مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۱، ۴۲-۳۵

جداسازی اسپرم‌های منجمد حامل کروموزوم x و y گاومیش با روش شیب غلظت وارزیابی آن با روش هیبرید کردن در جا با ماده فلورسنت

عبدالرضا رستگارنیا[1*] مسعود افشانی[2] پوپک افتخار یزدی[3]

۱) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه- ایران.
۲) دانش آموختهٔ دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه- ایران.
۳) گروه جنین شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، پژوهشکده رویان، تهران- ایران.

(دریافت مقاله: ۱۲ تیر ماه ۱۳۹۰ ، پذیرش نهایی: ۹ آبان ماه ۱۳۹۰)

چکیده

زمینه مطالعه: تعیین جنسیت اسپرم یکی از راه‌های مهم پیش انتخاب جنسی نتاج است که به همراه تلقیح مصنوعی، توانائی قابل توجهی برای بهبود روند اصلاح نژاد دام‌ها دارد. **هدف:** هدف از انجام این تحقیق ارزیابی شیب غلظت ناپیوسته Allgrad در جداسازی اسپرمهای گاومیش براساس کروموزومهای جنسی به روش هیبرید کردن فلورسنت در جا (FISH) بود. **روش کار:** جهت جداسازی اسپرم‌های حاوی کروموزوم‌های جنسی و منی منجمد گاومیش پس از ذوب به روش شیب غلظت ستونی از غلظت نامتناوب ۴ لایه‌ای از غلظت ۶۵ تا ۹۵ و با اختلاف ۱۰ درصد بین لایه‌های متوالی با استفاده از محیط تهیه گردید. نمونه اسپرم پس از ذوب برروی اولین لایه تیوب قرار گردید تا اسپرماتوزوئیدهای با چگالی مشابه را پس از سانتریفیوژ در یک سطح جمع آوری واستخراج نماید. از روش با پروب رنگی تهیه شده گاوی برای تمایز اسپرم‌ها در محیط‌های تفکیکی استفاده گردید. شمارش اسپرماتوزوئیدها برحسب وجود سیگنال‌های رنگی قرمز و سبز که به ترتیب معرف اسپرم‌های حامل کروموزوم‌های و بود صورت گرفت. **نتایج:** براساس نتایج بدست آمده اختلاف معنی داری در تعداد اسپرم‌های باکروموزوم‌های X در محیط مایع جداشده از لایه تحتانی نسب به فوقانی (۷۸/۳ در مقابل ۲۱/۷ درصد) گزارش گردید ($p<0/05$). ازسوی دیگر در تمامی نمونه‌های تحت آزمایش تعداد اسپرماتوزوئیدهای با کروموزوم‌های در مایع جداشده از لایه فوقانی (۷۵/۵ در مقابل ۲۴/۵ درصد) بیشتر بود ($p<0/05$). **نتیجه‌گیری نهایی:** به طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد استفاده از ستون نامتناوب چهار لایه‌ای محیط Allgrad یک روش مطمئن برای جداسازی اسپرماتوزوئیدها منی منجمد پس از ذوب گاومیش می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، انتخاب جنسیت، گرادیان Allgrad، گاومیش.

مقدمه

تعیین جنسیت در انسان و حیوانات دیگر موضوع پیچیده‌ای است و عوامل ژنتیکی و هورمونی در آن دخیل هستند. در دام‌ها نیز به واسطه لزوم انجام آزمایش‌های تحقیقاتی مورد نیاز روی حیوانات با جنس خاص و وجود منافع اقتصادی واصلاح نژادی، تعیین جنسیت تقریباً همزمان با آنسان آغاز شد. بنابراین بالابردن احتمال حصول جنس مورد نظر کمک شایانی به اهداف مورد نظر خواهد کرد(۶). در هنگام لقاح کروموزوهای تمامی تخمک‌ها شبیه به هم می‌باشند یعنی در گاومیش رودخانه‌ای(2n= 48) حاوی ۲۳ کروموزم سوماتیک و یک کروموزوم جنسی x می‌باشند، در صورتی که اسپرماتوزوا دارای دو گروه متفاوت هستند. یک دسته دارای کروموزوم x و دسته دیگردارای کروموزوم y می‌باشند. تقریباً یک نسبت مساوی بین اسپرماتوزوهای حامل x و y در منی وجود دارد. لقاح اسپرم‌های حاوی کرموزوم x با تخمک تشکیل جنس مونث با ژنوتیپ (xx) و لقاح آن دسته اسپرم‌های حاوی y با تخمک تشکیل جنس مذکر با ژنوتیپ (x y)را می‌دهد(۱۱). امروزه بیش از ۳۰۰ نوع بیماری وابسته به جنس شناخته شده است که هرکدام در یکی از جنس‌ها شایع تر است که در جنس دیگر وجود ندارد. لذا می‌توان با تعیین جنسیت اسپرم قبل از عمل لقاح از بروز این نوع بیماری‌های ژنتیکی جلوگیری کرد(۳،۵). امروزه تکنیک‌های مختلفی جهت جداسازی اسپرماتوزوئیدهایی دام‌های اهلی نظیر استفاده از ستون آلبومین، فلوسیتومتری و شیب غلظت گزارش گردیده است. اصول جداسازی اسپرم‌های حاوی کروموزوم x و کروموزوم y در روش شیب غلظت، بر پایه تفاوت چگالی در محتوی ژنتیکی اسپرم‌ها می‌باشد(۳،۱۳،۱۷). Lu و همکاران در سال ۲۰۱۰ میزان آبستنی متعاقب بکارگیری اسپرم‌های تعیین جنس شده در تلقیح مصنوعی گاومیش‌های نژاد باتلاقی و نیز اهمیت آن در تسهیل روند اصلاح نژاد در این گونه را نشان دادند (۱۲). در این راستا Presicce و همکاران در سال ۲۰۰۵ میزان آبستنی متعاقب بکارگیری اسپرم‌های تعییبن جنس شده در یک برنامه همزمان‌سازی فحلی و تلقح مصنوعی در زمان ثابت (ovosynch) در گاومیش‌های رودخانه‌ای نژاد مدیترانه‌ای را ۴۲/۸۱ درصد گزارش دادند(۱۵).

