วิธีตัดแยกเซลล์ตัวอ่อนหนูเมาส์ระยะก่อนฝังตัวและการเพิ่มขยายปริมาณยีนส์ที่จำเพาะของโครโมโซมเอ็กซ์และวาย ในบลาสโตเมียร์เดี่ยวเพื่อการกำหนดเพศ

นางสาวพรภิมล ตั้งชัยสิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สหสาขาวิชาสรีรวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-638-379-5

PREIMPLANTATION MOUSE EMBRYO BIOPSY METHODS AND AMPLIFICATION OF X- AND Y-CHROMOSOME SPECIFIC GENES IN SINGLE BLASTOMERES FOR SEX DETERMINATION

Miss Pornpimon Tangchaisin

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Physiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1997

ISBN 974-638-379-5

Thesis Title Preimplantation Mouse Embryo Biopsy Methods and Amplification of X- and Y-Chromosome Specific Genes in Single Blastomere for Sex Determination

By Miss Pornpimon Tangchaisin

Interdepartment Physiology

Principle Advisor Professor Dr. Pramuan Virutamasen

Co-advisor Dr. Thaweesak Tirawatnapong

Associate Professor Dr. Vithaya Yodyingyoud

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy

..... Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee

..... Chairman
(Professor Ratree Sudsuang, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Professor Pramuan Virutamasen, M.D.)

..... Member
(Thaweesak Tirawatnapong, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Vithaya Yodyingyoud, Ph.D.)

..... Member
(Professor Kanok Pavasuthipaisit, M.D.)

..... Member
(Associate Professor Mongkol Techakumpu, Ph.D.)

พรภิมล ตั้งชัยสิน : วิธีตัดแยกเซลล์ตัวอ่อนหนูเมาส์ระยะก่อนฝังตัวและการเพิ่มขยายปริมาณยีนส์ที่จำเพาะของโครโมโซมเอ็กซ์และวายในบลาสโตเมียร์เดี่ยวเพื่อการกำหนดเพศ (PREIMPLANTATION MOUSE EMBRYO BIOPSY METHODS AND AMPLIFICATION OF X- AND Y-CHROMOSOME SPECIFIC GENES IN SINGL BLASTOMERE FOR SEX DETERMINATION) อ. ที่ปรึกษา : ศ.นพ. ประมวล วีรุตมเสน, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. ทวีศักดิ์ ศิระวัฒนพงศ์ ; รศ. ดร. วิทยา ยศชิงฮวด; 198 หน้า. ISBN 974-638-379-5

