

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

**Veise sperma suguselekteerimine kolloidtsentrifuugimise teel ja veise X-kromosoomi
spetsiifiliste proovide loomine**

Magistritöö

40 EAP

Liisi Kink

Juhendajad: PhD Ants Kurg
MSc Olavi Reinsalu

TARTU 2018

INFOLEHT

Veise sperma suguselekterimine kolloidtsentrifuugimise teel ja veise X-kromosoomi spetsiifiliste proovide loomine

Suguselektsioon on loomakasvatajatele äärmiselt oluline. Hetkel on kommertsiaalselt kasutusel vaid voolutsütomeetria meetod, mis selekteerib spermarakke küll suure täpsusega, kuid on kallis ja aeganõudev. Kolloidtsentrifuugimine võiks olla sobivaks alternatiiviks kuna meetod on lihtne, kiire ning ei vaja teostamiseks kallist aparatuuri. Käesolevas töös modifitseeriti kolloidtsentrifuugimise meetodi tingimusi saavutamaks võimalikult suur X-kromosoomi kandvate spermarakkude rikastatus saagises. Teiseks eesmärgiks oli veise X-kromosoomi spetsiifiliste FISH proovide loomine suguselektsiooni meetodi valideerimise usaldusväärsuse tõstmiseks.

Märksõnad: suguselektsioon, kolloidtsentrifuugimine, X-kromosoomi spetsiifiline FISH, veise reproduktsioon

CERCS: T490 Biotehnoloogia

Bovine sperm sexing using density centrifugation and designing X-chromosome probes

In livestock industry, sex selection has a significant economic impact. The only method currently used for sperm sexing is flow cytometry. Although, method is 90% accurate, there is still a need for a more attainable approach. The focus of this study was to modify density centrifugation method in order to gender preselect bovine sperm. Second aim of this study was to design bovine X-chromosome specific probes that can be use in FISH to evaluate semen sexing results.

Keywords: sperm sexing, density centrifugation, X-chromosome specific FISH, bovine reproduction

CERCS: T490 Biotechnology

SISUKORD

| | |
|--|----|
| KASUTATUD LÜHENDID | 5 |
| SISSEJUHATUS | 6 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE | 7 |
| 1.1. Spermide selekteerimiseks kasutatavad meetodid | 7 |
| 1.1.1. <i>Swim-down</i> meetod | 8 |
| 1.1.2. <i>Swim-up</i> meetod | 9 |
| 1.1.3. Tihedusgradiendis tsentrifuugimise meetod | 11 |
| 1.1.4. Immunoloogiline meetod | 13 |
| 1.1.5. Voolutsütomeetria meetod | 14 |
| 1.2. Suguselektiooni kvaliteeti kontrollimine | 17 |
| 1.2.1. FISH märgistatud proovide loomine | 18 |
| 1.3. VEREP projekti ülevaade | 21 |
| 2. EKSPERIMENTAALOSA | 22 |
| 2.1. Töö eesmärgid | 22 |
| 2.2. Materjal ja meetodika | 23 |
| 2.2.1. Tiheduskolonnide valmistamine | 24 |
| 2.2.2. Suguselektioonikatsed | 25 |
| 2.2.3. FISH analüüs suguselektioonikatsete hindamiseks | 26 |
| 2.2.4. Fluorestsentsmikroskoopia | 27 |
| 2.2.5. X- ja Y-kromosoomi spetsiifiliste proovide valmistamine | 28 |
| 2.3. Tulemused ja arutelu | 31 |
| 2.3.1. Suguselektioonikatsed üheastmelises Bovicoll lahutuskolonnis | 31 |
| 2.3.2. Suguselektioonikatsed mitmeastmelises Bovicoll lahutuskolonnis | 37 |
| 2.3.3. Suguselektioonikatsed Percoll [®] ja Percoll [®] Plus tiheduskolloididega | 40 |
| 2.3.4. X-kromosoomi proovide loomine | 42 |
| KOKKUVÕTE | 46 |
| SUMMARY | 48 |
| TÄNUSÕNAD | 50 |
| KIRJANDUSE LOETELU | 51 |
| KASUTATUD VEEBIAADRESSID | 58 |

| | |
|---|----|
| LISAD | 59 |
| Lisa 1. Spermaproovide andmed | 59 |
| Lisa 2. Tsentrifuugi programm | 59 |
| Lisa 3. Sooritatud suguselektsioonikatsed ja nende tingimused | 60 |
| Lisa 4. DAPI ja Cy3 detekteerimine | 61 |
| Lisa 5. Y-proovi praimer | 61 |
| Lisa 6. PCR programm PerY praimeriga | 61 |
| Lisa 7. PCR programm XCRa3 ja XCRb5 praimeriga | 61 |
| Lisa 8. PCR programm XCRb6 praimeriga | 62 |
| Lisa 9. PCR programm XCRb7 praimeriga | 62 |
| LIHTLITSENTS | 63 |

KASUTATUD LÜHENDID

| | |
|------|--|
| BSA | veise seerumi albumiin |
| Cy3 | tsüaniinvärv 3 |
| DAPI | 4,6-diamidiin-2-fenüülindool |
| DMSO | dimetüülsulfoksiid |
| FISH | fluorestsents <i>in situ</i> hübridisatsioon |
| g | suhteline tsentrifugaaljõud |
| IVF | <i>in vitro</i> viljastamine |
| PBS | fosfaatpuhverdatud soolalahus |
| PSA | proovi spetsiifiline aktiivsusanäitaja |
| PVP | polüvinüülpürrolidoon |
| SSC | naatriumtsitraadi soolalahus |

SISSEJUHATUS

Maailma rahvaarv jõudis 2011. aastal 7 miljardini ning ennustatakse, et see kasvab 10 miljardini aastaks 2056. Rahvastiku suurenemisega kasvab ka pidev nõudlus toidu järele. Selle rahuldamiseks on seatud kõrged lootused biotehnoloogia-alastele saavutustele, mis aitaks kariloomade ja põllumajanduse ressursse efektiivsemalt kasutada.

Võimalus määrata ja valida järglaste sugu enne viljastamist on karjakasvatajate poolt äärmiselt ihaldatud kontseptsioon. Hetkel kõige laialdasemalt kasutusel olev voolutsütomeetria-tehnoloogia lahutab X- ja Y-kromosoomi kandvaid sugurakke DNA hulga erinevuse põhjal ning võimaldab sorteeritud rakkudega suguselektiooni kuni 90% täpsusega. Veisekasvatustes pole see siiski ideaalseid lahendusi pakkunud, kuna suguselekteeritud sperma on liialt kallis laialdaseks kasutamiseks ning madalama viljakusega kui tavasperma. Seetõttu külmutatakse täna kogu selekteeritud sperma ning kasutatakse ainult kunstlikul või *in vitro* viljastamisel. Endiselt on vajadus tehnoloogia järele, mis suguselekteeriks kariloomade spermat kiirelt ja efektiivselt ning ei viiks selle juures alla sperma kvaliteeti.

Antud magistritöö annab kirjanduse põhjal ülevaate põhilistest kasutusel olevatest suguselektiooni meetoditest ning nende plussidest ja miinustest. Töö eksperimentaalne osa on läbi viidud veise seemnerakkude suguselektiooni- ja viljakustehnoloogiate arendusprojekti raames. Kirjeldatud suguselektiooni katsed on sooritatud kolloidlahuses tsentrifuugimisel erinevatel tingimustel, et leida kõige optimaalsemad meetodi tingimused. Lisaks sooritati katseid loodud DNA proovidega, mida saaks kasutada veise X-kromosoomi spetsiifiliseks märkimiseks FISH meetodil.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Inimesed on mõtisklenud järglaste soo üle juba sajandeid, enne kui spermarakkudest ja sugukromosoomidest veel midagi teada ei olnud. 400 aastat e.Kr. pakkus Democritos välja hüpoteesi, mille kohaselt paremast testisest tulevad meessoost järglased ja vasakust testisest naissoost järglased. Vanarahva uskumusi toitsid ka vähesed arusaamad tõenäosusteooriast. Kümne järjestikuse pullvasika sündimine karjas pole statistiliselt üldse nii ebatavaline, kuid siiski põhjendati seda kas sööda muutmisega või mõne muu asjaoluga, mis ajaliselt kokku langes (Garner ja Seidel, 2008).

Imetaja spermas on X- ja Y-kromosoomide kandvate rakkude suhe 1:1 (Kiddy ja Hafs, 1971). Karjakasvatajatele on selle tasakaalu kallutamise majanduslikult väga kasumlik – emased loomad on olulised piimatootmisel ning järglaste andmisel, isased loomad on eelistatud lihatööstuses ja tõuaretuses. Hea suguselektiooni tehnoloogia leiaks rakendust lisaks põllumajandusele ka näiteks meditsiinis, et vältida suguliiteliselt päranduvaid haiguseid, ja zooloogias aidates väljasuremisohus olevaid liike (Seidel ja Garner, 2002).

1.1. Spermide selekteerimiseks kasutatavad meetodid

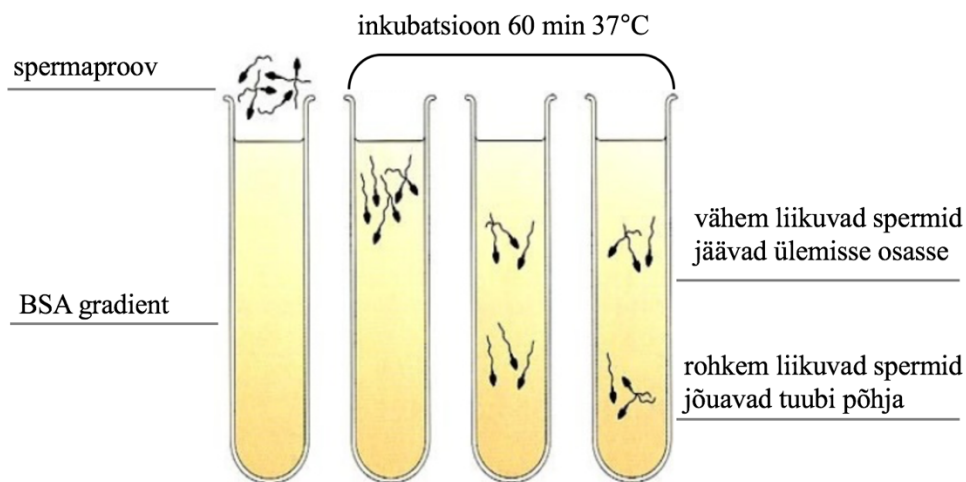
Loodus on hästi hoolt kandnud selle eest, et erinevaid sugukromosoomide kandvad rakud oleks fenotüübilt võimalikult sarnased, tagades nii liikide isas- ja emasisendite võrdse hulga (Seidel, 1999). Hetkel kõige paremat alust selekteerimiseks pakub X-kromosoomiga spermide suurem DNA hulk, mis pullide puhul on >4% (Johnson ja Welch, 1999). Vaatamata sellele, et X-kromosoom on tunduvalt suurem kui Y-kromosoom, on erinevused spermarakkude pea, kaela ja sabaosas ning kuivmassis protsentuaalselt väga väikesed. Just see teebki suguselektiooni tehniliselt keeruliseks (Keeler *et al.*, 1983; Cui, 1997; Morrell *et al.*, 2008; Williamson, 2004).

Teadlased on proovinud erinevaid meetodeid, kuidas X- ja Y-kromosoomide kandvaid rakke (edaspidi vastavalt X- ja Y-spermid) lahutada lähtudes erinevustest nende massis, liikuvuses, liikumismustrites, rakumembraanis, mahus jne. Selleks on enim kasutatud albumiini gradiente, tihedusgradiendis tsentrifuugimist ja *swim-up* meetodit. Uuemad katsetused on tehtud kulla

nanopartikleid ja interferomeetriat kasutades (Espinosa-Cervantes ja Córdova-Izquierdo, 2012; Rath *et al.*, 2013). Kahjuks pole veel ükski nendest lähenemistest andnud statistiliselt olulisi tulemusi reprodutseeritavalt ning tänaseni töötab kommertslikul tasandil vaid voolutsütomeetriaal põhinev sorteerimine (Jain *et al.*, 2011).

1.1.1. *Swim-down* meetod

Swim-down meetod toetub spermarakkude loomulikule liikumisele vedelikus. Tavaliselt kasutatakse katsetuubis BSA kontsentratsioonigradienti – pinnalt põhja suunas liikudes läheb kontsentratsioon järjest kangemaks. Spermaproov kantakse meediumi pinnale ning inkubeeritakse 37° C juures 60 minutit, mille jooksul ujuvad kõige liikuvamad rakud katsetuubi põhja (Beydola *et al.*, 2013). Meetod on illustreeritud joonisel 1.



Joonis 1. *Swim-down* meetod (pilt võetud www.slideshare.net ning kohandatud)

Antud võte on kõige vanem viis spermarakkude selekteerimiseks. Esimesena hakkas sellega katseid tegema Ericsson aastal 1973. Ta leidis, et kui kanda lahjendatud spermaproov veise seerumi albumiini (BSA) lahuse pinnale, siis Y-kromosoomi kandvad rakud suudavad efektiivsemalt ja kaugemale BSA lahusesse liikuda. Saadud tulemused olid äärmuslikud – 92% Y-sperme saagises võrreldes 49% kontrollis (Ericsson *et al.*, 1973). Peale selliste tulemuste publitseerimist proovisid mitmed sama katset korrata, mõned edukalt (Corson *et al.*, 1984; White *et al.*, 1984), kuid paljud lükkasid meetodika pädevuse ümber (Evans *et al.*, 1975; Ross *et al.*, 1975; David *et al.*, 1977).

Siinkohal tuleks kindlasti meeles pidada, et sugukromosoomide määramine rakkudes ei olnud sellel ajal kõige täpsem.

Aastate jooksul pole suudetud antud meetodi suguselekteerimise võimet veenvalt tõestada. Üheks hiljutisemaks näiteks saab tuua 2013. aastal Iraagis tehtud katsed. Võrreldi 8% pidevat BSA lahust ning 8% ja 16% BSA gradienti, millele pipeteeriti pestud ning lahjendatud spermaproov peale ning inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Embrüote viljastamisel ühekihilise BSA-ga selekteeritud spermaga saadi 72,7% isasembrüoid ning gradiendil lahutatud spermaga 81,8% isasembrüoid (Hadi ja Al-Timimi, 2013). Tulemused sarnanevad Ericsson *et al.*, 1973 ja Corson *et al.*, 1984 poolt saadutega. Peab aga välja tooma, et Hadi ja Al-Timimi katsetel vaadeldud embrüote arv jäi alla 20 ning pole seetõttu statistilist väga usaldusväärset ning võib suures osas juhuslikkuse osaks arvata.

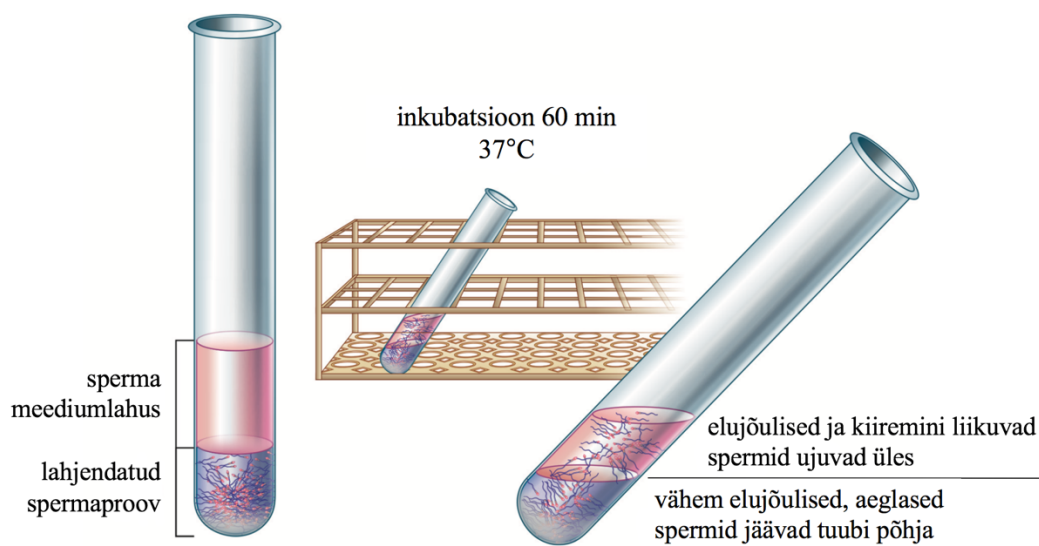
1.1.2. *Swim-up* meetod

Klassikalise *swim-up* meetodi arendasid välja Mahadevan ja Baker aastal 1984, mis seisnes rohkem elujõuliste spermarakkude eraldamisel vähem elujõulisematest kasutades ära esimeste suuremat liikumisjõudu. 1993 täiendasid meetodit Check ja Katsoff – modifitseeritud *swim-up*. Vaatamata sellele, et meetod on üks vanematest, on see endiselt kõige lihtsam, säästlikum ning laialdaselt kasutatav, eriti IVF laborites (Henkel ja Schill, 2003).

IVF tehnoloogias rakendatakse *swim-up*-i, et selekteerida välja spermid, mille viljastamise potentsiaal on kõik suurem. Meetodil on mitmeid positiivseid aspekte, mis ongi laialdase rakendamise põhjuseks. Kõige olulisem on rakkude õrn lahutamine – sperme ei lõhuta ära ega kahjustata membraane – see on viljakuse seisukohalt äärmiselt oluline. Lisaks on kogutud saagises suur protsent hea liikuvusega sperme (>90%). *Swim-up* katseid on lihtne läbi viia ning tulemus on kulutõhus (Henkel ja Schill, 2003).

Negatiivne külg äärmiselt puhta proovi kogumise juures on vähene saagis. Et kätte saadava sperma hulk oleks hea, peaks ejakulaat algselt sisaldama suurel hulgal rakke, mis tavaliselt ongi viljatusravi vajavate inimeste probleemiks. Aastate jooksul on tehtud meetodis ka palju täiustusi efektiivsemate pesu- ja lahutuslahuste ning spetsiifiliste tarvikute näol (Henkel ja Schill, 2003). *Swim-up* tehnika eelised ja puudused on kokku võetud tabelis 1.

Swim-up tehnika puhul toimub tavaliselt spermaproovi lahjendamine, eelpesu spetsiaalse pesulahusega ning mõned kerged tsentrifugimised madal jõul (alla 500 g), et vabaneda osast seminaalplasmast. Eelpestud ja lahjendatud spermale kantakse peale uus meediumlahus, mis on toitainete rikas ning atraktiivne rakkudele. Katsetuubi hoitakse 45° nurga all 37° C juures 60 minutit, mille jooksul eralduvad elujõulisemad spermid liikudes tuubi ülemistesse kihtidesse. Tunni möödudes korjatakse rakud kõige ülemisest kihist ning mõõdetakse nende hulk (Beydola *et al.*, 2013). Meetod on illustreeritud joonisel 2.



Joonis 2. *Swim-up* meetod (Beydola *et al.*, 2013 järgi)

Antud meetodikat kasutades on üritatud spermarakke suguselekteerida lähtudes põhimõttest, et väiksema DNA koguhulgaga Y-spermid peaksid kiiremini liikuma võrreldes X-spermidega. Check tegi 1994. aastal katsed, kus kasutas *swim-up* tehnikat kogudes kokku tuubi keskosasse jääva rakkude osa, lootes saada suure Y-spermide kontsentratsiooniga rakkude fraktsiooni (Check *et al.*, 1994). Saadud rakke kasutati IVF-is, mille tulemusena sündis vaid 3% isasloomi rohkem kui emasloomi. Taolisi katseid tehti 90ndatel veel, kuid vähe ja nende tulemused ei erinenud oluliselt kontrollidest (Henkel ja Schill, 2003).