در تمامی روش‌های جداسازی اسپرم نیاز به یک روش ارزیابی مناسب وجود دارد. معمولاً تعداد و میزان قابلیت اعتماد آزمایشاتی که برای ارزیابی روش‌های تعیین جنس اسپرم به کار می‌رود کمتر از تعیین جنسیت جنین می‌باشد. تعیین جنسیت اسپرم از طریق مقدار محتوی

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۳۴۴۰۰۹۴-۰۴۴۱ نمابر: ۳۴۶۰۹۸۰-۰۴۴۱ Email: arastegar@iaurmia.ac.ir

DNA آن ویا استفاده از قطعات DNA اختصاصی کروموزوم Xو Y روش‌های هستند که به منظور ارزیابی اسپرم‌های تعیین جنس شده به کار می‌روند. امروزه روش‌های نظیر FISH که با استفاده از قطعات اختصاصی کروموزوم‌های Xو Y عمل می‌کنند دارای نتایج قابل اطمینان تری هستند(۱۱،۱۳،۱۵). در تحقیق که برای اولین بار در کشور صورت گرفت سعی بر آن بوده که با انتخاب یک محیط جداکننده مناسب و سالم برای منی گاومیش ضمن حصول موفقیت در امر حفظ و جداسازی اسپرماتوزوئیدها، امکان انتخاب جنسیت در تشخیص های قبل از لقاح و لانه گزینی در این گونه فراهم گردد. جهت بررسی میزان تفکیک اسپرم‌های منی منجمد حاوی کروموزوم‌های X و Y گاومیش با روش شیب غلظت از نمونه پایوت تهیه شده با رقیق کننده تریس- زرده تخم مرغ در ایستگاه اصلاح نژاد جبل واقع در شهرستان ارومیه که در داخل تانک پرتابل نیتروژن مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتیگراد ذخیره گردیده بود استفاده گردید. در این تحقیق برای اولین بار برای تهیه شیب غلظت جهت جداسازی اسپرم‌های حامل کروموزوم Xو Y از محیط جدیدوتجاری Allgrad که در آزمایشگاه‌های کمک باروری به منظور شستشوی مایع منی و حذف سلول‌های مرده وسایر مواد اضافی اسپرم استفاده می‌شود استفاده شد تا اسپرماتوزوئیدهای با چگالی (Density) مشابه در یک سطح جمع آوری و استخراج گردد سپس نتایج آن باروش FISH ارزیابی شد.

مواد و روش کار

جمع آوری وانجماد منی: برای این منظور تعداد ۸ انزال دو راس از گاومیش‌های نر مورد نظر در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گاومیش (جبل- ارومیه) با استفاده از مهبل مصنوعی (مدل گاومیش، IMV، فرانسه) جمع آوری گردید. نمونه‌های منی با کیفیت عالی و با داشتن بیش از ۷۰ درصد اسپرماتوزوئید متحرک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با بافر تریس- زرده تخم مرغ، رقیق گردید. نمونه منی رقیق شدهٔ پس از طی مرحله سرد شدن (cooling rate) در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت و نیز اعمال زمان تعادل ۶-۴ ساعت در دمای ۴ درجه متعاقب افزودن گلیسرول، در پایوت‌های ۰.۵ میلی لیتری با اعمال زمان انجماد ۲۰ min/ ۱۲۰- ,۴۰ - در ازت مایع منجمد گردیده ودرداخل کانتینرهای مخصوص ازت مایع در دمای ۱۹۶ - درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند(۱۸).

شستشوی اسپرم(Sperm Washing): برای این منظور پس از ذوب پایوت‌ها (thawing) در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد در داخل بن ماری به‌مدت ۴۰ ثانیه، مقدار یک میلی لیتر از مایع منی رقیق شده محتوی پایوت‌ها را درون لوله آزمایش قابل سانتریفیوژ (Test Tube) قرار داده و حجم ان را توسط محیط Hams F10 به ۵ سی‌سی رسانیده سپس در دمای معمولی اتاق با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی از رسوب حاصله که حاوی تعداد اندکی از سلوهای زایا، گلبول‌ها ،اسپرم و رقیق کننده بود جدا گردیده ودوباره با استفاده از محیط s F10 Ham حاوی سرم حجم نمونه را به ۲ میلی لیتر رسانیده شد و در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و 5%CO2 درصد نگهداری گردید.

شیب غلظت ناپیوسته All grad: به منظور ایجاد ستون غلظت نامتناوب(Discontinuous Density Column) از غلظت‌های مختلف محیط جدید وتجاری Allgrad (Life Global, USA) در محلول s F10 Ham استفاده گردید. پس از انجام آزمون و خطا برروی ستون‌های غلظت نامتناوب ۲ و ۴ و ۸ و ۱۲ لایه که قبلا آزمایش شده بود، روش ستون با غلظت نامتناوب ۴ لایه با غلظت‌های ۹۵درصد، ۸۵درصد، ۷۵درصد و ۶۵درصد را درلوله‌های با انتهای مخروطی۱۵میلی لیتری (Falcon, USA) تهیه گردید. شیب غلظت ۹۵درصد به معنای وجود ۹۵درصد از محلول Allgrad و ۵درصد محیط Hams F10 که حاوی ۱۰ درصد سرم آلبومین انسانی می‌باشد و به تبعیت از آن محیط ۸۵درصد حاوی Allgrad از آن و ۱۵درصد محیط Hams F10 حاوی سرم می‌باشد. لایه ۹۵درصد را در پایین‌ترین قسمت لوله آزمایش و به ترتیب لایه‌های دیگر را روی آن قرارداده به صورتی که بالاترین لایه اختصاص به غلظت ۶۵درصد داده شد ونمونه اسپرم نیز بر روی آن قرار گرفت. اضافه کردن لایه‌های غلظت به لوله آزمایش با دقت بسیار زیاد و به آرامی توسط نوک پیپت پاستور انجام گردید. پس از قرار دادن هر ۴ لایه درون لوله آزمایش، نمونه اسپرم مورد آزمایش آماده شده به آرامی بر روی لایه با غلظت ۶۵درصد قرار داده شد. حجم هر لایه متوالی مورد نظر ۲ میلی لیتر بوده که با ۲ میلی لیتر نمونه اسپرم در مجموع حجم۱۰ میلی لیتر ستون غلظت نامتناوب تهیه شده را تشکیل داد. لوله ستون شیب غلظت حاوی نمونه اسپرم را به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۲۰۰ دور در دقیقه در دمای معمولی اتاق سانتریفیوژ کرده که در نتیجه، بخشی از اسپرما توزوئیدها در پایین ترین سطح و بخشی دیگر در لایه بالایی ستون غلظت قرار گرفت. برای استخراج اسپرماتوزوئیدهای لایه‌های متوالی به عنوان نمونه‌های گروه آزمایشی به صورت جداگانه از پیپت پاستور استفاده گردید. پس از استخراج اسپرم‌های جدا شده از لایه‌های فوقانی و تحتانی، هر کدام را به صورت جداگانه و با شماره وارد کرایوویال‌های مخصوص گردید این عمل برای تعداد۴۰ پایوت منی تحت آزمایش به طور جداگانه انجام گردید در ادامه نمونه‌های اسستحصال شده داخل لوله با بافر فسفات شسته شده و به مدت ۱۰دقیقه بادور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. با افزودن محلول متانول و اسیداستیک به نسبت ۳به۱به ته رسوب که حاوی اسپرم می‌باشد و نگهداری آن در دمای ۴ - درجه سانتیگراد به مدت نیم ساعت روی لام ازآن فروتی تهیه گردید. همزمان همین تعداد نمونه پایوت به عنوان گروه کنترل مشابه نمونه‌های گروه‌های آزمایشی شستشو داده شده ولی بر روی ستون غلظت قرار نگرفته و مستقیما با تکنیک FISH ارزیابی گردید(۱).

