



"مقاله پژوهشی"

امکان تعیین جنسیت با استفاده از DNA آزاد شناور جنینی در پلاسمای خون بز آبستن

مجید رحیمی^۱, آرش جوانمرد^۲, سید عباس رافت^۳ و کریم حسن پور^۴

- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
(a.javanmard@tabrizu.ac.ir)
- استاد گروه علوم دامی، دانشگاه کشاورزی، دانشگاه تبریز
- استاد گروه علوم دامی، دانشگاه کشاورزی، دانشگاه تبریز
- استاد گروه علوم دامی، دانشگاه کشاورزی، دانشگاه تبریز
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۰
صفحه: ۱۵۶ تا ۱۶۳

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: امروزه، در پرورش حیوانات اهلی از جمله بز و گوسفند، دستیابی به روشهای دقیق، آسان و مقرون به صرفه، پیش انتخاب جنسیت جنین، دارای اهمیت اقتصادی خاصی می باشد. اخیراً، آزاد جنینی شناور در پلاسمای خون، بعنوان کاندیدای مناسبی برای روش تعیین جنسیت غیرتهاجمی در دامها و گونه های حیات وحش در خطر انقرض، معروف شده است. بدین منظور، هدف از پژوهش حاضر، تعیین جنسیت جنین بز به کمک DNA آزاد جنینی شناور در پلاسمای خون بزهای آبستن بود.

مواد و روش ها: در این راستا، در مجموع، تعداد ۲۱ حیوان آزمایشی شامل ۱۷ بز ماده که دوره ای آبستن بعد شش هفتگی را تجربه می کردند، ۲ بز غیرآبستن و ۲ بز نر (کترل منفی) انتخاب شدند. در ادامه تحقیق، بزهای ماده با استفاده از روش سیدرگذاری در واژن، همزمان سازی فحلی انجام و سپس در معرض جفتگیری طبیعی قرار گرفتند. عدم بازگشت به فحلی مجدد به عنوان شاخص موقفیت در آبستن تلقی شد. همچنین در ماههای آخر از روش سونوگرافی برای تایید استیتی استفاده شد. متعاقباً، پس از جداسازی پلاسمای خون بز ماده، استخراج cffDNA با استفاده از دستورالعمل های آزمایشی متداول موجود صورت گرفت. آغازگرها این پژوهش برا اساس ژن آمیلوژنین، مستقر در کروموزوم X و Y، طراحی شد. واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از روش های استاندارد موجود بهینه سازی شد.

یافته ها: نتایج مولکولی حاصله، وجود دو باند در جنین نر (باند ژن AMELX با اندازه ۱۷۱ bp و باند ژن AMELY با اندازه ۱۱۱ bp) و یک باند در جنین ماده (باند ژن AMELX با اندازه ۱۷۱ bp و باند ژن AMELY با اندازه ۱۱۱ bp) را نشان داد. همچنین بزهای آبستن در اوخر دوره ای آبستن غلظت DNA جنین بالاتری را نسبت به دوره های قبلی نشان دادند.

نتیجه گیری: با مقایسه نتایج تعیین جنسیت مولکولی پیش از تولد جنین های تحت تولد جنین های تحت تولد، دقت تعیین جنسیت با استفاده از ژن آمیلوژنین، حساسیت، ویژگی و صحت، ۰/۸۳، ۰/۹۳ و ۰/۹۳ به دست آمد. شاید با کاربری تکنیک حاضر، بتوان در بررسی های مدیریتی تخمین بز جایگزین در گله (سیستم پرورش بزهای آبستن مازاد، یا پیش بینی تعداد بزهای نر در زایش آتی (سیستم پرواربندی) استفاده کرد.

واژه های کلیدی: بز، تعیین جنسیت، آمیلوژنین و cffDNA

به جز آنها که استعداد ژنتیکی به کارگیری به عنوان نرهای جوان جایگزین را دارند، ارزش کمتری دارند. تضمیم گیری های خاص مدیریتی در خرد و فروش بزهای ماده آبستن با پیش آگاهی از جنسیت جنین آن، خود می تواند بازده تولید و سودآوری نهایی را تحت تاثیر خود قرار دهد (۱۹).

از دیگر مزایا و اهمیت پیش اگاهی از جنسیت، کترل بعضی از بیماری های وابسته به جنس در دامپروری می باشد که با محدود کردن تولد یک جنس خاص می توان از تولد حیوانات با ناهنجاری های محتمل ژنتیکی پیشگیری کرد (۱۹).

در مبحث تعیین جنسیت جنین، همواره دو چالش عمده مطرح می باشد: اول، توسعه ای روشهای در ضمن دقیق بودن هیچ گونه آسیبی به جنین و بقای حیات آن وارد نکند. دوم، ضمن ضرورت دقیق بودن تشانگرهای DNA مورد استفاده، باید سریع و مقرون به صرفه باشد. روش های قبلي تهیه های سلول های جنینی برای تعیین جنسیت جنین، از جمله آمنیوستتر و نمونه گیری از پرزهای کوریونی، به دلیل نیاز به بیوپسی از جنین از جمله روشهای تهاجمی محسوب می شدند که همواره خطرات احتمالی آسیب های حاد به جنین و خطر سقط را همراه داشتند (۱۴، ۱۵، ۱۶).