Lootusrikkamaid tulemusi on andnud katsed lähiajast. 2014. aastal ilmus artikkel, kus saadi *swim-up* meetodit kasutades 60% rikastatud Y-kromosoomidega pulli spermaproovi. Katses kasutati 5 ml seroloogilist pipetti, mida hoiti püstises asendis. Fraktsioone koguti erinevatel ajavahemikel ning erinevatest kolonni piirkondadest ja spermide keskmiseks liikumiskiiruseks arutati 93 µm/s.

Samuti ei saanud rakkude viljakus katse käigus kannatada – embrüote IVF oli edukas saadud rakkudega (Azizzeddin *et al.*, 2014). See on hea näide, kuidas õigete modifikatsioonide abil on võimalik ka üsna lihtsakoelist meetodit kasutades Y ja X tasakaalu spermaproovis oluliselt kallutada.

Tabel 1. *Swim-up* meetodi eelised ja puudused (Henkel ja Schill, 2003 järgi)

| eelised | puudused |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • kerge teostada, lihtne protokoll • õrn meetod, ei kahjusta spermarakke • väga kulutõhus • väga puhas saagis kõrge liikuvusega spermaga | <ul style="list-style-type: none"> • suguseleksioon ei ole oodataval tasemel tõestatud • saagise kogus on väike • algproovis peab spermide arv olema kõrge • modifitseeritud meetod vajab spetsiaalseid katsetuube |

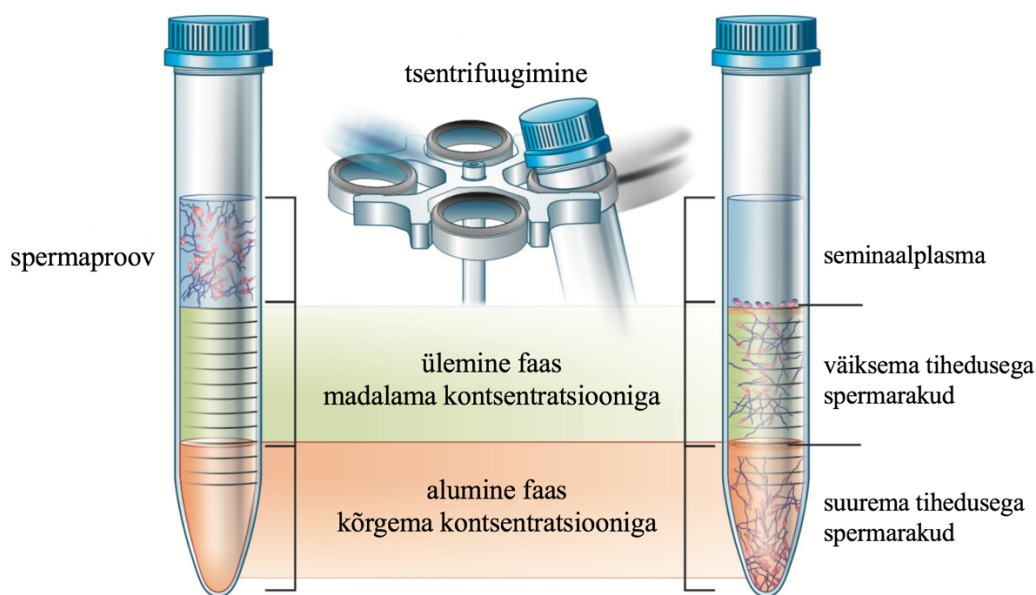
1.1.3. Tihedusgradiendis tsentrifugimise meetod

X-kromosoomi kandva spermaraku tuumamaht on suurem kui Y-kromosoomi puhul, millest tulenevalt on esimese tihedus hinnanguliselt 0,06% suurem. Selle erinevuse alusel kasutatakse suguselekterimiseks tihedusgradiendis tsentrifugimist (Windsor *et al.*, 1993).

Tsentrifugimise meetodis kasutatavad lahutuskolloidid saab jagada kolmeks – ühekihilised, pidevad ja astmelised gradiendid. Ühekihiliste korral on lahutuskolloidi kontsentratsioon ühtlane kogu katsetuubi ulatuses. Teise puhul kontsentreerub lahutuskolloid sujuvalt liikudes tuubi põhja suunas. Astmelistel gradientidel on erinevate kontsentratsioonide vahelised piirid konkreetsed ja tihti silmaga eristatavad (Beydola *et al.*, 2013). Katseid on tehtud erinevate lahutusmediumitega, näiteks suhkruga (Kanesharatnam *et al.*, 2012), kuid enim tuntud on ränipartikleid sisaldav kolloid Percoll[®], (Pertoft *et al.*, 1978). 1996. aastal keelati Percoll[®] kasutamine inimese spermal, kuna PVP kihiga kaetud räniosakesed on rakkudele toksilised (Pharmacia Biotech, 1996). Selle asendamiseks

on loodud palju teisi kolloide – BoviPure[®], Bovicoll[®], Ficoll[®], OptiPrep[®], PureSperm[®] on vaid mõned neist.

Lahutuskolloidist valmistatakse soovitud gradient, tüüpiliselt 1 kuni 12 kihti erineva kontsentratsiooniga, mille peale kantakse spermaproov. Gradient koos prooviga tsentrifugeeritakse, seejärel kogutakse saagis katsetuubi põhjast või teatud kontsentratsiooniga faasist (Henkel ja Schill, 2003). Meetod on illustreeritud joonisel 3. Tihti kombineeritakse antud meetod *swim-up* meetodikaga, et enne suguselekteerimist parandada spermakvaliteeti (Beydola *et al.*, 2013).



Joonis 3. Tihedusgradiendis tsentrifugeerimise meetod (Beydola *et al.*, 2013 järgi)

Tihedusgradiendi meetodil saadud suguselektioonikatsete tulemused on väga varieeruvad, mis on tingitud erinevatest katsetingimustest (lahutuskolloid, selle kontsentratsioon, kihtide arv, tsentrifugeerimise jõud ja aeg) ning seetõttu pole need ka omavahel võrreldavad. Levinumad parameetrid tsentrifugeerimisel on 15 kuni 30 minutit, 200 kuni 600×g (Henkel ja Schill, 2003). Hiljuti paremini õnnestunud tulemustest saab välja tuua kaks ilmunud tööd – Promthep *et al.*, 2016, kus kasutades 7-kihilist Percoll[®] gradienti saadi 60,75% rikastatud X-spermide proov ning Hossepian, 2015, milles kasutati 3-kihilist Percoll[®] ja OptiPrep[®] gradiente ning saadi mõlema puhul üle 70% rikastatus (Hossepian, 2015, Promthep *et al.*, 2016). Märkimist vajab ka Kobayashi *et al.*, 2004 artikkel, kus hästi ülesehitatud ja läbiviidud katsete põhjal saadi statistiliselt oluline 5,7% X-spermide ülekaal kasutades 7-kihilist Percoll[®] gradienti (Kobayashi *et al.*, 2004)

Sarnaselt *swip-up* võttega eraldab see elujõulisemad rakud kehvematest, kuna viimased jäävad gradiendi ülemistesse kihtidesse kinni. Seega saadud proov on rakkude seisukohalt kvaliteetne, mille kindlustab ka õrnem käsitlemine võrreldes voolutsütomeetriaga. Mõju spermide füsioloogiale on seoses tsentrifuugimisel kasutatava jõu ja ajaga – mida pikemat aega ning tugevamat jõudu rakendatakse, seda rohkem saavad kahjustada. Samuti saab selekteeritud saagise kätte väiksema ajakuluga ning protsessiks vajaminev aparatuur on tunduvalt odavam kui voolutsütomeetria puhul (Henkel ja Schill, 2003). Tihedusgradiendis tsentrifuugimise meetodi eelised ja puudused on kokku võetud tabelis 2.

Tabel 2. Tihedusgradiendis tsentrifuugimise meetodi eelised ja puudused (Henkel ja Schill, 2003 järgi)

| eelised | puudused |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> võrdlemisi kerge teostada, lihtne protokoll hea saagise kogus saagises on elujõulisemad rakud üsna leebe rakkudele, ei kahjusta | <ul style="list-style-type: none"> suguselektsioon laialt rakendataval tasemel pole tõestatud mitmekihilised gradiendid nõuavad aega ja kindlat kätt lahutuskolloid võib olla rakkudele kahjulik (Percoll®) |

1.1.4. Immunoloogiline meetod

Tähelepanek, et X- ja Y- kromosoomid erinevad tunduvalt oma suuruste poolest (Moruzzi, 1979) viis ideeni, et sama võiks kajastuda ka nende poolt ekspresseeritavates valkudes (Seidel ja Johnson, 1999). 2014. aastal ilmunud artiklis toodi välja 27 erinevat geeni, mis on X-spermidel üles reguleeritud ja neli geeni Y-spermidel (Chen *et al.*, 2014). Kontseptsioon, et erinevused geeniekspressioonis põhjustavad ka varieeruvust X- ja Y-spermide valkudes ning võimaldavad see läbi teostada suguselektsiooni, on immunoloogilise meetodi aluseks (Seidel ja Johnson, 1999).

Kõige esimesed katsetused tehti rakupinna H-Y antigeeniga. Arvati, et see spermaraku peaosa plasmamembraanis ekspresseeritud valk on Y-spetsiifiline, kuid edukaid selektsiooni tulemusi ei õnnestunud saada (Ali *et al.*, 1990) ning tänaseks on näidatud, et H-Y antigeen on olemas ka X-

spermide pinnal (Prasad *et al.*, 2010). Palju katseid on tehtud erinevaid valke kasutades, kuid soovitud tulemusi pole siiani saadud (Yadav *et al.*, 2017).

Proteoomika valdkonnas on tänu tehnika arengule (võimsad kromatograafia- ja mass-spektromeetria-analüsaatorid) võimalik valke tuvastada ja antikehasid luua rohkem kui kunagi varem. Hetkel tegeletakse palju spermarakkude valguprofiilide määramisega otsides sobivaid variante, mida suguselekteerimisel kasutada. Lootus, et lähitulevikus hakkab tulema edasiminekuks selle meetodi osas, on suur (Yadav *et al.*, 2017).

1.1.5. Voolutsütomeetria meetod

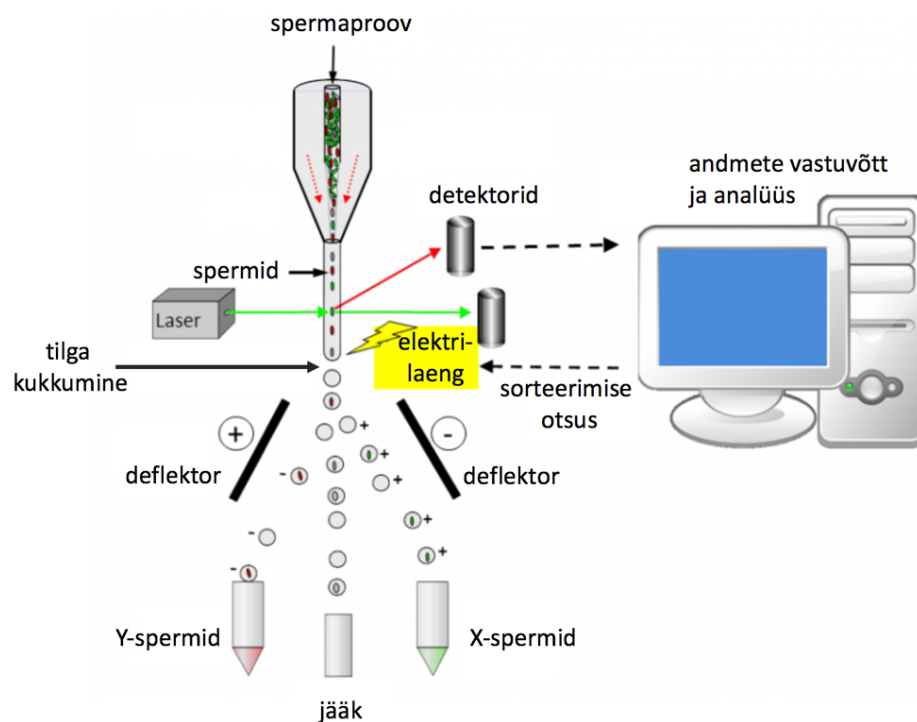
Voolutsütomeetria on tänaseni ainuke praktikas kasutatav suguselekteerimise viis (Yadav *et al.*, 2017). Meetodi loojaks on doktor Daniel Pinkel, kes aastal 1982 näitas, et spermaraku õigel orienteerimisel on võimalik mõõta selle täpne DNA hulk (Pinkel *et al.*, 1982). Nii saadi esmakordselt täpsed andmed X- ja Y-kromosoomide kandvate spermide erinevuste kohta erinevatelt liikidelt (lambad, lehmad, sead, küülikud) (Garner *et al.*, 1983). Protsessi jaoks pidi spermarakud surmama ja permeabiliseerima, kuna nende visualiseerimiseks kasutatud 4,6-diamidiin-2-fenüülindool (DAPI) fluorestseeruvat värv ei ole võimeline elujõulise raku membraani läbima (Garner ja Seidel, 2008).

Mõned aastad hiljem modifitseeris Johnson *et al.*, 1987 meetodit võttes kasutusele uue fluorestseeruva värvi Hoechst 33342, mis on võimeline läbima tervet rakumembraani. Selle tulemusena jäid spermid protsessi käigus elujõuliseks ning esimene järglane suguselekteeritud spermast sündis 1989. aastal (Johnson *et al.*, 1989). Johnson patenteeris¹ oma meetodi täiustuse 1991. aastal.

Voolutsütomeetria selekteerimise põhimõte seisneb DNA hulga hindamises, mida võimaldab X- ja Y-kromosoomide erinev suurus. Spermaproovi töödeldakse fluorestseeruva märgisega, mis seondub DNA-ga. Voolutsütomeetris suunatakse spermid peenesse joasse üks haaval, kus on oluline ka nende orientatsioon. Laseriga ergastatakse märgis ning detektor hindab kiirguse kogust

¹ United States Patent #5 1991 135:759.

spermaraku lamedalt küljelt. Pulli X-kromosoomi kandval spermil on <4% rohkem DNA-d, ehk sellega seondub ja kiirgab tagasi ka <4% rohkem märgist. Nii hindab masin igat spermarakku individuaalselt ning annab X-spermidele positiivse ja Y-spermidele negatiivse laengu, mille alusel suunatakse rakud kogumistuubidesse (Johnson ja Welch, 1999). Voolutsütomeetri illustratsioon on välja toodud joonisel 4.



Joonis 4. Voolutsütomeetri ülesehitus (B. Fuchs / MPI-MM). Joonisel on kujutatud, kuidas fluorestsentsmärgistatud spermaproov sisestatakse tsütomeetrisse. Esmalt toimub rakkude õige orienteerimine ning üks-ühe taha järjestamine hüdrodünaamilist jõudu ning rõhku kasutades. Vibratsiooniga tagatakse tilgakeste teke. Voolukambris toimub laseri abil ergastamine, detektorid loevad kiirgava signaali ning saadavad selle edasi arvutisse. Arvuti teeb saadud info põhjal otsuse, kas sperm kannab X- või Y-kromosoomi ning saadab vastuse, mille põhjal antakse rakule vastavalt kas positiivne või negatiivne laeng. Laenguga spermarakuga tilk vabaneb ning liigub vastaslaenguga deflektorplaadi suunas kogumistuubi. Laenguta tilgad kukuvad otse jäägituubi (Johnson ja Welch, 1999).

Voolutsütomeetril lahutamine pole kindlasti ideaalne meetod. Võrreldes eelnevalt kirjeldatutega on see üsna karm rakkude vastu. Välja saab tuua neli põhilist stressiallikat: jõud, mida rakendatakse

rakkude orienteerimisel ning liikumine läbi voolukambri ja otsiku; fluorestseeruva värvi ja laseri mõju; elektrilaengu andmine; liikumine elektriväljas. Kõik need mõjutavad tugevalt spermide kvaliteeti ning viljastamisvõimet. Lisaks, suguselekteeritud spermadoosid on kallid ning meetodi läbiviimiseks vajalik aparatuur veel kallim ja patenteeritud, mis tähendab ka kasutuslitsentside ostmist. (Rath *et al.*, 2013).

Üheks suurimaks miinuseks kõrge hinna kõrval on >75% spermarakkude kadu ning pikk protsess. Töökäik algab ejakulaadi ettevalmistamisega – lisatakse antibiootikume ning inkubeeritakse kuni 45 min fluorestseeruva märgise seondumiseks DNA-le. Võttes vaatluse alla voolutsütomeetri, mis selekteerib ideaaltingimustes 90% täpsusega 32000 spermarakku sekundis, siis analüüsi käigus heidetakse kõrvale 3000 rakku kui surnud või vigastatud rakud, 1000 tehnilistel põhjustel (kaks rakku ühes tilgas, kaks rakku liialt lähedal üksteisele vms), 8000 vale paigutuse ja 4000 kindla X- või Y- signaali puudumise tõttu. See teeb tegelikuks sorteeritud rakkude arvuks 16000 sekundis (vastavalt 8000 X-spermi ja 8000 Y-spermi), kuid sellega ei ole tööprotsess veel lõppenud. Igast proovist võetakse materjali ka kontrolli sooritamiseks ning osa jääb aparatuuri ja tarvikute sisse nn. tühja ruumi. Kuna sorteeritud spermaproovid on väga lahjendatud peale selekteerimist tuleb neid tsentrifuugides taas kontsentreerida, mille käigus läheb veel mõni protsent kaduma. Seejärel toimub rakkude pakendamine spermakõrtesse ning hoitakse mitmeid tunde madalal temperatuuril enne lõplikku külmutamist (Seidel, 2014).

Mitmetest negatiivsetest aspektidest hoolimata on antud meetodi suurimaks eeliseks kuni 90% puhtusega suguselektatsioon, mida ükski teine võte siiani pakkuda ei suuda (Yadav *et al.*, 2017). Voolutsütomeeter eemaldab protsessi käigus edukalt ka vigastatud ning surnud spermid andes kvaliteetse saagise. Lisaks on võimalik meetodit rakendada erinevate liikide sperma sorteerimisel. Aastate jooksul on tehtud mitmeid modifikatsioone eelkõige just aparatuuri osas, mis on tõstnud meetodi efektiivsust veelgi (Seidel, 2014). Näiteks, voolutsütomeetri suguselekteerimise kiirus on esialgse 6 milj. rakku/h (Johnson ja Welch, 1999) pealt suudetud tõsta kuni 100 milj. rakku/h. Rakkude väljumisotsikud on uuendatud ning lisatud mitu, mis suurendab masina väljalaset ajas. Samuti on vähendatud laserite intensiivsust (150 mW → 25 mW), rõhku (50 psi → 40 psi) ja fotokordisti müra uue tehnika abil (Rath *et al.*, 2013; Seidel, 2014). Voolutsütomeetria eelised ja puudused on kokkuvõtvalt välja toodud tabelis 3.

Tabel 3. Voolutsütomeetria meetodi eelised ja puudused (Rath *et al.*, 2013; Seidel, 2014 järgi.)

| eelised | puudused |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• väga efektiivne suguselekteerimine• võimaldab suguselektiooni erinevatel liikidel• eemaldab proovist surnud ja vigastatud spermid | <ul style="list-style-type: none">• aega nõudev• väga kallis• karm rakkudele• suur proovi kadu/madal saagis |

1.2. Suguselektiooni kvaliteeti kontrollimine

Esimeste suguselektiooni katsete edukust 1970.–80. aastatel oli keeruline hinnata, kuna puudus spetsiifiline meetod X- ja Y-kromosoomide kandvate spermarakkude identifitseerimiseks. See oli ka põhjuseks, miks eksperimentide tulemused nii laialt varieerusid. Tüüpiliselt kasutati fluorestseeruvat kinakriini, mis UV-valguses helendab. Arvati, et see seondub spetsiifiliselt Y-kromosoomi q-õlale andes mikroskoobis helendava täpikese, millest tulenevalt kutsuti meetodit F-keha testiks (*F body test*) (Barlow ja Vosa, 1970; Flaherty ja Matthews, 1996). F-keha testi kasutati kontrolliks mitmetes *swim-down* meetodi juures mainitud töodes, näiteks Ericsson *et al.*, 1973. 1980. aastate lõpus tõestati, et kinakriin ei ole Y-kromosoomile spetsiifiline ning ei sobi adekvaatseks hindamiseks (Flaherty ja Matthews, 1996).

