

Geenit alkion tiineyttämiskyvyn takana

Kati Korhonen¹, Nasser Ghanem², Dawit Tasfaye², Mervi Rätty¹, Elise Ketoja¹, Timo Tiirikka¹, Johanna Aro³, Hannu Myllymäki³, Johanna Vilkki¹ ja Jaana Peippo¹

¹MTT Biotekniikka- ja elintarviketutkimus, 31600 Jokioinen, etunimi.sukunimi@mtt.fi

²University of Bonn, Institute of Animal Science, 53115 Bonn

³Alkiokeskus Oy, Urheilutie 6, 01301 Vantaa

Tiivistelmä

Nykyaikaisessa karjanjalostuksessa huippuemien jälkeläismäärää voidaan lisätä alkiohuuhtelujen avulla. Huhdeltavan eläimen munasarjat aktivoidaan hormoneilla, jolloin ovulaatiossa irtoaa kerralla jopa kymmeniä munasoluja. Eläin keinosiemennetään, ja hedelmöittyneiden munasolujen annetaan kehittyä seitsemän vuorokautta ennen kuin ne huuhdellaan kohdusta ulos. Heti huuhtelun jälkeen tuoreena siirretyistä alkioista noin 50 % tiineyttää vastaanottajan.

Vastaanottajaeläimen tiinehtymiseen vaikuttaa useita tekijöitä, joista siirrettävän alkion elinkyky on yksi tärkeimmistä. Nykyisin alkion elinkyky arvioidaan ennen vastaanottajaan siirtoa silmämääräisellä mikroskooppitutkimuksella. Menetelmä on kuitenkin vain suuntaa antava. Tässä tutkimuksessa haluttiin selvittää, onko tiineyttävien alkioiden geenitoiminnassa tai aineenvaihduntareiteissä eroa ei-tiineyttäneisiin alkioihin. Jos näin olisi, voitaisiin alkioiden elinkyvyn arviointi tehdä tarkemmin geenitoimintaan perustuen ja näin mahdollisesti parantaa tiineystuloksia.

Tutkimusta varten huuhtelualkioista otettiin pieni näytepala ennen vastaanottajaan siirtoa. Tiineystuloksen selvittyä nämä pakastetut näytepalat ryhmiteltiin tiineyttäneisiin (T) ja ei-tiineyttäneisiin (ET). Koeryhmien geenitoimintaa tutkittiin näytepaloista mikrosirutekniikalla, joka mahdollistaa tuhansien geenien aktiivisuuden mittaamisen samanaikaisesti.

Mikrosirutulosten perusteella löydettiin kymmeniä geenejä joiden aktiivisuus erosi merkittävästi tiineyttäneiden ja ei-tiineyttäneiden alkioiden välillä. Tulosten varmistamiseksi kahdeksan mielenkiintoisimman geenin aktiivisuusero koeryhmien välillä tarkastettiin vielä qPCR-menetelmällä. Sen perusteella varmennettiin kolme geeniä (CKS2, SSPB1 ja H3F3A), joiden aktiivisuus todella oli tiineyttäneissä alkioissa selvästi ei-tiineyttäneitä korkeampi. Näistä geeneistä kaksi, H3F3A ja SSPB1, ovat solun yleisiin toimintoihin liittyviä ylläpitogeenejä. H3F3A tuottaa solunjakautumisesta riippumatonta histoni-proteiiniä joka on osa DNA:n perusrakennetta, ja SSPB1 ylläpitää mitokondrioiden normaalia toimintaa. CKS2 sen sijaan liittyy alkionkehityksen kannalta tärkeään solunjakautumiseen ja voisi näin ollen toimia alkion elinkyvystä kertovana merkkigeeninä.

Yksittäisten geenien lisäksi löydettiin kaksi tiineyttäneille alkioille ominaista aineenvaihduntareittiä; folaattisynteesi ja ribosomien toimintaan liittyvä reitti. B-ryhmän vitamiineihin kuuluva folaatti on tärkeä tekijä normaalissa alkionkehityksessä, ja ribosomien toiminta liittyy alkionkehityksen kannalta välttämättömiin proteiinisynteeseihin. Aineenvaihduntareittien löytyminen antaa yksittäisiä geenejä laajempaa tietoa siitä minkälaiset mekanismit tiineyttävissä alkioissa ovat toiminnassa.