آزمایش FISH: به منظور شناسایی و دقت عمل تفریق اسپرم‌های

حاوی کروموزوم‌های X و Y مورد نظر از محیط تحت آزمایش از پروبهای تهیه شده برای کروموزوم جنسی گاوی (Y and FITC biotin labeled X Cy3 labeled) محصول (Cambio, Ltd, Cambridge, UK Yak Sex Chromosomes) استفاده گردید. از آنجائی که هسته اسپرم بسیار متراکم است به منظور دسترسی پروب به توالی DNA می‌بایست هسته از تراکم خارج شود به این منظور اسلایدها در محلول تریس ۰.۱ مولار شستشو و پس از آبگیری در محلول اتانول در دمای اتاق خشک شد (۱). در ادامه به منظور تک رشته‌ای شدن DNA در هسته اسپرم (Denaturation) و پروب نمونه‌ها (Hybridization) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ دقیقه بر روی صفحه فلزی حرارتی قرارداده شده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ تا ۵ ساعت در گرمخانه گذارده شد در روز دوم بعد از اتمام زمان هیبریداسیون و برداشتن لامل، نمونه‌ها به آرامی شسته شده تا توالی‌های DNA متصل نشده جدا شوند و در نهایت رنگ‌آمیزی معکوس هسته و مونتاژ (Mounting) جهت آشکارسازی (Detection) با افزودن مقدار ۷ میکرولیتر محلول DAPI, Antifade (Aquarius) بر روی نمونه‌ها انجام گردید. زمان لازم برای مرحله آماده‌سازی، دناتوره و هیبریداسیون هر نمونه لام حدود ۳۰ دقیقه بوده و بعد طی مدت یک شب نگهداری زمان مورد نیاز برای عمل شستشو نیز ۳۵ دقیقه می‌باشد. در این روش رنگ‌های فلورسنت که به DNA اسپرم به صورت اختصاصی متصل می‌گردد، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مجهز به فیلترهای رنگی FITC و DAPI مشخص می‌گردد (۱،۱۵،۲۰). بر این اساس اسپرم‌های حاوی کروموزوم X که با رنگ biotin FITC باند شده، رنگ سبز را از خود ساطع و اسپرم‌های حاوی کروموزوم‌های Y که با رنگ Cy3 باند شده، در زیر میکروسکوپ رنگ قرمز را از خود ساطع می‌کنند، لذا با این اصل به راحتی اسپرم‌های حاوی کروموزوم X و Y از یکدیگر قابل تفریق گردید (تصویر ۱). بر این اساس با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت (Nikon, E800, Japan) مجهز به فیلترهای تک باند و سه باند یادشده و نرم افزار Cytovision کروموزوم‌های X و Y در اسپرم که بصورت نقاط سبز و قابل تشخیص هستند، با بزرگنمائی ×۱۰۰ شمارش شدند. به ازای هر نمونه تعداد حداقل بیش از ۴۰۰ سلول اسپرم شمارش و نتایج بدست آمده به صورت میانگین با پراکندگی آماری گزارش گردید. درصد اسپرم‌های حامل کروموزوم‌های X و Y در گروه کنترل و نمونه‌های عبور یافته از شیب غلظت All grad با آزمون مجذور کای (Chi Square) مقایسه آماری شدند (۱).

