دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"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 حسن‌پور[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز (نویسنده مسوول: a.javanmard@tabrizu.ac.ir)
۳- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۴- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۰
صفحه: ۱۵۶ تا ۱۶۳

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: امروزه، در پرورش حیوانات اهلی از جمله بز و گوسفند، دستیابی به روشی دقیق، آسان و مقرون به صرفه، پیش‌انتخاب جنسیت جنین، دارای اهمیت اقتصادی خاصی می‌باشد. اخیراً، DNAی آزاد جنینی شناور در پلاسمای خون، بعنوان کاندیدای مناسبی برای روش تعیین جنسیت غیرتهاجمی در دام‌ها و گونه‌های حیات وحش در خطر انقراض، معرفی شده است. بدین منظور، هدف از پژوهش حاضر، تعیین جنسیت جنین بز به کمک DNAی آزاد جنینی شناور در پلاسمای خون بزهای آبستن بود.

مواد و روش‌ها: در این راستا، در مجموع، تعداد ۲۱ حیوان آزمایشی شامل ۱۷ بز ماده که دوره‌ی آبستنی بعد شش هفتگی را تجربه می‌کردند، ۲ بز غیرآبستن و ۲ بز نر (کنترل منفی) انتخاب شدند. در ادامه تحقیق، بزهای ماده با استفاده از روش سیدرگذاری در واژن، همزمان‌سازی فحلی انجام و سپس در معرض جفتگیری طبیعی قرار گرفتند. عدم بازگشت به فحلی مجدد به‌عنوان شاخص موفقیت در آبستنی تلقی شد. همچنین در ماه‌های آخر از روش سونوگرافی برای تاییدابستنی استفاده شد. متعاقباً، پس از جداسازی پلاسمای خون بز ماده، استخراج cffDNA با استفاده از دستورالعمل‌های آزمایشی متداول موجود صورت گرفت. آغازگرهای این پژوهش بر اساس ژن آمیلوژنین، مستقر در کروموزوم X و Y، طراحی شد. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از روش‌های استاندارد موجود بهینه‌سازی شد.

یافته‌ها: نتایج مولکولی حاصله، وجود دو باند در جنین نر (باند ژن AMELX با اندازه‌ی ۱۷۱bp 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 بالاتری را نسبت به دوره‌های قبلی نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با مقایسه‌ی نتایج تعیین جنسیت مولکولی پیش از تولد جنین‌های تحت آزمایش، با نتایج عملی پس از 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 بررسی‌های مدیریتی تخمین بز جایگزین در گله (سیستم پرورش داشتی) و یا کنترل فروش بزهای آبستن مازاد، یا پیش‌بینی تعداد بزهای نر در زایش آتی (سیستم پرواربندی) استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بز، تعیین جنسیت، آمیلوژنین و cffDNA

مقدمه

گونه بز اهلی، از جمله دام‌های ارزشمند چندمنظوره می‌باشد، که محصولاتی همچون شیر و گوشت با کیفیت را تولید می‌نماید (۳۱). همچنین، در بسیاری از تحقیقات زیست فناوری، تولید پروتئین های نوترکیب دارویی با ارزش در بز اهلی، ممکن شده است (۳۱). در این راستا، فناوری‌های تولید مثلی که منجر به تولید بزغاله‌هایی با جنسیت از پیش تعیین شده شود از اهمیت اقتصادی مهمی برخوردار می‌باشد (۱،۱۸). به عنوان مثال، در پرورش بزهای تجاری تیپ شیرده، ارزش ماده‌ها به علت تولید شیر و تولید بزغاله که مادران آتی در گله خواهند بود، بیشتر از جنس نرها است و برعکس، در پرورش بزهای تجاری تیپ گوشتی مانند بوئر، ارجحیت با جنس نر است (۱۸)، زیرا به علت وجود هورمون تستوسترون سریع‌تر رشد کرده و گوشت بیشتری در سیستم پرواربندی تولید می‌کنند (۳۱). کنترل جنسیت به متخصصان اصلاح نژاد این اجازه را می‌دهد که جنس با ارزش‌تر 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 ماده‌ای که به‌عنوان جایگزین گله عمل می‌کنند و به‌منظور برگشت سرمایه، به فروش می‌رسند اهمیت مدیریتی بالایی دارد، در حالیکه در سیستم داشتی، بزهای نر به جز آنهایی که استعداد ژنتیکی به‌کارگیری به‌عنوان نرهای جوان جایگزین را دارند، ارزش کمتری دارند. تصمیم‌گیری‌های خاص مدیریتی در خرید و فروش بزهای ماده ابستن با پیش آگاهی از جنسیت جنین آن، خود می‌تواند بازده تولید و سودآوری نهایی را تحت تاثیر خود قرار دهد (۱۹).

