustutamiseks lisati lahusele 3,5 µl 4M hüdroksüülamiini lahust (Sigma-Aldrich, Steinheim, Saksamaa) ja hoiti 15 minutit toatemperatuuril pimedas.
- pH alandamiseks lisati igale proovile 35 µl 100 mM Na-atsetaati (pH 5,1).
- Puhastamise jaoks PCR kitiga (Macherey-Nagel, Düren, Germany) viidi lahuse ruumala ddH<sub>2</sub>O-ga 100 µl-ni.
- Puhastamise järgselt kontrolliti märgise seondumist DNA-ga NanoDropiga, kasutades programmi „Microarray“.
- Pärast NanoDropiga mõõtmist jaotati proovilahus vastavalt vajadusele 1 µg, 500 ng või 250 ng ja veetustati vaakumkondensaatoriga ning säilitati kuni kasutamiseni -20 °C juures. Proovide hoidmine -20 °C juures aitab vältida proovide degradeerumist ning säilitab neid vähemalt 1-2 aastat.

### **Fluorofooriga proovide kvaliteedi kontroll pärast märgistamise etappi**

DNA kontsentratsiooni ja sellega seondunud värvi hulka mõõdeti NanoDropiga kasutades programmi „Microarray“. Kui 260/280 väärtus oli üle 1,8, siis oli proov puhas valgulisanditest. Märgistatud proovide puhul tekkis graafikule kaks piiki: esimene näitas DNA neeldumist 260 nm juures ja teine Cy3 neeldumist 550 nm juures. Fluorofoori

seondumist DNA'ga hinnati kasutades proovi spetsiifilise aktiivsuse näitaja (PSA) arvutamist:  $PSA = (\text{värvi kogus pmol'ides } \mu\text{l'is}) / (\text{DNA kogusega } \mu\text{g'ides } \mu\text{l'is})$ . Selle valemi abil on võimalik hinnata värvi seondumise hulka DNA'ga. (Redon *et al.*, 2009). Oma eksperimentides seadsime alumiseks piirväärtuseks 25 pmol/ $\mu\text{l}$ , millest allapoole jäänud väärtuseid lugesime ebapiisavaks märgise seondumiseks.

## 4.2 Kromosoomi proovide valmistamine

Pikkade proovide valmistamise esimeseks etapiks oli PCR-i abil vajamineva piirkonna amplifitseerimine. Sellele järgnes PCR-i produkti puhastamine ning märgistamine fluorofooriga (Cy3/Cy5). Y-kromosoomi proovi valmistamiseks vajaminev (510 bp pikkune) järjestus pärines Habermanni *et al.*, (2005) artiklist ning sellest hakkasime tegema väiksemaid järjestusi, sest lõppesmärgiks oli töötada oligoproovidega. Katsetes kasutatud Y-kromosoomi proovide pikkused varieerusid 510 bp'st kuni 20 nukleotiidini. Pulli Y-kromosoomi spetsiifiliste proovidenä kasutati 510 bp pikkust proovi, mis lühendati kolmeks ligikaudu 250 bp pikkuseks järjestuseks kasutades bioinformaatika osakonna poolt programmi primer3 programmi (<http://primer3plus.ut.ee/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) abil disainitud praimereid. Praimerikandidaate testiti mittespetsiifiliste seondumiste osas BLAST-iga. Y-kromosoomi proovide kogused, mida katsetes kasutati varieerusid 1  $\mu\text{g}$ 'st kuni 250 ng'i pikkade proovide puhul.

X-kromosoomi spetsiifiliste korduste amplifitseerimiseks kasutati bioinformaatika õppetooli poolt programmi primer3 abil disainitud praimereid. X-kromosoomi järjestuste amplifitseerimiseks kasutatud praimerid on ära toodud lisa (lisa 1). Protokoll, mida X-kromosoomi proovide jaoks kasutati oli samasugune nagu Y-kromosoomi proovide puhul.

Autosoomi proovi valmistamiseks vajaminevad praimerite järjestused pärinesid Habermann *et al.*, 2005 avaldatud artiklist ning on ära toodud lisa (tabelis 1). 6. kromosoomi proovide märgistamise protokoll erines originaalartiklist selle poolest, et proovid märgistati pärast PCR reaktsiooni, mitte aga PCR'i käigus. Autosoomi proovide hübriidiseerimiseks kasutati sama protokoll, mida ka Y-kromosoomi proovide hübriidiseerimiseks. 6. kromosoomi piirkonna märgistamise jaoks kasutati valmistati 3 erineva nukleiinhappejärjesega proovi. Katsetes kasutati 1) kolme üksikut proovi eraldi ja 2) kõiki kolme proovi koos.

## **Oligonukleotiidproovide valmistamine**

Y-kromosoomi spetsiifiliste oligonukleotiidproovide valmistamine erines teistest kromosoomi proovide valmistamise viisidest, mida katsetes kasutati. Y-kromosoomi oligoproovide tegemiseks kasutati 243 bp pikkust Y-kromosoomi järjestust, mis jaotati ligikaudu 20 nukleotiidi pikkusteks järjestusteks selliselt, et järjestuste sulamistemperatuurid oleksid ühesugused (meie näite puhul ligikaudu 60 °C). Nende järjestuste põhjal telliti 12 fluorestseeruva märgisega praimerit. FISH eksperimendi jaoks valmistati proovid kombineerides omavahel 12 üheahelalist oligot. Katsete jaoks kasutati 1) proovi, mis saadi kombineerides omavahel 12 erinevat oligot. Vaakumkuivatatud proovi lõppkogus ~ 1 µg ; 2) proovi, mis saadi kui kombineeriti omavahel 6 erinevat oligot, mille iga ühe kogus proovis oli 1 µg.

## **4.3 Sperma preparaate valmistamine**

Käesoleva lõputöö katsete jaoks kasutati nii värsket kui ka külmutatud spermat. Esmalt kasutati spermide klaasile fikseerimiseks ja suguselekteerimiseks värsket spermat. Seejärel kasutati külmutatud suguselekteerimata ja suguselekteeritud spermat ning viidi läbi suguselekteerimise analüüs. Nii külmutatud kui ka külmutamata sperma pärines EMÜ veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse laborist.

1. Vähemalt päev enne rakkude fikseerimist pandi mikroskoobiklaasid (Brand, Saksamaa) 100 % metanooli (Naxo, Tartu, Eesti) ja hoitakse -20°C juures vähemalt 12 tundi, et vähendada preparaate hübridisatsiooni efektiivsuse langust (Pinkel *et al.*, 1986).
2. Rakkude fikseerimise päeval kuivatatakse klaasid gaasilise lämmastiku joas ning pannakse karpi ja hoitakse enne kasutamist – 20 °C juures.
3. Fikseerimispäeva hommikul valmistati spermide fikseerimiseks värsked lahused: 0,075M KCl ning 3:1 metanool ja äädikhappelahus. Enne kasutamist eelsoojendati 0,075 M KCl-i lahust vähemalt 30 min 37 °C juures vesivannil (vt. täpset lahuste protokollit lisast lisa 4).

### **Külmutamata sperma klaasile fikseerimine**

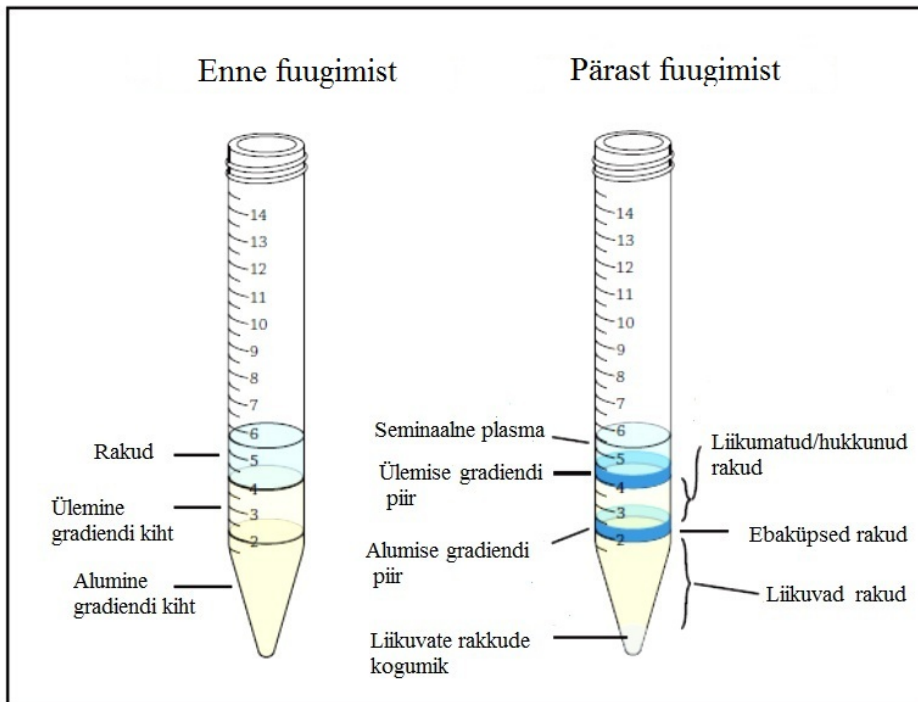
Värsket spermat pärines Eesti Maaülikooli veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituudi laborist ning samal päeval kui sperma Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia

laborisse toodi, valmistati sellest fikseeritud rakkudega klaasid. Rakkude mikroskoobiklaasile fikseerimiseks kasutati inimese spermide jaoks mõeldud FISH protokoll (Sarrate ja Anton, 2009) järgmiste muudatustega. Spermast tehti lahendus selliselt, et fikseerimise etapi alguseks oleks 1 ml-is sperma pesulahuses ligikaudu 100 miljonit rakku. 1 ml lahendust pipeteeriti 15 ml tuubi, milles oli 3 ml sperma pesulahust. Seejärel fuugiti rakud 1000g ja 20 °C juures 5 minutit. Fuugimise järgselt eemaldati supernatant kuni rakkudeni ning segati kergelt vorteksil ning seejärel lisati tilkhaaval eelsoojendatud 0,075 M KCl (edasi vt. külmutatud sperma klaasile fikseerimine punkt 4).