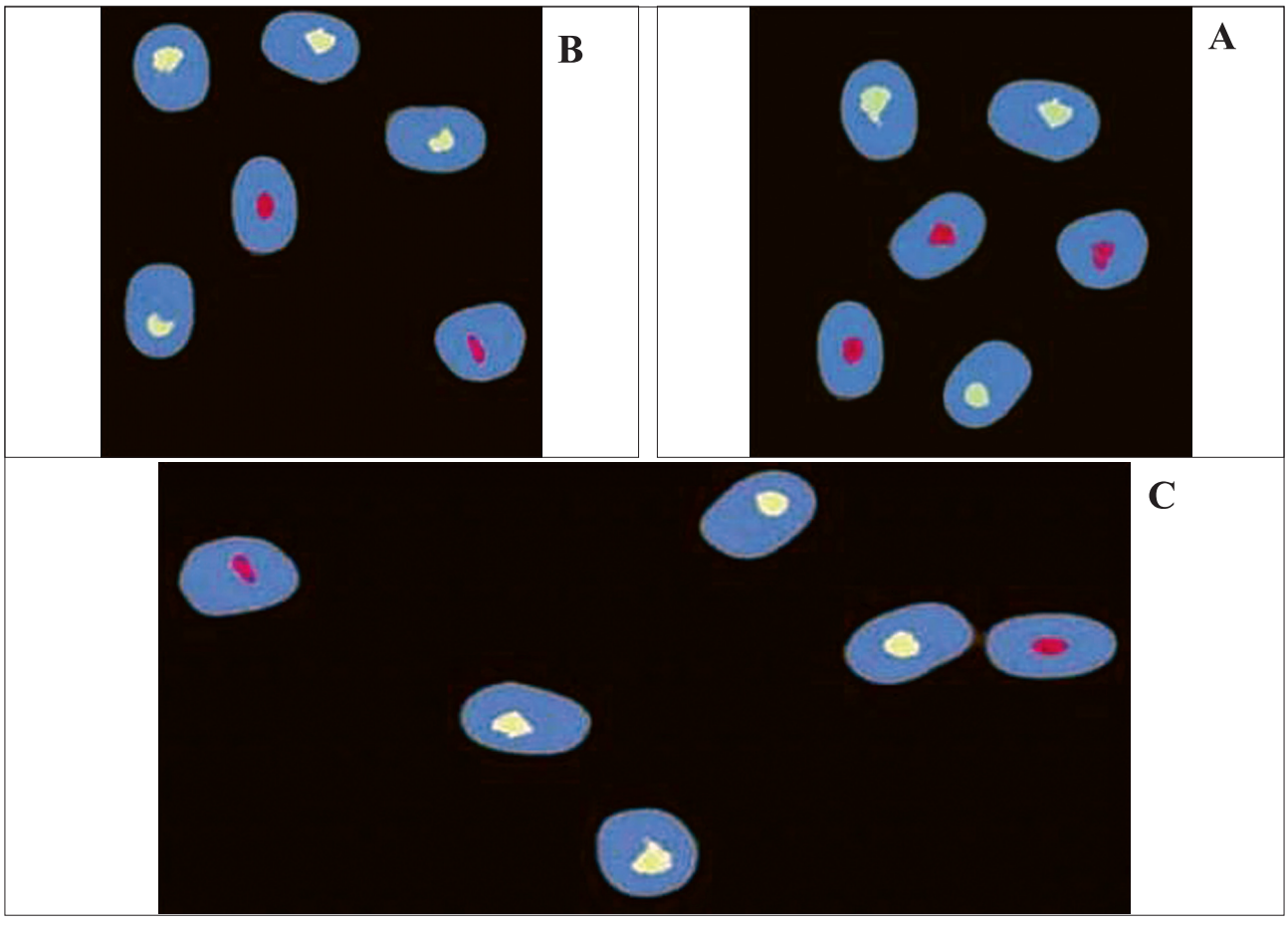
نتایج

نمونه اسپرم‌های استخراج شده در لایه فوقانی ستون غلظت ۶۵ تا ۷۵ درصد که در تکنیک FISH رنگ سبز را از خود ساطع کردند شمارش و نتایج هر گروه به صورت جداگانه و به شکل درصد ثبت گردید. میانگین کل اسپرم‌های حاوی کروموزوم X نمونه پایوت‌های مورد آزمایش در این لایه با پراکندگی آماری بین ۸ درصد و ۴۵ درصد با میانگین ۲۱/۷ درصد گزارش گردید (نمودار ۱، جدول ۱). از سوی دیگر میانگین کل اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y نمونه پایوت‌های مورد آزمایش در لایه مورد نظر نیز با پراکندگی آماری بین ۴۵ الی ۹۱ با میانگین ۷۸/۳ درصد گزارش گردید (نمودار ۲، جدول ۱). نمونه اسپرم‌های استخراج شده در لایه تحتانی شیب غلظت ۸۵ تا ۹۵ درصد که در تکنیک FISH رنگ سبز را از خود ساطع کردند نیز شمارش و نتایج هر گروه به صورت جداگانه و به شکل درصد ثبت گردید. میانگین کل اسپرم‌های حاوی کروموزوم X نمونه پایوت‌های مورد آزمایش در لایه تحتانی ستون غلظت مورد استفاده فوق با پراکندگی آماری بین ۱۵۵ الی ۹۲ با میانگین ۷۵/۵ درصد گزارش گردید (نمودار ۳، جدول ۱). میانگین کل اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y نمونه پایوت‌های مورد آزمایش در لایه مورد نظر نیز با پراکندگی آماری بین ۹ الی ۴۶ با میانگین ۲۴/۵ درصد گزارش گردید (نمودار ۴، جدول ۱).

پراکندگی آماری نمونه اسپرم‌های حاوی کروموزوم X در گروه کنترل بین ۳۷ درصد و ۶۶ درصد با میانگین ۵۱/۴۷۵ درصد (منحنی قرمز) و اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y نیز بین ۳۴ درصد الی ۶۳ درصد (منحنی آبی) با میانگین ۴۸/۵۲۵ درصد گزارش گردید (جدول ۱، نمودار ۵،۶). تفاوت بین میانگین تعداد کروموزوم‌های Y در گروه آزمایشی با شیب غلظت ۸۵ درصد - ۹۵ درصد در مقایسه با گروه کنترل (۲۴/۵ درصد در مقابل ۴۸/۵۲۵ درصد) معنی دار بود ($p<0/05$). همچنین اختلاف بین میانگین تعداد کروموزوم‌های X نیز در شیب یادشده در مقایسه با گروه کنترل (۷۵/۵ در مقابل ۵۱/۴۷۵ درصد) نیز معنی دار بود ($p<0/05$). در گروه آزمایشی شیب غلظت ۶۵ درصد - ۷۵ درصد تفاوت بین میانگین تعداد کروموزوم‌های Y با گروه کنترل (۷۸/۳ درصد در مقابل ۴۸/۵۲۵ درصد) گزارش گردید ($p<0/05$). در این راستا میانگین تعداد کروموزوم‌های X در شیب یاد شده در مقایسه با گروه کنترل (۲۱/۷ در مقابل ۵۱/۴۷۵ درصد) معنی دار بود ($p<0/05$).

بحث

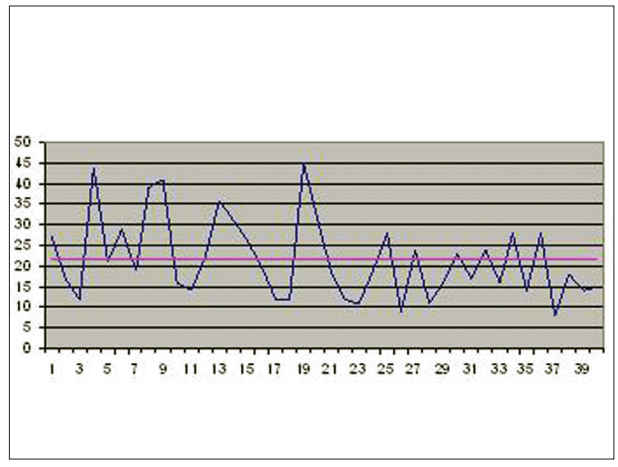
نتایج بدست آمده نشان داد که بکارگیری ستون نامتناوب چهار لایه‌ای با استفاده از محیط جدید و تجاری Allgrad در روش شیب غلظت برای منی منجمد گاومیش باعث جداسازی اسپرم‌های با کروموزوم‌های Y نسب به X در مایع جداشده از لایه فوقانی (۷۸/۳ درصد در مقابل ۲۱/۷ درصد) گردید ($p<0/05$). تاکنون هیچ بررسی مشابهی در خصوص استفاده از محیط Allgrad در تکنیک شیب غلظت برای جداسازی اسپرم‌های X و Y گاومیش صورت نگرفته است. مکانیسم جداسازی اسپرم‌های حامل کروموزوم X به Y توسط شیب غلظت ناپیوسته دقیقاً مشخص نیست. Sumner و همکاران ۱۹۷۱ گزارش دادند که اسپرم‌های حامل کروموزوم X دارای دانسیته بیشتری در ناحیه سر نسبت به اسپرم‌های حامل Y هستند و بنابراین این اسپرم‌ها در لایه تحتانی بعد از