Tämä tutkimus on osa neljävuotista (2006–2009) EU:n rahoittamaa SABRE-projektia.

Asiasanat: *in vivo*, alkion elinkyky, qPCR, mikrosiru

Johdanto

Alkutiineyden aikana tapahtuvat alkiokuolemat ovat yksi merkittävä maidon- ja lihantuotannon kannattavuuteen vaikuttava tekijä. On arvioitu, että 28–43 % kaikista tiineyksistä abortoituu ennen 16 vuorokautta (Diskin ja Morris 2008). Tärkeimmät syyt varhaisiin alkiokuolemiin löytyvät alkion heikosta elinkyvystä, emän kohdun epäoptimaalisesta fysiologisesta tilasta, epäsynkroniasta emän kiimankierron vaiheen ja alkion iän välillä, sekä ongelmista alkion ja emän välisessä hormonaalisessa kommunikoinnissa (Rodriguez-Zas ym. 2008, El-Sayed ym. 2006).

Kun keskitytään onnistuneen tiineyden tutkimiseen alkion elinkyvyn näkökulmasta, nousevat geenit tärkeään asemaan. Aiempien tutkimusten perusteella tiedetään, että normaali alkionkehitys on geenien tarkan yhteistoiminnan tulosta. Esimerkiksi alkion kohtuun kiinnittymisen voi estää virhe pelkästään yhden geenin toiminnassa (Niemann ym. 2007, Copp 1995).

Tutkimuksia, joissa tuhansia alkion elinkykyyn liittyviä geenejä olisi tutkittu samanaikaisesti, on vielä vähän. Osittain tämä johtuu siitä, että näihin tutkimuksiin soveltuva tekniikka -mikrosirut ja erityisesti toisen sukupolven sekvensointilaitteet- on kohtalaisen uutta. Vuonna 2006 El-Sayed ja kumppanit raportoivat mikrosirututkimuksensa tuloksena löydettyjä geenejä, joiden aktiivisuus liittyi laboratoriossa kasvatettujen *in vitro* alkioiden tiineyttämiskykyyn. He totesivat että tiineyttävissä alkioissa erityisen aktiivisia (up-reguloituja) olivat geenit, joita tarvitaan alkion kohtuun kiinnittymisessä (COX2, CDX2), hiilihydraattimetaboliassa (ALOX15), solujen kasvussa ja erilaistumisessa (BMP15), signaalien välityksessä soluissa (PLAU) ja istukan kehityksessä (PLAC8). Ei-tiineyttäneissä alkioissa aktiivisia olivat puolestaan geenit, jotka liittyvät sytokiinien ilmestymiseen tulehdusreaktioissa (TNF), aminohappojen sitoutumiseen (EEF1A1), transkriptiotekijöihin (MSX1, PTTG1), glukoosimetaboliinaan (PGK1, AKR1B1) ja alkion kohtuun kiinnittymistä estäviin tekijöihin (CD).

Tuoesiirtoihin, joissa tiinehtyminen on todennäköisintä, voidaan valita vain yksi alkio. Nykyisin alkion elinkyky arvioidaan ennen vastaanottajaan siirtoa silmämääräisellä mikroskooppitutkimuksella. Menetelmä on kuitenkin subjektiivinen, ja on todettu, että 25 %:ssa elinkykyisiksi luokitelluista *in vivo* alkioista on kromosomaalisia epänormaaliuksia (Viuff ym. 1999).

Tässä työssä tutkittiin *in vivo* huuhtelualkioiden geenitoimintaa tavoitteena löytää alkion hyvästä tiineyttämiskyvystä kertovia merkkigeenejä ennen siirtoa tehtävän elinkyvynarvioinnin tarkentamiseksi. Vastaavaa *in vivo* alkioiden geenitoiminnan tutkimusta ei ole aikaisemmin julkaistu.

Aineisto ja menetelmät

Huuhdeltaville eläimille aiheutettiin superovulaatio, eli useiden munasolujen samanaikainen irtoaminen hormonipistoshoidolla. Eläimet keinosiemennettiin ovulaatiopäivänä. Alkiot huuhdeltiin luovuttajaeläinten kohduista seitsemän vuorokauden kuluttua siemennyksestä. Huuhtelun jälkeen alkioiden kehitysaste ja laatuluokka (I-III) arvioitiin mikroskoopin avulla. Vain laatuluokkaan I kuuluvat alkiot valittiin tutkimukseen. Niistä leikattiin pieni näytepala eli biopsia silmäkirurgin veitsellä mikroskoopin avulla. Biopsian koko oli n. 40 % alkion kokonaissolumassasta, ja se sisälsi sekä ulko- että sisäsolu-massan soluja. Biopsianäytteet pakastettiin.