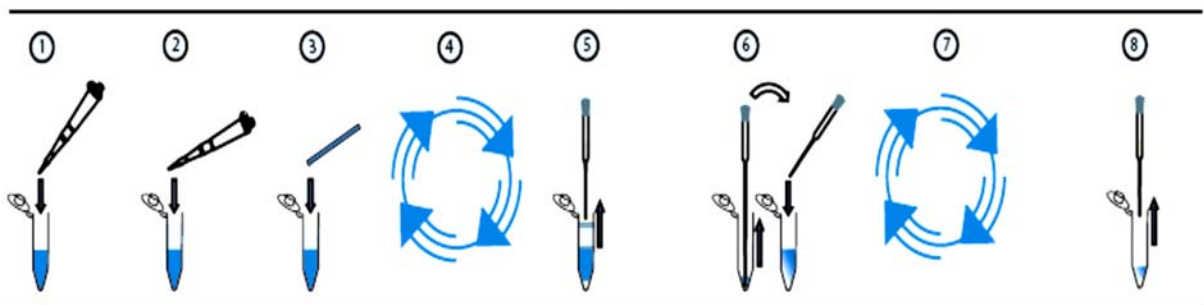
### **Külmutatud sperma klaasile fikseerimine**

Külmutatud spermat sisaldavad kõrred pärinesid Eesti Maaülikooli veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituudi laborist ning neid hoiti enne kasutamist Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudis vedelas lämmastikus. Külmutatud spermaga kõrsi oli kokku 10 paari, millest iga paari moodustas üks selekteerimata spermaga ja üks selekteeritud spermaga kõrs. Katses kasutatud kõrte täpsed andmed on esitatud lisa (lisa 3). Külmutatud spermatoosoidide kõrrest kättesaamiseks kasutati tihedusgradiendi meetodit (joonis 8 ja 9). Tihedusgradiendi tegemisel jälgiti BoviPure protokoll (Nidacon) mõne muudatusega.

1. Kõrrest suurema osa rakkude kättesaamiseks pipeteeriti lisaks 200 µl BoviWash lahust (Nidacon).
2. Pärast viimast tsentrifuugimist BoviPure protokoll järgi, eemaldati rakkudelt SpermWash lahus kuni rakusademeni. Rakkude fikseerimiseks klaasile kasutati Sarrate ja Anton 2009. aastal avaldatud protokoll mõnede muudatustega.
3. Allesjäänud lahus segati vorteksil ja selle käigus lisati tilkhaaval eelsoojendatud hüpotoonilist 0,075 M KCl-i ning hoiti 37 °C juures vesivannil 30 minutit.



**Joonis 8.** Rakkude paiknemine tihedusgradiendis enne ja pärast fuugimist. (Nidaconi protokoll Density gradient järgi).



**Joonis 9.** Tihedusgradiendi meetod. Tihedusgradiendi valmistamine (1-2), kõrrest rakkude eraldamine (3) kuni puhastatud rakkudeni (4-8). (Nidaconi protokoll BoviPure järgi).

4. Fuugiti 5 minutit 1000 g 20 °C juures. Pärast fuugimist eemaldati supernatant kuni sademeni. Sade lahustati vorteksil segades ning tilkhaaval fiksaatorit. Protseduuri korrati 4 korda kuni saadi valge sade. Pärast viimast fuugimist eemaldati supernatant sademeni ja segati.

5.  $-20^{\circ}\text{C}$  juurest võeti klaasid ning hoiti toatemperatuuril enne kui neile tilgutati 3-4 tilka rakkudega lahust. Pärast lahuse kuivamist vaadeldi klaase valgusmikroskoobiga, kasutades 10x objektiivi, et hinnata rakkude tihedust ja jaotumist üksteise suhtes. Sobiva tihedusega lahust kasutati kohe fikseeritud klaaside valmistamiseks. Liiga tiheda lahuse korral lahjendati lahust fiksaatoriga. Fikseeritud klaasid kuivatati toatemperatuuril tõmbekapi all ja hoiti  $-20^{\circ}\text{C}$  juures kuni kasutamiseni.

#### **4.4 Katsed**

##### **Fluorestsents *in situ* hübriidisatsiooni protokoll otsese ja kaudse märgistamise jaoks**

Otsese ja kaudse märgistamise jaoks kasutati erinevaid fluorestsents *in situ* hübriidisatsiooni protokolle. Mõlema märgistamise meetodi puhul jälgiti algul Habermann *et al.*, 2005 protokollide mõnede muutustega, kuid kaudse märgistamise puhul lisandus veel lisaprotokoll (Sohn *et al.*, 2007).

1. Enne katse algust võeti fikseeritud rakkudega klaasid  $-20^{\circ}\text{C}$  juurest toatemperatuurile ning rakkudega ala märgistati vastasküljelt teemantpliiatsiga.
2. Preparaate töödeldi 3 min 3 M NaOH'ga. Selleks pipeteeriti umbes 500-700  $\mu\text{l}$  3M NaOH'd teemantpliiatsiga märgistatud piirkonnale ning kaeti katteklaasiga (24x60 mm, Menzel-Glaser).
3. Pärast alusega töötlemist kasteti preparaate nelja järjestikusesse Coplini kannu, milles oli ddH<sub>2</sub>O.
4. Preparaatide veetustamine toimus tõusva kontsentratsiooniga etanooli reas 70%, 85% ja 96%.
5. Igas lahuses hoiti preparaate 2 minutit ning seejärel kuivatati kasutades gaasilist lämmastikku.
6. Proovide lahustamiseks kasutati hübriidisatsioonipuhvrit, mida hoiti enne kasutamist  $37^{\circ}\text{C}$  juures 5 minutit. Iga märgistatud proov lahustati 10  $\mu\text{l}$  hübriidisatsioonipuhvris (50% formamiid; 1x SSC; 10% dekstraansulfaat) ning denatureeriti  $80^{\circ}\text{C}$  juures 5 minutit. Denatureeritud proovilahust hoiti jääl enne preparaadile pipeteerimist.
7. Preparaadile pipeteeritud proov kaeti 22 x 22 mm katteklaasiga ning ääred suleti kummiliimiga.

8. Preparaadid asetati kaanega termoplokile, kuhu oli niiske keskkonna loomiseks lisatud ddH<sub>2</sub>O. Hübridisatsioon viidi läbi 37<sup>0</sup>C juures üleöö (tavaliselt kasutati hübridiseerimiseks 16 tundi).

9. Järelepsuks kasutati 0,1 x SSC lahust, mida kuumutati enne kasutamist 62<sup>0</sup>C juures. Preparaate hoiti 2 x 5 min 0,1 x SSC lahuses 62<sup>0</sup>C juures ning kuivatati seejärel gaasilise lämmastikuga.\*

10. Pärast järelepsu värviti rakud tuumade visualiseerimiseks DAPI (4,6 – diamidino - 2-fenüülindool, Sigma Aldrich) lahusega 1:1000 30% PBS'is ja seejärel vaadeldi preparaate fluorestsentsmikroskoobiga.

\* kaudse meetodi jaoks kasutati enne DAPI'ga värvimist lisaprotokoll. Selleks jälgiti Sohn *et al.*, 2007. Aastal avaldatud artikli protokoll mõne muudatusega. Kaudse meetodi jaoks kasutati PN puhvrit, mida hoiti enne kasutamist toatemperatuuril. Proovi valmistamise jaoks kasutati 1 µl anti-dig-FITC'i ja 99 µl PN puhvrit.

- Pärast järelepsu ja klaaside kuivatamist pesti klaase PN puhvris 2 minutit toatemperatuuril.
- Pärast pesu kuivatati klaase õhu käes umbes 10 minutit.
- Katseklaasile kanti 50 µl proovi (anti-DIG-FITC PN puhvris) ning kaeti katteklaasiga (24x60 mm, Menzel-Glaser) ja hoiti 30 minutit 37 °C juures termoplokil.
- Hübridisatsioonile järgnes pesu PN puhvriga 2 min.
- Klaasid kuivatati kasutades gaasilist lämmastikku.

### **FISH järelepsu tingimuste optimeerimine oligoproovide jaoks**

Oligoprooviga FISH eksperimendi jaoks kasutati Habermanni protokoll, kuid optimeeriti järelepsu tingimusi. Kirjanduse andmetel võivad märgistatud proovid hübridiseeruda mittespetsiifilistele järjestustele, mis on osaliselt homoloogsed proovi järjestusega. Üheks võimaluseks, kuidas eemaldada mittetäielikult hübridiseeruvaid proove, on varieerida järelepsu tingimusi. Järelepsu tingimusi saab varieerida muutes 1) formamiidi ja soolade kontsentratsiooni ja 2) temperatuuri. Mida madalam on soolade kontsentratsioon ja mida

kõrgem on järelepsu temperatuur, seda paremini eemaldatakse ebaspetsiifiline hübriidiseerumine. Kõige paremate tingimuste leidmiseks võrreldi järgmiseid järelepsu tingimusi: 1) erinevaid temperatuure ja 2) SSC kontsentratsiooni mõju oligoproovide hübriidiseerumisele. Võrreldi erinevaid temperatuure 62°C, 50°C, 42°C 0,1 x SSC kontsentratsiooni juures ja seejärel SSC kontsentratsioone (1M ja 2M ) 50°C juures.

