

Teknik penentusahan jantina spermatozoa lembu

(Sex determination of bovine spermatozoa)

Tan Ying Ju, Mahanem Mat Noor, Ainu Husna M S Suhaimi dan Wan Somarny Wan Md Zain

Pengenalan

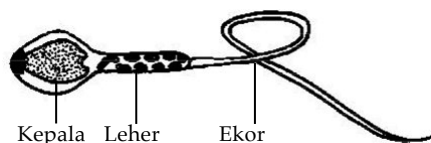
Sebelum era bioteknologi, pembiakbakaan haiwan ternakan dilakukan secara semula jadi dan memerlukan tempoh pembiakbakaan yang lama. Dengan aplikasi bioteknologi terkini dalam bidang pembiakan seperti pemanian beradas, pemindahan embrio, persenyawaan in vitro dan pengasingan jantina, jadual reproduktif telah dimanipulasikan selaras dengan pengurusan ladang dalam pembiakbakaan haiwan bermutu tinggi.

Teknik bioteknologi reproduktif ternakan termasuklah pengasingan dan penentusahan jantina spermatozoa. Manipulasi jantina progeni merupakan antara cabaran para penyelidik dalam bidang pertanian kerana bekalan haiwan ternakan jantan diperlukan dalam pengeluaran daging. Sebaliknya, ternakan betina diperlukan dalam mengganti kumpulan pengganda dan untuk industri tenusu.

Spermatozoa lembu

Spermatozoa merupakan sel germa yang dihasilkan melalui proses spermatogenesis yang terdiri daripada kepala, leher, bahagian tengah dan ekor yang bersamaan dengan bahagian hujungnya (*Gambar rajah 1*). Proses spermatogenesis merupakan proses penghasilan spermatozoa. Umumnya, spermatozoa dihasilkan di tubul seminiferus dan berasal daripada spermatogonia yang mula berkembang menjadi spermatosit dan kemudian melalui proses meiosis untuk menghasilkan spermatid. Testis lembu mengandungi banyak sel-sel germa yang dipanggil spermatogonia. Spermatogonia akan mengalami mitosis sebelum meiosis untuk mengekalkan kuantiti spermatogonia.

Kepala spermatozoa mengandungi enzim dan bahan genetik, bahagian tengah pula mengandungi bilangan mitokondria yang banyak sebagai 'kilang' untuk membina adenotrifosfat (ATP). Flagelum yang biasanya dikenali sebagai ekor dibentuk pada akhir proses spermatogenesis. Selepas morfologi spermatozoa terbentuk dengan lengkap, ia akan berupaya untuk berenang daripada bahagian dinding lumen ke bahagian tengah lumen. Spermatozoa akan mengikuti laluan ke rete testis,



Gambar rajah 1. Struktur spermatozoa
Sumber: Diubah suai daripada Wikipedia, the free encyclopedia 2008

duktus eferen dan lumen vas deferen. Proses spermatogenesis perlu berlaku secara berterusan untuk mengekalkan bilangan spermatozoa sepanjang hayat mamalia. Spermatozoa akan berada di dalam cecair air mani semasa dalam simpanan.

Air mani lembu merupakan cecair putih atau kekuningan yang dikeluarkan daripada uretra semasa ejakulasi. Pada kebiasaannya, setiap mililiter padu (mL^3) air mani mengandungi berjuta-juta spermatozoa, tetapi majoriti daripada komposisinya mengandungi hasil rembesan kelenjar sistem pembiakan jantan. Peranan utama air mani adalah khusus untuk reproduksi semata-mata, iaitu sebagai pengangkut yang membawa spermatozoa ke dalam saluran sistem pembiakan betina.

Pengasingan jantina spermatozoa

Menurut Barton (1988), kaedah pengasingan jantina spermatozoa yang diilhamkan adalah berdasarkan kepada perbezaan fizikal spermatozoa pembawa kromosom-X dan -Y, iaitu saiz, bentuk, densiti dan cas pada permukaan kepala spermatozoa. Setakat ini, teknik yang memberi peratusan kejayaan pengasingan jantina spermatozoa yang paling tinggi iaitu melebihi 90% adalah menggunakan mesin alir sitometri. Mesin alir sitometri berfungsi berdasarkan kepada perbezaan kandungan DNA antara spermatozoa pembawa kromosom-X dan -Y.