Biopsioidut alkiot siirrettiin tuoreena vastaanottajiin, joiden kiimankierto oli synkronoitu hormonipistoshoidolla sopivaan vaiheeseen. Jos vastaanottaja tuli kiimaan 21 vrk kuluttua siirrosta, tai myöhemmin, merkittiin eläin ei-tiineet -ryhmään. Tiineitä vastaanottajia seurattiin vasikan syntymään asti, jolloin eläin merkittiin tiineet-ryhmään. Kun kaikkien vastaanottajien tiineystulokset oli varmistettu, yhdistettiin sekä tiineyttäneiden alkioiden (T) biopsiat, että ei-tiineyttäneiden alkioiden (ET) biopsiat kolmeksi näytteeksi (jokainen näyte sisälsi kolme biopsiaa).

Kolmesta T ja ET -näytteestä eristettiin lähetti-RNA Dynabead oligo (dT)₂₅ -kitillä, ja käännettiin se cDNA:ksi Superscript II -entsyymillä. Saatu cDNA monistettiin käyttäen DOP-alukkeita ja PCRmaster -kittiä. Monistettu cDNA käännettiin aRNA:ksi Ampli-Scribe T7 transcription -kitillä. Käännetty aRNA puhdistettiin RNeasy mini -kitillä, ja sen saanto ja puhtaus tarkastettiin spektrofotometrillä. Saatu aRNA käännettiin aminoallyyli leimatuksi cDNA:ksi Amersham Postlabeling -kitin avulla. T ja ET -näytteet (nyt siis aminoallyyli leimattuina cDNA:na) leimattiin kumpikin omalla fluo-resoivalla värillään (Cy3 ja Cy5). Leimatut näytteet hybridisoitiin mikrosiruille, jotka tässä työssä olivat BlueChipin cDNA -siruja.

cDNA:n hybridisoituminen siruille määritettiin GenePix 4000B -skannerin avulla. Saatu raaka-data esikäsiteltiin, normalisoitiin ja kandidaattigeenilistat luotiin SAM-ohjelmistolla. Mikrosirutulokset raportoitiin suhteellisten aktiivisuuserojen muutoksina (eng. fold change) koeryhmien välillä.

Kandidaattigeenilistoista valittujen mielenkiintoisimpien geenien todelliset aktiivisuuserot koeryhmien välillä mitattiin ylimääräisistä alkibiopsianäytteistä (T ja ET) reaaliaikaisella qPCR-menetelmällä (ABI Prism 7000 SDS instrument/SYBR green kemia). Jokaiselle tutkittavalle geenille luotiin standardisuora (10^1 – 10^9) plasmidikloonauksen avulla. Näytteiden väliset erot lähtömateriaalin, eli alkiosolujen määrässä tasattiin GAPDH-kontrolligeenin näytekohataisten tulosten perusteella. Oletuksenahan on että GAPDH-geenin aktiivisuus on vakio jokaisessa solussa. Varsinainen PCR-reaktiotilavuus oli 20 µl sisältäen templaatin, geenikohtaiset alukkeet, SYBR greenin ja veden. Varsinaisen monistusreaktion jälkeen (95 °C 3 min, (95 °C 15s, 60°C 30s x40)) näytteet ajettiin ns. Dissosiaatio-ohjelmalla, jolla varmistettiin monistustuotteen puhtaus ja näin tulosten luotettavuus. qPCR-tulokset raportoitiin suhteellisten aktiivisuuserojen muutoksina (eng. relative expression) tutkittavien ryhmien välillä.