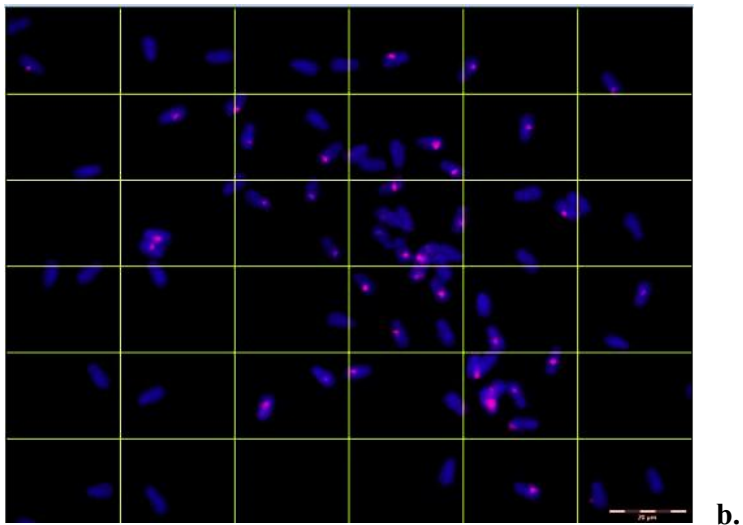
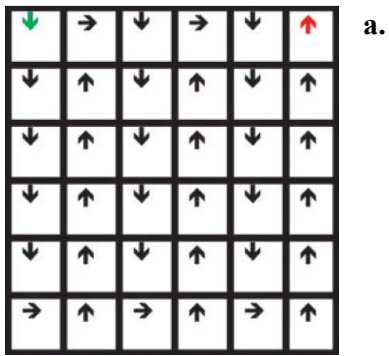
### **Pulli spermide analüüs fluorestsents mikroskoobiga**

Kõiki käesolevas töös analüüsitud rakke vaadeldi mikroskoobiga Nikon Eclipse TS100 ja pildistati sellele kinnitatud kaameraga Nikon DS-Fi2. Rakus olevate märgiste fluorestsentsi jälgimiseks vaadeldi preparaate Cy3/Cy5 filtritega ning 100x objektiiviga. Kujutiste salvestamiseks kasutati Olympus DP71 kaamerat ja tootjapoolset arvutitarkvara. Piltide järeltöötlemiseks kasutati PowerPoint tarkvara.

### **Sorteeritud ja sorteerimata sperma statistiline analüüs**

Suguselektsiooni kordusanalüüsiks kasutatud spermakõrred pärinesid Eesti Maaülikooli laborist. Kokku analüüsiti 3 paari spermakõrsi. Ühe spermakõrre paari moodustas 1 suguselekteeritud spermaga kõrs ja 1 suguselekteerimata spermag kõrs. Sorteeritud ja sorteerimata sperma analüüsimiseks kasutati Y-kromosoomi spetsiifilisi proove. Ühe spermakõrre paari analüüsimiseks FISH meetodiga kulus kolm päeva. 1) esimesel päeval valmistati külmutatud spermast fikseeritud rakkudega klaasid, mis seisis üleöö -20°C juures. 2) Teisel päeval tehti fikseeritud rakkudele FISH eksperiment ning hübriidiseeriti 17 tundi. 3) Kolmandal päeval lõpetati FISH eksperiment ning vaadeldi preparaate fluorestsentsmikroskoobiga.

Rakkude loendamiseks pildistati fluorestsentsmikroskoobiga vähemalt 10 pilti 22x22 mm suuruselt alalt. Kokku loeti vähemalt 200 raku iga katse kohta. Ülekattuvad ja pildi äärealadel olevaid spermid jäeti lugemata. Salvestatud rakupiltide analüüsimiseks kasutati 2011. aastal Bologna-Molina *et al.*, poolt avaldatud artiklit. Piltidel olevate rakkude loendamiseks kasutati võrgustikku, mille sai powerpoint tarkvara kasutades uuritava pildi peale panna (joonis 10a).



**Joonis 10.** Rakkude loendamise. a) rakkude loendamise suund (Ronell Bologna-Molina *et al.*, 2011 järgi) ja b) näide fluorestsentsmikroskoobiga tehtud pildi abil rakkude loendamisest. Mõõtkava 20  $\mu\text{m}$ .

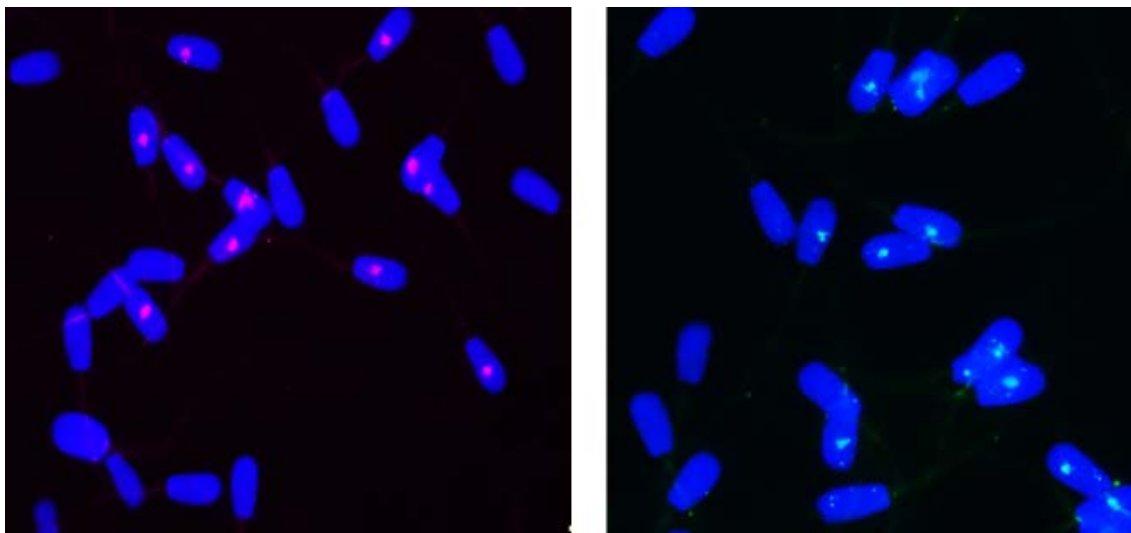
Saadud tulemuste analüüsimiseks kasutati binoomtesti, et kontrollida hüpoteese, et sorteerimata ja sorteeritud spermides on X- ja Y-kromosoomide võrdsel hulgal ning et vähemalt pooltes spermides on Y-kromosoom. Statistiliseks andmetötluseks kasutati R'i versiooni 3.0.2.

## 5. TULEMUSED

### 5.1 FISH protokoll ja märkimise optimeerimine

#### FISH kasutades otset ja kaudset märgistamist

Käesoleva töö alguses uuriti, kas otsene märgistamine võimaldab sama efektiivselt FISH'i läbi viia kui kaudne märgistamine. Katse jaoks kasutati mõlemal juhul 510 bp pikkust Y-kromosoomi proovi kogusega 250 ng. Kaudse märgistamise puhul oli proov märgistatud FITC'ga ning otsese märgistamise puhul Cy3'ga (joonis 11). Katse tulemus aga näitas, et ei esine erinevust kahe märgistamise meetodi vahel kasutades sama hübridiseerimise aega, sest nii otsese kui kaudse märgistamise puhul andsid katsed ühetaolise tulemuse.



a)

b)

**Joonis 11.** Otsene ja kaudne märgistamine. a) otsene märgistamine kasutades proovi, mis on märgistatud Cy3'ga. Spermide tuumad on värvitud DAPI'ga. b) kaudne märgistamine biotiiniga ja antikehaga, mis on märgistatud FITC'iga (roheline). Spermide tuumad on värvitud DAPI'ga (sinine).

#### Fluorestsents *in situ* protokollide optimeerimine

Iga spermide FISH protokollide puhul on üks olulisemaid etappe spermide tuumas tihedalt pakitud DNA denatureerimine. Selleks, et uurida, millist mõju avaldab denatureerimise aeg

proovide seondumisele, tegime katse kasutades erinevaid ajaintervalle 3M NaOH'ga spermi tuuma töötlemiseks.

**Tabel 4.** Katses kasutatud erinevad dekontensatsiooni- ja denaturatsiooniajad.

<b>3M NaOH ajakatse</b>	<b>1 minut</b>	<b>3 minutit</b>	<b>5 minutit</b>	<b>7 minutit</b>
<b>Tulemus</b>	-	+	+	-

+ spermi tuuma piisav 3M NaOH'ga töötlemise aeg, selleks, et saada tugevalt eristuvaid signaale.

- proov ei seondunud korralikult oma sihtmärkpiirkonnale ning signaalid olid hajusad. Ebapiisav 3M NaOH'ga töötlemise aeg.

Kõige parema tulemuse andis spermi tuuma töötlemine 3M NaOH'ga 3...7 minutit. Lisaks optimeeriti ka hübriidiseerimise tingimusi.

**Tabel 5.** Katses kasutatud erinevad hübriidiseerimisaegad.

<b>Hübriidiseerimise aeg</b>	<b>1 tundi</b>	<b>4 tundi</b>	<b>16 tundi</b>
<b>Tulemus</b>	+/-	+	+

+ proovide seondumise jaoks piisav hübriidiseerimise aeg.

- proovide seondumise jaoks ebapiisav hübriidiseerimise aeg.

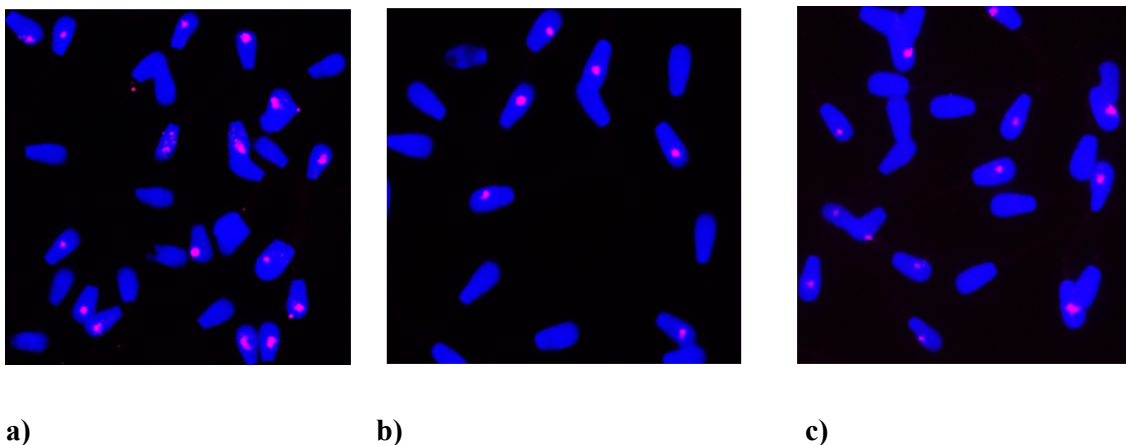
Habermann *et al.*, (2005) kasutas proovide hübriidiseerimiseks 1 tunni ning seda õnnestus ka meil oma katsetega korrata. Meie katsetulemused näitasid, et nii 1 tunni kui ka 16 tunniga on võimalik proove kromosoomidele hübriidiseerida, kuid kõige parema tulemuse annab 16 tunni pikkune hübriidiseerimine. 16 tunnise hübriidiseerimise puhul olid signaalid mikroskoobiga detekteerides teravamad kui 1 tunnise hübriidiseerimise korral.