Selain itu, protein-protein spesifik spermatozoa pembawa kromosom-X dan -Y telah dikenal pasti. Antigen untuk protein tersebut dihasilkan untuk mengasingkan spermatozoa pembawa kromosom-X dan -Y. Teknologi untuk mengasingkan jantina spermatozoa berdasarkan prinsip tersebut juga merupakan teknologi yang terkini pada masa kini.

Penentusahan jantina spermatozoa

Dalam mengawal kualiti kaedah pengasingan spermatozoa yang dijalankan, kaedah penentusahan jantina spermatozoa perlu dijalankan untuk memastikan ketulenan spermatozoa terasing dan peratusan kejayaan pengasingan spermatozoa. Kaedah penentusahan jantina pada masa kini bergantung kepada analisis jujukan DNA kromosom-Y pada haiwan jantan. Perbezaan yang terdapat antara kromosom-X dan -Y membolehkan penentusahan jantina pada spermatozoa melalui pelbagai teknik. Dalam kajian ini, penentusahan spermatozoa menggunakan teknik tindak balas berantai polimerase (PCR), penghibridan in situ berfluoresen (FISH) dan tindak balas berantai polimerase kuantitatif (qPCR) dibangunkan. Aplikasi kajian ini tidak terhad kepada penentusahan jantina spermatozoa, malah secara teorinya kaedah ini dapat diaplikasikan kepada sampel lain seperti darah, tisu dan embrio.

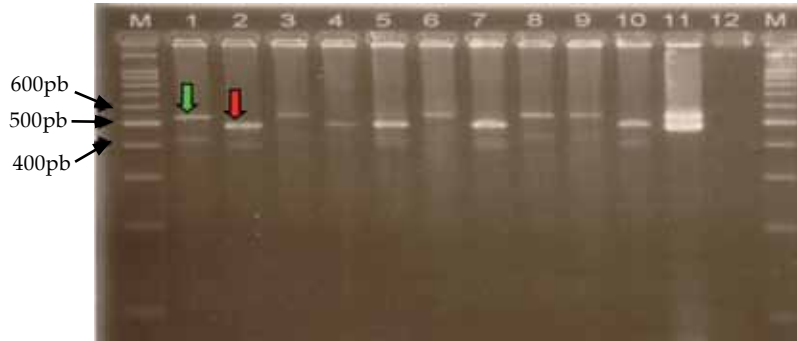
Tindak balas berantai polimerase (PCR) dalam penentusahan jantina spermatozoa

Tindak balas berantai polimerase yang lebih dikenali dengan nama singkatannya PCR merupakan teknik mengamplifikasikan DNA daripada kuantiti asal kepada berjuta kali ganda menggunakan mesin dan membolehkan produk akhir dianalisis. Kaedah ini diperkenalkan pada tahun 1986 oleh Smith dan Mullis. Fragmen DNA diamplifikasi dengan enzim polimerase melalui satu pasangan pencetus oligonukleotida ke hadapan dan ke belakang. Proses ini dikenali sebagai tindak balas berantai, di mana templat DNA asal diamplifikasi secara eksponen. Setelah melalui kitaran PCR, templat DNA akan dijana sehingga berjuta-juta salinan molekul DNA yang asal.

Penentusahan jantina dengan menggunakan teknik PCR yang dibangunkan dalam kajian ini adalah sensitif dan memberi ketepatan yang menghampiri 90%. Prosedur ini juga boleh dijalankan dalam tempoh masa yang singkat. Oleh itu, kaedah ini menjimatkan masa dalam melakukan diagnosis. Penentusahan jantina bermula daripada pengasingan spermatozoa tunggal. Teknik penentusahan jantina spermatozoa PCR menggunakan genom spermatozoa tunggal sebagai templat. Oleh kerana spermatozoa tunggal mempunyai hanya satu salinan DNA, teknik PCR bersarang (*nested PCR*) boleh digunakan untuk meningkatkan keberkesanan dan bilangan salinan amplicon. Dua lokus spesifik kromosom seks telah dipilih sebagai penanda dalam kajian ini, iaitu *Zinc Finger Protein X (ZFX)* dan *Sex Determining Region Y (SRY)*. Produk hasil PCR fragmen amplifikasi oleh pasangan pencetus ZFX yang bersaiz 474 pb spesifik DNA spermatozoa pembawa kromosom-X dan fragmen amplifikasi oleh pasangan pencetus SRY yang bersaiz 525 pb spesifik spermatozoa pembawa kromosom-Y. Kehadiran jalur pada gel agaros elektroforesis mengenal pasti kehadiran spermatozoa pembawa kromosom-X atau -Y pada sampel DNA spermatozoa yang dikaji (*Gambar 1*).

