

## 6. Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden hochsensitive Verfahren zur Geschlechtsdiagnose an Embryonen mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion (PCR) entwickelt. Die lange Reaktionsdauer der hierfür verwendeten herkömmlichen Thermocycler ist ein Faktor, der die praktische Anwendung der Geschlechtsdiagnose bei Embryonen erheblich einschränkt. Ziel dieser Untersuchungen war es, eine schnelle und sichere Art der Geschlechtsdiagnose an in vivo und in vitro erzeugten Rinderembryonen mit Hilfe eines Air Thermo-Cyclers (ATC) (Idaho Technology) zu entwickeln. Für die PCR wurden ein Primerpaar der Y-Chromosom-spezifischen Sequenz  $\lambda$ ES6.0 (BONDIOLI et al. 1989) und ein Primerpaar einer rinderspezifischen Sequenz als Kontrolle (ELLIS u. HARPOLD 1986) verwendet. Die Größe der erwarteten Produktbanden betrug für die männlich spezifische Sequenz 210 bp und für die rinderspezifische Sequenz 300 bp.

Die Optimierung des PCR-Protokolls an die Bedingungen des ATC fand an insgesamt 50 Rinderblutproben (25 männliche / 25 weibliche) unter Einsatz von 50pg DNA/Probe, entsprechend dem Einsatz der DNA aus 5 diploiden Zellen statt. Für die weiteren Untersuchungen wurden sowohl in vitro, als auch in vivo erstellte präimplantatorische Rinderembryonen verwendet. Zur Produktion der Rinderembryonen wurden Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) aus Schlachthofovarien mit der Slicing-Methode gewonnen. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Reifung der KOKs in TCM 199 + 10% OCS, eine 18-stündige Spermien-Oozyten-Kokultur in Fert-TALP und eine Kultur bis zur Mikromanipulation und Biopotentnahme an Tag 5 nach IVF in TCM 199 + 10% OCS. In vivo-Embryonen wurden nach Superovulation, Besamung und Spülung an Tag 5 post inseminationem durch unblutige Spülung des Uterus gewonnen. Durch eine schonende Quetschtechnik wurden den Embryonen entweder 2 x 5 Zellen oder, in Abhängigkeit vom Versuchsabschnitt, Einzelproben von 5 Zellen entnommen. Die Bioprote wurden vor der PCR verschiedenen DNA-Extraktionsverfahren (Erhitzung; Proteinase K; Proteinase K + Nonidet + Tween 20) unterzogen. Zusätzlich wurde bei einem Teil der Proben die Auswirkungen eines Taq-Polymerase-Antikörpers in der PCR untersucht. Der Taq-Polymerase-Antikörper diente als Alternative zu dem sonst in der PCR üblichen 'Hot Start', der im ATC bei Verwendung von Glaskapillaren als Reaktionsgefäße nicht möglich war. Die Übereinstimmung der mit PCR aufbereiteten Doppelproben (Dp) diente als Maß der Aussagesicherheit des Geschlechtsdiagnostetests. Embryonen, denen Einzel-

proben entnommen worden waren, wurden entweder für 3 Tage weiterkultiviert, gefärbt und Zellzahl und Blastozystenrate bestimmt. Ein geringer Teil der Embryonen wurde auf synchronisierte Empfängertiere übertragen, um die Anwendbarkeit des Tests in praxi zu ermitteln.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. Die Eignung des ATC und der verwendeten PCR-Protokolle zur Geschlechtsdiagnostik konnte anhand von je 50 pg aus Blut isolierter, genomischer DNA (~50 pg entsprechend 5 Zellen) bewiesen werden. Bei allen 50 Proben wurde das phänotypische Geschlecht der 25 männlichen und 25 weiblichen Rinder nach PCR bestätigt.
2. Durch die unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren wurde die Effizienz der Methode beeinflusst: 66% (33/50 Dp.) der In vitro-Embryonen konnten nach Extraktion durch Erhitzung, 58% (29/50 Dp.) nach Extraktion mit Proteinase K und 74% (74/100 Dp.) nach Extraktion mit Proteinase K + Nonidet + Tween 20 geschlechtsbestimmt werden.
3. Die zusätzliche Verwendung eines Taq-Polymerase-AK führte zu einer weiteren Effizienzsteigerung der Methode: Dadurch konnten bei 66% (33/50 Dp.) der In vitro-Embryonen nach Extraktion mit Proteinase K und 77% (77/100 Dp.) nach Extraktion mit Proteinase K + Nonidet + Tween 20 das Geschlecht bestimmt werden.
4. 70% (14/20 Dp.) der In vivo-Embryonen konnten nach DNA-Extraktion mit Proteinase K + Nonidet + Tween 20 und Mitverwendung eines Taq-Polymerase-AK gesext werden. Mit dem gleichen DNA-Extraktionsverfahren, aber ohne Mitverwendung eines Taq-Polymerase-AK, konnten 65% (13/20 Dp.) der Embryonen gesext werden. Damit wurde kein Unterschied im Verhalten zwischen In vivo- und In vitro-Embryonen in der PCR festgestellt.
5. Die für die Geschlechtsdiagnose benötigte Zeit betrug insgesamt 2 h, wobei nur 25 min auf die PCR entfielen.
6. Für die ATC-PCR sind drei verschiedene Kapillarengrößen von 10, 25 und 50 µl erhältlich. In dieser Arbeit mußte ein Kompromiß zwischen dem kleinsten Probenvolumen, das maximale Amplifikationsgeschwindigkeit ermöglicht, und dem größten Kapillarenvolumen, das die größte Verdünnung des Biopsiemediums erzielt, eingegangen werden.