## **5.2 Kromosoomi proovide katsetamine**

### **FISH pikkade Y-kromosoomi proovidega**

Proovide valmistamist alustati Y-kromosoomi proovist, milleks oli 510 bp pikkune Y-kromosoomi vastavale piirkonnale spetsiifiline järjestus. Seejärel vähendati järk-järgult proovi pikkust. Lõppeesmärgiks oli valmistada oligoproov, mis seonduks Y-kromosoomi spetsiifilisele piirkonnale. 510 bp pikkune Y-kromosoomi proov seonduks spetsiifiliselt oma

sihtmärkpiirkonnale ning andis tugeva signaali (joonis 12 a). Ka lühemad ~250 bp proovid seonduvad hästi oma sihtmärkjärjestusele (joonis 12 b ja c). Kontrollkatsed, mille eesmärgiks oli võrrelda pikkade ja lühikeste proovide seonduvat, näitasid, et seonduvatulemus pikkade ja lühikeste proovide vahel ei erine. Lisaks on õnnestunud ka esialgsed katsed 243 bp prooviga, mis on märgistatud Cy5'ga.



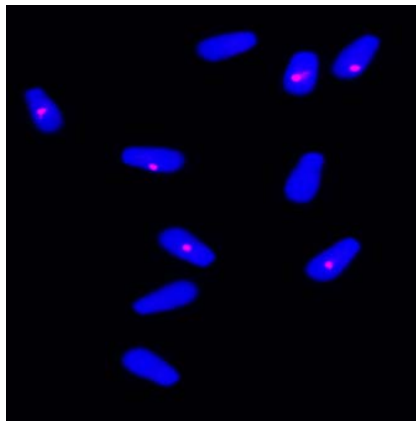
**Joonis 12.** Y-kromosoomi proovid, mis on märgistatud Cy3'ga (roosa) ja spermide tuumad on värvitud DAPI'ga (sinine). a) 510 bp pikkune proov; b) 243 bp pikkune proov; c) 267 bp pikkune proov.

### FISH oligoproovidega

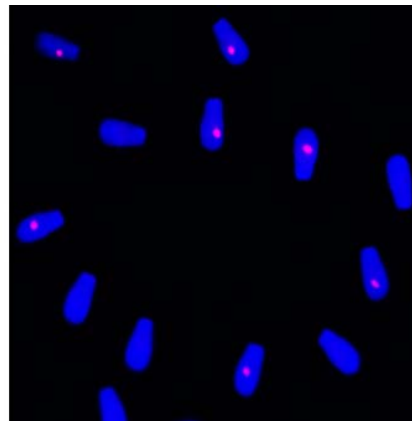
Oligoproovidega FISH eksperimendi jaoks kasutati Habermanni protokoll, kuid optimeeriti järelpesu tingimusi. Kuna oligoproovid on lühemad, siis nad ei vaja nii tugevaid järelpesu tingimusi kui pikad Y-kromosoomi proovid.

- Võrreldi erinevaid temperatuure 62 °C, 50 °C, 42 °C 0,1 x SSC kontsentratsiooni juures ja seejärel SSC kontsentratsioone (1M ja 2M ) 50 °C juures. Kõige parema tulemuse andis 1 x SSC ja 50 °C
- Oligoproove kasutati nii külmutatud spermast kui ka värskest spermast fikseeritud rakkude märgistamiseks. Katsete tulemused näitasid, et oligoproovid sobivad mõlema nii külmutatud sperma kui ka värske sperma märgistamiseks.

- Lisaks uuriti, kas esineb erinevus fluorestsentsi intensiivsuses kui märgistada Y-kromosoomi oligoproovidega ja sama pika kaheaahelalise prooviga. Enne eksperimendi läbiviimist püstitati hüpotees, et pikemat kaheaahelalist 243 bp pikkust nukleiinhappeproovi on lihtsam mikroskoobis detekteerida võrreldes oligoprooviga, sest pikema järjestusega proovi fluorestsentsiintensiivsus on suurem tänu suuremale hulgale märgistele, mis on pikale ahelale seondunud. Meie katse aga näitas, et kui kasutada oligoproovi ja pikka kaheaahelalist proovi, siis fluorestsents mikroskoobiga detekteerides ei esine proovide vahel erinevust.
- Uuriti ka erinevaid oligoproovide kombinatsioone. Katsetamist alustati 12 oligost koosneva prooviga. Proov seondus korralikult oma sihtmärkpiirkannale ning signaal oli piisavalt tugev, et seda mikroskoobiga detekteerida (joonis 13a). Hetkel on katsetamise järgus ka kuue oligoga proov. Esialgne katse kuue oligoga prooviga õnnestus, sest ka see proov seondus oma sihtmärkpiirkannale (joonis 13b).



a)



b)

**Joonis 13.** Y-kromosoomile seonduvad oligoproovid, mis on märgistatud Cy3'ga ja spermide tuumad on värvitud DAPI'ga (sinine). a) 12 üheaahelalisest oligost koosnev proov. b) 6 oligost koosnev proov.

### **FISH X- kromosoomi prooviga**

Eksperimendi jaoks kasutati nii üksikuid X-kromosoomi proove kogusega 1 µg kui ka erinevaid proovide segusid, kuid kummalgi juhul ei õnnestunud FISH abil X-kromosoomi märgistada.

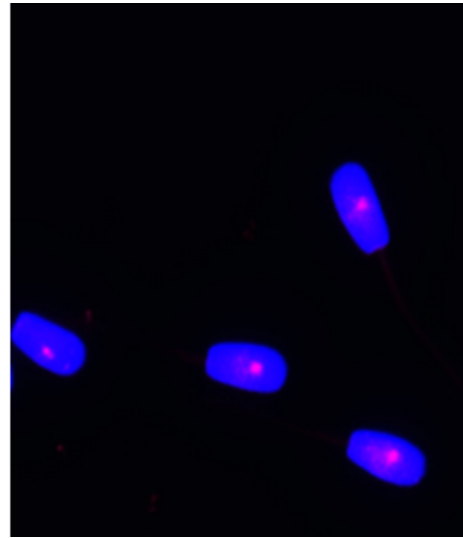
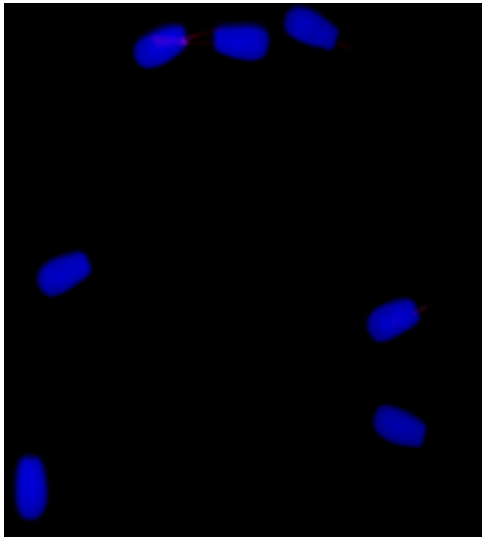
### **FISH autosoomi prooviga**

6. kromosoomi piirkonna märgistamise jaoks valmistati 3 erineva nukleiinhappejärjesega proovi. Katsetes kasutati 1) kolme üksikut proovi eraldi ja 2) kõiki kolme proovi koos. Üksikute proovide hübriidiseerimine tulemust ei andnud nagu ka kolme proovi segu kasutamine. Üksikute proovide kogus, mida katsetes kasutati oli 1 µg.

## **5.3. Eesti Maaülikooli spermakõrred**

### **Selekteeritud sperma kordusanalüüs FISH meetodiga**

Selekteeritud spermaga kõrsi analüüsiti koos selekteerimata kõrtega. Kokku analüüsiti 5 pulli selekteeritud ja selekteerimata spermat. Kasutatud kõrte andmed on välja toodud lisa 3. Selleks, et veenduda nii meie meetodi efektiivsuses kui ka Y-kromosoomi proovi spetsiifilisuses, analüüsiti külmutatud spermat, mis oli selekteeritud 1) X-kromosoomide järgi ja 2) Y-kromosoomide järgi (joonis 14). Tulemused näitasid, et Y-kromosoomi proov seondub spetsiifiliselt oma sihtmärkpiirkonnale Y-kromosoomil (joonis 14 b) ning ei seonu X-kromosoomi sisaldavatele spermidele (joonis 14 a).



a)

b)

**Joonis 14.** Suguselekteeritud kõrte analüüs. a) X-kromosoomi suhtes rikastatud suguselekteeritud kõrs. b) Y-kromosoomi suhtes rikastatud suguselekteeritud kõrs. Y-kromosoom on märgistatud 243 bp pikkuse prooviga, mille küljes on Cy3 märgis (roosa). Spermide tuumad on värvitud DAPI'ga (sinine).

Järgnevalt on ära toodud 3 suguselekteeritud ja 3 suguselekteerimata sperma katsetulemused:

**Tabel 3.** Selekteeritud ja selekteerimata sperma analüüs

PROOV	Rakud kokku	29, Y	29, X	29, Y %	29, X %
<b>suguselekteeritud</b>					
ILAN	683	368	315	54%	46%
LEGRO	725	379	346	52%	48%
GOLD	417	196	221	47%	53%
LEGRO	425	224	201	53%	47%
ESAR	520	247	273	47%	53%
<b>suguselekteerimata</b>					
ILAN	1054	597	458	57%	43%
LEGRO	455	238	217	52%	48%
GOLD	635	340	295	54%	45%
LEGRO	603	318	285	53%	47%
ESAR	396	168	228	42%	58%

Statistilise analüüsi läbiviimiseks kasutati p väärtust  $\alpha=0,05$ .