جمع بندی روشهای غیرتهاجمی تعیین جنسیت جنین در دامهای اهلی طبق مقالات پیشین عبارتند از: آنژیم های

مقدمه
گونه بز اهلی، از جمله دامهای ارزشمند چندمنظوره می باشد، که محصولاتی همچون شیر و گوشت با کیفیت را تولید می نماید (۳۱). همچنین، در بسیاری از تحقیقات ریست فناوری، تولید پروتئین های نوترکیب دارویی با ارزش در بز اهلی، ممکن شده است (۳۱). در این راستا، فناوری های تولید مثلی که منجر به تولید بزغاله هایی با جنسیت از بیش تیز شده شود از اهمیت اقتصادی مهمی برخوردار می باشد (۱، ۱۸). به عنوان مثال، در پرورش بزهای تجاری تیپ شیرده، ارزش ماددها به علت تولید شیر و تولید بزغاله که مادران آتی در گله خواهند بود، بیشتر از جنس نرها است و بر عکس، در پرورش بزهای تجاری تیپ گوشتشی مانند بوئر، ارجحیت با جنس نر است (۱۸)، زیرا به علت وجود هورمون تستوسترون سریع تر رشد کرده و گوشت بیشتری در سیستم پرواربندی تولید می کنند (۳۱). کترل جنسیت به متخصصان اصلاح تزاد این اجرازه را می دهد که جنس با ارزش تر را بیشتر از جنس دیگر تولید نمایند و در واقع به مدیریت ساختار و ترکیب گله کمک کنند (۳۰).

علاوه بر این، در صنعت پرورش بزهای شیرده، اطلاع از تعداد بزهای ماده ای که به عنوان جایگزین گله عمل می کنند و به منظور برگشت سرمایه، به فروش می رسند اهمیت مدیریتی بالایی دارد، در حالیکه در سیستم داشتی، بزهای نر

همزمان جنسیت جنین های متولد نشده را به درستی تعیین کرد و متعاقب این یافته ارزشمند تکنیک تعیین جنسیت مبتنی بر cffDNA شناور و آزاد در پلاسمای خون در بز (۳۰)، گاو (۲۷)، گوسفند (۱) و اسب (۸، ۲۳) و فیل (۳۰) خوک (۱۰) هم اکنون توسعه و با نتیجه نسبتاً مطلوب همراه بوده است (۱۴، ۱۵، ۱۶).

ژن آمیلوژنین (AMEL) یک ژن با ساختار نوکلئوتیدی محافظت شده است که در کروموزوم‌های جنسی پستانداران قرار دارد (۱). این ژن مسئول تولید پروتئینی است در تشکیل مینی‌دان نقش دارد، که ماده ای سفید و سفت است که لایه خارجی محافظت هر دنдан را تشکیل می‌دهد (۱۴، ۱۵). این ژن به صورت دو کپی بر روی هر دو کروموزوم جنسی X و Y مستقر می‌باشد. ژن آمیلوژنین X و Y به ترتیب دارای ۶ و ۴ اگزون است و تاکنون از این ژن به عنلت الگوی الکتروفورزی متفاوتی که در جنس نر و ماده ایجاد می‌کند برای تعیین جنسیت دامها به وفور استفاده کرده‌اند (۱۶). هدف از پژوهش حاضر تعیین جنسیت جنین بز، با کمک DNA جنینی آزاد شناور در پلاسمای خون بز آبستن با استفاده از تکنیک PCR بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام پژوهش حاضر، کارهای فارمی در ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان و مرافق آزمایشگاهی در آزمایشگاه ژنتیک گروه علوم دامی دانشگاه تبریز انجام شد.

گام اول انتخاب حیوان‌ها و اخذ نمونه خون کامل و جدا سازی پلاسما

در این تحقیق، با توجه به تقویم تولیدمثلی بزهای اهلی و فتوپریدیسм فصلی در مجموع ۲۱ بز شامل: ۱۵ رأس بز ماده‌ی آبستن با دوره‌ی آبستنی بعد ۶ هفتگی، ۲ رأس بز نر و همچنین ۴ بز ماده‌ی غیرآبستن (شاهد) به عنوان نمونه‌های کاندید برای کار مولکولی انتخاب و خونگیری به عمل آمد. جداسازی پلاسما از نمونه‌ها با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۱۰ هزار و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

استخراج cffDNA و تعیین کمیت و کیفیت آن
برای انجام این مرحله، از دستورالعمل آزمایشگاهی کلروفورم-ایزوامیل الکل (۲۶) برای استخراج استفاده شد. پس از استخراج DNA و قبل از انجام PCR، تعیین کیفیت و مقدار DNA استخراج شده (۲۴) با استفاده از موینیتورینگ الکتروفورز ژل آکارز ۸ دهم درصد و دستگاه نانوراپ صورت گرفت.