Tindak balas berantai polimerase kuantitatif (qPCR) dalam penentusahan jantina spermatozoa

Tindak balas qPCR merupakan modifikasi kepada kaedah PCR konvensional yang menggunakan tindak balas masa nyata. Ini membolehkan amplifikasi dipantau sepanjang proses PCR dijalankan. Teknik ini menggabungkan sifat sensitiviti dan spesifisiti ke dalam kaedah PCR yang biasa digunakan. Kaedah amplifikasi qPCR lebih menjimatkan masa kerana analisis lanjutan menggunakan elektroforesis gel tidak diperlukan. Kajian ini menggunakan kaedah yang paling ringkas dan murah, iaitu dengan menggunakan penginterkalarian pewarna SYBR hijau yang mengikat pada bebenang ganda dua dan membebaskan isyarat fluoresen.



Gambar 1. Gel elektroforesis metafor agaros 3% menunjukkan keputusan PCR bersarang multipleks spermatozoa tunggal kitaran kedua (M = penanda molekul 100 pb; telaga 2, 4, 5, 7, 10 = spermatozoa pembawa kromosom-X dikenal pasti; telaga 1, 3, 6, 8, 9 = spermatozoa pembawa kromosom-Y dikenal pasti; telaga 11 = kawalan positif; telaga 12 = kawalan negatif). Anak panah merah menunjukkan fragmen SRY dengan saiz 474 pb, anak panah hijau menunjukkan fragmen ZFX dengan saiz 525 pb

Dalam kajian ini, kuantiti spermatozoa pembawa kromosom-X dan -Y yang hadir berjaya ditentukan melalui tindak balas berantai polimerase kuantitatif (qPCR) dengan menggunakan dua penanda molekul iaitu Zinc Finger Protein X (ZFX) dan Sex Determining Region Y (SRY). Kedua-dua pasangan pencetus masing-masing adalah berhomologi dengan jujukan kromosom-X dan -Y genomik lembu. Pasangan pencetus ZFX dan SRY untuk teknik PCR bersarang multipleks juga digunakan dalam teknik qPCR. Spermatozoa lembu merupakan sel haploid iaitu sel yang mengandungi satu salinan kromosom autosom dan satu kromosom seks sahaja, sama ada kromosom-X atau -Y sahaja. Oleh itu, bilangan salinan ZFX dan SRY yang dikenal pasti daripada DNA spermatozoa secara langsung melambangkan bilangan salinan spermatozoa pembawa kromosom-X atau -Y yang hadir dalam sampel.

Satu graf piawai nilai Ct melawan bilangan salinan plasmid untuk ZFX dan SRY diplotkan dalam lingkungan 3.0×10^2 , 3.0×10^3 , 3.0×10^4 , 3.0×10^5 dan 3.0×10^6 . qPCR untuk mengukur bilangan salinan spermatozoa dijalankan bersama-sama dengan satu set plasmid piawai sebagai rujukan. Bilangan salinan spermatozoa pembawa kromosom-X dan -Y dikenal pasti melalui bacaan Ct dengan merujuk kepada graf piawai tersebut (Rajah 1).

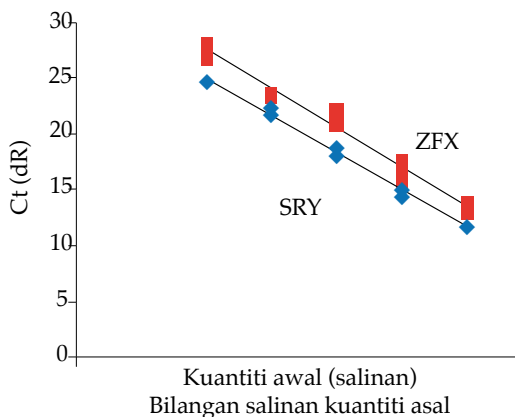
Penghibridan in situ berfluoresen (FISH) dalam penentusahan jantina spermatozoa

Satu kaedah lain yang dibangunkan dalam kajian ini dalam penentusahan jantina spermatozoa adalah teknik penghibridan in situ berfluoresen (FISH). FISH merupakan teknik sitogenetik yang digunakan untuk mengesan kehadiran dan lokasi jujukan spesifik DNA pada kromosom.