Katsetulemused näitasid, et sperma suguselekteerimine Eesti Maaülikoolis kasutatud meetodiga ei olnud õnnestunud, sest suguselekteeritud sperma analüüsi tulemused ühtisid suguselekteerimata sperma analüüsi tulemustega.

Statistilise andmeanalüüsi jaoks kontrollisin hüpoteesi, kas suguselekteerimata spermas on kromosoomide suhe ikka 1:1.

Nullhüpotees: suguselekteerimata spermas on X- ja Y-kromosoomide võrdsel hulgal ehk vähemalt pooled spermidest kannavad Y-kromosoomi.

H0: Y-kromosoomiga spermide esinemise tõenäosus = 1/2

H1: Y-kromosoomiga spermide esinemise tõenäosus  $\neq$  1/2

Selleks, et esitatud hüpoteesi kontrollida, leidsin iga suguselekteerimata kõrre jaoks vastavad p-väärtused ning tõenäosuse antud sündmuse toimumiseks. Kui p-väärtus (olulisustõenäosus) jäi 95%- usaldusintervalli juures väiksemaks kui  $\alpha=0,05$ , siis võtsin vastu alternatiivse hüpoteesi ja väitsin, et suguselekteerimata spermas ei ole X- ja Y-kromosoomide suhe 1:1.

Kuna tegemist on väikese valimiga (5 spermakõrt) ning uuritava tunnuse jaotus ei ole normaaljaotusega, siis kasutan t-testi asemel binom.test'i.

Kasutan valemit:

```
> binom.test(c(nsuccesses, nfailures), p)
```

nsuccess – tähistab „õnnestunud sündmuste arvu“, nfailures – „mitte õnnestunud sündmuste arvu“ ja p - tõenäosust „õnnestunud sündmuse toimumiseks“.

Eeldan, et pooled spermidest sisaldavad X- ja pooled Y-kromosoomi. Sellest tulenevalt määrان Y-kromosoomi kui „õnnestunud sündmuse“ esinemise tõenäosuseks 1/2.

Järgnevalt leian p-väärtused ja Y-kromosoomi esinemise tõenäosused:

**1. ILAN:** p-väärtus = 2.096e-05 ja Y-kromosoomiga spermide esinemise tõenäosus vähemalt pooltel juhtudel on ~56,6%.

**2. LEGRO:** p-väärtus 0.3485; tõenäosus: 52,3%.

**3. GOLD:** p-väärtus = 0.08071; tõenäosus: 53,5%.

**4. LEGRO:** p-väärtus = 0.1925; tõenäosus: 52,7%.

**5. ESAR:** p-väärtus = 0.00298 ; tõenäosus: 42,4%.

Suguselekteeritud kõrte analüüsil oli peamiseks kitsaskohaks ühe prooviga suguselektsiooni analüüsi tegemine. Mõlema, nii suguselekteerimata kui suguselekteeritud sperma analüüsimise jaoks tehti FISH eksperiment. Kokku viidi läbi 6 eksperimenti. Kuna suguselekteeritud ja suguselekteerimata spermakõrte tulemused olid samasugused, siis tehti järeldus, et viga ei olnud meetodis ega proovis, vaid esialgses suguselekteerimise meetodis.

## ARUTELU

Soo järgi järglaste selekteerimine on pakkunud inimestele huvi juba aastaid, sest selle kasu nähakse mitmes igapäeva valdkonnas, nagu kariloomakasvatases, lemmikloomakasvatases, meditsiinis jne. Käesoleval hetkel on suguselektiooni kordusanalüüsiks võimalik kasutada nelja erinevat tehnoloogiat, milleks on läbivoolu tsütomeetria, PCR, FISH ning embrüo biopsia. Kolmest nimetatud meetodist kasutatakse hetkel kõige rohkem FISH meetodit ja PCR'i (Flaherty *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2011), sest kordusanalüüs läbivoolu tsütomeetriga on kulukas ning kasutada tuleks uuesti sama tehnoloogiat. Selline meetodite varieerimine aitab vähendada vigade tekkimise võimalust.

Üheks sagedasti kasutatud meetodiks suguselektiooni järelkontrolli jaoks on FISH tehnoloogia. Hübridisatsioonipõhiste meetodite idee seisneb selles, et teadaolevale DNA järjestusele on võimalik seondada sellega komplementaarne proov, mis aitab tuvastada spetsiifilisi piirkondi DNAs. Erineva pikkusega komplementaarseid proove kasutades on võimalik teha esialgsele suguselekteerimisele kordusanalüüs. Hübridisatsiooniks on võimalik kasutada nii komplementaarseid sünteetilisi oligonukleotiide kui ka PCRi abil valmistatud pikemaid proove, mis on sageli märgistatud näiteks fluorestseeruvate värvidega.

Oma katsetes kasutasime pulli sperma suguselektiooni analüüsiks Habermann *et al.*, 2005 artiklis välja toodud kromosoomide spetsiifilisi järjestusi ning hübridisatsioonipõhist meetodit, mida modifitseerisime vastavalt katse eesmärkidele. Peamine erinevus meie meetodi ja Habermanni artiklis avaldatud meetodi vahel seisnes selles, et kasutasime kõigi kromosoomi proovide märgistamiseks kaudse märgistamise meetodit, sisestades PCR-i reaktsiooni käigus aminoallüülmodifikatsiooniga nukleotiidid, millele oli võimalik PCR-i järgselt liita fluorestseeruv märgis. Habermanni artiklis aga kasutati kromosoomi proovide märgistamiseks nii otsest kui ka kaudset meetodit: Y-kromosoomi proovi märgistamise jaoks kasutati kaudset meetodit ning kuuenda kromosoomi proovi märgistamise jaoks kasutati otsest märgistamist.

FISH meetodi jaoks on võimalik kasutada proove, mis on märgistatud kas kaudse või otsese meetodi abil. Mõlemal meetodil on omad eelised ja puudused, kuid kiire FISH eksperimendi jaoks sobivad eelkõige meie poolt kasutatud märgistamise abil valmistatud proovid. Peamine eelis on see, et proove on võimalik kohe pärast hübridiseerimist

fluorestsents mikroskoobiga vaadelda. Selleks, et võrrelda otsest märgistamist kaudse märgistamisega, tegime FISH eksperimendi, milles kasutasime samaaegselt nii otse kui ka kaudse meetodi abil valmistatud proove. Katsetulemuste visuaalsel hindamisel ei olnud märgata erinevusi kahe katse tulemuse vahel. Esialgsete katsetulemuste põhjal võib oletada, et otsene märgistamine on sama spetsiifiline kui kaudne märgistamine ning sellepärast kasutasime edaspidi FISH eksperimentide jaoks lihtsamat protokoll.

Iga spermi FISH protokollil on üks olulisemaid etappe spermi tuumas tihedalt pakitud DNA denatureerimine. Mida efektiivsem on DNA denatureerimine, seda paremini seondub fluorestsents märgisega proov oma sihtmärkpiirkonnaga. Selleks, et uurida, millist mõju avaldab denatureerimise aeg proovide seondumisele, tegime katse kasutades erinevaid ajaintervalle 3M NaOH'ga spermi tuuma töötlemiseks. Dekondensatsiooni- ja denaturatsiooniaeg 3M NaOH'ga varieerus 1 minutist kuni 10 minutini. Kõige parema tulemuse andis 3...7 min 3M NaOH'ga töötlemine. Kirjanduse andmetel sõltub spermi tuuma NaOH'ga töötlemise aeg preparaadi vanusest: mida vanem preparaat, seda kauem on vaja seda NaOH'ga töödelda (Pellestor, 2006).

Lisaks sellele optimeeriti ka hübriidiseerimise tingimusi. Optimeerimiseks kasutatav hübriidiseerimise aeg varieerus 1 tunnist kuni 16 tunnini. Kirjanduse põhjal on kasutatav hübriidiseerimise aeg väga varieeruv alates 1 tunnist kuni üleöö. Habermann *et. al.*, (2005) õnnestus proovid hübriidiseerida 1 tunniga ning seda õnnestus ka meil oma katsetega korrata. Kuigi nii 1 tunni kui ka 16 tunniga oli võimalik proove kromosoomidele hübriidiseerida, siis kõige parema tulemuse andis 16 tunni pikkune hübriidiseerimine, sest selle puhul olid signaalid mikroskoobiga detekteerides teravamad kui 1 tunnise hübriidiseerimise korral.

Üha enam eelistatakse suguselektsiooni kordusanalüüsiks sellist FISH tehnoloogiat, mis oleks kiire ja odav (Banerjee *et al.*, 1998). Üks võimalus sellise tehnoloogia arendamiseks oleks kasutada FISH eksperimentides pikkade nukleiinhappeproovide asemel oligonukleotiidseid proove. Proovide pikkus mõjutab hübriidiseerimise intensiivsust ja hübriidiseerimiseks kuluvat aega. Pikemad proovid seonduvad sihtmärkpiirkonnaga tugevamalt, kuid nende hübriidiseerimiseks kuluv aeg on pikem võrreldes lühikeste proovidega. Põhjus, miks pikemad proovid seonduvad tugevamalt seisneb selles, et nukleiinhapped moodustavad üksteisega seonduvaid vesiniksidemeid ning mida pikem on

proov, seda rohkem vesiniksidemeid tekib ja seda tugevama jõuga on komplementaarsed järjestused üksteisega seotud. Oligonukleotiidproovidel on mitmeid eeliseid pikemate nukleiinhappeproovide ees: 1) oligoproovid on spetsiifilisemad, mistõttu väheneb võimalus ebaspetsiifilise seondumise tekkimiseks; 2) oligoproovid on lühikesed, mistõttu on neid lihtsam rakkudesse viia ning 3) proovide hübridisatsiooniks vajaminev aeg lüheneb, mistõttu saab kiiremini läbi viia korduskatseid (vt. tabel 2).