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการตัดแยกเซลล์บลาสโตเมียร์จากตัวอ่อนระยะก่อนฝังตัว 2 วิธีคือ 1) PZD-push และ 2) direct aspiration โดยเปรียบเทียบการทำระหว่างตัวอ่อนระยะ 4-, 8-เซลล์ และมอรูล่า ต่ออัตราการเจริญพัฒนาภายหลังการตัดแยกเซลล์ทั้งในหลอดทดลองและหลังย้ายฝากตัวอ่อน และเพื่อประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีการวินิจฉัยเพศในตัวอ่อนหนูเมาส์ระยะก่อนฝังตัว โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส 2 ขั้นตอน ในการศึกษาเปรียบเทียบนี้นำตัวอ่อนหนูเมาส์พันธุ์ ICR แบ่งตัวอ่อนแบบสุ่มออกเป็น 4 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มควบคุม (2) กลุ่มควบคุมน้ำยา (3) กลุ่มตัดแยกเซลล์โดยวิธี PZD-push และ (4) กลุ่มตัดแยกเซลล์โดยวิธี direct aspiration พบว่าอัตราการเจริญแบ่งเซลล์เป็นบลาสโตซิสปกติ และอัตราการฟักตัวออกจากเปลือกของตัวอ่อนภายหลังตัดแยกเซลล์ออกโดยทั้ง 2 วิธี ในตัวอ่อนทั้ง 3 ระยะ ไม่แตกต่างจากตัวอ่อนในกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมน้ำยา แต่อัตราการฟักตัวสมบูรณ์ของบลาสโตซิส ที่เจริญมาจากตัวอ่อนที่ถูกตัดแยกเซลล์โดยวิธี direct aspiration ทั้ง 3 ระยะ มีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มควบคุมน้ำยา (P<0.01) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (4-เซลล์: 67.4%, 8-เซลล์: 72.8%, มอรูล่า: 71.2% VS กลุ่มควบคุมระยะ 4-เซลล์: 86.7% , 8-เซลล์: 86.4%, มอรูล่า: 87.6% และกลุ่มควบคุมน้ำยาระยะ 4-เซลล์: 85.4%, 8-เซลล์: 85.2%, มอรูล่า: 85.2%) รวมทั้งอัตราการเกิดมีชีวิตของบลาสโตซิสที่เจริญมาจากตัวอ่อนที่ถูกตัดแยกเซลล์โดยวิธี direct aspiration ที่ระยะ4-เซลล์ (11.5% VS 27.3%) และ8-เซลล์ (24.2% VS 41.2%) มีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การตัดแยกเซลล์โดยวิธี PZD-push อัตราการฟักตัวสมบูรณ์และอัตราการเกิดมีชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่า การตัดแยกเซลล์ในตัวอ่อน ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติหรือความพิการแต่กำเนิดในหนูเมาส์ที่คลอดมีชีวิต น้ำหนักตัวของหนูเมาส์ขณะแรกเกิด หย่านม และเมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ในหนูที่เกิดจากตัวอ่อนที่ถูกตัดแยกเซลล์ออก ไม่แตกต่างจากหนูเมาส์ในกลุ่มควบคุม และยังสามารถให้ลูกรุ่นที่สองที่สมบูรณ์ได้ อย่างไรก็ตามพบว่า การตัดแยกเซลล์ตัวอ่อนที่ระยะโมรูล่ามีความยุ่งยากมากกว่าในตัวอ่อนระยะ 8-เซลล์ ดังนั้นจึงใช้การตัดแยกเซลล์ตัวอ่อนที่ระยะ 8-เซลล์โดยวิธี PZD-push ซึ่งให้อัตราการเจริญของตัวอ่อนสูงที่สุด เพื่อใช้ในการวินิจฉัยแยกเพศในตัวอ่อนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส 2 ขั้นตอน การศึกษานี้เลือกใช้ยีน 2 ชนิดคือ Sry และ Zfy ซึ่งเป็นยีนที่แสดงความจำเพาะต่อเพศผู้บนโครโมโซมวายของหนูเมาส์ นำมาเป็นยีนเป้าหมายในการแยกตัวอ่อนเพศผู้ออกจากเพศเมีย และใช้ยีน DXNds3 ซึ่งอยู่บนโครโมโซมเอ็กซ์ของหนูเมาส์ ทำหน้าที่เป็นยีนควบคุมภายใน ทดสอบความถูกต้องและความจำเพาะของ primers ต่อยีนทั้ง 3 ชนิดนี้ โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดของหนูเมาส์เพศผู้ และเพศเมีย นำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ด้วย primers 2 คู่ สำหรับหนึ่งยีน พบว่าดีเอ็นเอตัวอย่างจากหนูเมาส์เพศผู้ให้ผลบวกต่อการเพิ่มปริมาณยีนทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่ดีเอ็นเอตัวอย่างจากหนูเมาส์เพศเมียให้ผลบวกต่อยีน DXNds3 เพียงอย่างเดียว (ความถูกต้องแม่นยำ 100%) ทดสอบประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส 2 ขั้นตอนในระดับเซลล์เดียวโดยนำ primers นี้มาใช้ในการวินิจฉัยเพศในบลาสโตเมียร์เดี่ยว โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในสภาวะเดียวกัน และย้ายฝากตัวอ่อนที่วินิจฉัยเพศแล้วกลับไปยังมดลูกของหนูตัวรับ ตรวจสอบเพศของลูกหนูเมาส์ที่คลอดเปรียบเทียบกับผลของการวินิจฉัยเพศโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่าเพศของลูกหนูเมาส์จำนวน 36 ตัว จากลูกหนูที่คลอดทั้งหมด 37 ตัว ตรงกับผลการวินิจฉัยเพศโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (ความแม่นยำ 97%) การวินิจฉัยเพศในตัวอ่อนระยะก่อนฝังตัว โดยการตัดแยกเซลล์จากตัวอ่อนระยะ 8-เซลล์ ด้วยวิธี PZD-push และเพิ่มขยายปริมาณยีนเอ็นเอจำเพาะในบลาสโตเมียร์เดี่ยว ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส 2 ขั้นตอน มีความปลอดภัยและน่าเชื่อถือ ถูกต้องแม่นยำสูง สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมในตัวอ่อนของคนก่อนที่จะฝังตัวในมดลูกได้ในอนาคต