تصویر ۱- نمونه اسپرم‌های جدا شده حاوی کروموزوم X (سبز) و Y (قرمز) در مجاورت یکدیگر. در گروه‌های تحت آزمایش با استفاده از توسط تکنیک FISH. A) شیب غلظت ۹۵درصد ـ ۸۵درصد، B) شیب غلظت ۷۵ درصد ـ ۶۵درصد، C) کنترل.

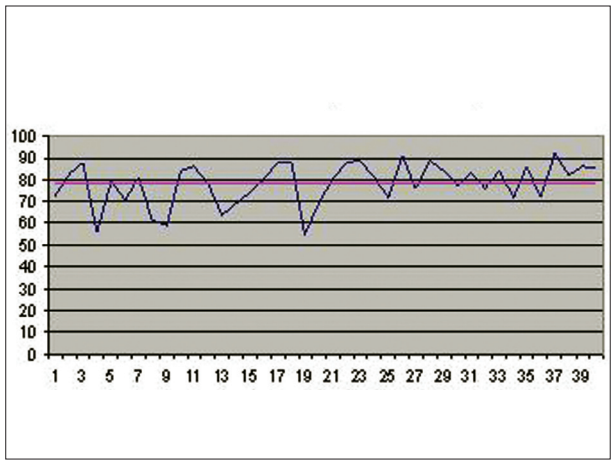
سانتریفوژ قرارگرفته در صورتی که اسپرم‌های حامل Y به دلیل مقدار DNA کمتر (۲/۹ کمترنسبت به اسپرم حامل (X بیشتر در لایه رویی باقی می‌مانند (۱۷). Kaneko و همکاران در سال ۱۹۹۶ پیشنهاد کردند که جداسازی اسپرم توسط پرکول که محیط مشابه Allgrad است بر اساس تفاوت در سرعت رسوب اسپرم است که می تواند تحت تاثیر سر اسپرم و تحرک آن باشد(۸). هرچند براساس گزارش Watkins و همکاران تفاوتی در اندازه قطر سر اسپرم‌های جداشده در لایه بالاو پائین شیب غلظت مشاهده نشده است(۱۹). ازطرفی با استفاده از روش فلوسیتومتری نشان داده شده که اسپرم حامل کروموزوم X در گاو دارای حرکت سریع تر از Y است (۱۱،۱۴). Kobayashi و همکاران در سال ۲۰۰۴ بیان کردند که تفاوت در تحرک اسپرم‌های حامل کروموزوم X و Y روی سرعت رسوب آنها تاثیر گذاشته و جداسازی آن در محیطی نظیر پرکل براین اساس می‌باشد(۹). براساس گزارش برخی از محققین اسپرم حامل X دارای سر بزرگتر از Y بوده و نظر به اینکه اندازه سر اسپرم بیشتراز چگالی آن برجداسازی اسپرم درمحیط شیب غلظت نقش دارد بنابراین اسپرم حامل کروموزوم X با سر بزرگ و وزن بیشترسریع تر رسوب می‌کند(۹). از سوی دیگر Amjad و همکاران و همچنین زالتن وهمکاران نشان دادند که تفاوتی در اندازه سر اسپرم حامل کروموزوم X و Y انسانی وجود ندارد (۲،۲۰). Lu و همکاران در سال ۲۰۰۶ اختلاف در محتوی DNA کروموزومی اسپرماتوزوئید گاومیش‌های نژاد نیلی راوی و مورا با استفاده ازتکنیک رنگ آمیزی فلوسیتومتری نشان دادند. بر این اساس همین محققین اختلاف در شدت رنگ فلوروسئینی اسپرماتوزوئیدهای دو نژادفوق را که مربوط به اختلاف محتوی DNA بین دو کروموزوم X و Y می باشد به ترتیب ۰/۱۱ ± ۳/۵۹ و ۰/۱۴ ± ۳/۵۵ گزارش دادند (۱۱).

به علاوه سطح اسپرم حاوی X دارای بار منفی بیشتری بوه و این احتمال وجوددارد که برهمکنش بین سطح اسپرم ومحیط جداسازی می تواند بر جداسازی اسپرم‌های حامل کروموزوم X و Y با استفاده از شیب ناپیوسته پرکل نقش داشته باشد. احتمالاً افزایش معنی‌داری در تعداد اسپرم‌های حامل کروموزوم X و Y در لایه پائینی شیب غلظت پرکل و نیز Puresperm را که محیط مشابه Allgrad است را می توان به مکانیسم مشابهی نسبت داد(۱،۳). دریک بررسی انجام گرفته توسط Watkins و همکاران درسال ۱۹۹۴ کارائی روش شیب غلظت ناپیوسته چند لایه‌ای با استفاده از محیط پرکول برای جداسازی اسپرماتوزوئیدهارا ۷۷ درصد گزارش کردند. در این تحقیق مکانیسم جداسازی اسپرماتوزوئیدهای



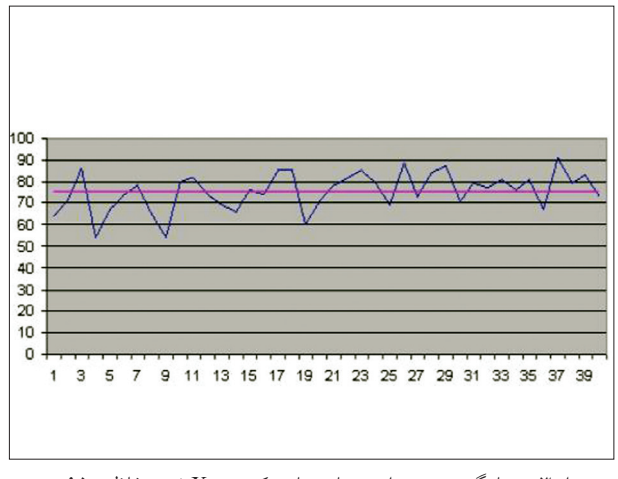
نمودار۱- میانگین درصد اسپرم‌های حاوی کرومزوم X در شیب غلظت ۷۵درصد-۶۵درصد، پراکندگی آماری داده‌ها بین ۸ و ۴۵درصد (منحنی آبی) و میانگین ۲۱/۷درصد (منحنی قرمز).(X Chromosome) 65%-75%