Tänapäeval on kasutusel kolm põhilist viisi selektioonikatse valideerimiseks: 1) kordusanalüüs; 2) PCR; 3) FISH.

Kordusanalüüsi kasutatakse eelkõige voolutsütomeetria puhul, kuna meetodi usaldusväärsust on tõestatud juba arvukatel kordadel. Kontrolliks võetakse osa sorteeritud spermast ning sonikeeritakse. Sonikeerimise põhjus on vabaneda spermasabadest, mis valdavalt põhjustavad rakkude ebakorrekse paigutuse tsütomeetris. Proov värvitakse uuesti fluorestseeruva määrgisega, et kindlustada seondumine kõikidele rakkudele ning sorteeritakse veelkord. Võrreldes teiste kontrollmeetoditega on see kõige kiirem, kuid nõuab siiski mitmete etappide läbiviimist. Suurimaks negatiivseks küljeks on saagise kulutamine niigi suure kaoga meetodil puhul (Johnson ja Welch, 1999).

Kontrollil PCR meetodiga kasutatakse soospetsiifilisi DNA proove ning saadud tulemusi loetakse sama usaldusväärseteks kui kordusanalüüsil. PCR puuduseks on pikk analüüsi aeg (Espinosa-Cervantes ja Córdova-Izquierdo, 2012), mis on lahenduse saanud reaalaja PCR näol. Uue lähenemise pakkus välja uurimisrühm Itaalias, näidates, kuidas X- ja Y-kromosoomide spetsiifilisi primereid ja märgiseid kasutades saab reaalajas hinnata sorteerimise tulemust 98.9% täpsusega (Parati *et al.*, 2006).

FISH on samuti väga täpne meetod rakkude sugukromosoomide tuvastamiseks ning seda on kasutatud ka antud töö raames läbiviidud katsete kontrolliks. Meetodikat kirjeldati esimest korda aastal 1969 ja selle põhimõte seisneb märgistatud DNA proovi hübridiseerimisel sihtmärkjärjestuse külge kromosoomil, mida saab seejärel mikroskoobis vaadelda. Valenegatiivsete tulemuste vältimiseks peaks kasutama nii X- kui Y-kromosoomi märgiseid. Erinevalt teistest kordusanalüüsi meetoditest on sellega määratav ka kromosoomide aneuploidia (Pardue ja Gall, 1969; John *et al.*, 1969; Flaherty ja Matthews, 1996). FISH on neist kolmest meetodist kõige aeganõudvam tunde kestva inkubatsiooni tõttu (Welch ja Johnson, 1999).

1.2.1. FISH märgistatud proovide loomine

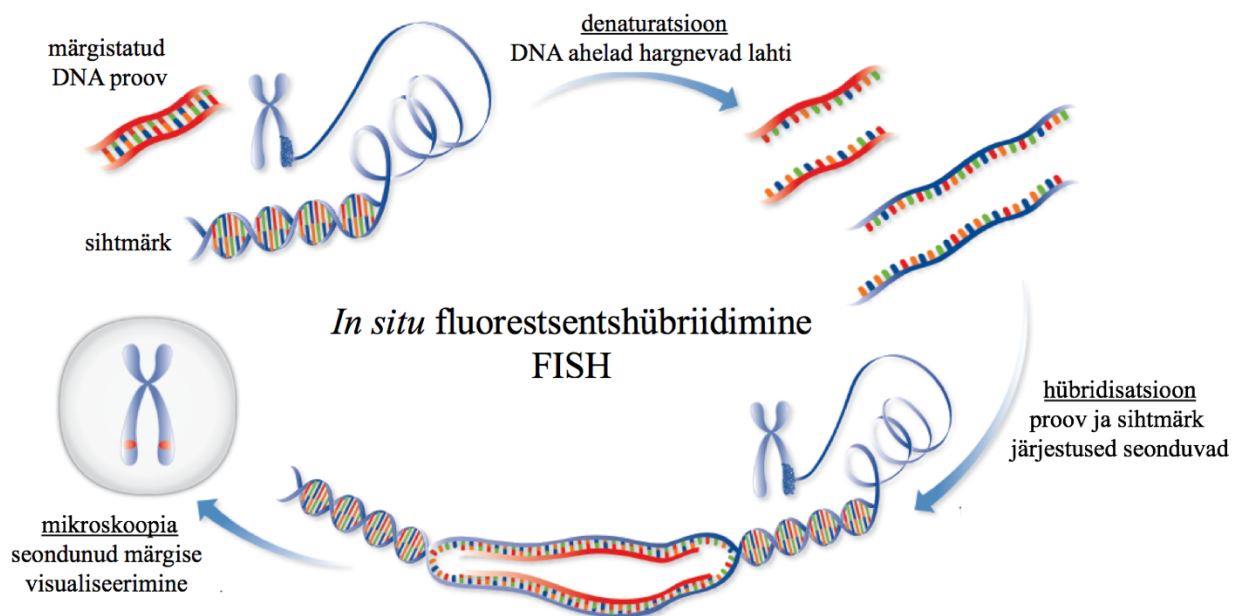
In situ hübridisatsiooni kasutatakse DNA järjestuste asukoha määramiseks kromosoomides. Meetod põhineb printsiibil, et kaheaahelaline DNA denatureerub kuumutamisel üheaahelaliseks ning moodustab temperatuuri langetamisel taas kaheaahelalise struktuuri. Kui protsessi lisada märgistatud DNA proove, seonduvad need komplementaarsetele piirkondadele uuritaval kromosoomil ning märgiseid on võimalik mikroskoobis tuvastada (Ferguson-Smith, 2001). FISH meetodi üldine skeem on välja toodud joonisel 5.

FISH meetodi kasutamiseks on esmalt vaja luua DNA proovid. Prooviks on üheaahelaline järjestus, mis omab suurt afiinsust sihtmärk järjestusega. Proov ja sihtmärk peavad olema komplementaarsed, kuid teatud tingimustel on lubatud mõningane kõrvalekalle. Proovide disainimisel on oluline, kui pikki sihtmärke otsitakse – geenide märgistamise korral on proovid tavaliselt üle 500 nukleotiidi pikkused, lühemate järjestuste puhul kasutatakse oligonukleotiide, tüüpiliselt 18-50 alust. Proovide saamiseks võib kasutada kloonimist või, tänapäeval rohkem eelistatult, PCR meetodit, mis võimaldab järjestuste amplifitseerimist ja märgistamist samaaegselt.

Oligoproovide puhul peab paardumine sihtmärkjärjestusega olema täielik ning piisavalt spetsiifiline, et vältida seondumist teistele sarnastele piirkondadele. Proovide disainimisel peaks jälgima juhtnööre:

- Proovi pikkus peaks jääma vahemikku 18 kuni 50 nukleotiidi. Pikad järjestused hübriidiseerivad kaua ja sünteesi saagis on madal, lühikesed proovid võivad seonduda mittespetsiifiliselt.
- Nukleotiidne G-C koostis peaks olema 40%-60%. G-C paaride vahel olevad 3 vesiniksidet on rohkem stabiilsemad ning risk mittespetsiifiliseks hübriidisatsiooniks on väiksem.
- Proovi sees ei tohiks olla komplementaarseid piirkondi, mis moodustaksid juuksenõela struktuure².
- Vältida ühe nukleotiidi pikki kordusjärjestusi proovis.

Järjestuste disainimiseks on mitmeid programme loodud, mis lisaks nimetatud punktidele kontrollivad ka homologsete regioonide olemasolu väljaspool sihtmärk regiooni (Aquino de Muro, 2008).

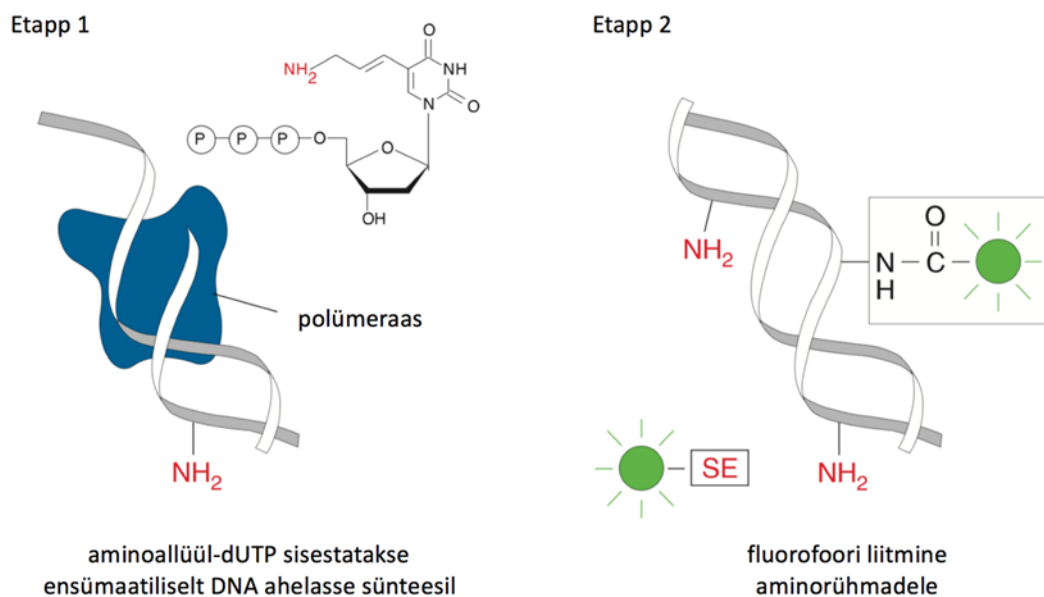


Joonis 5. FISH meetodi ülevaade (www.cytocell.com järgi).

² inglise keeles “hairpin structures”

Esimestes ISH katsetes 1970 aasta alguses kasutati proovide märgistamiseks radioaktiivseid isotoope (^3H , ^{125}I jt.), mida visualiseeriti autoradiograafiliselt (Ferguson-Smith, 2001). Tänapäeval kasutatakse eelkõige mitteradioaktiivseid märgiseid (biotiin, fluorofoorid, antikehad jt.) kuna need on ohutumad, stabiilsemad proovi jaoks ning märgistamise protsess ja signaali detekteerimine on lihtsam ja ajaliselt kiirem (Aquino de Muro, 2008).

Proovide märgistamise viise saab jagada otseseks ja kaudseks. Esimesel juhul on fluorofoor keemiliselt otse seotud proovi nukleiinhappe järjestusele ning hübriidsatsiooni tulemus on koheselt visualiseeritav. DNA otsene märkimine võib olla nii üheetapiline, kus modifitseeritud nukleotiidid on lisatud proovi ahelasse sünteesi käigus, kui ka kaheetapiline, mille puhul sisestatakse sünteesil teatud funktsionaalset rühma (näiteks, aminoallüüli) kandvad nukleotiidid, millele seejärel liidetakse fluorestsentsmärgis. Protsessi kirjeldab joonis 6 ning antud lähenemist on kasutatud ka käesoleva töö eksperimentaalses osas. Kaudsel viisil on proov seotud mittefluorestseeruva molekuliga, tavaliselt biotiin või hapteen, mis hübriidsatsiooni järgselt seotakse fluorestseeruva märgisega. Mõlema lähenemise puhul saab tuua välja plusse ja miinuseid – kui otsene märgistamine on tunduvalt kiirem vähemate töötappide tõttu, siis kaudne märgistamine annab läbi antikehade kasutamise võimaluse kasutada mitmeid erinevaid märgiseid sama aegselt (Morrison *et al.*, 2002).



Joonis 6. Kaheetapiline DNA proovide aminoallüülmärgistamine (Thermo Fisher Scientific Molecular Probes Handbook järgi)

1.3. VEREP projekti ülevaade

Antud magistritöö katsed on läbi viidud teadusprojekti 8F160059VLBS “Veise seemnerakkude suguselektsiooni- ja viljakustehnoloogiate arendus” (akronüüm *VEREP*) raames. *VEREP* projekti eestvedajaks on Eesti Tõuloomakasvatajate Ühistu (ETKÜ) ning koostööpartneriteks Eesti Maaülikool (EMÜ), Tervisetehnoloogiate Arenduskeskus (TerviseTAK), Tartu Ülikool (TÜ) ja Rootsi Põllumajandusteaduste Ülikool.

VEREP projekt on põllumajanduse biotehnoloogia valdkonna projekt, mille eesmärgiks on läbi ettevõtete ja teadusasutuste koostöö suurendada Eesti põllumajandussektori konkurentsivõimet luues uusi ning innovaatilisi tooteid ja teenuseid. Projekti peamisteks eesmärkideks on uudse suguselektsiooni tehnoloogia ning sperma kvaliteeditesti väljatöötamine. Eesmärgid ja tegevused on jagatud nelja alaprojekti vahel.

Käesolev magistritöö põhineb alaprojekt 4, mille eesmärgiks on veise sperma sooselektsioonitehnoloogia ja kvaliteeditesti valideerimine. Keskendutakse spermide tihedusgradiendis tsentrifuugimise meetodi väljaarendamisele, mis oleks odavaks alternatiiviks hetkel kasutusel olevale viisile ning sobiks värskete ja suure koguse ejakulaatide töötlemiseks. Oodatav kallutatus valitud sugupoole suhtes on vähemalt 10%. Samuti hinnatakse meetodi juures saagikust rakkude kontsentratsiooni, kvaliteedi ja eluvõime suhtes. Suguselektsiooni kontrolliks kasutatakse FISH uuringut ning kavandatakse välja töötada märgised veise X-kromosoomi tuvastamiseks spermides.

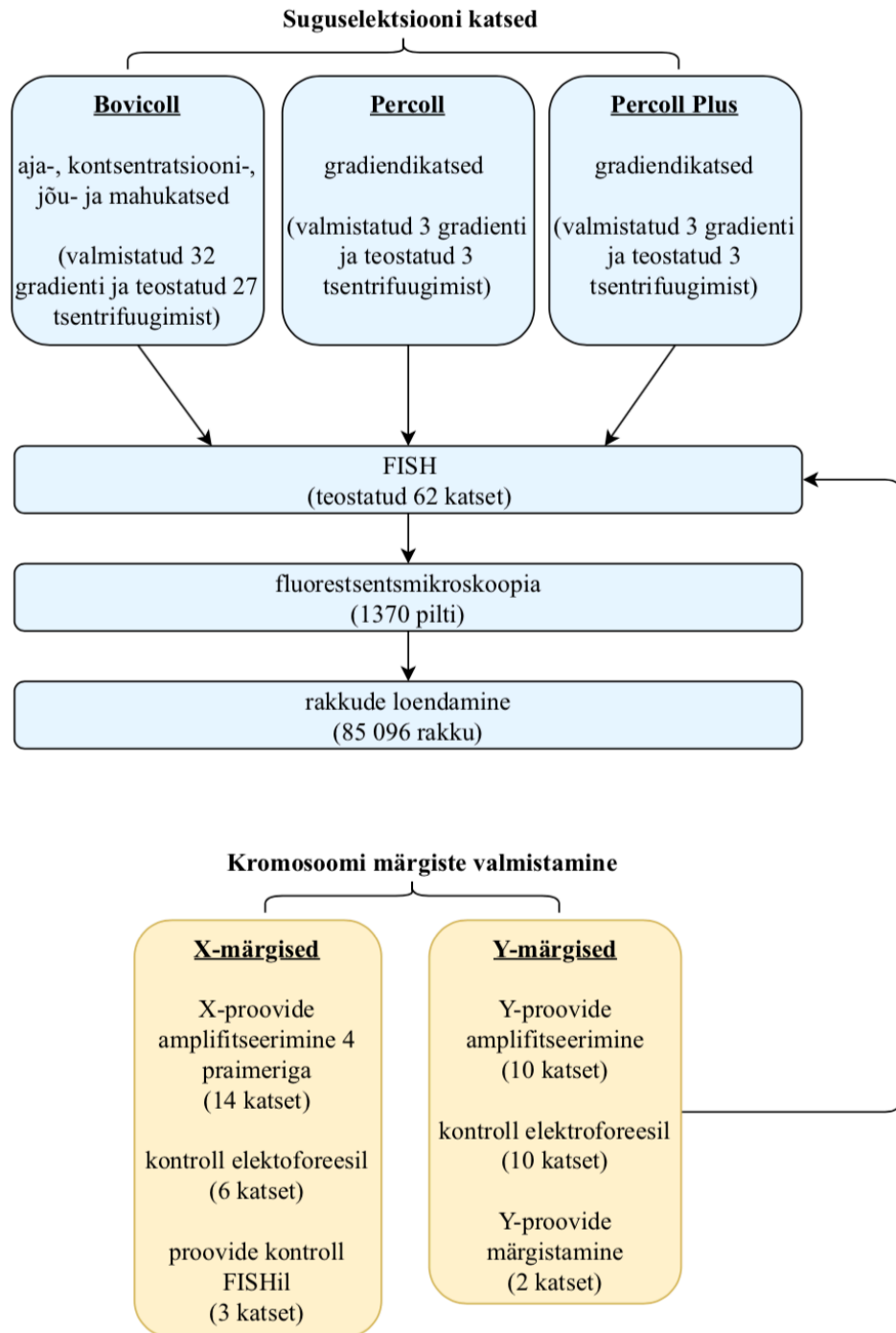
2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

1. Modifitseerida Bovicoll kolloidlahuses tsentrifuugimise meetodit, mis lubaks kallutada veise X- ja Y-kromosoome kandvate spermarakkude osakaalu.
2. Luua proovid veise X-kromosoomi kandvate spermarakkude tuvastamiseks FISH meetodil.

2.2. Materjal ja metoodika

Kõik eksperimentaalses kirjeldatud katsed on sooritatud toatemperatuuril, kui ei ole mainitud teisiti.



Joonis 7. Eksperimentaalse töö etapid koos sooritatud katsete arvuga.

2.2.1. Tiheduskolonnide valmistamine

Katseid viidi läbi kolme erineva lahutuskolloidiga – Bovicoll, Percoll[®] ja Percoll[®] Plus (GE Healthcare). Bovicoll ja selle erinevate kontsentratsioonide valmistamiseks vajalik lahjenduspuhver telliti lahuste leiutaja, prof. Jane Morrelli laborist, Rootsi Põllumajandusteaduste Ülikoolist, Uppsalast. Kolloidlahused valmistati ühe- ja mitmeastmeliste kolonnidena 15 ml või 50 ml mahuga katsetuubidesse. Erinevad kolloidide kontsentratsioonid (40%–90%) segati kokku steriilsetes tingimustes ning lahjendused saavutati spetsiaalsete puhverlahuste abil. Katsetel kasutatud erinevad üheastmelised tiheduskolonnid olid järgmised:

- 10 ml 90% Bovicoll kolloidlahus
- 10 ml 80% Bovicoll kolloidlahus
- 10 ml 70% Bovicoll kolloidlahus
- 10 ml 80 % Percoll[®] kolloidlahus
- 10 ml 80% Percoll[®] Plus kolloidlahus

Mitmeastmeliste kolloidlahuste kolonnide puhul tehti soovitud lahjendused eelnevalt valmis ning pipeteeriti seejärel aeglaselt üksteise peale vältides kihtide segunemist. Kasutati 15 ml katsetuube, kus astme mahuks oli 1-1,5 ml või 50 ml katsetuube, kus astme mahuga 2,9-7,1 ml. Kolloidlahuste astmete kontsentratsioon alati kasvas tuubi põhjapoole liikudes. Katsetel kasutatud erinevad mitmeastmelised tihedusgradiendid on välja toodud tabelis 4.