از دیگر مزایا و اهمیت پیش اگاهی از جنسیت، کنترل بعضی از بیماری‌های وابسته به جنس در دامپروی می‌باشد که با محدود کردن تولد یک جنس خاص می‌توان از تولد حیوانات با ناهنجاری‌های محتمل ژنتیکی پیشگیری کرد (۱۹).

در مبحث تعیین جنسیت جنین، همواره دو چالش عمده مطرح می‌باشد: اول، توسعه‌ی روشی که در ضمن دقیق بودن هیچ گونه آسیبی به جنین و بقای حیات آن وارد نکند. دوم، ضمن ضرورت دقیق بودن نشانگرهای DNA مورد استفاده، باید سریع و مقرون به‌صرفه باشد. روش‌های قبلی تهیه‌ی سلول‌های جنینی برای تعیین جنسیت جنین، از جمله آمنیوسنتز و نمونه‌گیری از پرزهای کوریونی، به دلیل نیاز به بیوپسی از جنین از جمله روش‌های تهاجمی محسوب می‌شدند که همواره خطرات احتمالی آسیب‌های حاد به جنین و خطر سقط را همراه داشتند (۱۴،۱۵،۱۶).

جمع‌بندی روش‌های غیرتهاجمی تعیین جنسیت جنین در دام‌های اهلی طبق مقالات پیشین عبارتند از: آنزیم‌های

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.16.3]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.156]

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 کاریوتایپ (۱۴،۱۵،۱۶)، استفاده از کاوشگرهای DNA اختصاصی کروموزوم Y و استفاده از نشانگرهای موجود در هر دو کرموزوم 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[1] شناخته می‌شوند (۱). این قطعات آزاد شناور، دارای منشاء پیدایش مختلف هستند که هنوز در خصوص 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 بردن این سلول‌ها از خود واکنش نشان می‌دهد و ماکروفاژها بقایی سلول‌های متلاشی شده را تمیز می‌کند.

طول این قطعات cffDNA تقریباً ۱۷۰ جفت باز، 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 می‌یابد (۲۱)، اما، پس از تولد نوزاد به سرعت تصفیه می‌شود. تحقیقات پیشین نشان می‌دهد که، غلظت‌های نرمال cfDNA بسیار متفاوت است و بین ۱ تا ۱۰۰۰۰۰ 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 محرک زایمان باشد یا ممکن است مسوول تغییرات هورمونی و اندوکرینولوژی باشد که روند یک زایمان نرمال را تحریک می‌کند (۲۱).

روند مرور منابع مرتبط (بین سال‌های۲۰۰۰-۲۰۱۱) 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 جفت در گاوسانان 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 ناامید کرد. با این حال، لموس و همکاران (۲۰۱۱) نه تنها حضور cffDNA را در پلاسمای مادر گاوها به طور دقیق تأیید کرد، بلکه 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 نسبتا 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 مینای دندان نقش دارد، که ماده ای سفید و سفت است که لایه خارجی محافظ هر دندان 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 به‌ترتیب دارای ۶ و ۴ اگزون است و تاکنون از این ژن به‌علت 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 مراحل 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 فتوپریدیسم 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) به‌عنوان 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–ایزوآمیل الکل (۲۶) برای استخراج استفاده شد. پس از استخراج DNA و قبل از انجام PCR، تعیین کیفیت و مقدار DNA استخراج‌شده (۲۴) با استفاده از مونیتورینگ الکتروفورز ژل آگارز ۸ دهم درصد و دستگاه نانودراپ صورت گرفت.

انتخاب پرایمرها

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

توالی آغازگر جلوبر:

5´ –CCGCCCAGCAGCCCTTCCAG-3´

توالی آغازگر برگشتی:

5´–ACCTCTGCCTTCAATATTCCCCA-3´

1- cffDNA

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.16.3]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.156]

به دلیل لیوفیلیزه بودن آغازگرهای سنتزشده تحویلی شرکت پیشگام (نمایندگی ماکروژن کره جنوبی)، هنگام استفاده، آغازگرها به غلظت ۱۰۰ پیکومول در میکرولیتر رقیق می‌شوند.

نحوه انجام واکنش زنجیره پلی مراز

برای تکثیر قطعه مورد نظر در حجم ۲۵Lμ از یک واحد آنزیم Taq Polymerase(Fermentas, Russia)، 200 میکرومول از هر dNTP، ۲۰۰ میکرومول $5MgCl_2$ الی ۱۰پیکومول مخلوط آغازگرها، ۱۰۰–۵۰ 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 سانتی‌گراد جهت واسرشته شدن اولیه DNA به مدت ۵دقیقه، (دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشته شدن DNA به مدت ۴۵ ثانیه دمای ۶۵ درجه سانتیگراد جهت اتصال آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت سنتز به مدت یک دقیقه) انجام گردید.