X Ratio Average



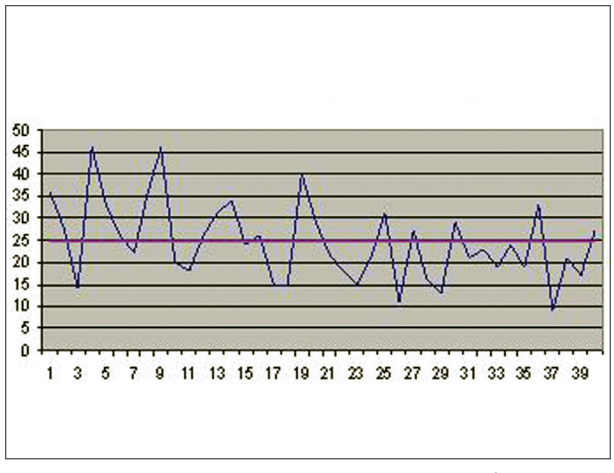
نمودار ۲- میانگین درصد اسپرم‌های حاوی کرومزوم Y شیب غلظت ۷۵درصد-۶۵درصد، پراکندگی آماری داده‌ها بین ۴۵ الی ۹۱درصد(منحنی آبی) و میانگین ۷۸/۳درصد (منحنی قرمز).(Y Chromosome) 65%-75%

Y Ratio Average



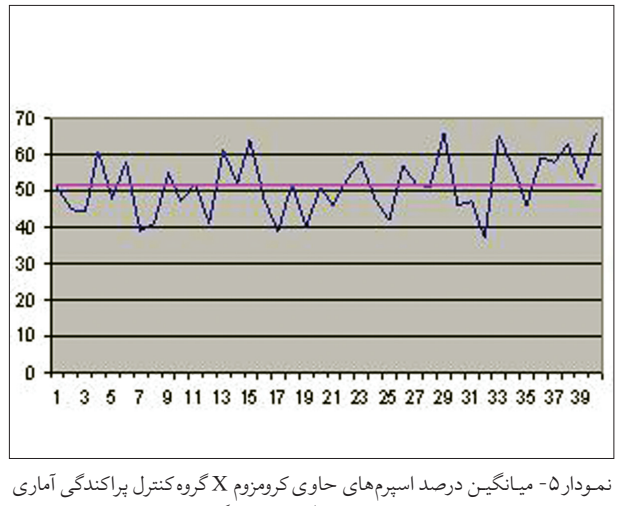
نمودار ۳- میانگین درصد اسپرم‌های حاوی کرومزوم X شیب غلظت ۹۵درصد-۸۵درصد، پراکندگی آماری داده‌ها بین۵۵الی ۹۲درصد (منحنی آبی) و میانگین ۷۵/۵ درصد (منحنی قرمز). (X Chromosome) 85%-95%

X Ratio Average



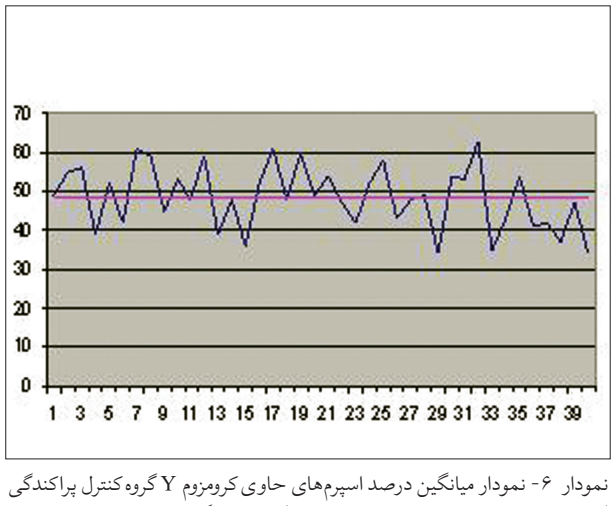
نمودار ۴- میانگین درصد اسپرم‌های حاوی کرومزوم Y شیب غلظت ۹۵درصد-۸۵درصد، پراکندگی آماری داده‌ها بین ۹ الی ۴۶درصد (منحنی آبی) و میانگین ۲۴/۵درصد (منحنی قرمز).(Y Chromosome) 85%-95%

Y Ratio Average



نمودار۵- میانگین درصد اسپرم‌های حاوی کرومزوم X گروه کنترل پراکندگی آماری داده‌ها بین ۳۷ و ۶۶درصد (منحنی آبی) و میانگین ۵۱/۴۷۵درصد (منحنی قرمز).Control Group X chromosome

Control group X Ratio Mean



نمودار ۶- نمودار میانگین درصد اسپرم‌های حاوی کرومزوم Y گروه کنترل پراکندگی آماری داده‌ها بین ۳۴ الی ۶۳درصد (منحنی آبی) و میانگین ۴۸/۵۲۵درصد (منحنی قرمز).Control Group Y chromosome

Control group Y Ratio Mean

حاوی کروموزوم X و Y براساس اختلاف سرونیز قدرت تحرک اسپرم بوده و ارزیابی جداسازی اسپرم بعد از پردازش لایه شیب پرکول با تکنیک رنگ آمیزی کوئینا کرین صورت گرفته است(۱۹). Leslie و همکاران در سال ۱۹۸۲ دقت عمل جداسازی اسپرماتوزئیدهاانسانی با استفاده از دو روش شیب سرم آلبومین گاوی و عبور از ستون های سفادکس G50 را به ترتیب حدود ۶۰درصد و ۷۴درصد گزارش داد. آنان بیان کردند محیط جداکننده آلبومین اسپرم ها را براساس قدرت تحرک آنها جداسازی کرده و برهمین اساس اسپرماتوزئیدهای حامل کروموزوم Y به دلیل قدرت تحرک بیشتر سریع تر لایه ها را طی کرده و در آخرین لایه قرار می گیرند(۱۰). به نظر می رسد در بکارگیری از محیط های نظیر پرکول Percoll و یا Puresperm و نیز Allgrad و سانتریفیوژ اسپرم ها براساس چگالی (Density) جداسازی کرده و لایه های قرارگیری اسپرم های حامل X و Y برعکس محیط آلبومین می باشد(۱۴،۱۳،۱۱،۹).