Tabel 4. Kasutatud mitmeastmelised tihedusgradiendid

| astmete arv | astmete kontsentratsioonid | kolloid | kolloidimaht ml | astme maht ml |
|-------------|---|---------------------------|-----------------|---------------|
| 7 | 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% | Bovicoll | 10,5 | 1,5 |
| | | | 20,3 | 2,9 |
| | | | 30,1 | 4,3 |
| | | | 39,9 | 5,7 |
| | | | 49,7 | 7,1 |
| | | Percoll [®] | 7 | 1 |
| | | | 10,5 | 1,5 |
| | | Percoll [®] Plus | 7 | 1 |
| | | | 10,5 | 1,5 |

2.2.2. Suguselektsioonikatsed

Suguselektsiooniks kasutatud sperma pärines Eesti Töuloomakasvatavate Ühistust ning kõik katsed viidi läbi värskes spermaga, mis oli kogutud katsesooritamise päeval. Spermarakkude kontsentratsioon mõõdeti ETKÜ-s. Ejakulaat lahjendati kontsentratsioonini 200×10^6 rakku/ml kasutades selleks Triladyl'i lahust (Minitüb GmbH&CO). Erandiks olid vaid katsed erinevate Bovicoll gradientide mahtudega, kus tehti lahjendus 800×10^6 rakku/ml. Kasutatud ejakulaatide andmed on välja toodud lisas 1.

Peale spermaproovide lahjendamist vajaliku kontsentratsioonini, pipeteeriti 1 ml aeglaselt mööda tuubi seina ettevalmistatud kolloidlahusele peale hoides katsetuubi kallutatuna umbes 45° nurga all. Sellest hetkest välditi tuubi liigset loksutamist ja raputamist, et lahutuskolloidi ja sperma kihid tahtmatut ei seguneks ning asetati ettevaatlikult tsentrifuugi. Kõik tsentrifuugimised teostati Sigma 4K15C tsentrifuugiga, mille seaded on välja toodud lisas 2. 0,1 ml lahjendatud spermaproovi eraldati alati katsete kontrolliks.

Katsetel varieeriti tsentrifuugimise pikkust 10 – 30 min (5 min sammuga) ning rakendatavat jõudu $200\text{--}400\times g$ ($50\times g$ sammuga). Kõik sooritatud suguselektsiooni katsed on kirjeldatud lisas 3. Vahetult pärast tsentrifuugimist korjati 0,1 ml proovi tuubi põhjast ning mõne gradiendi puhul ka 70% piirkonnast, et hinnata X- ja Y-spermide lahutamise edukust. Ühel katsel 7-astmelise Bovicoll gradiendiga korjati proove iga astme juurest, et vaadelda kolonni lahutusvõimet gradiendiastmete kaupa.

Katsetulemuste hindamiseks ja FISH meetodi ettevalmistamiseks fikseeriti kogutud proovidest rakud mikroskoobi alusklaasidele. Töö põhineb Sarrate ja Anton, 2009 protokollil, mis on laboris eelnevalt modifitseeritud T. Kitsemetsa poolt ning koosnes järgnevatest etappidest:

1. Kogutud 0,1 ml proovidele lisati 1 ml PBS, segati kergelt vorteksil ning tsentrifuugiti (Heraeus instruments Biofuge Pico) 5 min 4500 pööret/min juures, peale mida eemaldati supernatant. Sellega vabaneti liigsest kolloidist ja kontsentreeriti spermarakud.
2. Rakkude hüpo-osmootseks töötamiseks lisati 1 ml $0,075$ M KCl ning soojendati 30 min 37°C juures. Seejärel tsentrifuugiti 5 min 4500 pööret/min juures ning taas eemaldati supernatant.

3. Rakkude fikseerimiseks kasutati metanooli ja äädikhappe (Naxo) lahust vahekorraga 3:1, mis valmistati ette katse sooritamise päeval. 1 ml fikseerimislahust tilgutati aeglaselt spermarakkudele peale hoides katsetuubi samaaegselt vorteksil. Tsentrifugeeriti 5 min 4500 pööret/min juures ning eemaldati supernatant. Antud punkti korrati 3 korda.
4. Mikroskoobi alusklaasidel (Sigma-Aldrich) lasti vähemalt üks ööpäev seista 100% metanooli sees -20°C juures ning katse teostamise päeval pandi tõmbekappi kuivama. Alusklaasile kanti tilk fikseeritud spermaproovi ning rakkude tihedust hinnati visuaalselt Nikon Eclipse TS100 faaskontrast mikroskoobiga. Rakkude liialt suure tiheduse korral (rakud katsid üksteist, suured tihedad kogumikud) lisati lahjendamiseks juurde fikseerimislahust, kui rakkude tihedus oli liialt madal, lisati alusklaasile teine tilk proovi.
5. Spermarakkudega alusklaasidel lasti kuivada tõmbekapis ning asetati seejärel -20°C juurde vähemalt üleöö.

2.2.3. FISH analüüs suguselektsioonikatsete hindamiseks

Suguselektsiooni katsete edukuse kontrolliks kasutati eelnevalt laboris edukalt välja töötatud veise Y-kromosoomide märgiseid. Fluorestsents *in situ* hübridisatsiooni läbiviimiseks kasutati Habermann *et al.*, 2005 ilmunud protokoll, mida on laboris eelnevalt modifitseeritud T. Kitsemetsa poolt ning koosnes järgnevatest etappidest:

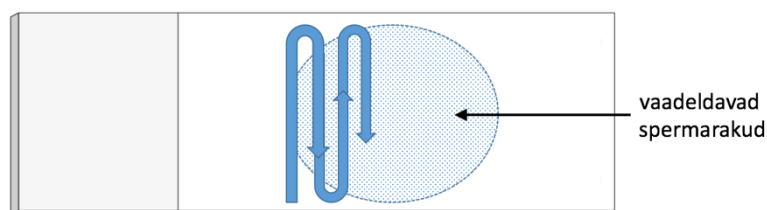
1. Spermarakkudega alusklaasid võeti -20°C juurest toatemperatuurile sulama ning klaasi tagaküljelt märgistati rakkude paiknemine.
2. Rakkude hübridiseerimise ettevalmistamiseks pipeteeriti märgistatud alale alusklaasil 0,7 ml 3 M NaOH ning kaeti 5 min katteklaasiga (VWR).
3. NaOH pesti preparaatidelt maha kastes neid järjestiku neljas dH₂O täidetud Coplini anumad.
4. Preparaatide dehüdraatimiseks hoiti neid kasvavas järjestuses 70%, 85% ja 96% etanoolilahustes 2 min ning seejärel kuivatati õhu käes.
5. Märgistatud DNA proovid (märgistuste tegemist vt. peatükist 2.2.5) valmistati ette lisades neile 10 μl hübridisatsiooni puhvrit, mis sisaldas 50% formamiidi, 1 \times SSC ja 10% dekstraansulfaati. Proov suspendeeriti hübridisatsioonipuhvrts ja hoiti pimedas 5 min 80°C juures.

Edasised sammud teostati hämaras ruumis või piirati muul moel valguse ligipääsu, et vältida fluorestseeruvate märgiste tuhmumist.

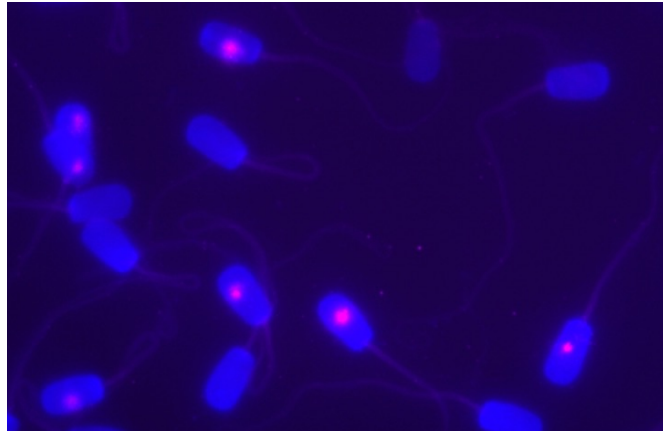
6. Kogu 10 µl märgistatud DNA proov kanti preparaadi rakkudega alale ning kaeti katteklaasiga. Katteklaasi ääred suleti õhukindlalt kummiliimiga ning lasti täielikult kuivada.
7. Preparaadid asetati 16–20 tunniks MJ Research Inc PTC-100 termoplokki 37°C juurde. Niiskuse säilitamiseks lisati dH₂O.
8. Peale inkubatsiooni pesti preparaate 62°C juures 5 min eelsoojendatud 0,1×SSC lahusega. Pesu teostati 2 kordusena, mille järel kuivatati preparaadid gaasilise lämmastiku joas.

2.2.4. Fluorestsentsmikroskoopia

Mikroskoopia ettevalmistamiseks värviti spermarakkude tuumad kasutades 100× DAPI (Sigma-Aldrich) värvi lahjendust 30% glütseroolis. Igale preparaadile lisati 50 µl lahjendatud DAPI ning kaeti katteklaasiga. Kõikidel katsete visualiseerimiseks kasutati Olympus BX61 fluorestsentsmikroskoopi. Preparaatidel liiguti vertikaalselt mittekattuvate vaateväljadena (joonis 8) ning pildistati Olympus XM10 kaameraga samalt positsioonilt nii DAPI kui ka Cy3 ergastusspektris (lisa 4). Igast preparaadist tehti 20-50 pilti valdavalt keskosast, valides selge signaali ja hea rakkude tihedusega piirkondi. Piltide töötlemiseks kasutati Olympus CellSense tarkvara. Piltidelt Y-kromosoomi märgistusega positiivsete ja negatiivsete rakkude loendamine toimus nn. käsitsi arvuti ekraanilt. Joonisel 9 on toodud näide fluorestsentsmikroskoopia töödeldud pildist.



Joonis 8. Mikroskoopias preparaadil liikumine.



Joonis 9. Fluorestsentsmikroskoopia pilt spermaproovi märgistamisel FISH meetodiga (1000× suurendus). Fluorestseeruva roosa signaaliga rakke loeti Y-kromosoomi kandvateks spermarakkudeks, ilma signaalita Y-kromosoom negatiivseteks.

2.2.5. X- ja Y-kromosoomi spetsiifiliste proovide valmistamine

Teadusprojekti 8-2/T12188VLBS “Pulli seemnerakkude soospetsiifiliste markerite identifitseerimine reproduktiivveterinaarias” (akronüüm *BOSS*) raames on laboris varasemalt välja töötatud pulli Y-kromosoomi spetsiifilised proovid. Nende valmistamisel järgiti olemasolevat protokollit ning kasutati käesolevas töös suguselektsioonikatsete tulemuste hindamiseks.

Y- ja X-kromosoomi spetsiifiliste proovide (edaspidi vastavalt Y- ja X-proovid) loomiseks kasutatud DNA pärines ETKÜ-lt saadud pulli verest (DNA eraldas M. Külaots). Proovide amplifitseerimiseks PCR meetodil kasutati dGTP, dCTP, dATP, dTTP nukleotiidide segu, millele lisati aaUTP suhtega 1:2 dTTP-le (Thermo Fischer Scientific).

Y-proovide amplifitseerimiseks kasutatud praimerite järjestused on välja toodud lisas 5. Valmistatud PCR segus kasutati DNA polümeraasi FirePol (Solis BioDyne) ning on detailselt kirjeldatud tabelis 4. Katse viidi läbi MJ Research PTC-200 PCR masinal, kasutatud programm on lisas 6.

X-kromosoomi proovide loomiseks teostati katseid 4 erineva praimeriga – XCRa3, XCRb5, XCRb6 ja XCRb7, mis amplifitseerivad veise X-kromosoomilt DNA järjestusi pikkustega 203-

246 bp³. Praimerid disainis biotehnoloogia laborispetsialist Olavi Reinsalu, kasutades veise genoomi andmebaasi (*Bovine genome database*). Veise genoomi andmetest otsiti kordusjärjestusi, mis oleksid unikaalsed veise X-kromosoomile, eelistades unikaalseid satelliitkorduseid. Valitud järjestused kontrolliti BLAST-is.

XCRa3, XCRb5 ja XCRb7 PCR reaktsioonisegu on välja toodud tabelis 5). XCRb6 praimeri puhul kasutati PCR segus DNA HotPol (Solis BioDyne) polümeraasi ning lisati ddH₂O arvelt 2 µl DMSO. Amplifitseerimiseks kasutatud programmid on välja toodud lisa 7, 8, 9.

Tabel 5. PCR segu ühele reaktsioonile (mahuga 20 µl)

| reagent | kontsentratsioon | maht |
|--------------------------|------------------|-------------------|
| ddH ₂ O | - | X µl ⁵ |
| puhver B (Solis BioDyne) | 1 × | 2 µl |
| MgCl ₂ | 1,5 mM | 1,2 µl |
| 1:2 dNTP segu | 0,3 µM | 3 µl |
| F+R praimer | 0,75 µM | 3 µl |
| DNA | 50 ng | X µl ⁴ |
| polümeraas | 1 U/µl | 0,3 µl |
| DSMO ⁵ | - | 2 µl |

PCR reaktsiooni tulemuste kontrollimiseks valmistati 2,5% agarosgeel (100 ml 0,5 M TBE lisati 2,5 g agarosi (Naxo) ja 3 µl etiidiumbromiidi) ning teostati elektroforees. Markeriks kasutati alati 1 kb O'GeneRuler DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific).

Amplifitseeritud DNA proovid puhastati PCR Clean-up komplekti abil (MACHEREY-NAGEL) ning kuivatati vaakumkondensaatoris.

³ kuna *VEREP* projekt on antud magistritöö avalikustamise hetkel kestev, siis disainitud praimerite järjestused avalikustamisele ei kuulu

⁴ DNA lahuse maht sõltus DNA algkontsentratsioonist ning lisatava vee maht omakorda DNA mahust

⁵ ainult XCRb6 PCR reaktsioonisegu puhul

Amplifitseeritud proovide värvimine Cy3 fluorofooriga

Protokoll põhineb Dirsch *et al.*, 2007 ja Hoen *et al.*, 2003 poolt avaldatud töödel, mida modifitseeris laboris T. Kitsemets. Töö etapid olid järgmised:

1. 0,1 M N_2CO_3 (pH 9) kuumutati 15 min 60°C .
2. Vaakumkondensaatoris kuivatatud proovid suspendeeriti 4,5 μl 0,1 M N_2CO_3 .

Edasised sammud teostati hämaras või piirati muul moel valguse ligipääsu proovidele.

3. Fluorestseeruva värvina kasutati Cy3, mida lisati proovile 4,5 μl ning inkubeeriti 1 tund, segades iga 15 min järel kergelt vorteksil.
4. Seondumata värvi kustutamiseks lisati 3,5 μl 4M H_2NOH ning hoiti 15 min pimedas.
5. Proovile lisati 35 μl 0,1 M NaOAc (pH 5,1).
6. Üleliigse värvi puhastamiseks kasutati PCR Clean-up komplekti (MACHEREY-NAGEL).

Peale puhastamist mõõdeti fluorestseeruva märgise seondumise edukust NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific), kasutades tootjapoolset tarkvara programmi MicroArray. Fluorestseeruva märgise seondumise edukuse hindamiseks arvutati proovi spetsiifiline aktiivsuse näitaja (PSA):

$$PSA = \frac{\text{värvi hulk } \left(\frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}}\right)}{\text{DNA hulk } \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}\right)} \quad (\text{Redon et al., 2009}).$$

PSA järgi jagati DNA märgistatud proovid alikvootideks vastavalt tabel 6 järgi, millel puhul lähtuti, et üks alikvoot oleks piisav ühe spermapreparaadi märgistamiseks. Proovid kuivatati vaakumkondensaatoris ning hoiustati hübridisatsiooni katseteks -20°C juures.

Tabel 6. Kromosoomispetsiifiliste proovide jagamine vastavalt PSA väärtusele.

| PSA | DNA hulk alikvoodis |
|----------|------------------------|
| ... < 25 | ebapiisav märgise tase |
| 25 – 35 | 1000 ng |
| 35 – 50 | 500 ng |
| 50 < ... | 300 ng |

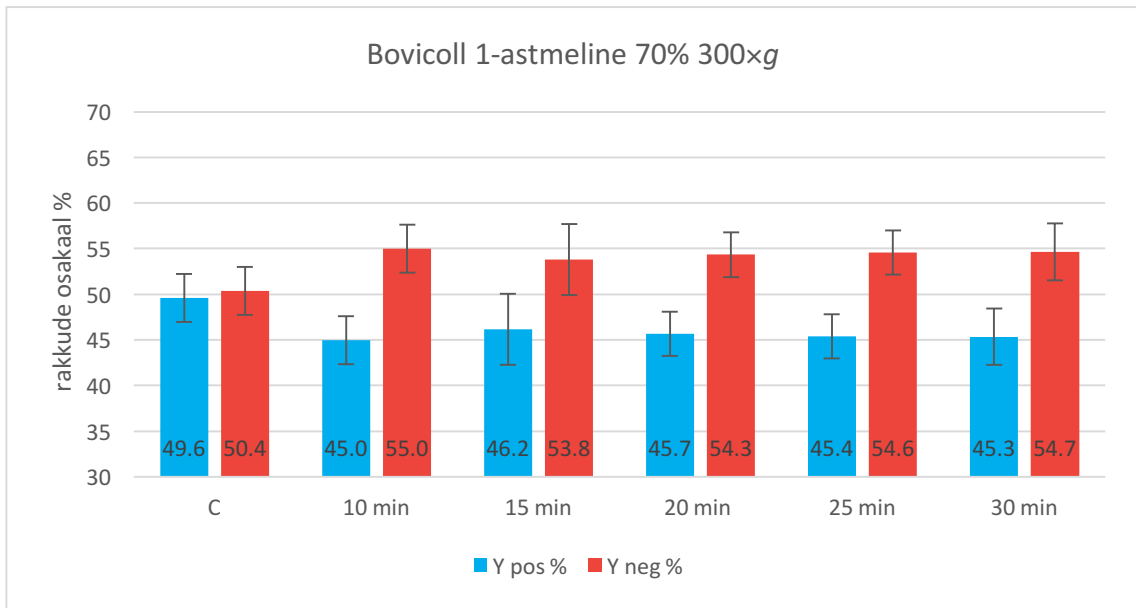
2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Suguselektsoonikatsed üheastmelises Bovicoll lahutuskolonnis

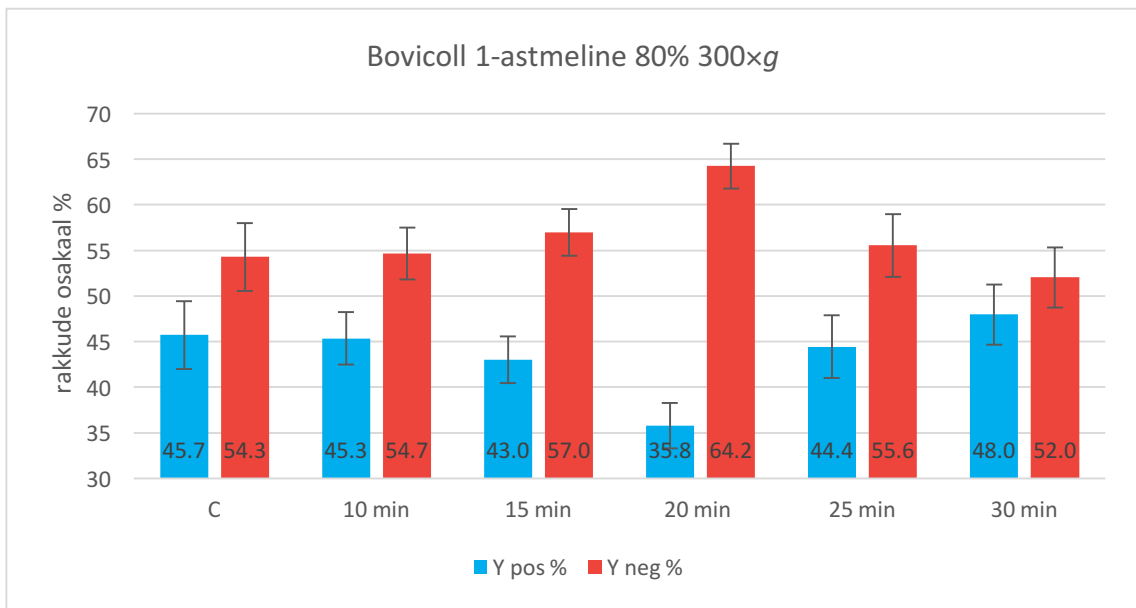
Suguselektsooni katsetel keskenduti eelkõige Bovicoll kolloidi üheastmelistele kolonnidele. Eesmärgiks oli leida meetod, mis oleks olemuselt võimalikult lihtne. Mitmete erinevate kolloidi kontsentratsioonide valmistamine, ettevaatlikult üksteise peale pipeteerimine on tülikas ning aeganõudev, lisaks võimaldab üheastmeline lahutuskolonn töödelda korraga suuremat sperma hulka kui mitmeastmeline kolonn (Morrell *et al.*, 2016). Meetodi optimaalsete tingimuste leidmiseks, mille korral X- ja Y-spermide osakaalu kallutatus saagises oleks võimalikult suur, testiti läbi erinevaid kolloidi kontsentratsioone, tsentrifugimise aegu ning sellel rakendatavat tsentrifugaaljõudu.