نحوه انجام الکتروفورز و عکس‌برداری

جهت مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز یک و نیم درصد و ۱۰۰–۷۰ ولت جریان در سیستم الکتروفورز (شرکت اختریان – ایران) به مدت ۲ ساعت استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید ۰/۵g/mLμ 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.

تجزیه و تحلیل آماری

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

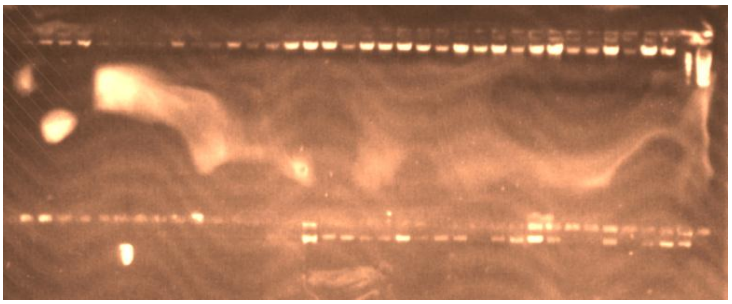
نتایج و بحث

کمیت و کیفیت cffDNA استخراجی

در خصوص نتایج کمیت و کیفیت، میانگین مشاهدات در خصوص غلظت DNA استخراج‌شده ۷۵ ±۲۰ng تعیین شد. شکل ۲ یک نمونه ژل استخراج DNA از نمونه‌های پلاسمای فقط ماده‌های ابستن را نشان می‌دهد و کیفیت هم بطور خلاصه بین ۰/۷ ±۱/۲ دامنه تغییرات داشت.

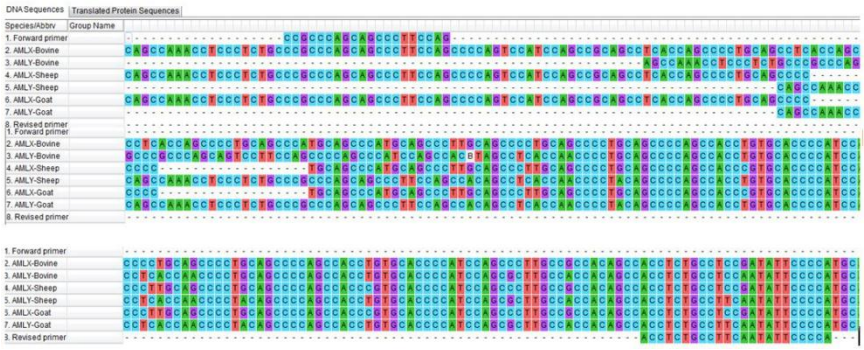
الگوهای مشاهده شده‌ی آغازگر اختصاصی AMELY/AMELX

پس از حصول اطمینان از کمیت DNA مورد استخراج، نتایج مشاهده شده الگوهای الکتروفورزی ثابت کرد که جنین بزغاله‌های نر دارای دو باند با اندازه‌های (۱۱۱bp و ۱۷۱bp) و همچنین جنین بزغله‌های ماده حاوی یک باند با اندازه‌ی (۱۷۱bp) بود که با نتایج مقاله اصلی همخوانی داشت. شکل ۳ به روشنی نشان می‌دهد 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) منتسب می‌شود.

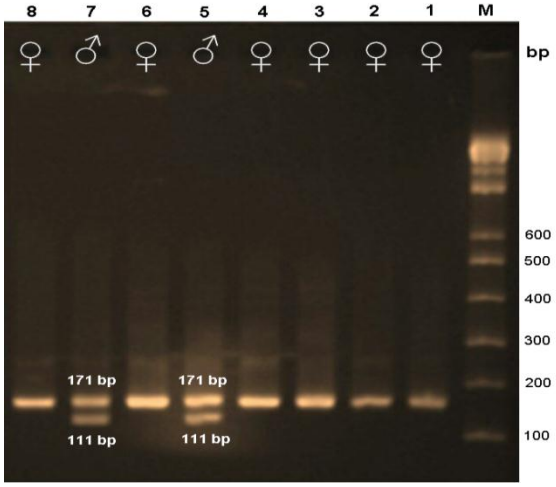


شکل ۱– کمیت و کیفیت cffDNA استخراج‌شده در طول هفته‌های مختلف آبستنی
(با افزایش مرحله‌ی آبستنی از چپ به راست، مقدار DNA نیز افزایش می‌یابد)
Figure 1. Quantity and quality of extracted cffDNA during different week of pregnancy
(With increasing pregnancy time DNA quantity increased)