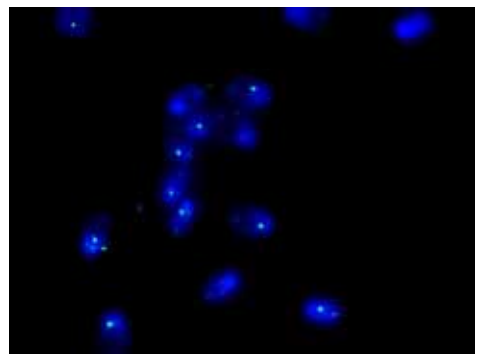
Berbanding dengan teknik PCR, FISH dapat menentusahkan jantina bilangan spermatozoa yang banyak di atas slaid pada satu masa dan pencerapan dapat dilakukan dalam masa beberapa jam sahaja. Peratusan kejayaan teknik ini mencapai 100%. FISH dilaporkan dapat memberikan keputusan dengan kadar ralat yang lebih rendah, iaitu 7% berbanding dengan 8 – 23% dengan kaedah penentusahan jantina melalui teknik PCR.

Sebelum penghibridan dengan prob, spermatozoa yang ditetapkan di atas slaid perlu dikondensasikan untuk membenarkan prob memasuki DNA dengan melonggarkan laluan ke arah kromosom. Pada kajian ini, Plasmid TSPY, iaitu spesifik spermatozoa pembawa kromosom-Y yang digunakan sebagai prob telah dilabelkan dengan kaedah pelabelan secara takik translasi. Prob yang disediakan dinyahaslikan kepada bebenang tunggal supaya dapat menghibrid kepada DNA sasaran yang juga telah dinyahaslikan. FISH dijalankan dan keputusan dilihat di bawah mikroskop berfluoresen (*Gambar 2*).

FISH merupakan kaedah yang efektif, menjimatkan masa dan tepat. Ini adalah kerana beratus-ratus spermatozoa dapat ditentukan jantinitanya pada satu masa. Selain itu, FISH dapat mengelakkan keputusan palsu memandangkan prob fluoresen yang digunakan adalah spesifik kepada jujukan sasaran. Walaupun kaedah FISH adalah lebih mahal berbanding dengan kaedah PCR, keupayaannya untuk menganalisis beratus-ratus sel spermatozoa dalam satu slaid tindak balas FISH pada satu masa adalah setanding dengan kaedah PCR yang melibatkan langkah penyediaan yang banyak dalam menganalisis beratus-ratus spermatozoa tunggal.



Rajah 1. Graf piawai ZFX dan SRY pada bilangan salinan plasmid 3.0×10^2 ke 3.0×10^6 pada ambang 409.00



Gambar 2. Spermatozoa yang dinyahkental bersaiz kepala 5 – 10 μm iaitu sama atau kurang daripada satu kali ganda daripada saiz asal pembesaran 630 X selepas penghibridan dengan prob TSPY menunjukkan sebahagian spermatozoa pembawa kromosom-Y memberi isyarat hijau

Perbandingan teknik penentuan jantina spermatozoa

Ketiga-tiga teknik penentuan jantina dibandingkan menggunakan analisis statistik dengan nisbah 1:1 bilangan spermatozoa pembawa kromosom-X kepada spermatozoa pembawa kromosom-Y sebagai kawalan. Purata nisbah bilangan spermatozoa pembawa kromosom-X kepada -Y dalam kajian ini telah dibuktikan 1:1 mengikut model meiotik piawai yang menyatakan bilangan spermatozoa pembawa kromosom-X dan -Y adalah setara pada haiwan normal. Keputusan ini adalah sejajar dengan kajian penentuan jantina lembu yang lain.

Hasil analisis statistik menunjukkan teknik penentuan jantina PCR, FISH dan qPCR tidak mempunyai perbezaan yang bererti. Namun, daripada ketiga-tiga teknik penentuan jantina spermatozoa lembu tersebut, teknik FISH memberikan nilai koefisien varian (CV) yang paling rendah, iaitu 2.65% diikuti dengan teknik PCR iaitu 4.54%. Walaupun teknik qPCR mempunyai nilai peratusan spermatozoa pembawa kromosom-X kepada -Y yang paling hampir dengan nisbah 1:1, tetapi teknik tersebut memberikan nilai CV yang paling tinggi antara ketiga-tiga teknik iaitu 10.68%.