Lahutuskolloidi kontsentratsiooni ja tsentrifugimise aja vahelisi võrdlusi viidi läbi kasutades kolme erinevat kolloidi kontsentratsiooni – 70%, 80% ja 90%, mille juures varieeriti tsentrifugimise aega 10-30 minutini 5 minutilise sammuga. Üheastmelise 70% kontsentratsiooniga Bovicoll kolonniga tsentrifugimisel saadud tulemused olid küllaltki sarnased hoolimata tsentrifugimise aja varieerimisest (joonis 10). 15, 20, 25 ja 30 minutiliste tsentrifugimiste juures langes Y-spermarakkude osakaal saagises vähesel määral järjepidevalt, muutudes 46,2% ($\pm 3,9\%$) osakaalu juurest 45,3% ($\pm 3,1\%$). Kõige suurema kallutatuse X- ja Y-spermide vahel saavutati 10-minutilise tsentrifugimise ajaga katses, kus X-spermide osakaal tõusis kontrolliga võrreldes 4,6% ($\pm 2,6\%$). Kontrollis oli oodatav 1:1 suhe X- ja Y-rakkude vahel.

80% Bovicoll kolonni kasutades saadi tsentrifugimisel suuresti varieeruvaid tulemusi (joonis 11). Katse kontroll näitas juba väikese kallutatuse X-kromosoomi kandvate spermarakkude poole (54,3% $\pm 3,7\%$). 10, 15 ja 25 minutilised tsentrifugimised andsid kerge (0,4-2,7% $\pm 3,0\%$) osakaalude muutuse X-spermide kasuks. Positiivne tulemus töö eesmärke täitval määral saadi 20 minutilise katse korral, kus suudeti X- ja Y-rakkude suhet muuta 10% võrra.

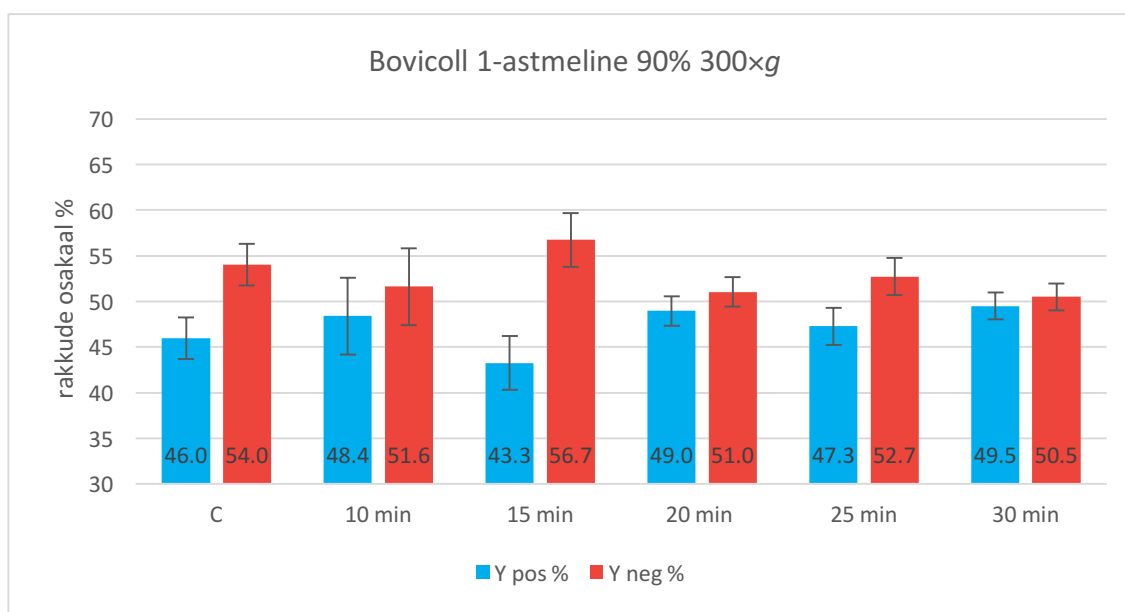


Joonis 10. Suguselektsioonikatse 1-astmelise 70% kontsentratsiooniga Bovicoll kolloidiga 300xg juures kasutades erinevaid tsentrifugimise aega. “C” joonisel tähistab antud katse kontrollväärtuseid.



Joonis 11. Suguselektsioonikatse üheastmelise 80% kontsentratsiooniga Bovicoll kolonniga 300xg juures kasutades erinevaid tsentrifugimise aega. “C” joonisel tähistab antud katse kontrollväärtuseid.

90% Bovicoll kolonniga teostatud ajakatses spermarakkude suguselektiooni arvestaval määral ei saavutatud (joonis 12). X- ja Y-rakkude osakaalude muutus oli väike ning võrreldes kontrolliga, oli kallutatud saagises isegi Y-spermide kasuks. Erandiks 15 min katse, kus saadi 2,7% ($\pm 2,9\%$) X-spermarakkude ülekaal kontrollist. Nii 80% kui ka 90% kolloidi kontsentratsiooniga katsete puhul on näha, kuidas suurem rakkude osakaalu nihe on saavutatav pigem lühemate tsentrifugimisaegade rakendamisel. Pikema aja vältel tugevamal jõul tsentrifugides (300×g 30 min) hakkab tiheduskolloidi X- ja Y-spermide separatsiooni võime kaduma ning vahetult tasakaalustuma.

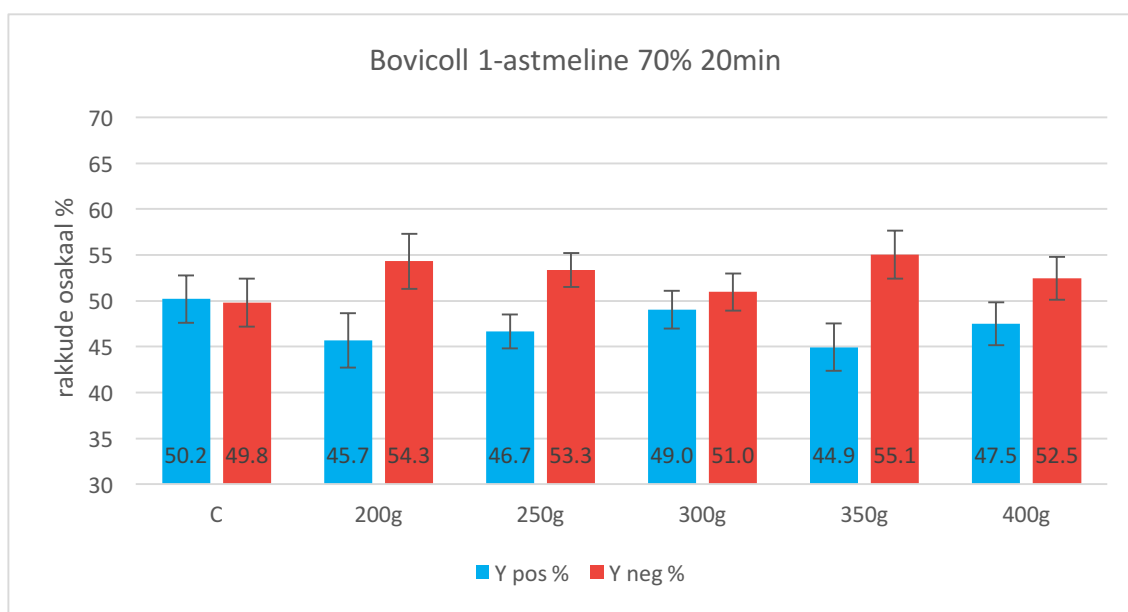


Joonis 12. Suguselektioonikatse 90% kontsentratsiooniga Bovicoll kolonniga 300×g juures erinevatel tsentrifugimise aegadel. “C” joonisel tähistab antud katse kontrollväärtuseid.

Bovicoll 80% ja 90% kontsentratsiooniga ajakatsedel täheldati suuremat X-spermide osakaalu juba kontrolliproovides. X- ja Y-kromosoomi kandvate spermarakkude 1:1 suhe on teoreetiline ning võib praktikas suuresti varieeruda. Kallutatust on täheldatud paljude liikide puhul ja eelkõige just X-kromosoomi ülekaalu poole. Veise sperma puhul on näidatud keskmist kõrvalekallet teoreetilisest ~5% ulatuses, kuid on raporteeritud juhte, kus üle 70% rakkudest ejakulaadis on X-spermid (Chandler *et al.*, 1998; Szyda *et al.*, 2000). Käesoleva töö kõikide kontrollproovide X- ja Y-spermarakkude suhted jäi keskmise varieeruvuse ($50\% \pm 5\%$) vahemikku.

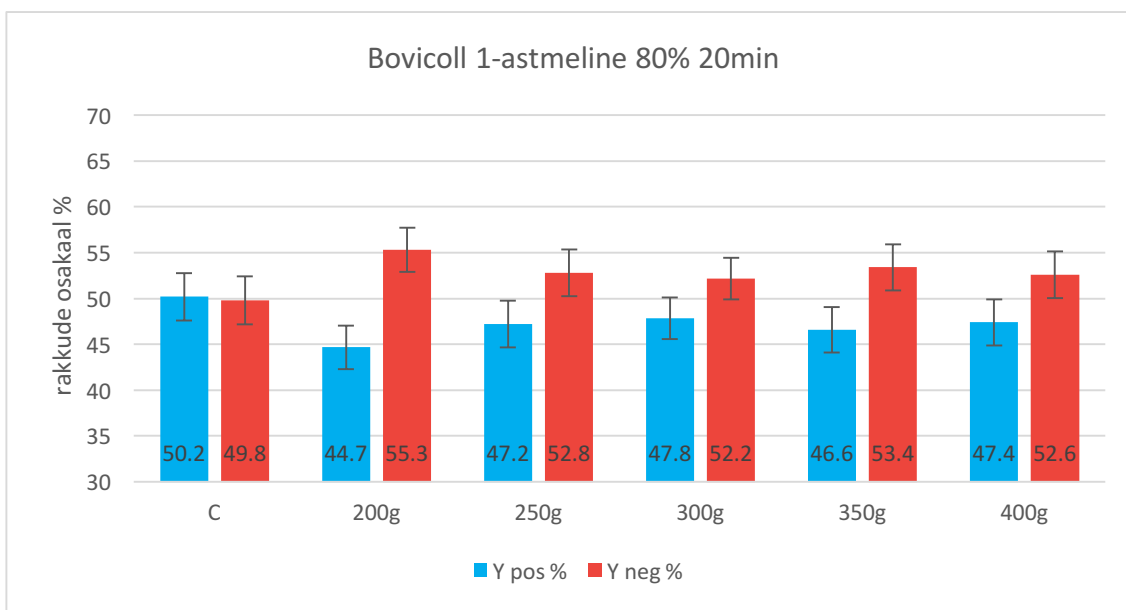
Tsentrifugaaljõu ja kolloidi kontsentratsiooni omavahelise mõju uurimiseks spermarakkude selektsioonile teostati 70%-90% kontsentratsiooniliste Bovicoll kolonnidega katseid varieerides jõudu 200-400×g sammuga 50×g. Eelnevalt teostatud aja ja kolloidi kontsentratsiooni katsete tulemustest lähtudes valiti tsentrifuugimise pikkuseks 20 minutit.

Suguselektsioonil 70% kontsentratsiooniga Bovicolliga erinevatel g-väärtustel suudeti X- ja Y-spermarakkude suhet muuta 1,2% - 5,3% ($\pm 2,4\%$) (joonis 13), parimad tulemused saavutati 200×g ja 350×g tsentrifuugimisel. Võrreldes tulemustega ajakatsetel saadutega, olid jõukatsete tulemused rohkem varieeruvad, kuid sugurakkude osakaalude muutused protsentuaalselt suuremad.



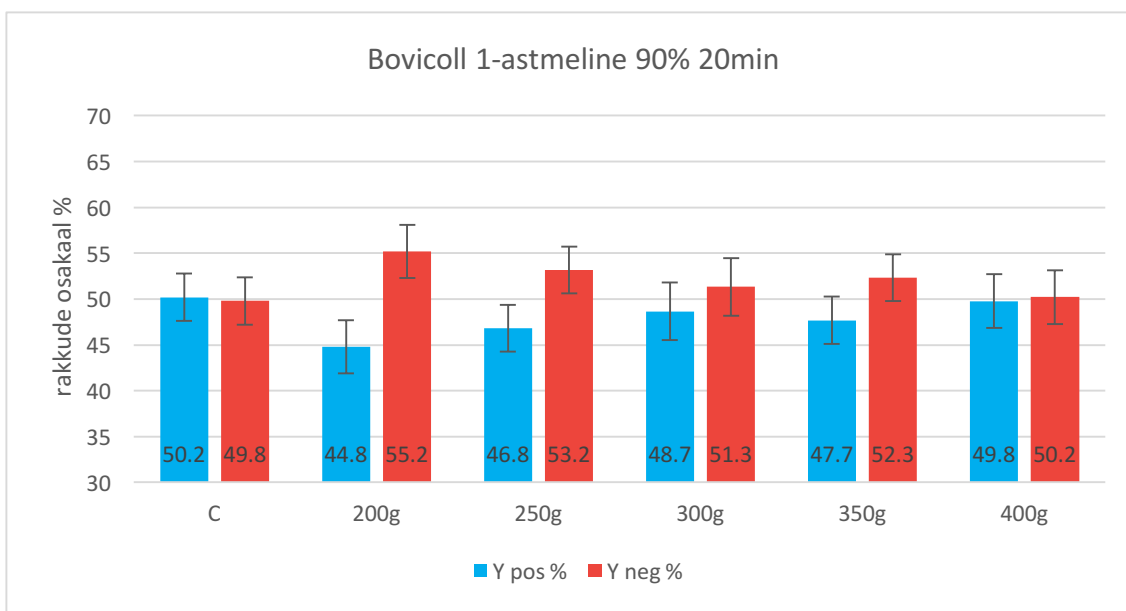
Joonis 13. Suguselektsioonikatse 70% kontsentratsiooniga Bovicoll kolonniga 20 min jooksul rakendades tsentrifuugimisel erinevat jõudu. “C” joonisel tähistab antud katse kontrollväärtuseid.

Erineva jõu rakendamisel 80% kontsentratsiooniga Bovicoll kolonni kasutades saadi stabiilseid tulemusi, kus Y-spermide osakaal langes vähehaaval kasutades tsentrifuugimisel tugevamaid jõude (joonis 14). Muutused kontrollist jäid 2,4% ($\pm 2,3\%$) ja 5,5% ($\pm 2,4\%$) vahele. Parim kallutus nendel katsetel saavutati 200×g korral – 5,5% ($\pm 2,4\%$) X-spermarakkude osakaalu tõus võrreldes kontrolliga. Eelnevalt ajakatsete juures saadud parimat tulemust korrata ei õnnestunud, kui seal saadi 80% kolonni kasutades 20 min 300×g juures 10% ($\pm 2,4\%$) osakaalu erinevus, siis kontsentratsioonikatsetel samadel tingimustel jäi tulemuseks vaid 2,4% ($\pm 2,3\%$).



Joonis 14. Suguselektsioonikatse 80% kontsentratsiooniga Bovicoll kolonniga 20 min jooksul rakendades tsentrifuugimisel erinevat jõudu. “C” joonisel tähistab antud katse kontrollväärtuseid.

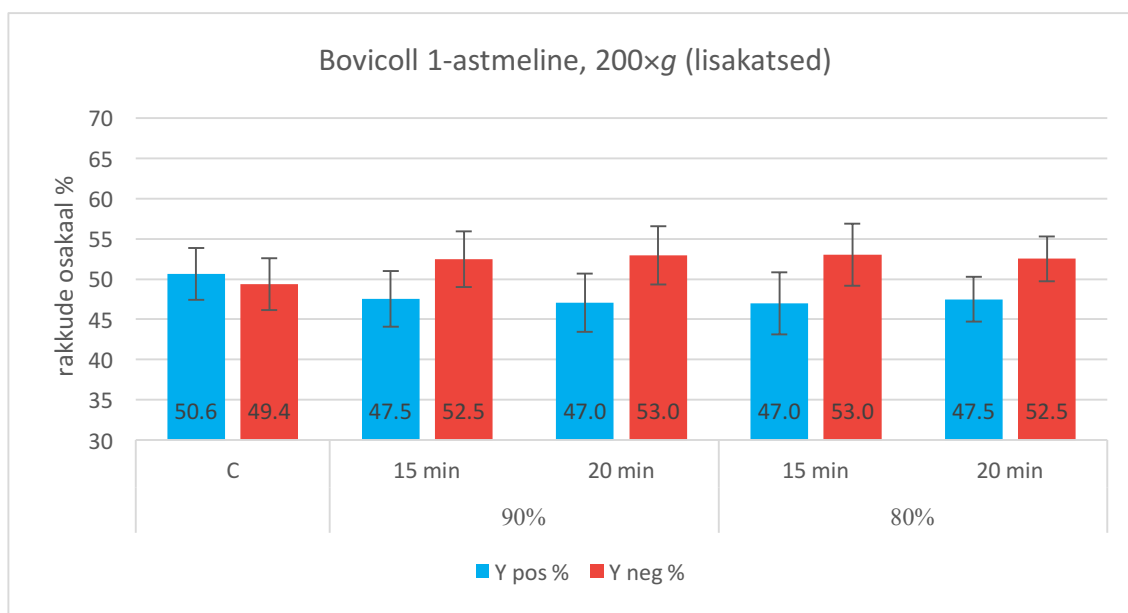
Tsentrifugaaljõu muutmisel 90% Bovicoll kolloidiga saadud selektsioonitulemustest oli parim kallutatus 200×g korral (5,4% ± 2,9%) ning kõige kehvem 400×g korral (0,4% ± 2,9%) (joonis 15).



Joonis 15. Suguselektsioonikatse 1-astmelise 90% kontsentratsiooniga Bovicoll kolonniga 20 min jooksul rakendades tsentrifuugimisel erinevat jõudu. “C” joonisel tähistab antud katse kontrollväärtuseid.

Kolmest võrdlevast tsentrifugaaljõu varieerimise katse tulemusest on näha, kuidas spermarakkude suguselektsoon toimub edukamalt pigem madalamate jõudude juures – iga erineva kolloidi kontsentratsiooniga oli parimaks tulemuseks 200×g juures teostatud katsed. Saadud andmed võib arvata, et 90% Bovicoll'i lahjendus on liialt kange suguselektsoonikatsete jaoks – kolloid on sellisel kontsentratsioonil liialt tihe, et lahutada X- ja Y-kromosoomide kandvaid rakke nende 0,06% mahu erinevuse alusel.