Ka käesoleva lõputöö üheks eesmärgiks oli välja töötada proovid, mis oleksid lühikesed ja mida oleks võimalik kiirelt ja lihtsalt kasutada esialgse suguselekteerimise järelkontrolli tegemiseks. Erineva pikkusega Y-kromosoomi proovide võrdlemisel selgus, et nii pikad proovid kui ka oligonukleotiidproovid sobivad hästi FISH eksperimendi läbi viimiseks. Oligonukleotiidproovid vajavad aga teistsuguseid hübridiseerimise ja järelepsu tingimusi võrreldes pikema järjestusega proovidega kuna nad on lühikesed, seonduvad nõrgemalt oma sihtmärkjärjestusega ning võivad liialt kõrge temperatuuri ja madala soola kontsentratsiooni juures oma sihtmärkjärjestustelt lahti tulla. Oma katsetes oligonukleotiidproovidega optimeerisime ainult järelepsuks vajalikke tingimusi. Madaldasime järelepsuks kasutatavat temperatuuri ning tõstisime soola kontsentratsiooni. Kui edaspidi õnnestuks välja töötada lühikese hübridiseerimisajaga oligonukleotiidproovide FISH meetod, siis see võimaldaks kiiremini läbi viia suguselektsiooni kordusanalüüsi. Seoses sellega võiks tulevikus katsetada veel erinevaid kombinatsioone lühikestest oligonukleotiid järjestustest, et leida kõige parem järjestuste segu, millega märgistada Y-kromosoom. Lõppeesmärgiks oleks kasutada suguselektsiooniks 1-2 oligonukleotiidjärjestusest koosnevat Y-kromosoomi proovi.

Käesoleva töö üheks eesmärgiks oli leida X-kromosoomile seonduv spetsiifiline järjestus. Ka X-kromosoomiga töötamiseks püstitati samad eesmärgid, kuid erinevalt Y-kromosoomi proovist ei õnnestunud X-kromosoomi proove X-kromosoomile hübridiseerida. Põhjused, miks X-kromosoomiga katsed välja ei tulnud võivad seisneda selles, et X-kromosoom on tihedamalt protamiinidega pakitud kui Y-kromosoom (Vilfan *et al.*, 2004) ning Y-kromosoomis on palju rohkem kordusjärjestusi võrreldes X-kromosoomiga. Kirjanduse põhjal on Y-kromosoom küll palju väiksem võrreldes X-kromosoomiga, kuid võrreldes X-kromosoomiga on Y-kromosoomis palju rohkem kordusjärjestusi, mis tähendab, et Y-kromosoomi märgistamisel fluorestseeruva märgisega prooviga hakkab Y-kromosoom heledalt fluorestseeruma (Sort ja Balaban, 1994).

Kui FISH'i suguselekteerimise eksperimentides kasutatakse ainult ühte sugukromosoomi spetsiifilist proovi, siis võib alati tekkida küsimus, kas ühe sugukromosoomi märgistamine on piisav selleks, et selle põhjal teha üldistusi katse tulemuste kohta. Kui märgistatakse ainult ühte sugukromosoomi, siis peab tegema oletuse, et märgistamata rakkudes on 1) teine kromosoom või 2) hübriidsatsiooni tingimused ei olnud piisavad proovide seondumiseks. Sellepärast oleks eksperimendi täpsuse huvides vajalik kasutada vähemalt kahte kromosoomi proovi: kas kahte sugukromosoomi proovi või ühte sugukromosoomi proovi ja ühte autosoomi proovi. Kui FISH eksperimendis kasutatakse lisaks ühele sugukromosoomi proovile ka ühte autosoomi proovi, siis see aitab välistada võimaluse katsetulemuste valeks interpreteerimiseks. Kui näiteks autosoomi proov seondub oma sihtmärkpiirkonnale ja sugukromosoomi proov ei seonu, siis on tõenäoliselt viga seondumata jäänud sugukromosoomi proovis, mitte aga meetodis (Han *et al.*, 1993b).

Antud lõputöö teiseks eesmärgiks oli Eesti Maaülikoolist pärit suguselekteeritud spermale kordusanalüüsi tegemine. Sellise suguselekteerimise järelkontrolli läbiviimine võimaldas uurida, kuidas sobivad 1) meie poolt välja töötatud spermide fikseerimise ja FISH'i proovide hübriidiseerimise protokollid ning 2) meie meetodi abil valmistatud Y-kromosoomi spetsiifiline proov suguselektsiooni kordusanalüüsiks. Lisaks erinevate proovipikkuste katsetamisele uuriti ka, kuidas sobib FISH protokoll suguselektsiooni järelkontrolli jaoks. Kordusanalüüside tulemused viitasid sellele, et esialgne suguselekteerimine Eesti Maaülikoolis kasutatud meetodiga, ei olnud sperme sorteerinud, sest suguselekteeritud sperma tulemused ühtisid suguselekteerimata sperma tulemustega. Kuigi antud katses kasutati külmutatud sperma analüüsimiseks ühte sugukromosoomi proovi, siis katse tulemuste analüüsimine toetas oletust, et ka ühe spetsiifilise sugukromosoomiprooviga on võimalik läbi viia suguselektsiooni järelkontrolli. Edasised plaanid seoses kahevärvi FISH meetodiga oleksid järgmised: 1) leida X-kromosoomi spetsiifiline järjestus, mis sobiks X-kromosoomi märgistamiseks ja 2) töötada välja kuuenda kromosoomi proovi hübriidiseerimiseks sobiv FISH protokoll, et oleks võimalik kasutada samaaegselt nii ühte sugukromosoomi proovi kui ka ühte autosoomi proovi ning selle abil tõsta kordusanalüüsi usaldusväärsust.

Tänapäeval tehakse üha rohkem eksperimente elusrakkudega. Elusrakkudega töötamisel on kasulik kasutada lühema järjestusega proove. Lühikese järjestusega proovid on kasutlikud

näiteks siis kui tahetakse kasutada rakku sisenevaid peptiide, mille külge on seotud lühike komplementaarne järjestus uuritava piirkonna jaoks.

Seega oleks hübriidsatsioonil põhinevaid meetodeid võimalik elusrakkude puhul suguselekteerimiseks rakendada kasutades lühikesi rakku penetreeruvaid peptiide (CPPs, *cell penetrating peptiides*). Kui CPP-dega siduda spetsiifilised nukleiinhappejärjestused, siis on võimalik neid järjestusi viia peptiidide abil rakku, kus nad saavad seonduda komplementaaruse alusel uuritava kromosoomi piirkonnaga. Uuem suund on näiteks spetsiifiliste järjestuste sidumine nanopartiklite vahendusel CPP-dega, et selle abil nukleiinhappeid rakku viia (Reissmann, 2014).

Kõikidest antud lõputöö raames tehtud katsete tulemustest võib järeldada, et meil on olemas kiire, lihtne ja piisavalt täpne meetod esmase suguselektsiooni järelkontrolli tegemiseks. Meie proove on lihtne valmistada ja kasutada, sest nad on lühikesed ja spetsiifilised kindlale kromosoomi piirkonnale (kordusjärjestused), mistõttu ei ole vaja kasutada hübriidsiooni läbiviimiseks lisa DNA'd (näitkes genoomse DNA fragmentide segu või Cot-1 DNA-d), et suurendada proovi spetsiifilist seondumist. Katsed külmutatud spermaga näitasid, et see meetod on sobilik ka rutiinseks suguselekteeritud sperma järelkontrolli tegemiseks. Selleks aga, et olla kindel suguselektsiooni järelkontrolli õnnestumises, on siiski vaja lisaks ühele sugukromosoomi proovile ka teist sugukromosoomi proovi või vähemalt ühte autosoomi proovi.

## KOKKUVÕTE

Aastaid on täiustatud tehnoloogiaid, et läbi viia suunatud soovalikut, mis võimaldaks parandada kariloomade geneetilisi omadusi, säilitada haruldasi loomatõuge, suurendada järglaste hulka jne. Käesoleval hetkel on ainus efektiivne kariloomade soovaliku meetod läbivoolutsütomeetriga spermide selekteerimise tehnoloogia, mis sorteerib sperme kuni 90% täpsusega. Selleks aga, et olla kindel esmase sorteerimise täpsuses kasutatakse suguselekteerimise järelkontrolli meetodeid: PCR'i, FISH'i, kiiret kordusanalüüsi läbivoolutsütomeetriga ja embrüo biopsiat. Neljast analüüsimeetodist eelistatakse hetkel kõige rohkem FISH meetodit, sest 1) spetsiifiliste sugukromosoomide abil on võimalik ära määrata kindlad piirkonnad uuritavas kromosoomis ja 2) FISH meetod võimaldab korraga analüüsida suuri rakuhulki, mistõttu saab kiiresti ja lihtsalt teha analüüse suurele hulgale rakkudele.

Käesolevas töös uuriti võimalusi, kuidas on võimalik läbi viia suguselektsiooni järelkontrolli kasutades erineva pikkusega Y-kromosoomi proove. Katsetulemused näitasid, et erineva pikkusega Y-kromosoomi proovid ning oligonukleotiidproovid sobivad sperma suguselekteerimiseks. Katsetamisel on hetkel veel autosoomi proovid ja tulevikus on plaanis leida ka X-kromosoomi märgistamise jaoks spetsiifilised proovid.

Käesolevas töös analüüsiti pulli külmutatud suguselekteeritud ja suguselekteerimata spermat, kasutades selleks Y-kromosoomi spetsiifilisi proove. Katse tulemused näitasid, et ka ainult üks sugukromosoomi proov, antud juhul Y-kromosoomi spetsiifiline proov, sobib hästi selekteeritud sperma järelkontrolli tegemiseks. Antud töö põhjal võib järeldada, meil on olemas kiire, lihtne ning hinnalt soodne meetod, mille abil on edaspidi võimalik läbi viia efektiivne pulli sperma suguselektsiooni järelkontroll.

# Gender preselection reanalysis by FISH

## Summary

Triin Kitsemets

In many years numerous attempts have been made to preselect the sex of offspring in farm animals, because gender preselection has tremendous benefits in the livestock industry. Controlling sex ratio has got many advantages including: higher productivity and economic benefits. Dairy farmers can breed more heifers for milk production and beef cattle breeders more bulls for meat production.