انتخاب پرایمرها

آغازگرهای این پژوهش در طی یک بررسی از مقاله‌ی کوکولاک ریشنا و همکاران (۱۱) (شماره‌ی بانک ژن AMELX: DQ469588.1 و AMELY: DQ469589.1) اقتباس شد. توالی نوکلوتیدی آغازگرهای استفاده شده عبارت بودند از:

توالی آغازگر جلوبر:

5'-CCGCCAGCAGCCCTTCCAG-3'

توالی آغازگر برگشتی:

5'-ACCTCTGCCTTCATAATTCCCCA-3'

1- cffDNA

وابسته به X و روش‌های تشخیصی بر پایه آنتی ژن H-Y و کلیات روش‌های تهاجمی که به بیوپسی جنین نیاز داشت عبارت بودند از فناوری سیتوژنتیک و تهیه کاربوتایپ (۱۴، ۱۵، ۱۶)، استفاده از کاوشگرهای DNA اختصاصی کروموزوم Y و استفاده از نشانگرهای موجود در هر دو کروموزوم X و Y می‌باشد (۱۳). تکنیک‌های مولکولی مورد استفاده در تعیین جنسیت در بیشتر گونه‌ها بر پایه تشخیص توالی DNA (۱۲) در ژن‌های کاندیدا برای تعیین جنسیت همانند SRY، آمیلوژنین یا ZFX/ZFY (۲۰) با استفاده از PCR می‌باشد (۳۰).

کلیه قطعات DNA موجود در جریان خون که محدود یا محصور نشده باشند، به عنوان DNA آزاد شناور^۱ شناخته می‌شوند (۱). این قطعات آزاد شناور، دارای منشاء پیدایش مختلف هستند که هنوز در خصوصی آن، تردیدها و مباحث ناشناخته وجود دارد، اما فرضیه کاملاً پذیرفته شده این است که از مکانیسم‌هایی همچون آپوپتوز، نکروز یا آزادسازی فعال سلول‌ها، نشات می‌گیرد (۲۸). حدس زده می‌شود که انتقال سلول‌های جنین به خون مادر از طریق جفت منشا پیدایش cffDNA در پلاسما می‌باشد. در واقع این قطعات وارد شده به خون مادر سلول‌های بیگانه یا خارجی (Foreign) هستند (۱۷). در نتیجه، سیستم ایمنی بدن مادر با از بین بدن این سلول‌ها از خود واکنش نشان می‌دهد و مکرووفاژها بقایی سلول‌های متلاشی شده را تمیز می‌کند.

طول این قطعات تقریباً ۱۷۰-۲۱۰ نانومتر (nm) می‌باشد. است (۱۷). ctDNA نیمه عمر تقریباً دو ساعت دارد و در بیماری غلظت cffDNA در طول آبستنی با ورود سلول‌های بیشتری به جریان خون مادر افزایش می‌باشد (۲۱)، اما، پس از تولد نوازاد به سرعت تصفیه می‌شود. تحقیقات پیشین نشان می‌دهد که، غلظت‌های نرمال cfDNA بسیار متفاوت است و بین ۱ تا ۱۰۰۰۰ قطعه در میلی لیتر پلاسما وجود دارد. با پیشرفت آبستنی با افزایش ناگهانی ۱/۶۷ برابر در دو ماه پس از شروع دوران آبستنی، افزایش تدریجی در پلاسمای مادر را مشاهده کرد. فرضیاتی تایید نشده وجود دارد (۶) که وجود این قطعات در گردش خون مادر ممکن است محرك زایمان باشد یا ممکن است مسؤول تغییرات هورمونی و اندوکرینولوژی باشد که روند یک زایمان نرمال را تحریک می‌کند (۲۱).

روند مرور منابع مرتبط (بین سال‌های ۲۰۱۱-۲۰۰۰) در این خصوص در نشخوارکنندگان، نشان می‌دهد (۱۴، ۱۵، ۱۶) که در اوایل، فرضیاتی وجود داشت که وجود cffDNA در گردش خون دام ماده که در انسان یافت می‌شود قابل تعمیم به نشخوارکنندگان نیست و علت آن گپهای اطلاعات و وجود تفاوت‌های ساختاری جفت انسان و نشخوارکنندگان می‌باشد. در این خصوص، بعضی محققان معتقد بودند که ساختار حفت در گاآسانان synepitheliochorial بوده و هیچ ارتباط مستقیمی بین جنین و گردش خون مادر میزبان جنین وجود ندارد و در آن مقطع زمانی این ادعاهای علمی محققان را از تلاش برای یافتن cffDNA در پلاسمای مادر نالمید کرد. با این حال، لموس و همکاران (۲۰۱۱) نه تنها حضور cffDNA را در پلاسمای مادر گاوها به طور دقیق تأیید کرد، بلکه

تجزیه و تحلیل آماری

پس از انجام مرحله مولکولی کار و تعیین باندها و تعیین جنسیت، نتایج مولکولی با نتایج که عملاً در تولد های بزرگاله ها و مشاهده جنسیت واقعی آنها حاصل شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون فیشر دو طرفه شاخص های حساسیت، ویژگی و صحت آزمون در دامنه اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شد.

نتایج و بحث

كمیت و کیفیت cffDNA استخراجی

در خصوص نتایج کمیت و کیفیت، میانگین مشاهدات در خصوص غلظت DNA استخراج شده $75 \pm 20\text{ ng}$ تعیین شد. شکل ۲ یک نمونه ژل استخراج DNA از نمونه های پلاسمای فقط ماده های استن را نشان می دهد و کیفیت هم بطور خلاصه بین $0/7 \pm 1/2$ دامنه تغییرات داشت.