Kaneko و همکاران در سال ۱۹۸۳ نسبت جداسازی اسپرم های حاوی کروموزوم X و Y گاوی متعاقب استفاده از روش شیب غلظت ناپیوسته چند لایه ای پرکول و سانتریفیوژ و نیز ارزیابی آن توسط رنگ آمیزی کوئیناکرین را به ترتیب ۷۲/۶درصد به ۲۷/۴ درصدگزارش دادند. در تحقیقی که توسط Aleahmad و همکاران در سال ۲۰۰۴ برروی نمونه مایع منی طبیعی انسانی انجام شد، نمونه ها پس از عبور از شیب غلظت ۸ لایه ای از غلظت ۳۵ درصد تا ۸۴ محیط Puresperm جداسازی و با تکنیک FISH مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این بررسی تفاوت درصد اسپرم های حامل کروموزوم X و Y در لایه ۳۵درصد تا ۸۴درصد نسبت به گروه کنترل معنی دار و بیش از ۷۷ درصد گزارش گردید(۱). در یک بررسی مشابه انجام گرفته توسط Mehmood و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از شیب غلظت ناپیوسته دو لایه ای ۴۵ و ۹۰ درصد از محیط پرکول و سانتریفیوژ توانستند بیش از ۷۰درصد اسپرماتوزوئیدهای حاوی کروموزوم X و Y منجمد گاومیش را پس از ذوب جداسازی و برای استفاده در تکنیک IVF مورداستفاده قرار دهند(۱۳). در تحقیق حاضرنیز از روش شیب غلظت چند لایه ای از محیط جدید و تجاری Allgrad که امروزه این محیط به عنوان یکی از سالم ترین محیط پردازش اسپرم که در تکنیک IVF کاربرد دارد برای جدا سازی استفاده گردید. از سوی دیگر با بکارگیری روش FISH اسپرم های جداسازی شده براحتی و طی مدت زمان کمی تعیین جنسیت شده اند وکارایی محیط شیب غلظت مورد نظر در این روش بیش از ۸۰درصد گزارش گردید.

امروزه استفاده از تکنیک FISH برای ارزیابی روش های تعیین جنسیت اسپرم به دلیل رهایی از مشکلات روش PCR، کاهش مدت زمان انجام آزمایش، پایین آوردن درصد خطا و. و نیز دقت عمل قابل توجه برای تفریق اسپرم های حامل X و Y بیشتر مد نظر می باشد(۱،۱۵،۲۰). در این روش از پروب های اختصاصی برای کروموزوم های X و Y که با آنالیز رنگ های مخصوص فلوروسنت به آسانی در زیر میکروسکوپ فلوروسنت تشخیص داده شود، مورد استفاده قرار می گیرد. استفاده از پروب اختصاصی گاوی نتایج مشابهی با گاومیش درتکنیک FISH داشته است. درتحقیقی که در همین ارتباط توسط Revay و همکاران در سال ۲۰۰۳ برروی نمونه منی ۵ راس گاومیش صورت گرفت. در یک گروه آزمایشی کروموزوم های X و Y گاومیش را توسط پروبهای اختصاصی گاومیش هیبرید کرده که درآن بجزمنطقه سانترومری کروموزوم ها به خوبی با پروبها باند شدند و در گروه دیگر توسط پروبهای به دست آمده از کروموزوم های X و Y گاوی عمل هیبریداسیون انجام گردید. درروش اول بیش از ۹۲درصد کروموزوم ها تفریق شدند(X ۴۶/۸ درصد و Y ۴۵/۸ درصد) و درروش دوم نیز ۴۸درصد کروموزوم های X و Y تفریق شدند. نتایج حاصل از دو گروه آزمایشی اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشت(۱۶). در تحقیق حاضر نیز از پروبهای حاصل از کروموزوم های جنسی گاوی (Yak sex chromosomes) استفاده گردید.

Di Berardino و همکاران در سال ۲۰۰۴ کاربرد پروب رنگی تهیه شده از کروموزوم X و Y گاوی در تعیین جنسیت اسپرماتوزوئیدهای دام های داخل گونه نظیرگاومیش را با استفاده ازتکنیک FISH نشان دادند. این محققین گزارش کردند که در بکار گیری این پروب ها هیچ اختلاف معنی داری در تفکیک کروموزوم های جنسی بین گاو وگاویش وجود ندارد(۴). Habermann و همکاران در سال ۲۰۰۴ در گاومیش توانستند کروموزوم اتوزومال شماره ۶ را توسط پروب های مخصوص باند کرده و با شناسائی حدود ۱۶درصد از کروموزوم های Y و ۹درصد از کروموزوم های اتوزومال شماره ۶ توسط تکنیک FISH و به کار گیری آن در روش فلوسیتومتری تا ۷۴ درصد اسپرم حاوی کروموزوم Y را جداسازی نمایند(۷).

به طوکلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بکارگیری ستون نامتناوب چهار لایه ای با استفاده از محیط جدید وتجاری Allgrad به روش شیب غلظت باعث جداسازی اسپرماتوزوئیدهای حاوی کروموزوم X و Y گردیده و می توان از این روش در مراکز تهیه اسپرم منجمد گاومیش برای تعیین جنسیت درطی فرایند عمل آوری وانجماد منی استفاده کرد. بااین حال نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده رویان با شماره ۷۸/۳۶۴۲۲ می باشد. بدین وسله از کلیه زحمات مسئولین وپرسنل محترم پژوهشکده رویان که زمینه اجرای این تحقیق را فراهم آوردند کمال تشکر وسپاس رادارم.