Selain itu, sisihan piawai untuk qPCR juga menunjukkan nilai yang paling tinggi antara ketiga-tiga teknik penentuan jantina iaitu 5.38 untuk qPCR, berbanding dengan PCR (2.36) dan FISH (1.31). Dari segi statistik, teknik FISH tidak mempunyai variasi keputusan yang besar berbanding dengan teknik lain. Dari segi nilai CV dan sisihan piawai, teknik FISH dalam penentuan jantina merupakan teknik yang paling jitu. Sebaliknya, qPCR memberikan variasi keputusan yang paling besar. Oleh itu, untuk mendapatkan keputusan yang jitu, teknik qPCR memerlukan bilangan replikasi yang tinggi.

Walaupun begitu, ketiga-tiga teknik penentuan jantina mempunyai perbezaan dan kelebihan dari segi lain seperti kos, masa, tenaga kerja dan kuantiti sampel yang diperlukan (*Jadual 1*). Pemilihan teknik yang sesuai di dalam makmal perlu mengambil kira faktor-faktor tersebut serta kemudahan yang sedia ada.

Jadual 1. Perbandingan antara tiga teknik penentuan jantina spermatozoa

Faktor	PCR	FISH	qPCR
Kos	Rendah	Sederhana	Sederhana
Masa	Satu hari	Dua hari	Satu hari
Tenaga kerja	Tinggi	Sederhana	Sederhana
Kuantiti sampel diperlukan	Sedikit	Sedikit	Banyak
Nilai CV	4.54%	2.65%	10.68%
Sisihan piawai	2.36	1.31	5.38
Peratus kejayaan (anggaran)	Sederhana	Tinggi	Sederhana

Kesimpulan

Penentuan jantina dengan teknik PCR bersarang multipleks menggunakan penanda-penanda molekul ZFX dan SRY menunjukkan purata spermatozoa pembawa kromosom-X dan kromosom-Y masing-masing sebanyak 51.9% dan 48.1%. Manakala teknik FISH menggunakan penanda molekul TSPY berjaya mengenal pasti purata spermatozoa pembawa kromosom-X dan kromosom-Y masing-masing sebanyak 49.3% dan 50.7%. Teknik qPCR menggunakan penanda-penanda molekul ZFX dan SRY pula memberikan purata spermatozoa pembawa kromosom-X dan kromosom-Y masing-masing sebanyak 50.4% dan 49.6%. Ketiga-tiga teknik ini seiring dengan kajian terdahulu yang menyatakan terdapat nisbah 1:1 spermatozoa pembawa kromosom-X dan -Y dalam sesuatu sampel yang diambil secara rawak.

Penghargaan

Setinggi-tinggi penghargaan kepada kakitangan di Makmal ART, MARDI Muadzam Shah yang membantu iaitu Zaidi Salleh, Mohd. Noor Yasin dan Mohd. Shahril Abd. Rahim.

Bibliografi

- Barr, M.L. (1960). Sexual dimorphism interphase nuclei. *The American Journal of Human Genetics* 12: 118 – 127
- Bondioli, K.R. (1992). Embryo sexing: a review of current techniques and their potential for commercial in livestock production. *Journal of Animal Science* 70: 19 – 29
- Bredbacka, P., Kankaanpää, A. dan Peippo, J. (1995). PCR-Sexing of bovine embryos: A simplified protocol. *Theriogenology* 44: 167 – 176
- Cassar, G., King, W.A. dan King, G.J. (1994). Influence of sex on early growth of pig conceptuses. *Journal of Reproductive and Fertility* 101: 317 – 320
- Checa, M.L., Dunner, S. dan Canon, J. (2002). Prediction of X- and Y-chromosome content in bovine sperm by using DNA pools through capillary electrophoresis. *Theriogenology* 58: 1579 – 86
- Colley, A., Buhr, M. dan Golovan, S.P. (2008). Single bovine sperm sex typing by amelogenin nested PCR. *Theriogenology* 70: 978 – 983
- Dervishi, E., Martinez-Royo, A., Sanchez, P., Alabart, J.L., Cocero, M.J., Folch, J. dan Calvo, J.H. (2008). Reliability of sex determination in ovine embryos using amelogenin gene (AMEL). *Theriogenology* 70: 241 – 247
- Hassanane, M., Kovacs, A., Laurent, P., Lindblad, K. dan Gustavsson, I. (1999). Simultaneous detection of X- and Y- bearing bull spermatozoa by double colour fluorescence *in situ* hybridization. *Molecular Reproduction and Development* 53: 407 – 412
- Hossepian de Lima, V.F.M., Moreira-Filho, C.A., De Bern, A.R. dan Jorge, W. (1993). Sex determination of murine and bovine embryos using cytotoxicity and immunofluorescence assays. *Theriogenology* 39: 1,343 – 1,352
- Kawarasaki, T., Matsumoto, K., Murofushi, J., Chikyu, M., Itagaki, Y. dan Horiuchi, A. (1999). Sexing of porcine embryo by *in situ* hybridization using chromosome Y- and 1-specific DNA probes. *Theriogenology* 53: 1,501 – 1,509