الگوهای مشاهده شده آغازگر اختصاصی AMELY/AMELX

پس از حصول اطمینان از کمیت DNA مورد استخراج، نتایج مشاهده شده الگوهای الکتروفورزی ثابت کرد که جنین بزرگاله های نر دارای دو باند با اندازه های (۱۱۱bp و ۱۷۱bp) و همچنین جنین بزرگاله های ماده حاوی یک باند با اندازه های (۱۷۱bp) بود که با نتایج مقاله اصلی همخوانی داشت. شکل ۳ به روشنی نشان می دهد که چاهک ۵ و ۷ حاوی دو باند الکتروفورزی بوده و شناسایی جنسیت در خصوص این دو نمونه جنسیت نر و به سایر چاهک ها جنسیت ماده (یک باند الکتروفورزی) منتنسب می شود.

به دلیل لیوفیلیزه بودن آغازگرهای سنتز شده تحويلی شرکت پیشگام (نمایندگی ماکروژن کره جنوبی)، هنگام استفاده، آغازگرها به غلظت ۱۰۰ پیکومول در میکرولیتر رقیق می شوند.

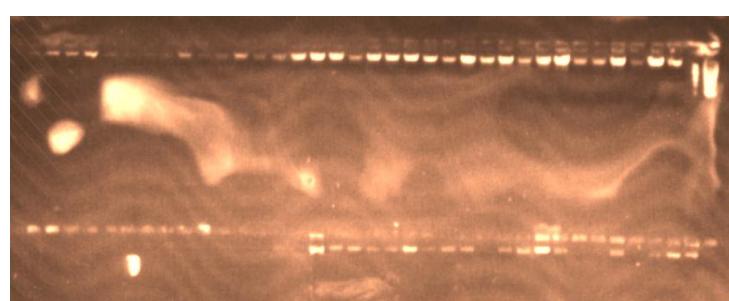
نحوه انجام واکنش زنجیره پلی مراز

برای تکثیر قطعه مورد نظر در حجم $25\text{ }\mu\text{l}$ از یک واحد آنزیم Taq Polymerase(Fermentas, Russia) ۲۰۰ میکرومول از هر $d\text{NTP}$ ۲۰۰ میکرومول 5MgCl_2 ۱۰ پیکومول مخلوط آغازگرها، ۵۰-۱۰۰ نانوگرم DNA و بافر استاندارد استفاده گردید.

واکنش PCR به تعداد ۳۴ چرخه در دستگاه ترموسایکلر (Techno Thermocycler, Germany) با برنامه حرارتی مناسب دمای ۹۴ درجه سانتی گراد جهت واسرشته شدن اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه، (دمای ۹۴ درجه سانتی گراد جهت واسرشته شدن DNA به مدت ۴۵ ثانیه دمای ۶۵ درجه سانتی گراد جهت اتصال آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی گراد جهت سنتز به مدت یک دقیقه) انجام گردید.

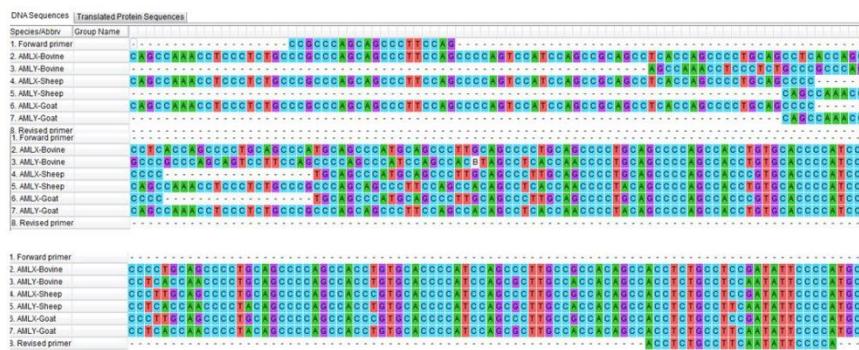
نحوه انجام الکتروفورز و عکسبرداری

جهت مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز یک و نیم درصد ۷۰-۱۰۰ ولت جریان در سیستم الکتروفورز (شرکت اختربان - ایران) به مدت ۲ ساعت استفاده شد. رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ انجام گرفت. قطعه تکثیر و برش داده شده زیر لامپ UV با طول موج ۲۳۰ نانومتر مشاهده شد و عکسبرداری توسط دستگاه Gel Documentation (مدل Biometra) صورت گرفت.

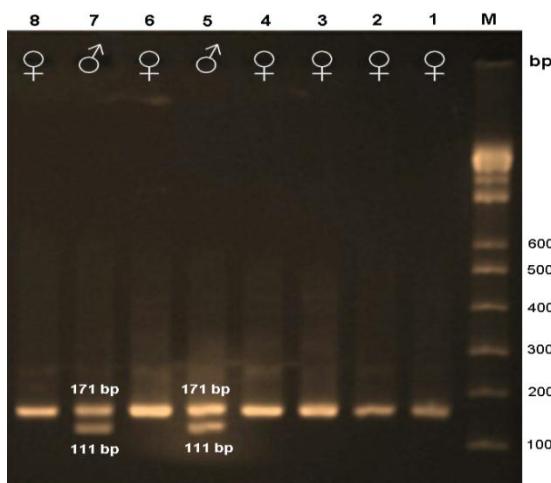


شکل ۱- کمیت و کیفیت cffDNA استخراج شده در طول هفتاهای مختلف آبستن (با افزایش مرحله ایستتی از چپ به راست، مقدار DNA نیز افزایش می یابد)