Jõu-, aja- ja kontsentratsioonikatsete tulemuste põhjal valiti välja 4 kombinatsiooni, millega teostati lisakatsed. Korraldi 90% ja 80% Bovicoll kolonni selektsoonivõimet 200×g juures 15 ja 20 minutil. Kõikidel juhtudel saadud tulemused olid positiivsed. X-spermarakkude osakaalu õnnestus tõsta võrreldes kontrolliga, kuid nihke protsendid jäid tagasihoidlikuks – 3,1% ($\pm 2,8\%$) kuni 3,7% ($\pm 3,8\%$), millest viimane saadi kasutades 80% kontsentratsiooniga kolloidi 15 minuti pikkusel tsentrifugeerimisel (joonis 16).

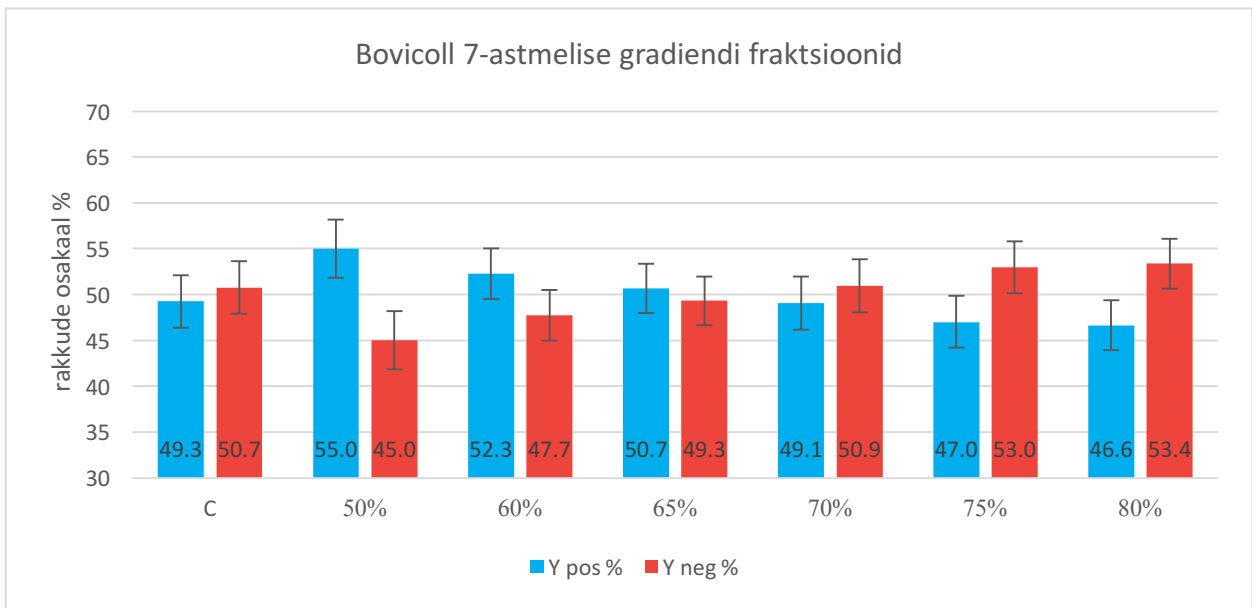


Joonis 16. Suguselektsooni lisakatsed 90% ja 80% kontsentratsiooniliste Bovicoll kolonnidega 15-20 min 200×g juures. “C” joonisel tähistab antud katse kontrollväärtuseid.

2.3.2. Suguselektioonikatsed mitmeastmelises Bovicoll lahutuskolonnis

X- ja Y-spermide osakaalu muutuse jälgimiseks tihedusgradiendis kasutati Bovicoll 7-astmelist kolonni, kus astmete kontsentratsioonideks oli 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75% ja 80%. Katse viidi läbi 10,5 ml mahuga kolonnis, kus iga erineva kolloidi kontsentratsiooniga kolonniastme mahuks oli 1,5 ml. Tsentrifuugimisel rakendati 300×g suurust jõudu 30 min jooksul, seejärel eraldati proov igast (v.a. kõige esimesest 40%) lahutusastmest X- ja Y-spermide osakaalu uurimiseks.

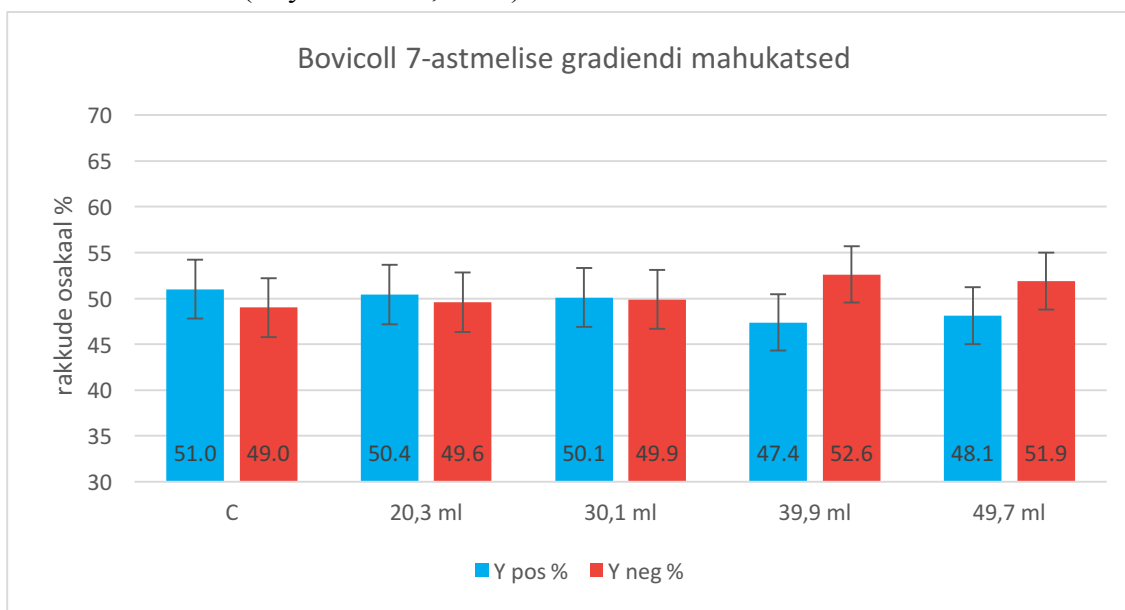
Katsetulemused illustreerivad hästi, kuidas X- ja Y-spermarakkude osakaalud muutuvad tihedusgradienti läbides (joonis 17). Kontrollproovis oli oodatav 1:1 suhe erinevaid sugukromosoome kandvate rakkude vahel. Erinevatest astmetest võetud proovides oli näha järkjärgulist Y-spermide osakaalu vähenemist liikudes rohkem kontsentreeritumate kolloidi kihtide poole. 50% kolloidi kontsentratsiooni juures oli Y-sperme 5,8% ($\pm 3,1\%$) rohkem võrreldes kontrolliga. Kolloidi põhjast, kus kolloidi kontsentratsioon oli 80%, korjatud proovis oli aga saavutatud 2,6% ($\pm 2,7\%$) X-spermide ülekaal. Katsetulemustest on näha, kuidas X- ja Y-spermid lahutuvad üksteisest liikudes kolonni põhjasuunas läbides kolloidi erinevaid kontsentratsioone – 50% astmes nähtud ligi 6% ($\pm 3,2\%$) kallutatust võrdsustus juba 65% astme juures.



Joonis 17. Suguselektiooni jälgimine erinevate kontsentratsiooniga astmetes 10,5 ml mahuga 7-astmelise Bovicoll kolonnis, rakendades 300×g jõudu 30 min jooksul. “C” joonisel tähistab antud katse kontrollväärtuseid.

Bovicoll mitmeastmelist kolonni kasutades teostati katseid veel erinevate kolloidi mahtudega, et hinnata suguselektiooni kolonni erinevatel mahtudel ja kõrgustel. Katsed viidi läbi 50 ml mahuga katsetuubis, kuhu valmistati 20,3 ml (astme maht 2,9 ml), 30,1 ml (astme maht 4,3 ml) 39,9 ml (astme maht 5,7 ml) ja 49,7 ml (astme maht 7,1 ml) Bovicoll gradient, mille astmete kontsentratsioonid olid 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75% ja 80%. Antud katsel lahjendati ejakulaat kontsentratsioonini 800×10^6 rakku/ml.

Katse tulemustest oli näha, kuidas kolonni maht tugevalt mõjutab suguselektiooni võimet tihedusgradiendis tsentrifugeerimise meetodil (joonis 18). ~20 ml ja ~30 ml korral oli sugurakkude separatsioon äärmiselt väike, alla 1% võrreldes kontrolliga, mis illustreerib hästi kolonni mahu, eelkõige selle kõrguse mõju suguselektioonile. Kõrgemate kolonnide korral on rakkude poolt läbitav teekond pikem, mille jooksul neid lahutada. Alates ~40 ml kolloidimahust oli näha X- ja Y-kromosoomi kandvate rakkude osakaalu muutust. 39,9 ml mahu juures sooritatud katse oli parimaks tulemuseks, mille juures saavutati 3,6% ($\pm 3,1$ %) erinevus kontrollist. ~20 ml ja ~30 ml kolonniga katsetel võis suguselektiooni ebapiisava tulemuse juures määrav olla ka rakkude hulga ja kolonni mahu vaheline sõltuvus – 800×10^6 rakku/ml kontsentratsioon on liialt suur, et lahutada X- ja Y-spermid väiksemate kolonni mahtude juures. Lahjendamine on oluline, kuna liialt rakkude tihedus viskoosne mass põhjustab kolloidi pinnal nn. hulpimis efekti ning rakud ei hakka kolloidi sisse liikuma (Beydola *et al.*, 2013).



Joonis 18. Suguselektiooni jälgimine 7-astmeliste Bovicoll kolonni erinevate mahtude korral rakendades 300xg jõudu. “C” joonisel tähistab antud katse kontrollväärtuseid.

Nii ühekihilist kui astmelist Bovicoll tiheduskolloidi kolonni kasutades suudeti keskmiselt kallutada X- ja Y-sugurakkude osakaalu 3% - 4%, mis oodatud 10% eesmärki ei täitnud. Katsetulemused olid äärmiselt muutlikud ning raskesti reprodutseeritavad. Selgeid põhjuseid selleks tuua ei saa, kuna katse tulemused erinesid kohati äärmiselt suures ulatuses vaid väikeste katsetingimuste muutuste juures. Näiteks, üheastmelise 90% Bovicoll kolonni 300×g tsentrifuugimisel 10 minuti jooksul oli X-spermide osakaal 51.6% ($\pm 4,2\%$), 15 minuti jooksul hüppas osakaal 56,7% ($\pm 2,9\%$) juurde ning 20 minutilise katse korral langes taas 51.0% ($\pm 1,6\%$). Kas suguselektsoonikatsed on äärmiselt tundlikud aja-, kolloidikontsentratsiooni ja katse pikkuse osas, või on eksperimendi teostamise juures kõrvaline asjaolu, mis avaldab tulemusele mõju. Täpsemaks statistiliseks analüüsiks on tarvilik suurem korduskatsete arv.

Töö eesmärgiks oli leida võimalikult lihtne meetodika, seetõttu võiks suguselektiooni katseid jätkata ühekihilise Bovicoll kolonniga. Lisaks ei näidanud gradientidel sooritatud katsed suuremat selektsioonivõimet. Tiheduskolloidis tsentrifuugimise meetodit kasutatakse tänapäeval eelkõige spermaproovi puhastamiseks, eemaldades surnud rakud ja seminaalplasmast. Karjakasvatajatele oleks suguselektiooni ja puhastamise etappide ühtseks liitmine väga kasulik (Morrell ja Humblot, 2016).

Edaspidi võiks proovida suuremate kolonnide kasutamist suguselektioonil. 2014 aastal modifitseeritud *swim-up* meetodit kasutades saadud 60% Y-spermide rikastatus saadi 5 ml pipetti kasutades. Teekond, mida rakud läbisid oli sellejuures pikem ning andis võimaluse paremaks lahutumiseks (Azizeddin *et al.*, 2014). Sarnast lähenemist tasuks proovida ka käesolevate katsete edasiarendusena.

2.3.3. Suguselektsoonikatsed Percoll[®] ja Percoll[®] Plus tiheduskolloididega

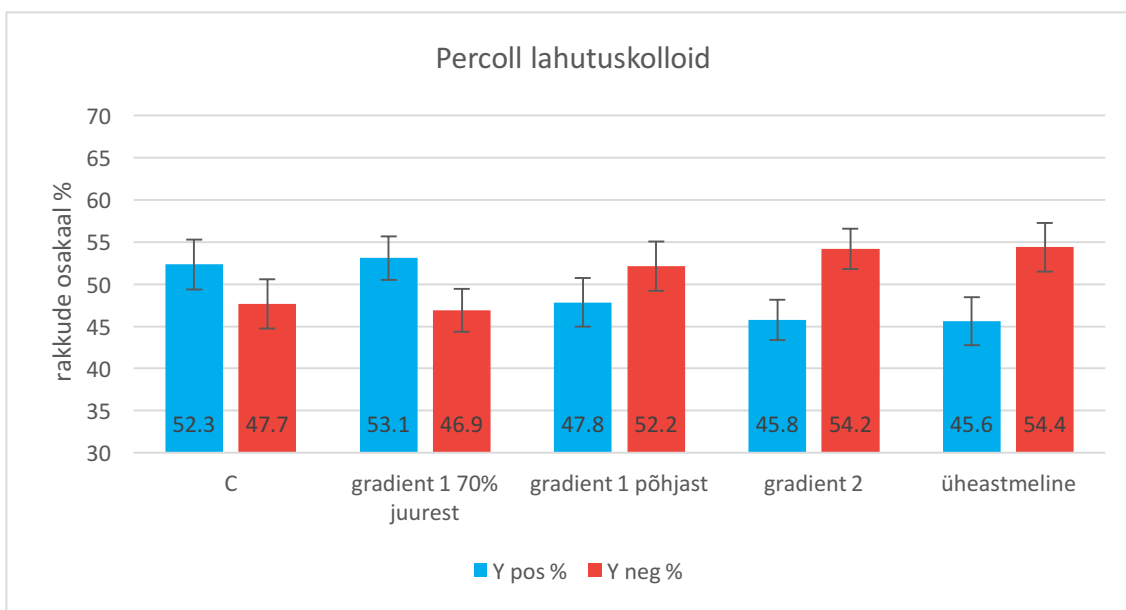
Hindamaks erinevate kolloidide mõju veise sperma suguselektsoonile, viidi läbi X- ja Y-spermarakkude eraldamise katseid ka Percoll[®] ja Percoll[®] Plus kolloidide kasutades. Percoll[®] ja Percoll[®] Plus on omaduste poolest väga sarnased, erinevus tuleb kolloidipartiklite kattekihist – esimese puhul on selleks PVP, Percoll[®] Plus partiklid on kaetud silaankihiga, mis tõttu on viimased vähem toksilised (Cell separation media. Methodology and applications handbook, GE Healthcare).

Nii Percoll[®] kui ka Percoll[®] Plus kolloidist valmistati kaks erinevat gradienti ja üks üheastmeline lahutuskolonn, millele rakendati erinevaid suguselektsooni katsetingimusi:

- Gradient 1 – 7 ml 7-astmeline (iga aste 1 ml) 40%-80% kolonn, 300×g 15 min
- Gradient 2 – 10,5 ml 7-astmeline (iga aste 1,5 ml) 40%-80% kolonn, 300×g 30 min
- Üheastmeline kolonn – 10 ml 80% kolloid, 300×g 20 min

Percoll[®] kolloidi kasutades õnnestus kallutada sugurakkude osakaal X-spermide poole (joonis 19). Gradient 1 juures võeti proov nii kolonni põhjast kui ka 70% kolloidi kontsentratsiooniga kolonni astmest. Aluseks oli selle juures Promthep *et al.*, töö aastast 2016, kus saadi 60,75% X-spermide osakaal ja kõige elujõulisemad spermarakud just 65%-75% kontsentratsiooniga Percoll[®] gradiendi piirkonnast, mitte põhjaproovist. Käesolevas töös seda tulemust ei kinnitatud, gradient 1 70% kolloidi kontsentratsiooniga kolonni astmest eraldatud proov oli ainus, kus selektsioon ei õnnestunud. Sugurakkude osakaalu muutus kontrollist oli alla 1% ning seegi Y-spermide osakaalu kasuks. Kolonni põhjast eraldatud proov näitas gradient 1 puhul tugevamat 4,5% (\pm 2,9%) kallutatust.

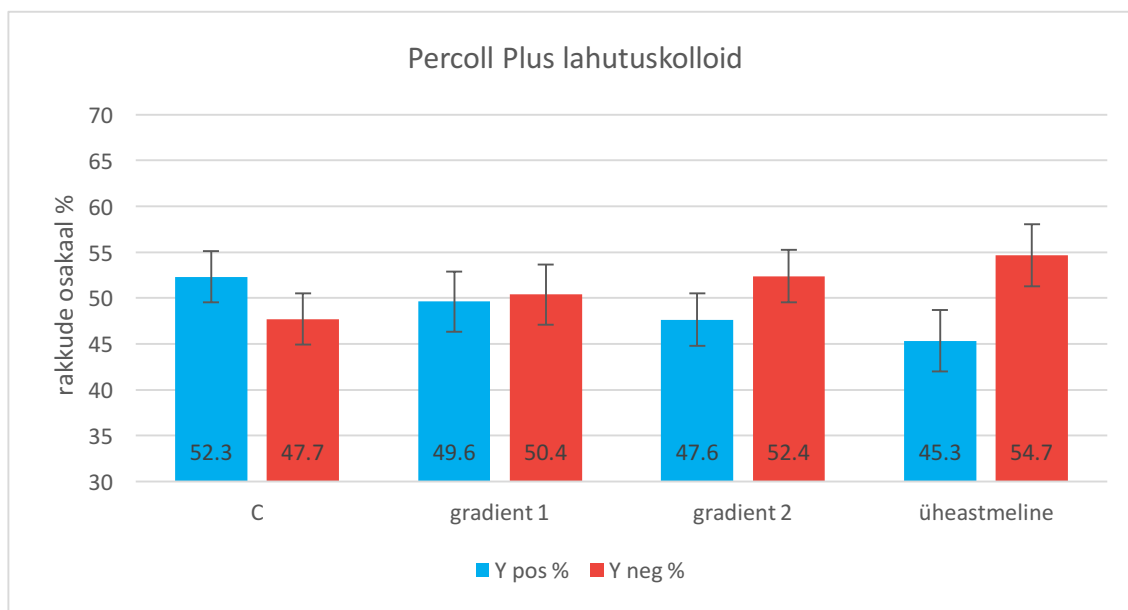
Gradient 2 ja üheastmelise kolonniga teostatud katsed oli selektsioonitulemuselt sarnased, vastavalt 6,6% (\pm 2,4%) ja 6,7% (\pm 2,9%) muutus sugurakkude osakaalus. Tulemused kinnitavad, et X- ja Y-spermide separatsiooniks ei ole ilmingimata vajalik erinevate kontsentratsioonidega astmelised kolonnid. Samaväärne tulemus on optimaalsetel katsetingimustel saavutatav ka üheastmeliste kolonnidega.



Joonis 19. Suguselektsioonikatsed Percoll[®] lahutuskolloidiga. Gradient 1 mahuga 7ml, tsentrifuugimisaeg 15 min, proov koguti 70% astmest ning katsetuubi põhjast. Gradient 2 mahuga 10,5 ml, tsentrifuugimisaeg 30 min. Gradient 1 ja 2 olid mõlemad 7-astmelised, astmete kontsentratsioonidega 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75% ja 80%. Üheastmeline lahutuskolonn oli 80% kontsentratsiooniga, mahuga 10 ml, tsentrifuugimisaeg 20 min. Kõikidel katsetel oli rakendatud tsentrifugaaljõuks 300×g. “C” joonisel tähistab antud katse kontrollväärtuseid.