Tulokset ja tulosten tarkastelu

Kandidaattigeenit

Mikrosirutekniikka mahdollisti tuhansien geenien yhtäaikaisen aktiivisuuden mittauksen alkibiopsianäytteistä (T=tiineyttäneet ja ET=ei-tiineyttäneet alkiot). Geenien aktiivisuuserot T- ja ET-alkioiden välillä määritettiin mikrosirutuloksista SAM-ohjelmistoa käyttäen ($FDR \leq 5\%$, $P \leq 0.05$), ja näin saatiin ns. kandidaattigeenilistat. Näissä listoissa (taulukot 1 ja 2) ovat geenit, joiden aktiivisuusero T- ja ET-alkioiden välillä oli yli 1,4-kertainen. Löydetyistä geneista 45 oli tiineyttäneissä alkioidissa up-reguloitua, ja 21 down-reguloitua. Kandidaattigeeneistä valittiin lupaavimmat geenit qPCR-varmennukseen (Up-reguloidut: LDHB, SSPB1, Aurora-A, H3F3A, CKS2 ja down-reguloidut: SVIL, ATP11C, LOC50, HSPCB) koeryhmien välisen aktiivisuuseron ja geenien toimintaan liittyvien taustatietojen perusteella.

Taulukko 1. Tiineyttäneiden alkioden down-reguloidut geenit.

Geenin nimi	Aktiivisuusero	Biologinen prosessi johon geeni liittyy
EST from a microgravity versus gravity subtracted library from	4,0	Tuntematon
Supervillin (SVIL)	2,8	Solun tukirangan muodustuminen
Homo s. mRNA for ATPase, Class VI, type 11C (ATP11C)	2,6	ATP biosynteesi, Fosfolipidien kuljetus
mRNA for aromatase cytochrome P450 pseudogene (LOC50)	2,4	Tuntematon
Heat shock 90kDa protein 1, beta (HSPCB)	2,0	Stressivaste, Istukan kehitys
Proline-rich nuclear receptor coactivator 1	1,6	Tuntematon
Homo s. myosin regulatory light chain interacting protein	1,6	Solujen liike, Hermoston kehitys
Partial mRNA for non-selenium glutathione phospholipid	1,5	Lipidien katabolia, Hapettumisen estäminen
Similar to chromosome 15 open reading frame 23	1,5	Proteiinien sitoutuminen
Sus scrofa mRNA, clone:AMP010031A04, expressed in alveolar macrophage	1,5	Tuntematon
Polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 2	1,4	Tuntematon
Similar to Securin (Pituitary tumor-transforming protein)	1,4	DNA:n korjaus, solusykli

Taulukko 2. Tiineyttäneiden alkioiden up-reguloidut geenit.