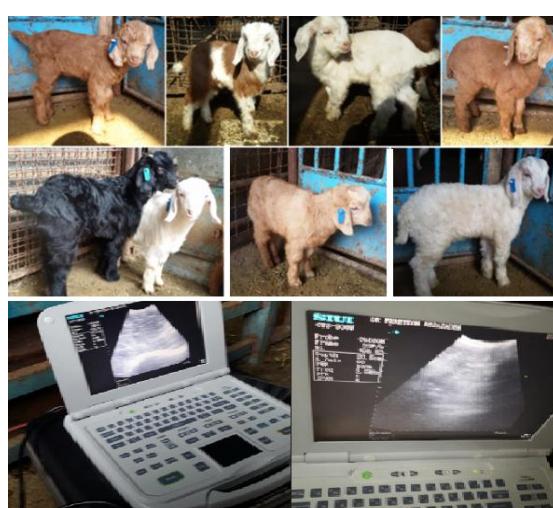
Figure 1. Quantity and quality of extracted cffDNA during different week of pregnancy
(With increasing pregnancy time DNA quantity increased)



شکل ۲- توالی نوکلئوتیدی ژن آمیلوژنین (ژن کاندیدا) در گاو، گوسفند و بز (آغازگر برای قسمتی از ژن که داخل کادر سیاه است طراحی می‌شود
Figure 2. Sequence of amelogenin gene in bovine and ovine and caprine species



شکل ۳- نتایج حاصل از PCR و مشاهده‌ی الگوهای باندی در جنین نر و ماده‌ی بزهای آبستن
Figure 3. Observation after PCR and electrophoresis pattern among male and female sex of embryo in pregnant Does



شکل ۴- انجام سونوگرافی برای تایید ابستنی موفق و همچنین مقایسه نتایج تعیین جنسیت در تولد بزغاله‌ها
Figure 4. Perform Sonography for confirmation of successful pregnancy and also comparison the results of sex determination at the birth of kids

جدول ۱- خلاصه نتایج تعیین جنسیت بر اساس PCR بعد از تولد

Table 1. Summary of sex determination results based on PCR after birth

شماره نمونه	جنسیت مبتنی بر PCR	جنسیت بعد تولد
۱	نر	نر
۲	نر	نر
۳	نر ^a	دو قلو نر ماده
۴	نر	نر
۵	ماده	ماده
۶	نر	ماده
۷	ماده	ماده
۸	ماده	ماده
۹	ماده	ماده
۱۰	ماده	نر
۱۱	نر	نر
۱۲	نر	نر
۱۳	ماده ^b	دو قلو بر ماده
۱۴	نر	نر
۱۵	نر	دو قلو بر
تعداد کل	۱۵	۱۲ نر و ۶ ماده

جدول ۲- خلاصه شاخص‌های آماری برای ارزیابی نتایج حاصل از تعیین جنسیت بر اساس PCR بعد از تولد

Table 2. Summary of statistical indices for assessment of sex determination based on PCR method after birth

شاخص‌های اندازه‌گیری	اصطلاح انگلیسی	فرمول	درصد	CI%
حساسیت	Sensitivity	$a/(a+b)$	۰/۸۳	۹۳/۴۵-۶۱/۶۶
ویزگی	Specificity	$d/(c+d)$	۰/۹۳۳	۹۹/۸۳-۶۷/۰۵
صحت	Accuracy	$(a+d)/(a+b+c+d)$	۰/۹۳۲	
میزان پیش‌بینی مثبت	Positive Predictive value	$a/(a+c)$	۰/۹۳	
میزان پیش‌بینی منفی	Negative Predictive value	$d/(b+d)$	۰/۸۷	

^{a,b}: مثبت حقیقی، ^{a,b}: منفی کاذب، ^{c,d}: منفی حقیقی

و بهره‌گیری از تکنیک PCR توانستند جنسیت جنین‌ها را بدقت بالا پیش‌بینی کنند و نتیجه‌ی حاصله نشان داد که استفاده از ژن آمیلوژنین می‌تواند به عنوان روشی سریع، ساده و با حساسیت بالا در مراحل ابتدایی تکوین جنین جهت تعیین جنسیت بزها به کار گرفته شود. بولانگر و همکاران (۳) در مطالعه‌ای که انجام دادند به این نتیجه رسیدند که از ژن FOXL2 و همچنین ژن IncRNAs ژن‌ها به طور توانم توان برای تعیین جنسیت بزهای ماده استفاده کرد، اما در رابطه با پیش‌بینی جنسیت جنین نر توسط ژن‌های مذکور هنوز جای تردید و مطالعه وجود دارد. در خصوص کارایی استفاده از cffDNA و ژن آمیلوژنین اسدپور و همکاران (۱) مشابه طراحی آزمایشات این مطالعه، در گوسفند تحقیقی را گزارش کردند و نشان دادند که این روش دارای صحت و شاخص ویزگی بالایی می‌باشد که نتایج ما هم با نتایج تحقیق انها همخوانی داشت. رضایی و همکاران (۲۳) مشابه متداول‌وزی این تحقیق را در مادیان ابستن نژاد ترکمن با ژن کاندیدای SRY انجام دادند و دقت صحت و ویزگی متوسط به بالایی را در پیش‌بینی نتایج مولکولی با تولدهای واقعی گزارش کردند. در تحقیق مشابه دیگر کدیور و همکاران (۱۴) از دی‌ان‌ای با منشا جنینی از ازاد و شناور در پلاسمای خون مادر در گوسفند استفاده کردند و به ترتیب شاخص‌های حساسیت، ویزگی و صحت را ۹۶/۸۷ و ۹۳ درصد بدست اوردند (۱۴، ۱۵، ۱۶) که تقریباً با نتایج ما همخوانی داشت. بطور کلی بررسی منابع گسترده‌ای که در خصوص تحقیقات مشابه با این روش در حیوانات اهلی انجام شد دامنه تغیرات شاخص صحت از ۶۰ الی ۱۰۰ درصد متغیر