C645731 : MAJOR PHYSIOLOGY
KEY WORD: PREIMPLANTATION MOUSE EMBRYO / EMBRYO BIOPSY / PCR / SINGLE BLASTOMERE /SEX DETERMINATION
PORNPIMON TANGCHAISIN : PEIMPLANTATION MOUSE EMBRYO BIOPSY METHODS AND AMPLIFICATION OF X- AND Y-CHROMOSOME SPECIFIC GENES IN SINGLE BLASTOMERE FOR SEX DETERMINATION. THESIS ADVUSOR : PROF.PRAMUAN VIRUTAMASEN, M.D. THESIS CO-ADVISOR : Dr. THAWEESAK TERAWATANAPONG, Ph.D.; ASSOC. PROF. VITHAYA YODYINGYOUD, Ph.D. 198 pp. ISBN 974-638-379-5

The purpose of the present study was to compare the efficiency of two different embryo biopsy methods regarding the development in vitro and in vivo of biopsied embryos at three different cleavage stages in the mouse model and to assess the reliability of sex determination in mouse preimplantation embryos using the two-step polymerase chain reaction method. In a comparative study, ICR preimplantation mouse embryos at different three stages (four- ,eight-cell and early morula stages) were randomly allocated into four groups: (1) a control group, (2) a solution control group, (3) a PZD-push biopsy group, and (4) a direct aspiration biopsy group. The rates of normal blastocyst formation and hatching blastocysts of the biopsy embryos (including PZD-push and direct aspiration) were not significantly different from those of the control and solution control embryos. However, in the direct aspiration group, the rates of completely hatched blastocysts (4-cell: 67.4%, 8-Cell: 72.8%, morula: 71.2% VS control embryos at the 4-cell: 86.7% , 8- cell: 86.4%, and morula: 87.6% and solution control group at the 4-cell: 85.4%, 8-cell: 85.2%, and morula: 85.2%) and live-births at the 4-cell (11.5% VS 27.3%) and 8-cell stages (24.2% VS 41.2%) were significantly ($p<0.01$) lower than those observed in the control and solution control embryos, whereas embryo biopsy at the 8-cell and morula stages with PZD-push technique were not significantly different from the controls. No grossly anatomical abnormalities were found in body weights or in subsequent ability to reproduce a second generation of mice derived from both biopsied and non-biopsy control embryos. Embryos biopsied at the morula stage had, however, more difficulties than at the 8-cell stage. Therefore, embryo biopsy at the 8-cell stage using PZD-push technique is the most suitable stage for embryo biopsy. For sex determination, the Sry and Zfy genes, known to be presented in the sex-determining region of the mouse Y chromosome, were selected for Y-specific target sequences and the DXNds 3 locus located on the mouse X chromosome served as the internal control sequence. DNAs extracted from heart blood of male and female mice were used to test the accuracy and specificity of the selected primers using the two-step PCR method. The same experimental conditions were then applied to amplify the single copy genes in single mouse blastomere with two pairs of primers for each of the target sequences. The sex-determined embryos were transferred to the uteri of pseudopregnant recipients to test the consistency of the assay system. All male and female blood DNA sample results confirmed the correct sex identification of the origin (100%). Nineteen of 20 single blastomeres showed the accurate diagnosis when compared with their 7/8 embryos. The sex of 36 out of 37 mouse pups born from biopsied male and female embryos agreed with the predicted sex. Reliable genetic analysis of sex chromosome- specific sequences in single cells is possible by two-step PCR and may be applied for sex determination of human embryos and the diagnosis of defective genes in human preimplantation embryos derived from the in vitro fertilization program.