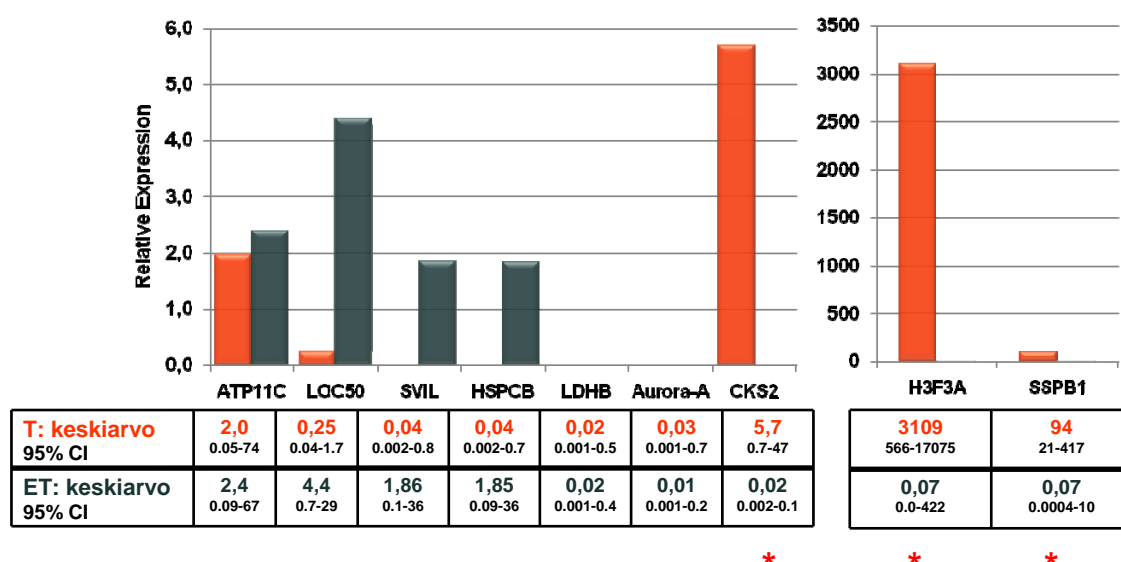
Geenin nimi	Aktiivisuus usero	Biologinen prosessi johon geeni liittyy
Lactate dehydrogenase B (LDHB)	8,0	L-laktaatti dehydrogenaasi aktiivisuus
Similar to single-stranded DNA binding protein 1 (SSPB1)	3,2	DNA:n kahdentuminen
Aurora-A	2,8	Solusykli, Proteiinien aminohappofosforylaatio
H3 histone, family 3A (H3F3A)	2,4	Nukleosomien koostaminen (ei DNA:n kahdentumiseen liittyvä)
Bubalus bubalis clone pDS5.6 satellite sequence	2,4	Tuntematon
Homo s. NADH dehydrogenase subunit 5 (MTND5)	2,1	NADH dehydrogenase activity
Homo s. SRY (sex determining region Y) NAbbox4 (SOX4)	2,0	Solusyklin ja apoptoosin säätely
Beta-actin (ACTB)	1,9	ATP:n, nukleotidien ja proteiinien sitoutuminen
Homo sapiens keratin 18 (KRT18)	1,9	Solusyklin ja apoptoosin säätely
Clone IMAGE:7961461 beta-2-microglobulin mRNA	1,8	Immuunivaste
Annexin A2 (ANXA2)	1,8	Angiogeneesi, fibrinolyysi
Ribosomal protein S27a	1,6	Translaatio
Homo s. poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	1,6	RNA:n pilkkominen, mRNA:n käsittely
MAP kinase phosphatase-1	1,6	Proteiinien aminohappofosforylaatio
Proline-rich nuclear receptor coactivator 1	1,5	Reseptorien aktiivisuus
Oocyte-secreted protein variant 2 (OOSP1)	1,5	Tuntematon
Ribosomal protein S18	1,5	Translaatio
Placenta-specific 8 (PLAC8)	1,5	Tuntematon
Homo s. chromosome 3 open reading frame 59	1,5	Tuntematon
Sushi repeat-containing protein	1,5	Tuntematon
Ubiquitin-like/S30 ribosomal fusion protein (FAU)	1,5	Translaatio
CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 (CKS2)	1,5	Solusyklin säätely
Homo s. F-box protein 5, (FBXO5)	1,5	Solusyklin säätely
Intestinal alkaline phosphatase III (ALPI)	1,4	Aineenvaihdunta prosessit
Sodium channel, voltage-gated, type III beta, (SCN3B)	1,4	Ionien kuljetus
Pea Chloroplast 4.5S, 5S, 16S and 23S mRNA	1,4	Tuntematon
Cisplatin resistance-associated overexpressed protein	1,4	RNA:n pilkkominen, mRNA:n käsittely, apoptoosi, stressivaste
Homo s. serine/threonine protein kinase Kp78 splice variant	1,4	Tuntematon

Tiineyttäneiden alkioiden up- ja down-reguloitujen geenien varmennustulokset

Geenien aktiivisuus koeryhmissä varmennettiin qPCR-menetelmällä, koska tiedetään että mikrosirutusten joukossa voi olla väärä negatiivisia tai positiivisia tuloksia. Näytteinä käytettiin kokeen aikana kerättyjä ylimääräisiä alkiobiopsioita molemmista koeryhmistä.

Up-reguloitujen geenien (LDHB, SSPB1, Aurora-A, H3F3A ja CKS2) varmennustulokset testattiin tilastollisesti geeniryhmänä, ja todettiin että tiineyttäneissä alkioissa nämä geenit todella olivat merkittävästi ($P < 0.05$) aktiivisempia kuin ei-tiineyttäneissä alkioissa. Geeneistä kolme, H3F3A, SSPB1 ja CKS2, olivat tiineyttäneissä alkioissa merkittävästi ($P = 0.02$, $P = 0.01$ ja $P = 0.0008$) aktiivisempia myös yksittäin tarkasteltuna. Geenien aktiivisuuserot kolmen biologisen toistonäytteen välillä olivat samankaltaiset tiineyttäneet ja ei-tiineyttäneet ryhmissä. H3F3A ja SSPB1 geenien aktiivisuudet osoittivat kuitenkin suurempaa hajontaa ei-tiineyttäneissä alkionäytteissä verrattuna tiineyttäneisiin alkionäytteisiin.