استخراج DNA و کیفیت آن

در این تحقیق، از cffDNA شناور و آزاد در پلاسمای خون بز ابستن به عنوان ابزاری برای تعیین مولکولی جنسیت جنین استفاده شد.

در گام اول، واریانس مشاهده شده در کمیت و کیفیت DNA را می‌توان به مدت زمان نگهداری نمونه‌ها بعد از جداسازی پلاسماء، مقدار نمونه و هفت‌های ای که بز ماده ابستنی را تجربه می‌کند و به کیفیت و تازگی با فرهای استخراج و نهایتاً، به مدل سانتریفوژ و دقت کاربرد وابسته دانست. همچنین، نتایج این پژوهش به روشنی نشان داد هرچه به هفته‌های اخر ابستنی نزدیک می‌شویم و یا در داخل رحم تعداد بیشتر از یک جنین وجود داشته باشد به علت آزاد شدن بیشتر cffDNA کمیت DNA هم بیشتر در نانودرآپ خوانده می‌شود.

در گام دوم پژوهش حاضر، از پرایم‌های اختصاصی ژن آمیلوژنین برای ایجاد تمایز مولکولی بین جنین‌های با جنسیت نر و ماده استفاده شد. نتایج این بخش از مطالعه حاضر با تحقیقات مشابه پیشین همخوانی داشت. به عنوان مثال، چین و همکاران (۵) از تکنیک مولکولی PCR برای تعیین جنسیت بز بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی ژن آمیلوژنین استفاده کردند و دقت روش را ۱۰۰ درصد گزارش نمودند، ایشان از سلول‌های جنین استفاده کردند که در این روش به دلیل نمونه‌گیری از سلول‌های جنین، همواره احتمال آسیب به جنین وجود دارد.

مالیک و همکاران (۱۸) با نمونه‌گیری از سلول‌های جنینی بز در مرحله‌ی بلاستوسیست و استفاده از ژن آمیلوژنین و SRY

ژن آمیلوژنین مورد آزمون مولکولی قرار گرفت. در مجموع، وجود دو باند در جنین نر (باند ژن AMELX با اندازه‌ی bp ۱۷۱ و باند ژن AMELY با اندازه‌ی ۱۱۱bp) و یک باند در جنین ماده (باند ژن AMELX با اندازه‌ی ۱۷۱bp) را نشان داد. همچنین بزهای آبستن در اواخر دوره‌ی آبستنی غلظت DNA جنینی غلظت بالایی نسبت به دوره‌های قبلی نشان دادند. با مقایسه‌ی نتایج تعیین جنسیت مولکولی پیش از تولد جنین‌های تحت آزمایش، با نتایج عملی پس از تولد دقیق تعیین جنسیت با استفاده از ژن آمیلوژنین، حساسیت، ویژگی و صحت، ۰/۸۳، ۰/۹۳ و ۰/۹۳ به دست آمد. نتایج این مطالعه با بسیار از تحقیقات مشابه اگرچه همخوانی داشت ولی به نظر می‌رسد در بزهای ماده آبستن با جنین دوقلو بسته به جنسیت جنین‌ها با اربیبی روبرو است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله، از کارکنان محترم ایستگاه تحقیقاتی خلمت پوشان و از دانشگاه تبریز برای فراهم اوردن بودجه پژوهشی این مطالعه سپاسگزاریم. همچنین، از داوران محترم که کامنت‌های خوبی را برای ارتقا کیفیت نگارشی این گزارش علمی دادند سپاسگزاریم.

بود. از جمله توجیهات منطقی برای وجود این تفاوت‌ها می‌توان به انتخاب ژن کاندیدای متفاوت، گونه دامی و نژاد متفاوت، زمان نمونه‌گیری در طول ابستنی دام ماده، اندازه نمونه و تفاوت متد تعیین الگوی الکتروفورزی و دقت دستگاه مورد استفاده (PCR و ریل تایم PCR)، استفاده از سابرگرین یا پروپ دانست (۱۳).

از محدودیت‌های تحقیق حاضر، می‌توان به محدودیت دسترسی به تعداد بزهای آبستن در دسترس در ایستگاه دانست زیرا استفاده از نمونه مزارع با مسافت طولانی از CfDNA ازماشیگاه ژنتیکی مولکولی به علت نیم عمر پایین ممکن نبود و همچنین محدودیت در بودجه و امکانات مانع از افزایش تعداد نمونه‌ها شد.