Currently the only method for sexing mammalian spermatozoa with a high accuracy is the Beltsville sperm sexing technology. The method is based on the separation of X- and Y-bearing spermatozoa by their DNA amount difference (Seidel, 2007). This procedure is currently widely used for gender preselection in most livestock species. Although flow cytometry sorts sperms quite accurately, it's still important to monitor sexing quality before using sorted sperms for livestock breeding. Sex selection can be evaluated by FISH, quantitative PCR and sort reanalysis by flow cytometry. FISH is currently the method of choice for evaluating sex preselection because: 1) X- and Y-chromosomes can be identified accurately by using sex chromosome specific probes and 2) large numbers of sperms can be scored and analysed in a short period of time (Flaherty *et al.*, 1996).

This study shows that it is possible to evaluate sex preselection by 1) using short and simple FISH method and 2) by using only one sex chromosome specific probe. Our first objective was to find X- and Y-chromosome specific probes. Although we found only Y-chromosome specific probe we still managed to accurately analyse both unfrozen and frozen bovine semen by FISH method. Our future goals is to improve our method by 1) finding X-chromosome specific probe and also appropriate hybridisation conditions for autosome specific probes in order to use two-colour detection system for sperm selection; 2) to develop specific oligonucleotide sequences complementary to the specific repeatable DNA sequences in X- and Y-chromosomes. Oligoprobes can be used for gender preselection in live cells by binding those short oligonucleotide sequences to transport peptides, which will help to carry the cargo into the live cells so that oligonucleotides can bind to the specific regions on the chromosome.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Andersen, C. Y., Byskov, A. G. (1997). Enhanced separation of X and Y bearing sperm cells by a combined density gradient centrifugation evaluated by fluorescence in situ hybridization of the Y-chromosome. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 76(2):131-4.

Ali, J. I., Eldridge, F. E., Koo, G. C., Schanbacher, B. D. (1990). Enrichment of bovine X- and Y-chromosome-bearing sperm with monoclonal H-Y antibody-fluorescence-activated cell sorter. *Arch Androl.* 24(3):235-45.

Aquino de Muro, M. (2005). Probe Design, Production, and Applications. *Medical Biomethods Handbook.* pp 13-16.

Balo da Silva, C. M., Ortega Ferrusola, C., Morillo Rodriguez, A., Gallardo Bolaños, J. M., Plaza Dávila, M., Morrell, J. M., Rodriguez Martínez, H., Tapia, J. A., Aparicio, I. M., Peña, F. J. (2013). Sex sorting increases the permeability of the membrane of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 138(3-4):241-51.

Banerjee, S. K., Weston A. P., Persons, D. L., Campbell D. R. (1998). Quick-FISH: a rapid fluorescence in situ hybridization technique for molecular cytogenetic analysis. *Biotechniques.* 24(5):826-30.

Beydola, T., Sharma, R. K., Agarwal, A. (2013). Sperm Preparation and Selection Techniques. In book: Rizk, B. R. M. B., Aziz, N., Agarwal, A., Sabanegh, E. Jr. *Medical and Surgical Management of Male Infertility.* Jaypee Brothers Medical Publishing, News Delhi. London. Philadelphia. Panama.

Betteridge, K. J. (1984). The folklore of sexing. *Theriogenology.* 21, 3-6.

Bologna-Molina, R., Damián-Matsumura, P., Molina-Frechero, N. (2011). An easy cell counting method for immunohistochemistry that does not use an image analysis program. *Histopathology.* 59(4):801-3.

Brandriff, B. F., Gordon, L. A., Haendel, S., Singer, S., Moore, D. H., Gledhill, B. L. (1986). Sex chromosome ratios determined by karyotypic analysis in albumin isolated human sperm. *Fertil Steril.* 46:678-685

- Check, J. H., Kwirenk, D., Katsoff, D., Press, M., Breen, E., Baker, A. (1994). Male:female sex ratio in births resulting from IVF according to swim-up versus Percoll preparation of inseminated sperm. *Arch. Androl.* v.33, p.63-65.
- Check, M. L., Bollendorf, A., Check, J. H., Hourani, W., Long, R., McMonagle, K. (2000). Separation of sperm through a 12-layer percoll column decreases the percentage of sperm staining with quinacrine. *Arch Androl.* 44(1):47-50.
- Chen, C. M., Hu, C. L., Wang, C. H., Hung, C. M., Wu, H. K., Choo, K. B., Cheng, W. T. (1999). Gender determination in single bovine blastomeres by polymerase chain reaction amplification of sex-specific polymorphic fragments in the amelogenin gene. *Mol Reprod Dev.* 54(3):209-14.
- Cran, D. G., Johnson, L. A. (1996). The predetermination of embryonic sex using flow cytometrically separated X and Y spermatozoa. *Hum Reprod Update.* 2(4):355-63.
- Deech, R. (1998). Family Law and Genetics. In book: Brownsword, R., Cornish, W. R., Llewelyn, M.- Law and Human Genetics: Regulating a Revolution. Hart Publishing.
- De Graaf, S. P., Evans, G., Maxwell, W. M., Downing, J. A., O'Brien, J. K. (2007). Successful low dose insemination of flow cytometrically sorted ram spermatozoa in sheep. *Reprod Domest Anim.* 42(6):648-53.
- De Jonge, C. J., Flaherty, S. P., Barnes, A. M., Swann, N. J., Matthews, C. D. (1997). Failure of multitube sperm swim-up for sex preselection. *Fertil Steril.* 67(6):1109-14.
- Dirsch, O., Ji, Y., Bohr, J., Shen, K., Levison, D., Dahmen, U. (2007). Probe production for in situ hybridization by PCR and subsequent covalent labeling with fluorescent dyes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 15(3):332-7.
- Ericsson, R. J., Langevin, C. N., Nishino, M. (1973). Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature.* 246, 421-424.
- Espinosa-Cervantes, R., Córdova-Izquierdo, A. (2012). Sexing sperm of domestic animals. *Trop Anim Health Prod.* 45(1):1-8.

- Flaherty, S. P., Matthews, C. D. (1996). Application of modern molecular techniques to evaluate sperm sex selection methods. *Mol Hum Reprod.* 2(12):937-42.
- Flaherty, S. P., Michalowska, J., Swann, N. J., Dmowski, W. P., Matthews, C. D., Aitken, R. J. (1997). Albumin gradients do not enrich Y-bearing human spermatozoa. *Hum Reprod.* 12(5):938-42.
- Fugger, E. F., Black, S. H., Keyvanfar, K., Schulman, J. D. (1998). Births of normal daughters after Microsort sperm separation and intrauterine insemination, IVF or ICSI. *Hum. Reprod.* 13: 2367–2370.
- Gall, J. G., Pardue, M. L. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 63, 378–383.
- Goldberg, E. H., Boyse E. A., Bennett D., Scheid M., Carswell E. A. (1971). Serological demonstration of H-Y(male) antigen on mouse sperm. *Nature.* 232, 478-480.
- Habermann, F. A., Winter, A., Olsaker, I., Reichert, P., Fries, R. (2005). Validation of sperm sexing in the cattle (*Bos taurus*) by dual colour fluorescence in situ hybridization. *J Anim Breed Genet.* 122 Suppl 1:22-7.
- Hamano, K., Li, X., Qian, X. Q., Funauchi, K., Furudate, M., Minato, Y. (1999). Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted sperm heads. *Biol Reprod.* 60(5):1194-7.
- Han, T. L., Flaherty, S. P., Ford, J. H., Matthews, C. D. (1993). Detection of X- and Y-bearing human spermatozoa after motile sperm isolation by swim-up. *Fertil Steril.* 60(6):1046-51.
- Han, T. L., Ford, J. H., Webb, G. C., Flaherty, S. P., Correll, A., Matthews, C.D. (1993b). Simultaneous detection of X- and Y-bearing human sperm by double fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev.* 34(3): 308-13.
- Hendriksen, P. J., Tieman, M., Van der Lende, T., Johnson, L. A. (1993). Binding of anti-H-Y monoclonal antibodies to separated X and Y chromosome-bearing porcine and bovine sperm. *Mol Reprod Dev.* 35(2):189-96.

Hendriksen, P. J., Welch, G. R., Grootegoed, J. A., Van der Lende, T. Johnson, L. A. (1996). Comparison of detergent- solubilized membrane and soluble proteins from flow cytometri- cally sorted X- and Y-chromosome bearing porcine spermatozoa by high resolution 2-D electrophoresis. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 342–350.

Henkel, R. R., Schill, W-B. (2003). Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*, Vol. 1, p.108.

Howes, E. A., Miller, N. G., Dolby, C., Hutchings, A., Butcher, G. W., Jones, R. (1997). A search for sex-specific antigens on bovine spermatozoa using immunological and biochemical techniques to compare the protein profiles of X and Y chromosome-bearing sperm populations separated by fluorescence-activated cell sorting. *J Reprod Fertil.* 110(2):195-204.

Johnson, L. A., Flook, J. P., Hawk, H. W. (1989). Sex preselection in rabbits: Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 41(2):199–203.

Johnson, L. A., Welch, G. R. (1999). Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology.* 52(8):1323-41.

Julez, M. (2014). [Pre-conception sex selection]. *Orv Hetil.* 155(46):1815-9.

Kawarasaki, T., Welch, G. R., Long, C. R., Yoshida, M., Johnson, L. A. (1998). Verification of flow cytometrically-sorted X- and Y-bearing porcine spermatozoa and reanalysis of spermatozoa for DNA content using the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique. *Theriogenology.* 50(4):625-35.

Kobayashi, J., Sekimoto, A., Uchida, H., Wada, T., Sasaki, K., Sasada, H. Umezu, M., Sato, E. (1998). Rapid detection of male-specific DNA sequence in bovine embryos using fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev.* 51(4):390-4.

Kobayashi, J., Oguro, H., Uchida, H., Kohsaka, T., Sasada, H., Sato, E. (2004). Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous percoll gradients with rapid fluorescence in situ hybridization. *J Reprod Dev.* 50(4):463-9.

Lin, S. P., Lee, R. K., Tsai, Y. J., Hwu, Y. M., Lin, M. H. (1998). Separating X-bearing human spermatozoa through a discontinuous Percoll density gradient proved to be

inefficient by double-label fluorescent in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet.* 15(9):565-9.