Tiineyttäneiden alkioiden down-reguloitujen geenien (SVIL, ATP11C, LOC50 ja HSPCB) varmennustuloksia testattiin tilastollisesti geeniryhmänä, ja todettiin että tiineyttäneissä alkioissa nämä geenit todella olivat merkittävästi ($P = 0.008$) vähemmän aktiivisia kuin ei-tiineyttäneissä alkioissa. Kun geenejä tarkasteltiin yksittäin, ei kuitenkaan yhdenkään geenin aktiivisuus tilastollisesti merkittävästi eronnut ei-tiineyttäneiden ja tiineyttäneiden alkioiden välillä (Kuva 1).



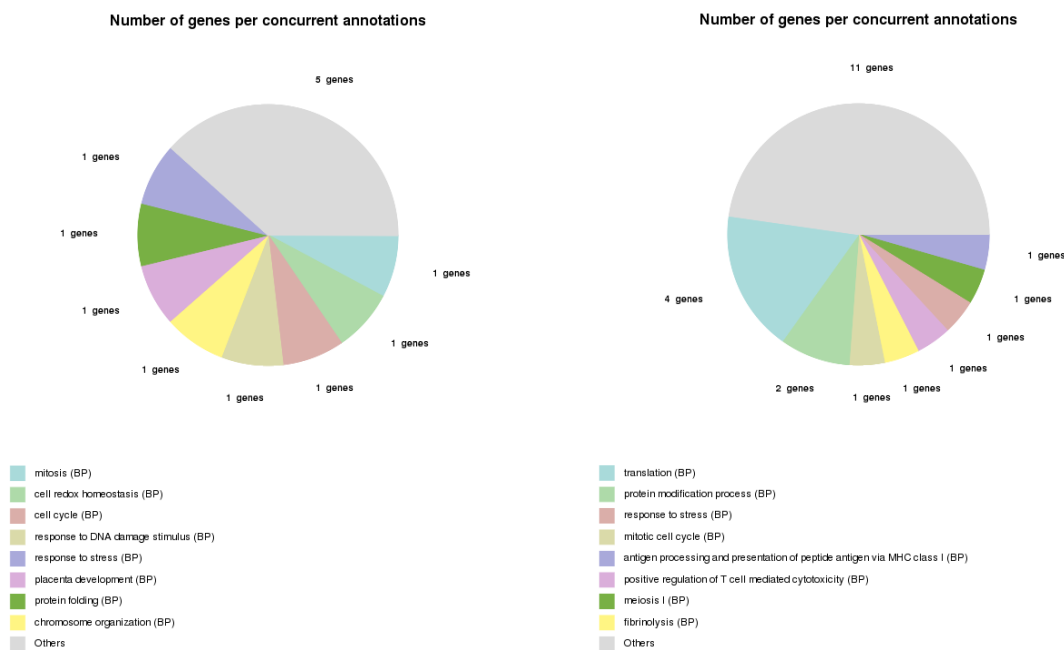
Kuva 1. Valittujen geenien aktiivisuus koeryhmissä varmennettiin qPCR-menetelmällä.

*Geenit joiden aktiivisuusero koeryhmien välillä on tilastollisesti merkitsevä ($P > 0.05$).

Geeniontologiat ja geeniverkot

Kandidaattigeenilistat (taulukot 1 ja 2) analysoitiin myös FatiGO:lla, joka on osa Babelomics-ohjelmistoa. FatiGO:n avulla kandidaattigeenit yhdistettiin geeniontologioihin ja -reitteihin. Tulokset osoittivat, että kandidaattigeenien ontologiat (GO-termit) löytyivät pääasiassa ontologiapuu korkeilta tasoilta. Tämä tarkoittaa, että useimpien kandidaattigeenien toiminta on vielä melko tuntematonta. Kuvassa 2 on esitetty geenien GO-termit tasolla 6.

Geeniverkkoja tarkasteltaessa todettiin, että tiineyttäneiden alkioiden down-reguloitujen geenit eivät yhdistyneet mihinkään geeniverkkoon. Kaksi tiineyttäneiden alkioiden up-reguloitua geeniä (ALPI ja FAU) yhdistettiin folaattisynteesi- ja ribosomigeeniverkkoihin, järjestyksessä.



Kuva 2. Tiineyttäneiden alkioiden down-reguloituihin (vasen) ja up-reguloituihin (oikea) geeneihin yhdistetyt GO-termit.