نتیجه‌گیری کلی

آگاهی از جنسیت بزغاله‌های که هنوز متولد نشده‌اند یک محور مهم و کلیدی مدیریت تولید مثل و پرورش می‌باشد و می‌تواند در محاسبه جمعیت جایگرین و فروش مازاد گله به مدیران فارم کمک کند. اگر چه روش‌های مختلفی در این حوزه توسعه یافته است با این حال، روش‌های غیرتهاجمی می‌تواند بدون اسیب به بقاء و زندگانی جنین، با بازدهی مناسب جنسیت جنین را پیش‌بینی کند. در این پژوهش سوابسترای مطالعاتی استفاده از دی ان ای شناور ازad با منشا جنینی در پلاسمای خون بز آبستن بود که با روش مبتنی بر

منابع

- Asadpour, R., M.H. Asadi, R. Jafari Joozani, G.H. Hamidian. 2015. Ovine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA) and cervical mucus secretions. Asian Pacific Journal of Reproduction, 4(1): 65-69.
- Barták, B., Z. Nagy, S. Spisák, Z. Tulassay, M. Dank, P. Igaz and B. Molnár. 2018. *In vivo* analysis of circulating cell-free DNA release and degradation. Orvosi hetilap, 159: 223-233.
- Boulanger, L., M. Pannetier, L. Gall, A. Allais-Bonnet, M. Elzaiat and D. Le Bourhis. 2014. FOXL2 Is a female sex-determining gene in the Goat. Current Biology, 24: 404-408.
- Chen, A., Z. Xu and S. Yu. 2007. Sexing goat embryos by PCR amplification of X- and Y-chromosome specific sequence of the Amelogenin gene. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 20(11): 1689-1693.
- Chen, C.M., C.L. Hu, C.H. Wang, C.M. Hung, H.K. Wu and K.B. Choo, 1999. Gender determination in single bovine blastomeres by polymerase chain reaction amplification of sex-specific polymorphic fragments in the amelogenin gene. Molecular Reproduction and Development, 54(3): 209-214.
- Davoodian, N. and A. Kadivar. 2016. Prenatal determination of farm animal fetal sex using free fetal DNA in maternal plasma. Journal of Agriculture and Veterinary Science, 9(11): 38-45.
- De Leon, P.M.M., V.F. Campos, O.A. Dellagostin, J.C. Deschamps, F.K. Seixas and T. Collares. 2012. Equine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA). Theriogenology, 77(3): 694-698.
- Demyda-Peyras, S. 2017. Sex chromosomal abnormalities associated with equine in fertility: validation of a simple molecular screening tool in the Purebred Spanish Horse. Animal Genetics; 48: 412-417.
- De Villers, D.M. 2020. Development and validation of a qPCR assay for the non-invasive determination of fetal sex in cattle and African Buffalo. Master of Science in Biochemistry at the North- West University (M.sc Thesis).
- Fontanesi, L., E. Scotti and V. Russo. 2008. Differences of the porcine Amelogenin X and Y chromosome genes (AMELX and AMELY) and their application for sex determination in Pigs. Molecular Reproduction and Development, 75: 1662-1668.
- Gokulakrishna, P., R.R. Kumar, B.D. Sharma, S.K. Mendiratta, D. Sharma and O.P. Malav. 2013. Determination of sex origin of meat from cattle, sheep and goat using PCR based assay. Small Ruminant Research, 113: 30-33.
- Han, S.H., B.C. Yang, M.S. Ko, H.S. Oh and S.S. Lee. 2010. Length difference between Equine ZFX and ZFY genes and its application for molecular sex determination. Assisted Reproduction and Genetics, 27(12): 725-728.