Acknowledgment

All experiments in this thesis were carried out in the Reproductive Medicine Unit, Department of Obstetric and Gynecology, Faculty of Medicine Chulalongkorn University during the academic period of 1993-1997.

Throughout the process of my research I received a lot of help, friendship, encouragement and different supports from many colleagues and friends in this unit. I would like to give my sincerely thanks to: Prof. Dr. Pramuan Virutamasen for providing me the opportunity to do research here and his thoughtful advice and supports in many aspects throughout my graduate career; Dr. Thaweesak Tirawatnapong for his help and close collaboration and for valuable advice in molecular genetics and PCR techniques; Associate Prof. Dr. Vithaya Yodyingyoud for his valuable advice and support; Prof. Dr. Ratree Sudsuang, Prof. Dr. Kanok Pavasuthipaisit, and Associate Prof. Dr. Mongkol Techakumpu for their helpful and critical proof-reading of my thesis; Assistant Prof. Dr. Khamtorn Pruksananonda and Assistant Prof. Dr. Somchai Suwajanakorn and all members of the IVF laboratory unit for their helpful and collaboration; Ms. Saowarat Propadith for help in typing some parts of this thesis and preparation of slides; MS. Petra Hirch who corrected my English language in my articles and in this thesis.

Finally, I would like to give my deepest appreciation to my parents, my sisters for their love, patience and understanding.

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

LIST OF ABBREVIATIONS

APRT..... .....adenine phosphoribosyl transferase

ART.....Assisted reproductive technology

ATP..... .....adenosine triphosphate

BSA.....bovine serum albumin

bp.....base pair

Ca^{2+}..... .....calcium ion

cDNA..... .....complementary DNA

CF..... .....Cystic Fibrosis

cM..... .....centrimorgan

CO_2.....carbondioxide

CVS.....Chorionic villi sampling

dATP..... .....deoxyadenosine triphosphate

dCTP..... .....deoxycytidine triphosphate

dGTP..... .....deoxyguanosine triphosphate

dNTP..... .....deoxynucleotide triphosphate

dTTP..... .....deoxythymidine triphosphate

DMD..... .....Duchenne muscular distrophy

DNA..... .....deoxyribonucleic acid

EDTA..... .....ethylinediaminetetraacetic acid

FISH..... .....fluorescent in situ hybridization

FITC..... .....fluorescein isothiocyanate

hCG.....human chorionic gonadotropin

HCl.....hydrochloric acid

HPRT.....hypoxanthine phosphoribosyl transferase

hr.....hour (s)

ICM.....inner cell mass

ICSI.....Intracytoplasmic sperm injection

ISH.....In situ hybridization

IU.....International unit

IVF.....In vitro fertilization

kb.....kilobase or 1000 base pair

KCl.....potassium chkoride

LN_2.....liquid nitrogen

M.....molar

Mg^{2+}.....magnesium ion

MgCl.....magnesium chloride

mg.....milligram

min.....minute(s)

ml.....milliliter

mM.....millimolar

PAR.....Pseudoautosomal region

PBS.....phosphate-buffered saline

PCR.....Polymerase chain reaction

PEP.....Primer extension preamplification

pH.....power of hydrogen

PID.....Preimplantation genetic diagnosis

pmol.....picomolar

PMSG.....pregnant mares' serum gonadotropin

PZD.....partial zona dissection

SRY.....Sex determining region of Y

T6.....Tyrode's solution 6

TDF.....Testis-determining factor

Tdy.....Testis-determining Y of mouse

TE.....trophectoderm

UV.....ultraviolet light

µg.....microgram

µl.....microlitter

µm.....micromolar

µM.....micrometer

V.....volt (s)

VS.....versus

ZFX.....Zinc finger X gene

ZFY.....Zinc finger Y gene

ZP.....zona pellucida