Maleki, A. F., Moussavi, A. H., Nassiri, M. R., Tahmoorespur, M., Vakili, S. A. (2013). Introducing and validation of SYBR Green Real-Time PCR method to determinate sex ratio in bovine semen. *Anim Reprod Sci.* 140(1-2):1-6.

Morrison, L. E., Ramakrishnan, R., Ruffalo, T. M., Wilber, K. A. (2002). Labeling fluorescence in situ hybridization probes for genomic targets. *Methods Mol Biol.* 204:21-40.

Moruzzi, J. F. (1979). Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 57(2):319-23.

Parrilla, I., Vázquez, J. M., Cuello, C., Gil, M. A., Roca, J., Di Berardino, D., Martínez, E. A. (2004). Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. *Reproduction.* 128(5):615-21.

Pellestor, F. (2006). PRINS in situ PCR protocols 2<sup>nd</sup> ed. pp 58. Human Press.

Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(9):2934-8.

Rath, D., Johnson, L. A., Dobrinsky, J. R., Welch, G. R., Niemann, H. (1997). Production of piglets preselected for sex following in vitro fertilization with X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. *Theriogenology.* 47(4):795-800.

Redon, R., Fitzgerald, T., Carter, N. P. (2009). Comparative genomic hybridization: DNA labeling, hybridization and detection. *Methods Mol Biol.* 529:267-78.

Reissmann, S. (2014). Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides. *J Pept Sci.* 20(10):760-84.

Rudkin, G. T., Stollar, B. D. (1977). High resolution of DNA-RNA hybrids *in situ* by indirect immunofluorescence. *Nature* 265, 472–474.

- Samura, O., Miharu, N., He, H., Okamoto, E., Ohama, K. (1997). Assessment of sex ratio and aneuploidy rate in motile spermatozoa selected by three different methods. *Hum Reprod.* 12(11):2437-2442.
- Sang, L., Yang, W. C., Han, L., Liang, A.X., Hua, G. H., Xiong, J. J., Huo, L. J., Yang, L. G. (2011). An immunological method to screen sex-specific proteins of bovine sperm. *Journal of Dairy Science* .94 (4): 2060–2070
- Sarrate, Z., Anton, E. (2009). Fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol in human sperm. *J Vis Exp.* (31), 1-2.
- Seidel, G. E., Jr. (2003). Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology.* 59(2):585-98.
- Seidel, G. E., Jr. (2007). Overview of sexing sperm. *Theriogenology.* 68(3):443-6.
- Sills, E. S., Kirman, I., Thatcher, S. S., Palermo, G. D. (1998). Sex-selection of human spermatozoa: evolution of current techniques and applications. *Arch Gynecol Obstet.* 261: 109-115.
- Short, R. V., Balaban, E. (1994). *The Differences Between the Sexes.* Cambridge University Press. 401.
- Sohn, S. H., Cho, E. J., Son, W. J., Lee, C. Y. (2007). Diagnosis of bovine freemartinism by fluorescence in situ hybridization on interphase nuclei using a bovine Y chromosome-specific DNA probe. *Theriogenology.* 68(7): 1003-11.
- Speicher, M. R., Carter, N. P. (2005). The new cytogenetics: Blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews Genetics* 6, 782–792.
- Sugiura, G., Kühn, H., Sauter, M., Haberkorn, U., Mier, W. (2014). Radiolabeling strategies for tumor-targeting proteinaceous drugs. *Molecules.* 19(2): 2135-65.
- 't Hoen, P. A., de Kort, F., van Ommen, G. J., den Dunnen, J. T. (2003). Fluorescent labelling of cRNA for microarray applications. *Nucleic Acids Res.* 31(5):e20.

Vilfan, I. D., Conwell, C. C., Hud, N. V. (2004). Formation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. *J Biol Chem.* 279(19):20088-20095.

Wang, D., Zhu, H., Guo, J., Lin, B., Zhang, L., Hao, H., Du, W., Zhao, X. (2011). A Study of a Method to Assess the Purity of Sorted Bovine Semen Using Rapid Single-Sperm Sexing PCR. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* 10: 750-756.

Wang, H. X., Flaherty, S. P., Swann, N. J., Matthews, C. D. (1994). Discontinuous Percoll gradients enrich X-bearing human spermatozoa: a study using double-label fluorescence in situ hybridization. *Hum. Reprod.* 9(7), 1265-1270.

Welch, G. R., Johnson, L. A. (1999). Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology.* 52(8):1343-52.

## LISA

### LISA 1. Kromosoomide amplifitseerimisel kasutatud praimerid

<i>Y kromosoomi praimerid</i>	<b>Praimeri järjestus (5' → 3') suund</b>	<b>Amplifitseeritava ala pikkus</b>
<i>Bov Y Per 1.2 Forward</i>	CAACCAGTATCTGTATGCCT	510 bp
<i>Bov Y Per 1.2 Reverse</i>	AAACATACGCAACAATCTGCTT	
<i>PerY domään I Forward</i>	CCAGTTGCACAGTCAGAA	230 bp
<i>PerY domään I Reverse</i>	CAACCAGTATCTGTATGCCT	
<i>PerY domään III Forward</i>	CACGCGATTCTCACCTCTG	267 bp
<i>PerY domään III Reverse</i>	AAACATACGCAACAATCTGCTT	
<i>PerY domään II Forward</i>	TGTAGATGTGTGTGCCATCC	243 bp
<i>PerY domään II Reverse</i>	ACCGGTTCCACAGTCTCTAG	

<i>X kromosoomi praimerid</i>	<b>Praimeri järjestus (5' → 3') suund</b>	<b>Amplitseeritava ala pikkus</b>
<i>X Rep-10A Forward</i>	CCTCTGAAACACATGCACAC	345 bp
<i>X Rep-10A Reverse</i>	GTGCTACTGGAGGTATCTGG	
<i>X Rep-102 Forward</i>	TAGTCATTTTGAGGCCTCCC	201 bp
<i>X Rep-102 Reverse</i>	AACATCTGAATTGCTCCCCA	
<i>X Rep-47 Forward</i>	TGGAGGCTCACAAATACAGA	121 bp
<i>X Rep-47 Reverse</i>	CCTTGAGCTCATCTTACACCT	
<i>X Rep-156 Forward</i>	TCAGACAGAGATAGACAAATACTG	149 bp
<i>X Rep-156 Reverse</i>	TGTATTGCCCTCCATCTTC	
<i>X Rep-107 Forward</i>	TAGTCATTTTGAGGCCTCCC	110 bp
<i>X Rep-107 Reverse</i>	GGAGACTTGCTGACCTCATA	
<i>PLP-Forward</i>	GTTGTGTTAGTTTCTGCTGTACAATAAAGTG	96 bp
<i>PLP-Reverse</i>	GATGGCAGGTGAGGGTAGGA	

<b>6 kromosoomi praimerid</b>	<b>Praimeri järjestus (5' → 3') suund</b>	<b>Amplifitseeritava ala pikkus</b>
<i>Bov D6Z1-A For</i>	GAGGGGAAATGATTGCATTG	298 bp
<i>Bov D6Z1-A Rev</i>	GAAACCCTGATGACCAGCAT	
<i>Bov D6Z1-B For</i>	CTTCTGGGAGTCTGGGAGTG	298 bp
<i>Bov D6Z1-B Rev</i>	CTTGGAAC TTTGGCCTTGAG	
<i>Bov D6Z1-C For</i>	GGGGACAAGGAAACACCATA	344 bp
<i>Bov D6Z1-C Rev</i>	CCACCACCCAAGGTTACAGT	

## LISA 2. PCR programm

<b>Etapp</b>	<b>Temperatuur</b>	<b>Aeg</b>	<b>Tsüklite arv</b>
DNA esmane denaturatsioon	95 °C	5 min	1
DNA denaturatsioon	95 °C	30 sek	45
Praimerite seondumine märklaud DNA-le	55 °C	30 sek	45
DNA ahela süntees	72 °C	30 sek	45
Lõppsüntees	72 °C	10 min	1

### **LISA 3. Suguselektiooni kordusanalüüsil kasutatud spermakõrred**

Järgnevalt on ära toodud suguselekteerimise katse jaoks kasutatud spermakõrte info:

- 1. ILAN-ET 27339** EHF EE NL537453159 04.04.13 ETKU 10/1
- 2. LEGRO 27330** EHF EE EE12493197 08.03.13 ETKU 10/1
- 3. GOLD-ET 27341** EHF EE NL878742925 12.03.13 ETKU 10/1
- 4. LEGRO 27330** EHF EE 12493197 08.03.13 ETKU 10/1
- 5. ESAR 27326** EHF EE 11189169 08.03.13 ETKU 10/1

### **LISA 4. Spermide fikseerimiseks kasutatud lahused**

#### **Rakkude fikseerimiseks vajalikud lahused**

- Vähemalt päev enne rakkude fikseerimist pandi mikroskoobiklaasid (Brand, Saksamaa) 100 % metanooli (Naxo, Tartu, Eesti) ja hoitakse -20 °C juures vähemalt üleöö, et vähendada preparaatide hübriidisatsiooni efektiivsuse langust (Pinkel *et al.*, 1986).
- Rakkude fikseerimise päeval kuivatatakse klaasid lämmastikujoas ning pannakse karpri ja hoitakse enne kasutamist – 20 °C juures. Fikseerimispäeva hommikul valmistatakse fikseerimiseks värsked lahused.
- Enne fikseerimist töödeldi rakke hüpotoonilise lahusega. Hüpotoonilises lahuses võtavad rakud soolade kontsentratsiooni ühtlustamiseks väliskeskkonnast vett ja paisuvad.
- Hüpotoonilise lahuseks kasutati 0,075 M KCl lahust, mis valmistati vahetult enne rakkude fikseerimist arvestusega, et ühe fikseeritava rakuproovi kohta kulub ~ 500 µl lahust.
- Enne kasutamist eelsoojendati 0,075 M KCl-i lahust vähemalt 30 min 37 °C juures vesivannil.
- Rakkude fikseerimiseks kasutati metanooli ja jää-äädikhappe segu vahekorras 3:1. Ühe fikseeritava rakuproovi jaoks kulus ~ 1 ml fiksaatorit. Metanool on vajalik valkude denatureerimiseks ja sadestamiseks, äädikhape aga koaguleerib nukleoproteiini.