13. Hrovatin, K. and T. Kunej. 2017. Genetic sex determination assays in 53 mammalian species: Literature analysis and guidelines for reporting standardization. *Ecology Evolution*, 8: 1009-1018.
14. Kadivar, A.H., J. Hassanpour and A. Dehcheshmeh. 2015. A novel approach to prenatal fetal sex diagnosis by detecting an insertion in the Y-chromosome of ovine Amelogenin gene, *Small Ruminant Research*, 123: 218-23.
15. Kadivar, A., H. Hassanpour, P. Mirshokraei, M. Azari, K. Gholamhosseini and A. Karami. 2013. Detection and quantification of cell-free fetal DNA in ovine maternal plasma; use it to predict fetal sex, *Theriogenology*, 79: 995-1000.
16. Kadivar, R., D. Tafti, H.H., Khoei, M.H. Nasirabadi, N.S. Esfandabadi and N. Cheraghi. 2016. Developing a Nested Real-Time PCR Assay for Determining Equine Fetal Sex Prenatally, *Journal of Equine Veterinary Science*, 40: 74-9.
17. Mackie, F.L., K. Hemming, S. Allen, R.K. Morris and M.D. Kilby. 2017. The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis. *Obstetricians and Gynaecologists*, 124: 32-46.
18. Malik, H.N., D.K. Singhal, A. Mukherjee, N. Bara, S. Kumar and S. Saugandhika. 2013. A single Blastomere sexing of caprine embryos by simultaneous amplification of sex Chromosome-Specific Sequence of SRY and Amelogenin genes. *Livestock Science*, 157: 351-357.
19. Mara, L., S. Pilichi, A. Sanna, C. Accardo, B. Chessa and F. Chessa. 2004. Sexing of in vitro produced ovine embryos by duplex PCR. *Molecular Reproduction and Development*, 69: 35-42.
20. Pamilo, P., S. Kelly and V.R. Harley. 1993. Evolution of the ZFX and ZFY Genes: rates and Interdependence between the genes. *Molecular Biology and Evolutions*, 10(2): 271-281.
21. Primacio, R., H. Milot and C. Jacob. 2017. Early fetal sex determination using cell-free DNA in micro-volume of maternal plasma. *Journal of Pregnancy and Child Health*, 4: 6-15.
22. Pushpakumara, A., C. Thitaram and J.L. Brown. 2019. Elephants. *Veterinary reproduction & obstetrics* (Eds Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W.) 724-744.
23. Rezaei Tonekaboni, F., R. Narenjisani, H. Staji and M. Ahmadi-hamedani. 2020. Comparison of cell-free fetal DNA plasma content used to sex determination between three trimesters of pregnancy in Torkaman pregnant mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, 95: 103273-103279.
24. Ristanic, M., L. Stanisic, M. Maletic, U. Glavinic, V. Draskovic, N. Aleksic and Z. Stanimirovic. 2019. Bovine fetal sex determination - Different DNA extraction and amplification approaches for efficient livestock production. *Reproduction Domestic Animal*, 53: 947-954.
25. Saberivand, A. and S. Ahsan. 2016. Sex determination of ovine embryos by SRY and Amelogenin (AMEL) genes using maternal circulating cell free DNA. *Animal Reproduction Science*, 9-13.
26. Samadi Shams, S., S. ZununiVahed, F. Soltanzad, V. Kafil, A. Barzegari, and S. Atashpaz. 2011. Highly effective DNA extraction method from fresh, frozen, dried and clotted blood samples. *Bioimpacts*, 1(3): 183-187.
27. Shea, B.F. 1999. Determining the sex of Bovine embryos using polymerase chain reaction results: A six-year study. *Theriogenology*, 51: 841-845.
28. Shirali, S., A. Mesbah-Namin, H. Zahiri, E. Khodadi and S.M. Mirtorabi. 2014. Non-invasive fetal sex determination using nested PCR of free fetal DNA in maternal plasma. *Academic and Applied Studies*, 4(9): 22-30.
29. Stoops, M.A., G.D. Winget, C.J. DeChant, R.L. Ball and T.L. Roth. 2018. Early fetal sexing in the rhinoceros by detection of male-specific genes in maternal serum. *Molecular Reproduction. Development*, 85: 197-204.
30. Strah, R. and T. Kunej. 2019. Molecular sexing assays in 114 mammalian species: *in silico* sequence reanalysis and a unified graphical visualization of diagnostic tests. *Ecology Evolution*, 9: 5018-5028.
31. Solaiman, S.G. 2010. Goat science and production. Wiley Blackwell publication.
32. Szczerbal, I., J. Nowacka-Woszuk, C. Kopp-Kuhlman M. Mackowski and M. Switonski. 2020. Application of droplet digital PCR in diagnosing of X monosomy in mares. *Equine Veterinary Journal*, 52(4): 627-631.

The Potential Usefulness of Free Fetal DNA for Prenatal Fetal Gender Determination in Blood Plasma of Pregnant Goat

Majid Rahimi¹, Arash Javanmard², Abbas Rafat³ and Karim Hasanpur⁴

1- Graduated M.Sc. Student, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz,
(Corresponding Author: a.javanmard@tabrizu.ac.ir)

3- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

4- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

Received: 5 Jun, 2021

Accepted: 11 September, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: To date, sex determination technique in domestic animal has economic benefits. Recently, circulating free DNA (cfDNA) highlighted as suitable candidate for non-invasive sex determination in livestock and endangered wild life animals. Based on this motivation, the objective of this report was the potential usefulness of free fetal DNA in maternal blood for prenatal fetal gender determination in pregnant goats.

Material and Methods: In this respect, a total of 21 animals, including 17 pregnant females with a gestation period of six weeks, unborn goats and 2 males (negative controls) were selected. During the running experiment, estrous synchronization was performed by intravaginal CIDR. The animals not returned to estrus was considered as an indicator of success in pregnancy. Also in the last months, ultrasound method was used to confirm pregnancy. In the next phase, cfDNA was extracted from the blood plasma of female goats using the available common experimental protocol. The primers in this experiment were designed based on AME gene located on X and Y chromosomes. The polymerase chain reaction was optimized based on available standard methods.

Results: The observation addressed existence of two fragment in the male embryo (171 bp AMELX gene band and 111 bp AMELY gene band) and one fragment in the female embryo (171 bp AMELX gene band). Here, most of findings was in line of similar previous literatures and sex determination based on AME gene in case of sensitivity, specificity and accuracy indices indicated 0.83, 0.93 and 0.93 respectively.

Conclusion: On this basis, the results opened a new horizon of the potential usefulness of free fetal DNA in maternal blood for prenatal fetal gender determination in pregnant goats.

Keywords: AMEL, cfDNA, Goat, Sex determination also in the last months, ultrasound method was used to confirm pregnancy