Schwankungen in der chemischen Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemisches aufgrund der verfahrensbedingten Volumenschwankungen bei der Bioplatentnahme wirkten sich bei geringen Reaktionsvolumina von 25 µl in der ATC-PCR stärker aus und führten zu suboptimalen Reaktionsbedingungen.

7. Gerätebedingte Unregelmäßigkeiten in der Temperaturkonstanz der Amplifikationszyklen führten teilweise zu suboptimalen Reaktionsbedingungen und einer geringeren Produktausbeute und Bestimmungsrate.
8. Die Bioplatnahme reduzierte die Rate der Blastozystenentwicklung nicht ( $p < 0.05$ ). 81,8% (45/55) der bioplatierten Embryonen und 92,7% (51/55) der unbioplatierten entwickelten sich bis Tag 8 nach IVF zu Blastozysten weiter.
9. Die durchschnittliche Zellzahl ( $X \pm SEM$ ) betrug in der bioplatierten Gruppe der schlüpfenden und geschlüpften Blastozysten  $118.6 \pm 11.6$ , bei den frühen Blastozysten, Blastozysten und expandierten Blastozysten  $67.8 \pm 6.9$ . In der unbioplatierten Kontrollgruppe betrug die durchschnittliche Zellzahl bei den schlüpfenden und geschlüpften Blastozysten  $129.8 \pm 20.8$ , bei den frühen Blastozysten, Blastozysten und expandierten Blastozysten  $81.3 \pm 5.0$ . Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen bioplatierten Embryonen und der Kontrollgruppe (n.s.,  $p < 0.05$ ).
10. Es konnte kein Einfluß des Entwicklungsstadiums auf das Geschlecht beobachtet werden.
11. Ebenfalls war kein Einfluß der Embryonenqualität auf das PCR-Ergebnis feststellbar.
12. 51 Tage nach Transfer von 27 Embryonen auf 27 Färsen konnte bei drei Empfängertieren eine Trächtigkeit nach Ultraschalluntersuchung festgestellt werden (3/27, 11%).

Die Ergebnisse zeigen, daß die PCR mit Hilfe eines ATC eine schnelle, kostengünstige und gut in den Arbeitsablauf einzugliedernde Methode der Geschlechtsbestimmung ist, die aber große Sorgfalt seitens des Betreibers und optimale räumliche Gegebenheiten voraussetzt. Unregelmäßigkeiten in der Temperaturkonstanz des ATC und der Transfer von Biopsiemedium führten zu nicht optimalen Reaktionsbedingungen. Weiterentwicklungen in diesen Bereichen könnten den Erfolg der Methode steigern helfen. Die Methode der Bioplatnahme hat sich anhand der unbeeinträchtigten Weiterentwicklung und Zellzahlen als geeignet für die Geschlechtsdiagnose erwiesen.

## 7. Summary

Viola Sailer-Neuß

Sexing of bovine in vivo and in vitro produced embryos by Hot-Air-PCR

In the past few years, highly sensitive methods have been developed for embryonic sexing based on use of the polymerase chain reaction (PCR). Unfortunately, the amount of time required for sex determination by this method has greatly limited the application of embryonic sexing. The goal of the present study was to develop a fast and safe method for sex determination from in vitro and in vivo derived bovine embryos using the recently developed, faster Air Thermocycler (ATC) from Idaho Technology. For the PCR analysis, a set of oligonucleotide primers derived from the Y-Chromosome specific sequence  $\lambda$ ES6.0 (BONDIOLI et al. 1989). A second primer pair specific for a repeat sequence present in all bovine DNA was used as a control for the presence of successful DNA preparation (ELLIS and HARPOLD 1986). The size of the diagnostic band for the Y-specific primers was 210 bp and that produced by the bovine specific primers was 300 bp.

The optimization of a PCR protocol using the ATC was performed on blood samples (25 male and 25 female) using 50 pg DNA per reaction, an amount approximately equal to the DNA from 5 diploid bovine cells. For the main experiment, in vitro embryos were produced by isolation of Cumulus-Oocyte-Complexes (COC) by the slicing method, using ovaries obtained from a slaughterhouse. Subsequent to COC isolation, the oocytes were matured for 18 hours in TCM-199 with OCS and then fertilized by incubation with sperm in Fert-TALP for 18 hours. The resulting zygotes were further cultured to day five (16 cell to morula stage) of development at which point they were biopsied for sexing. In vivo embryos were flushed from superovulated donors on the fifth day following insemination.