Johtopäätökset

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää tiineyttäneiden alkioiden geenitoimintaa tuhansien geenien tasolla. Valittu mikrosiruteknikka oli sopiva työkalu tämän mittakaavan tutkimukseen. Mikrosirudata analysoitiin ja tuloksena saatiin tiineyttäville alkiolle tyypillisiä kandidaattigeenejä ja geenireittejä.

Tiineyttäneiden alkioiden kandidaattigeenilistalta löytyi neljä up-reguloitua geeniä jotka liittyvät solusyklin säätelyyn, kun taas ei-tiineyttäneiden alkioiden listalta tällaisia geenejä ei löytynyt. Tulos on johdonmukainen, sillä solusyklin säätely ja solujen jakautuminen ovat alkionkehityksen onnistuneen etenemisen kannalta keskeisiä tekijöitä. Tiineyttäneistä alkiosta löytyi myös kaksi mielenkiintoista geenireittiä; folaattisynteesi ja ribosomit. Folaatti on yksi B-ryhmän vitamiineista ja tärkeä tekijä normaalissa alkionkehityksessä (Kobus ym. 2009). Ribosomit puolestaan ovat välttämättömiä proteiinisynteesin toiminnassa. Geenireittituloksiin täytyy kuitenkin suhtautua varauksella, sillä molempiin reitteihin liitettiin vain yksi geeni. Näitä geenejä ei myöskään varmennettu qPCR:llä niiden alhaisen koeryhmien välisen aktiivisuuseron takia.

Varmennukseen valitut up-reguloitut geenit osoittivat korkeampaa aktiivisuutta tiineyttäneissä alkioiden myös qPCR -määrityksen perusteella, mutta ainoastaan H3F3A, SPPB1 ja CKS2 geenien osalta aktiivisuusero ryhmien välillä oli tilastollisesti merkitsevä. H3F3A:n tehtävä on tuottaa solunjakautumisesta riippumatonta histoni-proteiiniä, joka on osa DNA:n perusrakennetta. SPPB1 puolestaan ylläpitää mitokondrioiden normaalia toimintaa. CKS2-geeni ei kuulu kahden muun tavoin solun ylläpitogeeneihin, vaan se on osa alkionkehityksen kannalta tärkeää solunjakautumisen ohjausjärjestelmää.

Alkiosta otetusta näytepalasta voidaan nykyään rutiinisti määrittää alkion sukupuoli. Myös erilaisten tuotantogeenien alleelityypimäärityksiä on mahdollista tehdä (Peippo ym. 2007). Näitä valmiina olevia tekniikoita soveltamalla myös tiettyjen geenien aktiivisuustason määrittäminen ennen alkionsiirtoa olisi mahdollista. Tämän tutkimuksen perusteella CKS2 geenin aktiivisuus voisi toimia indikaattorina alkion tiineyttämiskyvystä.

Kirjallisuus

- Copp, A.** 1995. Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet.* 11: 87-93.
- Diskin, M., and Morris, D.** 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 260-7. Review.
- El-Sayed, A., Hoelker, M., Rings, F., Salilew, D., Jennen, D., Tholen, E., Sirard, M-A., Schellander, K., Tesfaye, D.** 2006. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol. Genomics* 28: 84-96.
- Kobus, K., Nazari, E., Muller, Y.** 2009. Effects of folic acid and homocysteine on spinal cord morphology of the chicken embryo. *Histochem. Cell Biol.* 132: 525-32.
- Niemann, H., Carnwath, J., Kues, W.** 2007. Application of DNA array technology to mammalian embryos. *Theriogenology* 68: S165-77. Review.
- Peippo, J., Viitala, S., Virta, J., Rätty, M., Tammiranta, N., Lamminen, T., Aro, J., Myllymäki, H., Vilkki, J.** 2007. Birth of correctly genotyped calves after multiplex marker detection from bovine embryo microblade biopsies. *Mol. Reprod. Dev.* 74: 1373-8.
- Rodriguez-Zas, S., Schellander, K., Lewin, H.** 2008. Biological interpretations of transcriptomic profiles in mammalian oocytes and embryos. *Reproduction* 135: 129-39. Review
- Viuff, D., Rickords, L., Offenberg, H., Hyttel, P., Avery, B., Greve, T., Olsaker, I., Williams, J., Callesen, H., Thomsen, P.** 1999. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biol. Reprod.* 60: 1273-8.