- King, W.A., Linares, T., Gustavessin, I. dan Bane, A. (1979). A method for preparation of chromosome from bovine zygotes and blastocysts. *Veterinary Science Communications* 3: 51 – 56
- Mullis, K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Science American* 262: 56 – 61
- Parati, K., Bongioni, G., Aleandri, R. dan Galli, A. (2006). Sex region determination in bovine semen: A new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology* 66: 2,202 – 2,209
- Rens, W., Yang, F., Welch, G., Revell, S., O'Brien, P.C.M., Solanky, N., Johnson, L.A. dan Ferguson Smith, M.A. (2001). An X-Y paint set and sperm FISH protocol that can be used for validation of cattle sperm separation procedures. *Reproduction* 21: 541 – 546
- Sato, T., Ikuta, K., Sherlock, J., Adinolfi, M. dan Suzumori, K. (2003). Comparison between fluorescence in situ hybridization (FISH) and quantitative-fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the detection of aneuploidies in single blastomeres. *Prenatal Diagnosis* 23: 678 – 684
- Schwerin, M., Gallagher, D.S., Miller, J.R. dan Thomsen, P.D. (1992). Mapping of Y repetitive bovine DNA sequences on cattle Y-chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 61: 189 – 194
- Silva, P.F.N. dan Gadella, B.M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65: 958 – 978
- Wikipedia, the free encyclopedia (2008). Diperoleh pada 18 Oktober 2008 dari http://en.wikibooks.org/wiki/Anatomy_and_Physiology_of_Animals/Reproductive_System
- Whyte, J.J., Roberts, R.M. dan Rosenfeld, C.S. (2007). Fluorescent in situ hybridization for sex chromosome determination before and after fertilization in mice. *Theriogenology* 67: 1022 – 1031

Ringkasan

Teknologi penentuan jantina spermatozoa merupakan teknologi yang melibatkan pengasingan spermatozoa pembawa kromosom-X dan -Y sebelum persenyawaan. Dalam kajian ini tiga penanda molekul digunakan iaitu *Zinc Finger Protein X (ZFX)*, *Sex Determining Region Y (SRY)* dan *Y-encoded, testis-specific protein (TSPY)* yang digunakan dalam teknik menentukan jantina spermatozoa. Teknik penentuan jantina spermatozoa tersebut adalah tindak balas berantai polimerase (PCR), penghibridan in situ berfluoresen (FISH) dan tindak balas berantai polimerase kuantitatif (qPCR). Sampel spermatozoa lembu *Bos indicus* baka Kedah-Kelantan (KK) sejuk beku digunakan dalam kajian ini.

Summary

Sperm sexing is a technology involving the separation of X- and Y-chromosome bearing spermatozoa before fertilisation. In this study, three molecule bearing spermatozoa sex markers had been used for spermatozoa sex determination, which are *Zinc Finger Protein X (ZFX)*, *Sex Determining Region Y (SRY)* and *Y-encoded, testis-specific protein (TSPY)*. The methods for bovine spermatozoa sex determination are polymerase chain reaction (PCR), fluorescence in-situ hybridisation (FISH) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Cryopreserved spermatozoa from *Bos indicus* cattle of the Kedah-Kelantan (KK) breed were used in this study.

Pengarang

Tan Ying Ju

Pusat Penyelidikan Sains Ternakan, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: yjtan@mardi.gov.my

Mahanem Mat Noor

Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 UKM, Bangi, Selangor

Ainu Husna M S Suhaimi dan Wan Somarny Wan Md Zain

Pusat Penyelidikan Sains Ternakan, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