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.16.3]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.156]



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

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.16.3]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.156]

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]	دوقلو نر ماده
۴	نر	نر
۵	ماده	ماده
۶	نر	نر
۷	ماده	ماده
۸	ماده	ماده
۹	ماده	ماده
۱۰	ماده	نر
۱۱	نر	نر
۱۲	نر	نر
۱۳	ماده[b]	دو قلو نر ماده
۱۴	نر	نر
۱۵	نر	دوقلو نر
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
ویژگی	Specificity	d(c+d)	۰/۹۳۳	۹۹/۸۳-۶۸/۰۵
صحت	Accuracy	(a+d)/(a+b+c+d)	۰/۹۳۲	
میزان پیش بینی مثبت	Positive Predictive value	a/(a+c)	۰/۹۳	
میزان پیش بینی منفی	Negative Predictive value	d/(b+d)	۰/۸۷	

a: مثبت حقیقی، b: منفی کاذب، c: مثبت کادب، d: منفی حقیقی

استخراج DNA و کیفیت آن

در این تحقیق، از cffDNA شناور و آزاد در پلاسمای خون بز ابستن به‌عنوان 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 پلاسما، مقدار نمونه و هفته‌ای که بز ماده ابستنی را تجربه می‌کند و به کیفیت و تازگی بافرهای 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 نانودراپ خوانده می‌شود.

در گام دوم پژوهش حاضر، از پرایمرهای 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، چیین 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 کرده بودند 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 و بهره‌گیری از تکنیک PCR توانستند جنسیت جنین‌ها را با دقت بالا پیش‌بینی کنند و نتیجه‌ی حاصله نشان داد که استفاده از ژن آمیلوژنین می‌تواند به‌عنوان 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 و یا از هر دوی این ژن‌ها به‌طور توأم می‌توان 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 ویژگی بالایی می‌باشد که نتایج ما هم با نتایج تحقیق انها همخوانی داشت. رضایی و همکاران (۲۳) مشابه متدولوژی این تحقیق را در مادیان ابستن نژاد ترکمن با ژن کاندیدای SRY انجام دادند و دقت صحت و ویژگی متوسط به بالایی را در پیش بینی نتایج مولکولی با تولدهای واقعی گزارش کردند. در تحقیق مشابه دیگر کدیور و همکاران (۱۴) از دی ان ای با منشا جنینی ازاد و شناور در پلاسمای خون مادر در گوسفند استفاده کردند و به ترتیب شاخص‌های حساسیت، ویژگی و صحت را ۸۷، ۹۶ و ۹۳ درصد بدست اوردند (۱۴،۱۵،۱۶) که تقریبا با نتایج ما همخوانی داشت. بطور کلی بررسی منابع گسترده ای که در خصوص تحقیقات مشابه با این روش در حیوانات اهلی انجام شد دامنه تغییرات شاخص صحت از ۶۰ الی ۱۰۰ درصد متغیر

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.16.3]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.156]

بود. از جمله توجیهات منطقی برای وجود این تفاوت‌ها را 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 پروب 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 ازمایشگاه ژنتیکی مولکولی به علت نیم عمر پایین CfDNA 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 جایگزین و فروش مازاد گله به مدیران فارم کمک کند. اگر چه روش‌های مختلفی در این حوزه توسعه یافته است با این‌حال، روش‌های غیرتهاجمی می‌تواند بدون اسیب به بقاء و زنده‌مانی جنین، با بازدهی مناسب جنسیت جنین را پیش‌بینی کند. در این پژوهش سوبسترای مطالعاتی استفاده از دی ان ای شناور ازاد با منشا جنینی در پلاسمای خون بز آبستن بود که با روش مبتنی بر 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 bp۱۱۱) و یک باند در جنین ماده (باند ژن AMELX با اندازه‌ی bp۱۷۱) 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 دقت 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 ابستن با جنین دوقلو بسته به جنسیت جنین‌ها با اریبی روبرو است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله، از کارکنان محترم ایستگاه تحقیقاتی خلعت 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.

منابع

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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).
10. 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.
11. 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.
12. 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.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.16.3]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.156]

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 bi-variate 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 monosomyin mares. Equine Veterinary Journal, 52(4): 627-631.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.16.3]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.156]

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

Majid Rahimi[1], Arash Javanmard[2], Abbas Rafat[3] and Karim Hasanpur[4]

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, cffDNA 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 pervious 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

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.16.3]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.156]