Percoll[®] Plus kolloidi kasutades viidi läbi samad suguselektsiooni katsed nagu Percoll[®] kolloidiga, et hinnata kolloidide vahelist erinevust sugurakkude selekteerimisel. Katsetel saadud X- ja Y-spermide osakaalu muutused olid väiksemad, kuid sarnased Percoll[®] kolloidi kasutades (joonis 20). Kõige suurem osakaalu muutus, 7% ($\pm 3,4\%$), saavutati ka Percoll[®] Plus puhul üheastmelise kolonni kasutamisel.

Percoll[®] ja Percoll[®] Plus gradiente kasutades õnnestus X- ja Y-spermide osakaalu mõjutada, kuid mitte oodataval määral. Promthep *et al.* poolt saadud ~61% ja Hossepian, 2015 ~75% X-spermarakkude osakaal saagises jäi antud katsete juures kordamatuks.



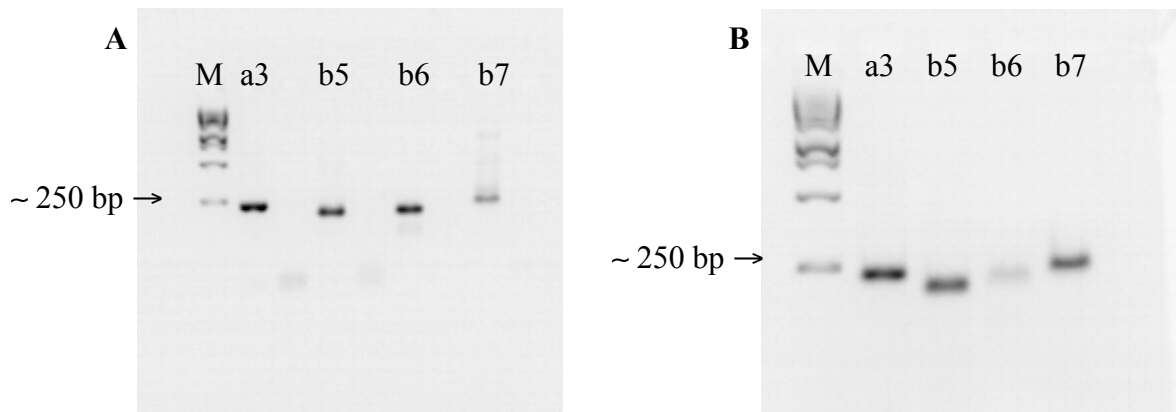
Joonis 20. Suguselektsoonikatsed Percoll® Plus lahutuskolloidiga. Gradient 1 mahuga 7ml, tsentrifuugimisaeg 15 min. Gradient 2 mahuga 10,5 ml, tsentrifuugimisaeg 30 min. Gradient 1 ja 2 olid mõlemad 7-astmelised, astmete kontsentratsioonidega 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75% ja 80%. Üheastmeline lahutuskolonn oli 80% kontsentratsiooniga, mahuga 10 ml, tsentrifuugimisaeg 20 min. Kõikidel katsetel oli rakendatud tsentrifugaaljõuks 300×g. “C” joonisel tähistab antud katse kontrollväärtuseid.

2.3.4. X-kromosoomi proovide loomine

Veise X-kromosoomi spetsiifiliste proovide loomiseks kasutati 4 praimerite paari, mis amplifitseerivad DNA järjestusi XCRa3, XCRb5, XCRb6 ja XCRb7⁶ pikkustega 203-246 bp. Kõiki PCR katsete tulemusi kontrolliti geel-elektroforeesil. XCRa3, XCRb5 ja XCRb7 praimeritega DNA proovide sünteesimine õnnestus oodataval määral (joonis 21). XCRb6 praimeriga proovijärjestuse amplifitseerimine oli äärmiselt keeruline ning tulemused muutlikud. Tihti suudeti saavutada oodatud proovi kogus väikeste PCR reaktsiooni mahtude (20 µl) korral (joonis 21A), kuid suuremate kogustega jäi amplifitseerimise tase nõrgaks (joonis 21B). Reaktsiooni tingimusi seejuures ei muudetud.

⁶ Laboris välja mõeldud, kirjanduses mitteesinevad nimetused

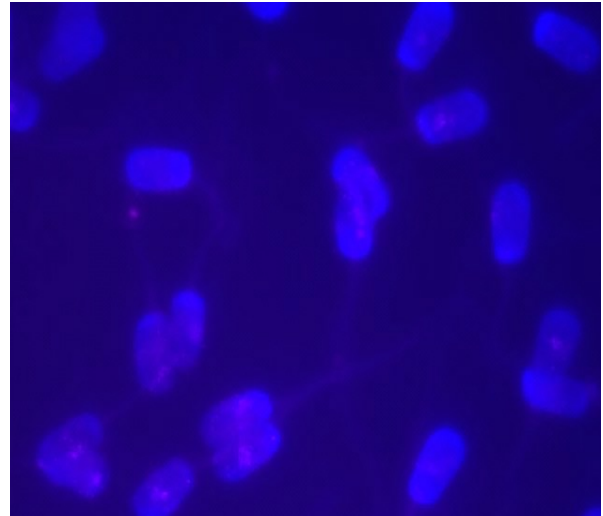
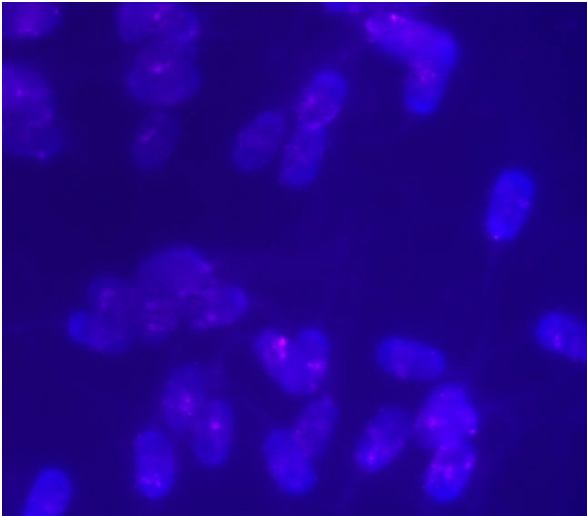
Põhjuseid, miks XCRb6 praimeriga amplifitseerimine ei õnnestunud võib jagada kaheks, kas PCR reaktsioonisegu või PCR reaktsioonitingimused pole optimaalsed. Esimese puhul võib praimerit, DNA, polümeraasi või lisatud nukleotiidide omavahelised kontsentratsioonid olla mittesobivad. Reagentide saastumine on tihti ka põhjuseks, mida antud töös seda kontrolliti ja välistati. PCR valed reaktsioonitingimused mõjutavad suuresti amplifitseerimise tulemust, eelkõige vale tsükli arv ja temperatuur (Molecular Cloning Handbook, GenScript USA Inc.)



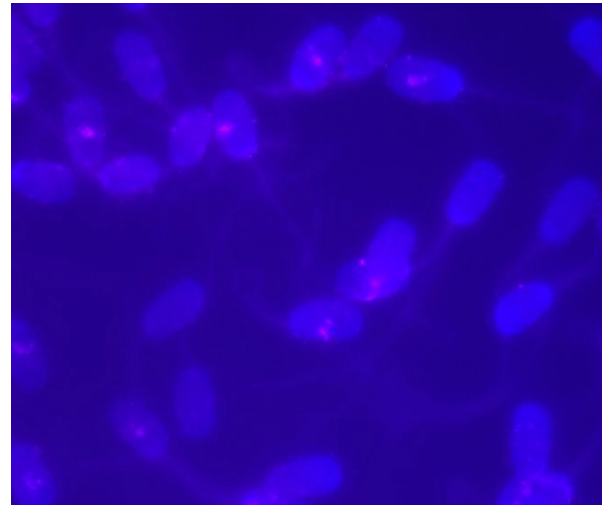
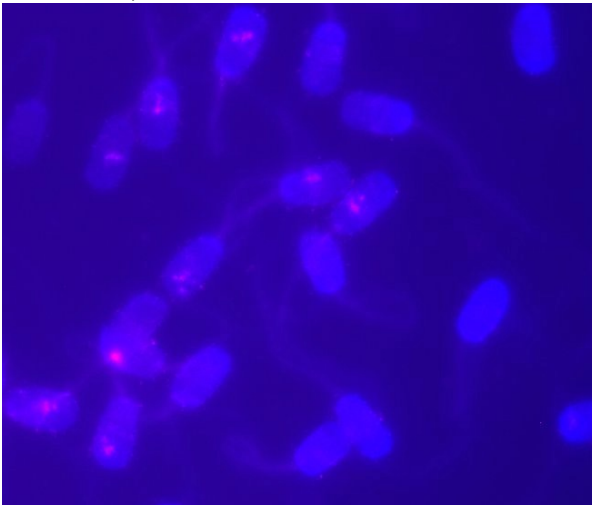
Joonis 21. Geel-elektroforeesi pildid PCR amplifitseerimise tulemustest. “a3”, “b5”, “b6”, “b7” tähistavad vastavalt kasutatud reaktsioonisegus primereid XCRa3, XCRb5, XCRb6, XCRb7; “M” tähistab markerit. A) 20 µl mahuga kontroll-amplifitseerimine; B) suurema koguse (24×20 µl) amplifitseerimine

PCR-il saadud aminoallüül-UTP nukleotiidide sisaldavad XCRa3, XCRb5 ja XCRb7 järjestused värviti kasutades fluorestseeruvat Cy3. PSA väärtuste järgi jaotati proovid DNA 1000 ng hulga alusel alikvootideks, mida kontrolliti FISH meetodil. Varasemate projektide raames oli laboris juba veise X-kromosoomi spetsiifiliste proovidega katseid sooritatud ning leitud, et üksikute proovide kasutamine hübriidiseerimisel piisavat signaali ei anna. Seetõttu, kasutati ka antud töö raames 4 või 5 kromosoomiproovi sama aegselt, lisades juurde laboris varasemalt loodud X-kromosoomi proove – XCRb3 ja XCRd. Katseid teostati 3 erineva kombinatsiooniga.

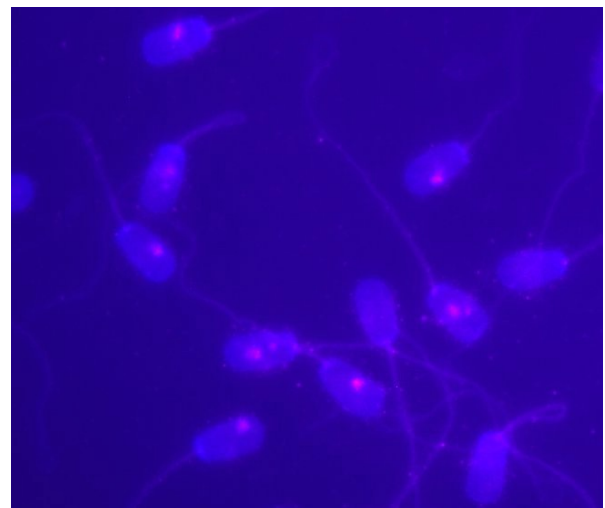
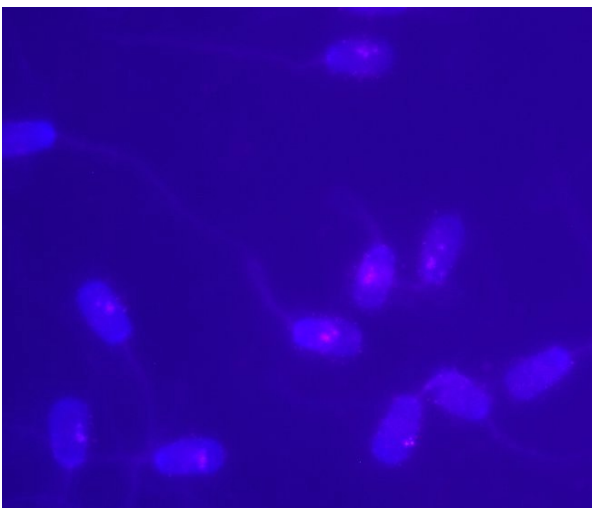
XCRa3, XCRb5, XCRb7, XCRd proovide segu kasutamisel oli X-kromosoomi signaal olemas, kuid äärmiselt nõrk (joonis 22). Järgmise katse puhul, kuhu lisati juurde XCRb3 proov ning kasutati 5 kromosoomiproovi segu, oli signaal palju konkreetsem (joonis 24). Kahe eelneva katse põhjal otsustati proovide segust eemaldada XCRa3 ning tulemusena saadi puhtam signaal (joonis 25).



Joonis 22. XCRa3, XCRb5, XCRb7, XCRd proovide kasutamine FISH meetodil (1000x suurendus).



Joonis 23. XCRa3, XCRb3, XCRb5, XCRb7, XCRd proovide kasutamine FISH meetodil (1000x suurendus).



Joonis 24. XCRb3, XCRb5, XCRb7, XCRd proovide kasutamine FISH meetodil (1000x suurendus).

Üheks probleemiks katsetel oli nõrk signaal FISH meetodil, mille põhjuseid võib olla mitmeid. Veise X-kromosoom on 148 Mb suurune ning tugevalt pakitud rakutuumas. Selleks, et märgistatud proovid saaksid sihtmärgile seonduda on neil sellele ligi pääseda, mis tähendab DNA denatureerimine (Habermann *et al.*, 2005). Antud töös rakendati FISH-il X-proovidega sama protokollu nagu Y-proovide korral. DNA denatureerimise ja hübridiseerimise kestvuse varieerimist peaks tulevikus katsetama, et leida optimaalseim.

Ebapiisav signaal võib tuleneda proovi vähesest märklaudade arvust kromosoomil (Aquino de Muro, 2008). Kinnitatud on juba eelnevalt, et parimaks X-kromosoomi märgistamiseks on vajalik mitme disainitud proovide kooskasutamine, sest üksikud hübridiseerimisel oodatud tulemust ei anna. Seda oli näha ka nelja proovi (XCRA3, XCRb5, XCRb7, XCRd) seguga katsest (joonis 22), kui lisati juurde XCRb3 proov (joonis 23). Erinevate proovide kombineerimise juures peab jälgima, et ei tekiks liigselt taustasignaali ja ebaspetsiifilisi signaale (Redon *et al.*, 2009). Nõrk signaal hübridiseerimisel võib olla põhjustatud ka kromosoomiproovi vähesest kogusest, kuid antud katsetel kasutati 1000 ng DNA hulka proovi koguses, mis peaks olema piisavalt suur seondumiseks.

Liigne taustasignaal oli teiseks suuremaks probleemiks X-spetsiifiliste proovide loomise juures. Siinkohal peaks taas mõtlema kasutatud proovide kombinatsiooni üle või muutma FISH protokollu. Hübridisatsiooni järgsed pesud on olulised ebaspetsiifilise märgise eemaldamiseks. Nende juures saab varieerida vesivanni temperatuuri ja SSC kontsentratsiooni (Habermann *et al.*, 2005, Van Stedum ja King 2002). Teostatud katsete tulemustest oli näha, kuidas XCRA3 proovi eemaldamine andis tunduvalt puhtamat taustasignaali (joonis 24).

Disainitud veise X-kromosoomi spetsiifiliste proovide seast on lootust leida sobiv kombinatsioon, mis annaks FISH meetodil oodatava tulemuse. Siinkohal on vajalik veel optimaalsete tingimuste välja selgitamine ning X-kromosoomi spetsiifilisuse valideerimine Y-kromosoomi spetsiifilise prooviga koosmärgistamisel.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö üheks eesmärgiks oli modifitseerida kolloidlahuses tsentrifuugimise meetodit, mis võimaldaks muuta X- ja Y-kromosoome kandvate sugurakkude osakaalu veise spermas. Selleks viidi läbi suguselektiooni katseid lahutuskolloidide erinevate kontsentratsioonidega, varieerides tsentrifuugimisel aega ja jõudu.

Katsetel keskenduti ühekihilistele Bovicoll kolloidlahustele 15 ml kolonnis. X-kromosoomi kandvate spermarakkude osakaalu kallutamise protsent varieerus katsetel. Kõrgeim, 10% nihe saavutati 80% kontsentratsiooniga Bovicoll kolloidkolonni tsentrifuugimisel 300×g juures 20 minutit, kuid antud tulemust reprodutseerida ei õnnestunud. Keskmine osakaalude kallutus oli 3%-4%. X- ja Y-spermide osakaalu muutuse jälgimiseks tihedusgradiendis kasutati Bovicoll 7-astmelist kolonni. Erinevatest astmetest võetud proovides oli näha järk-järgulist Y-spermide osakaalu vähenemist liikudes rohkem kontsentreeritumate kolloidi kihtide poole.

Lisaks teostati katseid Bovicoll'i suurema mahuga (kuni 50 ml) kolonnides ning Percoll[®] ja Percoll[®] Plus kolloididega. Mahukatsetel ~20 ml ja ~30 ml kolonnidega oli sugurakkude separatsioon äärmiselt väike, alla 1% võrreldes kontrolliga, mis illustreerib hästi kolonni mahu, eelkõige selle kõrguse mõju suguselektioonile. Kõrgemate kolonnide korral on rakkude poolt läbitav teekond pikem, mille jooksul neid lahutada. Percoll[®] ja Percoll[®] Plus kolloide kasutades teostati kaks gradienti ning üks ühekihiline kolonn ning mõlema kolloidi puhul olid parimad tulemused viimaste korral. Tulemused kinnitavad, et X- ja Y-spermide separatsiooniks ei ole ilmtingimata vajalik erinevate kontsentratsioonidega astmelised kolonnid, samaväärne tulemus on optimaalsetel katsetingimustel saavutatav ka üheastmeliste kolonnidega.

Töö teiseks eesmärgiks oli veise X-kromosoomi spetsiifiliste proovide loomine, mille abil saaks tõsta suguselektiooni meetodi valideerimise usaldusväärsust. PCR-il saadud X-kromosoomi spetsiifilised proovid (XCRa3, XCRb5, XCRb7) värviti Cy3 märgisega. Kombineerides neid kahe varasemalt laboris välja töötatud X-spetsiifilise prooviga (XCRb3, XCRd), teostati FISH analüüse. Kõige edukam tulemus saadi XCRb3, XCRb5, XCRb7, XCRd proovide segu korral – hübriidiseerinud signaal oli kõige selgem ning taustmäärdu mine vähene. X-kromosoomi proovide segusid ning nende hübriidiseerimise protokollid on vajalik veel optimeerida ning Y-kromosoomi

spetsiifilist proovi kasutades kaksikmärgistamisega valideerida voolutsütomeetriliselt suguselekteeritud spermaga.

Bovine sperm sexing using density centrifugation and designing X-chromosome probes

Liisi Kink

Summary

The ability to preselect and alter the sex ratio of offspring has been a desired technology in the livestock industry. Females are necessary for milk production and breeding, and males in meat production. The only method that is currently used for sperm sexing is flow cytometry which separates X- and Y-bearing spermatozoa based on the differences in their DNA amount. Although, method is 90% accurate, there is still a need for a new approach in the bovine industry, because sexed semen samples are expensive and doses have low fertility rates. The focus of this study was to modify density centrifugation method in order to preselect gender of bovine spermatozoa. Density colloid centrifugation would be an easier, quicker and cheaper alternative to flow cytometry.

Single layer Bovicoll colloids were prepared in 15 ml Falcon® tubes and used in experiments alternating the solution of colloid (70%, 80%, 90%), centrifugation duration (10-30 min, with 5 min step) and force (200–400×g, with 50×g step). The results showed X-bearing spermatozoa enrichments with varied percentages between experiments. The highest X-sperm enrichment achieved was 10% centrifuging with 80% Bovicoll at 300×g for 20 min, but the result was non-reproducible. The average increase of enrichment was 3%-4%.