References

1. Aleahmad, F, Gourabi, H., Zeinali, B., Kazemi Ashtiani, S., Baharvand, H. (2009) Separation of X- and Y-bearing human spermatozoa by sperm isolation medium gradients evaluated by FISH. Reprod. Biomed. 18: 475-478.
2. Amjad, M.H., Sailen.B., Panduraneg ,K.M. (2001) Lack of significant morphological differences between human X and Y spermatozoa and their precursor cells(spermatid) exposed to different prehybidization treatment. J . Androl. 22:119-23.
3. Check, M.L. (2000) Seperation of sperm through a 12 layer percoll column decreases the percentage of sperm staining with quinacrine. Arch.Androl. 44: 47-50.
4. Di Berardino, D., Vozdova, M .,Kubickova, S., Cernohorska,H., Coppola,G.,Enne.,G ., Jirirubes., J. (2004) Sexing river buffalo (*Bubalus bubalis* L.), sheep (*Ovis aries* L.), goat (*Capra hircus* L.), and cattle Spermatozoa by double color FISH using bovine (*Bos taurus* L.) X-andY-painting probes. Mol. Reprod. Dev. 67: 108-115.
5. Edwards, R.G., Brody, S.A. (1995) Oocyte growth, maturation, fertilization. In: Principles and Practice of Assisted Human Reproduction. Edwards, R.G., Brody, S.A. (eds.). W.B. Saunders. Philadelphia. USA. p. 285-349.
6. Flaherty, S., Mathews, C. (1996) Application of molecular techniques to evaluate sex selection methods. Mol. Hum. Reprod. 2: 937-942.
7. Habermann, F.A., Winter, A., Olsaker, I., Reichert, P., Fries, R. (2004) Validation of sperm sexing in cattle (*Bos taurus*) by dual colour fluorescence in situ hybridization. J. Anim. Breed. 12:221-232.
8. Kaneko, S., Oshio, S, Kobanawa, K ., Kobayashi, T. (1986) Purification of human sperm by a discontinuous Percoll density gradient with an inner column. Biol. Reprod. 35:1059-63.
9. Kobayashi, J., Histoshi, O ., Hiroshi, U., Tetsuya, K. (2004) Assessment of bovine X and Y bearing spermatozoa in fractions by discontinuous Percoll gradiant with rapid FISH. J. Reprod. Dev. 50:463-9.
10. Leslic,W., Quin, G. P., Livan, P., Preciado, K., Lorraine, T., Long, Sullivan, H.(1982) Separation of human X and Y spermatozoa by albumin gradients and Sephadex chromatography. Fertil. Steril. 37:104-107.
11. Lu, Y.Q., Zhang, M, Meng, B., Lu, S.S., Wei, Y.M., Lu, K.H. (2006) Identification of X- and Y-chromosme bearing buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm. Anim. Reprod. Sci. 95:158-164.
12. Lu,Y., Zhang ,M., Lu, S., Xu, D., Huang, W., Meng, B. et.al.(2010)Sex-preselected buffalo(*Bubalus bubalis*) calvesderived from arti?cial insemination with sexed sperm. Anim. Reprod. Sci. 119:161-169.
13. Mehmood, A., Anwar,M., SaqlanNaqvi, S.M. (2009) Motility, acrosome integrity, membrane integrity an oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. Anim. Reprod. Sci. 111: 141-148.
14. Penfold, L.M., Holt, C., Holt, W.V., Welch,C.R., Cran, D. G., Johnson, L. A. (1998) Comparative motility of X and Y chromosome bearing bovine sperm separated on the basis of DNA content by flow sorting. Mol. Reprod. Dev. 50: 323-327.
15. Presicce, G.A.,Verberckmoes, S., Senatore, E.M., Klinc, P., Rath, D. (2005) First established pregnancies in Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) following deposition of sexed spermatozoa near the utero tubal junction. Reprod. Dom. Anim. 40: 73-75.
16. Revay, T., Kovacs, A., Presicce, G. A., Rens, W., Gustavsson, I. (2003) Detection of water buffalo sex chromosomes in spermatozoa by fluorescence in situ hybridization. Reprod. Dom. Anim. 38:377-379.
17. Sumner, A., Robinson, T., Evans, H. J. (1971) Distinguishing between X and Y- bearing spermatozoa by fluorescence and DNA content. Nat. New Biol. 229: 231-233.
18. Vale, W.G. (1994) Collection, processing and deep freezing of buffalo semen buffalo. J. Anim. Reprod. 2:65-72.
19. Watkins. A.M., Chan, P.J., Patton, W.C. (1996) Sperm kinetics and morphology before and after fractionation on discontinuous percoll gradient for sex preselection: computerized analyses. Arch.

Androl. 37:1-5.

20. Zalatan, Z., Celik, O.C., Ovari, L, Jakab, A., Sati, J. L., Ward, D.C. et. al. (2006) Dimensional assessment of X- bearing and Y-bearing haploid and disomic human sperm with the use of fluorescence in situ hybridization and objective morphometry. Fertil. Steril .85:121-7.

J. Vet. Res. 67, 1:35-42, 2012

Separation of X and Y-bearing buffalo frozen spermatozoa using gradient medium and evaluation by fluorescence in-situ hybridization

Rastegarnia, A.R.[1*], Afshani, M.[2], Eftekhar-Yazdi, P.[3]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University Urmia Branch, Urmia - Iran.*

[2]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University Urmia Branch., Urmia-Iran.*

[3]*Department of Embryology, Reproductive Medicine Research Center, Royan Institute, ACECR, Tehran-Iran.*

(Received 3 July 2011 , Accepted 31 October 2011)

Abstract:

BACKGROUNDS: Sperm sexing as one of the important ways for pre-selection of offspring along with artificial insemination, has the potential to considerably improve animal breeding and the efficiency of dairy and meat production. The discrepancy between X- and Y- chromosome bearing sperm is the basis of this procedure. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to evaluate a discontinuous sperm isolation medium Allgrad gradient in separation of buffalo spermatozoa according to sex chromosomes by fluorescence in-situ hybridation (FISH). **METHODS:** A four-layer discontinuous Allgrad gradient, 65%-95% with 10% differences between each subsequent layer was prepared in gradient separation for post thaw X- and Y-bearing spermatozoa. Following centrifugation, sperm from the top and bottom fraction were aspirated and fixed on a slide. The FISH procedure was performed by using X and Y bovine specific DNA probes. At least 400 spermatozoa were scored for each sample. The proportions of X- and Y-bearing spermatozoa were determined by the presence of red or green fluorescent signals. **RESULTS:** There was no significant difference in the percentage of spermatozoa with the specific signals of X and Y chromosomes in the control groups. After separation, in treatment groups, the percentage of X-bearing spermatozoa in the bottom layer exceeded that of the one in the top layer (78.3 vs. 21.7) ($p<0.05$). Adversely, in all treatment groups the significant difference between the frequencies of Y-bearing spermatozoa in the top layers was evident (75.5vs.24.5)($p<0.05$). **CONCLUSIONS:** This study showed that using four-step discontinuous gradient by Allgrad isolation medium was a reliable method for the separation of X- and Y-bearing frozen-thawed buffalo spermatozoa and can be more expedient for IVF in Buffalo.

Key words: sperm, sex preselection, allgrad gradient, buffalo.

***Corresponding author's email: a.rastegar@iaurmia.ac.ir, Tel: 0441- 340094, Fax: 0441-3460980**