

Geschlechtsbestimmung bei Ziegenembryonen

M. El-Gayar und W. Holtz

Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Universität Göttingen,
Albrecht-Thaer-Weg 3, D-37075 Göttingen

Im Rahmen des Embryotransfers kann es von Interesse sein das Geschlecht der transferierten Embryonen zu kennen. Ziel der vorliegenden Untersuchung war, ein schonendes Biopsieverfahren für Ziegenembryonen zu entwickeln um das Geschlecht mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu bestimmen. Um sicher zu stellen, dass der Embryo während und nach der Zellentnahme in seiner Zona pellucida verbleibt, wurde die traditionell verwendete Haltepipette von uns modifiziert.

Zwölf nach Superovulation und transcervikaler Spülung (Suyadi et al., 2000, Small Rum. Res. 36, 195-200) gewonnene Tag 7-Blastocysten der Rasse Burenziege wurden mit Hilfe einer um 90° abgewinkelten Haltepipette (Abb. 1) fixiert, so dass sich die mikrochirurgische Klinge mit Hilfe des Mikromanipulators mit wenig Aufwand durch die Zona pellucida bis zum Trophoblast führen liess. Zellen in einer Größenordnung von 5-10 % des Embryos wurden dem Trophoblasten entnommen. Durch Erhitzen der Zellen in 8 µl Wasser auf 99°C für 5 min wurde die DNA aus den Trophoblastzellen freigesetzt. Zur Geschlechtsbestimmung wurden als erstes die ZFX/ZFY Genfragmente (Aasen und Medrano, 1990, Bio/Technology 8, 1279-1281) mittels PCR amplifiziert. Ein 3 µl-Amplifikat aus der ersten PCR wurde zur Reamplifikation mittels Nested-PCR verwendet. Zur RFLP-Analyse wurden 10 µl des PCR-Produkts mit SacI bei 37°C für mindestens 60 min inkubiert. Nach Restriktionsverdauung wurden die Fragmente auf einem 1% Agarosegel (mit Ethidiumbromid) aufgetrennt. Anschliessend wurde jeweils ein biotierter Embryo chirurgisch auf ein Empfängertier am 6. Zyklustag übertragen. Zur Ermittlung der Trächtigkeit wurden die Tiere 24 Tage nach dem Transfer transrektal ultrasonographisch untersucht (Echtzeit-Scanner SSD 500, mit 7,5 Mhz Linear-Schallkopf). Das Ergebnis der Geschlechtsbestimmung wurde bei der Geburt überprüft.

Traditionelle Haltepipette
(Hogan et
al., 1986, A Laboratory Manual,
Cold
Spring Harbor, NY)

Eigene
Haltepipette
(90°
Winkel)

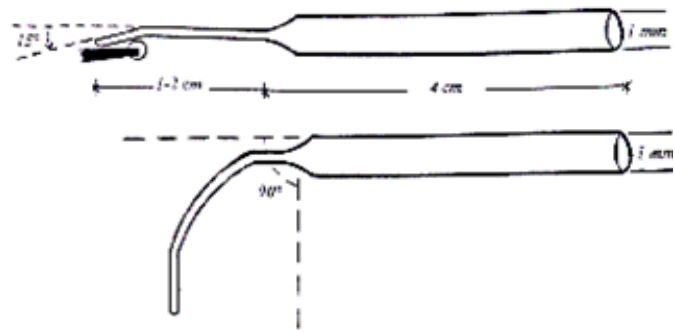


Abbildung 1: Traditionelle und eigens entwickelte um 90° abgewinkelte Haltepipette

Die Haltepipette, die im Winkel von 90° gebogen war, erwies sich für die Biopsieentnahme aus Blastocysten als besonders geeignet. Die Trächtigkeitsrate nach Transfer der bioptierten Embryonen lag bei 67% (8/12). Somit beeinträchtigte die Entnahme der Trophoblastzellen die Überlebensrate der Embryonen offenbar kaum. Ein Empfängertier hatte am Tag 35 abortiert. Nach PCR und elektrophoretischer Auftrennung zeigten sich bei männlichen Embryonen 3, bei weiblichen 2 Banden. Mit Hilfe der PCR konnte das Geschlecht an 83% (10/12) der Biopsieproben diagnostiziert werden. Bei den restlichen 2 Tieren liess sich kein eindeutiges Urteil fällen. Diese Ergebnisse zeigen, daß es möglich ist, das Geschlecht von Ziegenembryonen anhand einiger Trophoblastzellen zu bestimmen. Ein Transfer gesexter Ziegenembryonen wurde bislang noch nicht berichtet. Von 7 lebend geborenen Lämmern waren 4 männlich und 3 weiblich. Wo das Geschlecht mittels PCR diagnostiziert wurde, konnte dieses durch die geborenen Lämmer verifiziert werden. Die Genauigkeit der Geschlechtsbestimmung lag bei 80% (4/5). Ein weibliches Lamm wurde fälschlich als männlich diagnostiziert. Möglicherweise lag eine Kontamination mit an der Zona pellucida anhaftenden Spermatozoen vor. Dies tritt nach unserer Beobachtung bei Ziegenembryonen häufig auf und erfordert besondere Sorgfalt. Die 90°-Haltepipette hat sich auch bei der Teilung von Ziegenembryonen als besonders geeignet erwiesen.