Bovicoll 7-layer discontinuous gradient was used to observe X- and Y-bearing spermatozoa separation by layers. Bovicoll stock was diluted to make 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75% and 80% (1,5 ml aliquots) solutions that were layered from higher to lower concentration, starting with 80% at the bottom. Tube was centrifuged at 300×g for 30 min, after which a sample from each layer was collected and analysed. The result illustrated a gradual increase in X-bearing sperm enrichment from top towards bottom layers. Although, overall enrichment was lower than using single layer centrifugation. One single layer and two gradients using Percoll® and Percoll® Plus colloids were also tested in comparison. In all cases, separation on single layer column was more successful, indicating that layered gradients are not necessary for X- and Y-sperm separation.

The reason behind inconsistent sperm separation results from density centrifugations is unclear. The variation may be due to small column size (15 ml). Azizeddin *et al.* managed to achieve 60% enrichment in Y-bearing spermatozoa using swim-up method. Method was modified by using 5 ml serological pipette so the distance where sperms had time separate was longer. Same idea could be applied to density centrifugation columns – using higher columns might increase X:Y ratio to a desirable level.

Second aim of this study was to design bovine X-chromosome specific probes that can be use in FISH to evaluate semen sexing results. Three different primer pairs were used to amplify X-specific probes (XCRa3, XCRb5, XCRb7) and labelled with Cy3. Combining them with two probes (XCRb3, XCRd) that had previously been designed in the laboratory, three hybridisations were carried out. The most promising signal with clearest background signal came from using a combination of XCRb3, XCRb5, XCRb7, XCRd probes. The probe mixture and FISH protocol still needs optimisation and validation by dual-use with Y-chromosome specific probes on cytometrically sorted sperm.

TÄNUSÕNAD

Soovin südamest tänada oma juhendajaid Ants Kurge ja Olavi Reinsalut asjakohase juhendamise ja lõpmatu kannatlikuse eest!

Täna ka oma perekonda ning sõpru, kes sellel teekonnal mulle toeks olid. Eriline tänu ja soe kallistus Kristi Krebsile!

Lisaks soovin tänada oma SYNLAB Eesti kolleege mõistva suhtumise eest!

KIRJANDUSE LOETELU

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. *Archives of Andrology*, 24(3), 235–45.

Aquino de Muro, M. 2008. Probe design, production, and applications, p. 41–53. In Walker, J. M., Rapley, R., *Molecular Biomechanics Handbook*, 2nd ed., Humana Press, Totowa.

Azizzeddin, A., Ashkar, F. A., King, W. A., & Revay, T. (2014). Enrichment of Y-chromosome-bearing bull spermatozoa by swim-up through a column. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(1), 1–4.

Barlow, P., & Vosa, C. G. (1970). The Y Chromosome in Human Spermatozoa. *Nature*, 226(5249), 961–962.

Beydola, T., Sharma, R. K., Agarwal, A. 2013. Sperm Preparation and Selection Techniques, p. 243–251. In Rizk, B. R. M. B., Aziz, N., Agarwal, A., Sabanegh, E. Jr. (ed.), *Medical and Surgical Management of Male Infertility*, Jaypee Brothers Medical Publishing, New Delhi.

Chandler, J. E., Steinholt-Chenevert, H. C., Adkinson, R. W., Moser, E. B. (1998) Sex ratio variation between ejaculates within sire evaluated by polymerase chain reaction, calving, and farrowing records. *Journal of Dairy Science*, (81), 1855–1867.

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. *Archives of Andrology*, 33(1), 63–65.

Check, J.H. & Katsoff, D. (1993). A prospective study to evaluate the efficacy of modified swim-up preparation for male sex selection. *Human Reproduction*, 8(2), 211–214.

Chen, X., Yue, Y., He, Y., Zhu, H., Hao, H., Zhao, X., ... Wang, D. (2014). Identification and characterization of genes differentially expressed in X and Y sperm using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. *Molecular Reproduction and Development*, 81(10), 908–917.

Corson, S. L., Batzer, F. R., Alexander, N. J., Schlaff, S., and Otis, C. (1984). Sex selection by sperm separation and insemination. *Fertility and Sterility*. 42(50), 756–760.

Cui, K. H. (1997). Size differences between human X and Y spermatozoa and prefertilization diagnosis. *Molecular Human Reproduction*, 3(1), 61–67.

David, G., Jeulin, C., Boyse, A., & Schwartz, D. (1977). Motility and percentage of Y- and YY-bearing spermatozoa in human semen samples after passage through bovine serum albumin. *Journal of Reproduction and Fertility*. 50(2), 377–379.

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. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 15(3):332–7.

Ericsson, R. J., Langevin, C. N., & Nishino, M. (1973). Isolation of Fractions rich in Human Y Sperm. *Nature*, 246(5433), 421–424.

Espinosa-Cervantes, R., & Córdova-Izquierdo, A. (2012). Sexing sperm of domestic animals. *Tropical Animal Health and Production*, 45(1), 1–8.

Evans, J. M., Douglas, T. A., & Renton, J. P. (1975). An attempt to separate fractions rich in human Y sperm. *Nature*, 253(5490), 352–354.

Ferguson-Smith, M. A. 2001. In situ hybridization, p.1002–1004. In Brennan, S., Miller, J. H., *Encyclopedia of genetics*, 1st ed., vol.1. Academic Press, Cambridge.

Flaherty, S. P., & Matthews, C. D. (1996). Application of modern molecular techniques to evaluate sperm sex selection methods. *Molecular Human Reproduction*, 2(12), 937–942.

Garner, D. L., & Seidel, G. E. (2008). History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, 69(7), 886–895.

Garner, D. L., Gledhill, B. L., Pinkel, D., Lake, S., Stephenson, D., Van Dilla, M. A., Johnson, L. A. (1983). Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 28(2), 312–321.

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. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 122(Suppl 1), 22–7.

Hadi, S., & Al-Timimi, I. H. (2013). Separation of Y- chromosome Bearing Ram's Sperms using an Albumin Gradient Technique and Identification of Embryos by PCR. *AL-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences*, 12(1), 144–151.

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

Hoen, P. A., de Kort, F., van Ommen, G. J., den Dunnen. J. T. (2003). Fluorescent labelling of cRNA for microarray applications. *Nucleic Acids Research*, 31(5):e20.

Hossepian de Lima, V. (2015). Enrichment of bovine semen with x-bearing spermatozoa using Percoll™ and Optiprep® discontinuous gradients. *Animal and Veterinary Sciences*, 3(1), 1–7.

Jain, A., Yathish, H. M., Jain, T., & Sharma, A. (2011). Efficient production of sexed semen by flow cytometry: A review. *Agricultural Research Communication Centre*, 32(1), 36–45.

John, H., Birnstiel, M., Jones, K. (1969). RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level. *Nature*, 223(5206), 582–587

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), 1323–1341.

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. *Biology of Reproduction*, 41(2), 199–203.

Johnson, L. A., Flook, J. P., & Look, M. V. (1987). Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Research*, 17(3), 203–212.

Kanesharatnam, N., Eswaramohan, T., & Balasubramaniam, K. (2012). Fractionation of X and Y Chromosome-Bearing Bovine Spermatozoa through Sugar Gradients for Sex Predetermination in Dairy Cattle. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2(3), 203–206.

Keeler, K. D., Mackenzie, N. M., & Dresser, D. W. (1983). Flow microfluorometric analysis of living spermatozoa stained with Hoechst 33342. *Journal of Reproduction and Fertility*, 68, 205–212.

Kiddy, C. A., Hafs H. D., editors (1971). Sex ratio at birth – prospects for control. A Symposium of American Society of Animal Science, Savoy, IL.

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. *The Journal of Reproduction and Development*, 50(4), 463–469.

Mahadevan, M., & Baker, G. 1984. Assessment and preparation of semen for in vitro fertilization, p. 83–97. In C. Wood & A. Trounson (eds.), *Clinical In Vitro Fertilization*. Springer, London.

Morrell, J. M., Dalin, A.-M. & Rodriguez-Martinez, H. (2008). Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. *Animal Reproduction*, 5, 121–126.

Morrell, J. D., Sabes Alsina, M., Abraham, M. C., Sjunnesson, Y. (2016) Practical applications of sperm selection techniques for improving reproductive efficiency. *Animal Reproduction*, 13, 340–345.

- Morrell, J., Humblot, P. (2016) Animal Reproduction Technologies – Future Perspectives. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 6, 301–313
- Morrison L. E., Ramakrishnan R., Ruffalo T. M., Wilber K. A. (2002). Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets. In Fan, Y. S. *Molecular Cytogenetics. Methods in Molecular Biology*, vol 204, Humana Press, Totowa.
- Moruzzi, J. F. (1979). Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57(2), 319–23.
- Pardue M. L., Gall J. G. (1969). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 168(3937), 1356–135
- Parati, K., Bongioni, G., Aleandri, R., & Galli, A. (2006). Sex ratio determination in bovine semen: A new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology*, 66(9), 2202–2209.
- Pertoft, H., Laurent, T. C., Låås, T., & Kågedal, L. (1978). Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Analytical Biochemistry*, 88(1), 271–282.
- Pharmacia Biotech (1996). Important notice: Percoll® NOT to be used in assisted reproduction technologies in humans. Pharmacia Biotech Inc; December 12.
- Pinkel, D., Lake, S., Gledhill, B. L., Van Dilla, M. A., Stephenson, D., & Watchmaker, G. (1982). High resolution DNA content measurements of mammalian sperm. *Cytometry*, 3(1), 1–9.
- Prasad, S., Rangasamy, S., & Satheshkumar, S. (2010). Sex preselection in domestic animals – Current status and future prospects. *Veterinary World*, 3(7), 346–348.
- Promthep, K., Satitmanwiwat, S., Kitiyanant, N., Tantiwattanakul, P., Jirajaroenrat, K., Sitthigripong, R., & Singhapol, C. (2016). Practical use of percoll density gradient centrifugation on sperm sex determination in commercial dairy farm in Thailand. *Indian Journal of Animal Research*, 50(3), 310–313.

Rath, D., Barcikowski, S., de Graaf, S., ... Washausen, S. (2013). Sex selection of sperm in farm animals: Status report and developmental prospects. *Reproduction*, 145(1), R15–R30.

Redon, R., Fitzgerald, T., Carter, N. P. (2009) Comparative Genomic Hybridization: DNA labeling, hybridization and detection. *Methods in Molecular Biology*, 529, 267-278

Ross, A., Robinson, J. A., & Evans, H. J. (1975). Failure to confirm separation of X- and Y-bearing human sperm using BSA gradients. *Nature*, 253(5490), 354–355.

Sarrate, Z., Anton, E. (2009). Fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol in human sperm. *Journal of Visualized Experiments*, 31, 1–2.

Seidel, G. E. (1999). Sexing mammalian spermatozoa and embryos - state of the art. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 477–487.

Seidel, G. E. (2014). Update on sexed semen technology in cattle. *Animal : An International Journal of Animal Bioscience*, 8 Suppl 1, 160–4.

Seidel, G. E., & Garner, D. L. (2002). Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction*, 124(6), 733–743.

Seidel, G. E., & Johnson, L. A. (1999). Sexing mammalian sperm — Overview. *Theriogenology*, 52(8), 1267–1272.

Szyda, J., Simianer, H., Lien, S. (2000) Sex ratio distortion in bovine sperm correlates to recombination in the pseudoautosomal region. *Genetical Research*, 75, 53–59.

Van Stedum S., King W. 2002 Basic FISH Techniques and Troubleshooting. In Fan, Y. S. *Molecular Cytogenetics. Methods in Molecular Biology*, vol 204, Humana Press, Totowa.

White, I. G., Mendoza, G., & Maxwell, W. M. C. 1984. Preselection of sex of lambs by layering spermatozoa on protein columns, p. 299–300. In D. R. Lindsay & D. T. Pearse (eds.), *Reproduction in Sheep*. Australian Academy of Science, Canberra.

Williamson, S. (2004). Sex (IST) Selection? *Medical Law International*, 6(3), 185–206.

Windsor, D. P., Evans, G., & White, I. G. (1993). Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: A review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(2), 155–171.

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), 1343–1352.

Yadav, S. K., Gangwar, D. K., Singh, J., Tikadar, C. K., Khanna, V. V., Saini, S., ... Singla, S. K. (2017). An immunological approach of sperm sexing and different methods for identification of X- and Y-chromosome bearing sperm. *Veterinary World*, 10(5), 498–504.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Maailma statistika infoleht <http://www.worldometers.info/world-population/> (kasutatud 30.06.2017)

Eesti Teadusinfosüsteem <https://www.etis.ee> (kasutatud 02.07.2017)

Ameerika Ühendriikide Patendi- ja Kaubamärgiamet <https://www.uspto.gov> (kasutatud 12.07.2017)

Esitluste jagamiskeskond <https://www.slideshare.net> (kasutatud 15.07.2017)

Ameerika Ühendriikides suguselekteeritud spermamüügiga tegeleva firma koduleht <https://mastergen.com/> (kasutatud 16.07.2017)

Ühendkuningriigis suguselekteeritud spermamüügiga tegeleva firma koduleht <http://www.stgen.com/> (kasutatud 16.07.2017)

Eesti Tõuloomakasvatajate Ühistu pullide andmebaas <https://pullid.etky.ee> (kasutatud 24.07.2017)

LISAD

Lisa 1. Spermaproovide andmed

| kogumise kuupäev | pull (looma ID) | alg-kontsentratsioon ($\times 10^6$ rakku/ml) | sooritatud katsed |
|------------------|---------------------------|--|---|
| 05.05.2017 | Boska (DE 356759277) | 1700 | Bovicoll 90% 300 \times g 10-30 min |
| 09.05.2017 | Boska (DE 356759277) | 1100 | Bovicoll 80% 300 \times g 10-30 min |
| 19.05.2017 | Boska (DE 356759277) | 1400 | Bovicoll 70% 300 \times g 10-30 min |
| 02.06.2017 | Boska (DE 356759277) | 600 | Bovicoll 90-70% 200-400 \times g 20 min |
| 06.07.2017 | Sambuka (NL 738418777) | 1750 | Bovicoll 90-80% 200 \times g 15-20 min |
| 15.11.2017 | Berwol (DE 358665683) | 1851 | Bovicoll 20,3-49,7 ml 7-astmeline gradient 17-36 min 300 \times g |
| 19.12.2017 | Commer (DE 358362782) | 1700 | Percoll [®] Plus 80% 300 \times g 20 min; 7ml 7-astmeline gradient 15 min 300 \times g; 10,5 ml 7-astmeline gradient 30 min 300 \times g |
| 28.12.2017 | Boska (DE 356759277) | 1605 | Percoll [®] 80% 300 \times g 20 min; 7ml 7-astmeline gradient 15 min 300 \times g; 10,5 ml 7-astmeline gradient 30 min 300 \times g |

Lisa 2. Tsentrifuugi programm

| | |
|-------------|------|
| temperatuur | 22°C |
| kiirendus | 19 |
| aeglustus | 2 |

Lisa 3. Sooritatud suguselektsoonikatsed ja nende tingimused

| kolloid | kolloidi maht | astmete arv | kontsentratsioon | tcentrifugeerimise jõud | tcentrifugeerimise aeg | korjatud proov | |
|---------------|---------------|-------------|------------------|-------------------------|------------------------|----------------|--------|
| Bovicoll | 10 ml | 1 | 90% | 200×g | 20 min | põhjast | |
| | | | | 250×g | | | |
| | | | | 300×g | 10 min | | |
| | | | | | 15 min | | |
| | | | | | 20 min | | |
| | | | | | 25 min | | |
| | | | 30 min | | | | |
| | | | 350×g | 20 min | | | |
| | | | | | 400×g | | |
| | | | 80% | 200×g | põhjast | | |
| | | | | 250×g | | | |
| | | | | 300×g | | | 10 min |
| | | | | | | | 15 min |
| | | | | | | | 20 min |
| | 25 min | | | | | | |
| | 30 min | | | | | | |
| | 350×g | 20 min | | | | | |
| | 400×g | | | | | | |
| | 70% | 200×g | põhjast | | | | |
| | | 250×g | | | | | |
| 300×g | | 10 min | | | | | |
| | | 15 min | | | | | |
| | | 20 min | | | | | |
| | | 25 min | | | | | |
| | 30 min | | | | | | |
| 350×g | 20 min | | | | | | |
| 400×g | | | | | | | |
| 20,3 ml | 7 | 40 – 80% | 300×g | 17 min | põhjast | | |
| 30,1 ml | | | | 24 min | | | |
| 39,9 ml | | | | 30 min | | | |
| 49,7 ml | | | | 36 min | | | |
| 10,5 ml | | | | 30 min | | Igast astmest | |
| Percoll® | 10 ml | 1 | 80% | 300×g | 20 min | põhjast | |
| | 7 ml | 7 | 40 – 80% | | 15 min | 70%, põhjast | |
| | 10,5 ml | | | | 30 min | põhjast | |
| Percoll® Plus | 10 ml | 1 | 80% | 300×g | 20 min | põhjast | |
| | 7 ml | 7 | 40 – 80% | | 15 min | | |
| | 10,5 ml | | | | 30 min | | |

Lisa 4. DAPI ja Cy3 detekteerimine

| Värv | Ex λ (max) | Em λ (max) |
|------|--------------------|--------------------|
| DAPI | 364 | 454 |
| Cy3 | 552 | 565 |

Lisa 5. Y-proovi praimer

| praimer | 5' → 3' järjestus | amplifitseeritava ala pikkus |
|-------------------------------|----------------------|------------------------------|
| PerY domään II <i>forward</i> | TGTAGATGTGTGTGCCATCC | 243 bp |
| PerY domään II <i>reverse</i> | ACCGGTTCCACAGTCTCTAG | |

Lisa 6. PCR programm PerY praimeriga

| etapp | kestvus | temperatuur | tsükli arv |
|---------------------------|---------|-------------|------------|
| DNA esmane denaturatsioon | 5 min | 95°C | 1 |
| DNA denaturatsioon | 30 sek | 95°C | 30 |
| Praimerite seondumine | 30 sek | 54°C | 30 |
| DNA süntees | 30 sek | 72°C | 30 |
| Lõppsüntees | 10 min | 72°C | 1 |

Lisa 7. PCR programm XCRa3 ja XCRb5 praimeritega

| etapp | kestvus | temperatuur | tsükli arv |
|---------------------------|---------|-------------|------------|
| DNA esmane denaturatsioon | 5 min | 95°C | 1 |
| DNA denaturatsioon | 30 sek | 95°C | 30 |
| Praimerite seondumine | 30 sek | 53°C | 30 |
| DNA süntees | 30 sek | 72°C | 30 |
| Lõppsüntees | 10 min | 72°C | 1 |

Lisa 8. PCR programm XCRb6 praimeriga

| etapp | kestvus | temperatuur | tsüklike arv |
|---------------------------|---------|-------------|--------------|
| DNA esmane denaturatsioon | 5 min | 95°C | 1 |
| DNA denaturatsioon | 30 sek | 95°C | 30 |
| Praimerite seondumine | 30 sek | 50°C | 30 |
| DNA süntees | 30 sek | 72°C | 30 |
| Lõppsüntees | 10 min | 72°C | 1 |

Lisa 9. PCR programm XCRb7 praimeriga

| etapp | kestvus | temperatuur | tsüklike arv |
|---------------------------|---------|-------------|--------------|
| DNA esmane denaturatsioon | 15 min | 95°C | 1 |
| DNA denaturatsioon | 30 sek | 95°C | 30 |
| Praimerite seondumine | 30 sek | 50°C | 30 |
| DNA süntees | 30 sek | 72°C | 30 |
| Lõppsüntees | 10 min | 72°C | 1 |

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ Liisi Kink _____
(sünnikuupäev: _____ (autori nimi) 19.10.1989 _____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Veise sperma suguselekteerimine kolloidtsentrifuugimise teel ja veise X-kromosoomi spetsiifiliste proovide loomine
(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on _____ Ants Kurg ja Olavi Reinsalu _____
(juhendaja nimi)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018 (kuupäev)