The biopsy method involved making a hole in the zona pellucida with a glass needle and gently pressing on the embryo until approximately five cells emerge through the hole. In parts of the study, where the embryos were not going to be further cultivated or transferred, a second press-biopsy was performed to permit comparison of replicate samples. Biopsy samples were further treated by one of three protocols for DNA extraction: 1) Simple heating in distilled water; 2) Proteinase K digestion in buffer; 3) Proteinase K digestion in lysis buffer containing Nonidet and Tween 20. A subgroup of these samples was used to test the effect of

adding an anti-Taq polymerase antibody to the PCR reaction as an alternative to the traditional "Hot Start" method which is not possible in sealed capillary tubes. Proof of the reproducibility of the method was obtained by comparing the results of duplicate samples. The survival of biopsied embryos - from which five cells had been removed - was determined by culturing them in vitro for three days at which point they were stained and cell numbers were counted. A smaller subgroup of embryos were transferred directly to recipients following biopsy.

The following results were obtained:

1. The ATC based PCR protocol gave consistent sexing results with as little as 50 pg of bovine DNA, the equivalent of 5 diploid cells, on DNA isolated from 50 blood samples of known sex.
2. The reproducibility of the sexing protocol in twin samples was found to be dependant on the method for DNA extraction. Using in vitro produced embryos, simple heating gave 66% (33/50) reproducibility, extraction with Proteinase K alone gave 59% (28/50) reproducibility, and extraction using Proteinase K + Nonidet + Tween 20 gave 74% (74/100).
3. The addition of Taq Start, an antibody to Taq polymerase, to the reaction increased the efficiency of the ATC PCR reaction. Using in vitro produced embryos, the reproducibility with Proteinase K extraction was increased to 66% (33/50) and the reproducibility with Proteinase K + Nonidet + Tween 20 was increased to 77% (77/100).
4. The result of testing two PCR protocols with in vivo produced embryos was the observation that 70% (14/20) of double biopsy samples gave identical results in Taq Start PCR using Proteinase K + Nonidet + Tween 20. Without Taq Start, only 65% (13/20) were identical. There was no difference between in vitro and in vivo embryos.
5. With this method, sexing requires a total of 2 hours of which only 25 minutes is taken up by the PCR reaction.
6. There are three different sizes (10, 25 and 50  $\mu$ l) of capillaries available for the ATC. It was apparent in this study that one must compromise between using the smallest capillaries which maximize the speed of the PCR reaction and the largest capillaries which maximize the dilution of contaminants. It seems clear that medium carried over with the cell biopsy had a negative effect on the PCR reaction and that much of the variability in the results could be accounted for by variability in the amount of medium introduced into the 25  $\mu$ l reaction volume chosen for this study.

7. Irregularities in the temperature control of the ATC may have resulted in suboptimal yields of the PCR-products of the sexing reaction.
8. The biopsy procedure did not significantly alter the rate of blastocyst production or development rate ( $p < 0.05$ ). 81.8% (45/55) of the biopsied embryos and 92.7% (51/55) of the non-biopsied embryos developed to blastocysts after culture to day 8 after IVF.
9. The mean cell number ( $X \pm \text{SEM}$ ) for biopsied embryo both hatched and in the process of hatching was  $118.6 \pm 11.6$  as compared to  $67.8 \pm 6.9$  for the group of early blastocysts, blastocysts and expanded blastocysts. For the non-biopsied control group, the hatched and hatching blastocysts had a mean cell number of  $129 \pm 20.8$ , and the group consisting of earlier blastocysts had a mean cell number of  $81.3 \pm 5.0$ . There was no significant difference in mean cell numbers between biopsied and non-biopsied embryos in either group ( $p < 0.05$ ).
10. There was no influence of the stage of development and the proportion of male or female embryos.
11. The quality of the embryos was not correlated with the success of the PCR analysis, i.e. the DNA quality from various groups of embryos was constant.
12. A total of 27 biopsied embryos were transferred to 27 recipients. However, after 51 days, ultrasound examination revealed pregnancy in only 3 animals (3/27, 11%). It is not possible to determine whether this was related to the stage of development, the biopsy procedure or to other problems related to the transfer procedure itself.

The results indicate that the PCR method based on the ATC machine provides a fast, economical method for sex determination. The practical significance of this speed is the possibility to determine the sex of in vivo derived embryos and to transfer those of the desired sex back to recipients within one normal working day, thereby avoiding a prolonged exposure to in vitro conditions. It is clear that PCR based sexing based on the small numbers of cells obtained in a biopsy requires a high level of operator expertise and considerable care in sample handling. The slight variations in the temperature control of the Model 1605 Air Thermo-Cycler and the problem of carry-over of biopsy medium into the 25 ul reaction volume are sources of error in this form of PCR sexing. It is clear that further improvements in this method will increase its practical application. The biopsy procedure itself did not cause any adverse effect on further embryo development.