



"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 رفت^۳ و کریم حسن پور^۴

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز (نویسنده مسؤول: 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 بزه‌های آبستن بود.

مواد و روش‌ها: در این راستا، در مجموع، تعداد ۲۱ حیوان آزمایشی شامل ۱۷ بز ماده که دوره‌ی آبستنی بعد شش هفته‌گی را تجربه می‌کردند، ۲ بز غیرآبستن و ۲ بز نر (کنترل منفی) انتخاب شدند. در ادامه تحقیق، بزه‌های 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 تاییدآبستنی 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 مرز 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 بزه‌های 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، ۰/۹۳، 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 بزه‌های آبستن مازاد، یا پیش‌بینی تعداد بزه‌های نر در زایش آتی (سیستم پروراندی) 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 پروتئین‌های نو ترکیب 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 بزه‌های 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 بزه‌های 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 پروراندی 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 بزه‌های شیرده، اطلاع از تعداد بزه‌های ماده‌ای که به‌عنوان جایگزین گله عمل می‌کنند و به‌منظور برگشت سرمایه، به فروش می‌رسند اهمیت مدیریتی بالایی دارد، در حالیکه در سیستم داشتی، بزه‌های نر

به جز آنهایی که استعداد ژنتیکی به‌کارگیری به‌عنوان نرهای جوان جایگزین را دارند، ارزش کمتری دارند. تصمیم‌گیری‌های خاص مدیریتی در خرید و فروش بزه‌های ماده آبستن 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 آگاهی 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 آمیونوسنتز 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

همزمان جنسیت جنین های متولد نشده را به درستی تعیین کرد و متعاقب این یافته ارزشمند تکنیک تعیین جنسیت مبتنی بر cfDNA 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 کروموزوم های 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 می دهد (۱۴،۱۵). این ژن به صورت دو کپی بر روی هر دو کروموزوم جنسی X و Y مستقر می باشد. ژن آمیلوژنین X و Y به ترتیب دارای ۶ و ۴ اگزون است و تاکنون از این ژن به علت الگوی الکتروفورزی متفاوتی که در جنس نر و ماده ایجاد می کند برای تعیین جنسیت دام ها به وفور استفاده کرده اند (۱۶). هدف از پژوهش حاضر تعیین جنسیت جنین بز، با کمک DNA جنینی آزاد شناور در پلاسمای خون بز آبدست با استفاده از تکنیک PCR بود.

مواد و روش ها

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 حیوان ها و اخذ نمونه خون کامل و جدا سازی پلاسما

در این تحقیق، با توجه به تقویم تولیدمثلی بزهای اهلی و فتوپریدسم فصلی در مجموع ۲۱ بز شامل: ۱۵ رأس بز ماده ای آبدست با دوره ای آبدستی بعد ۶ هفتگی، ۲ رأس بز نر و همچنین ۴ بز ماده ای غیرآبدست (شاهد) به عنوان نمونه های کاندید برای کار مولکولی انتخاب و خونگیری به عمل آمد. جداسازی پلاسما از نمونه ها با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۱۰ هزار و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

استخراج cfDNA و تعیین کمیت و کیفیت آن

برای انجام این مرحله، از دستورالعمل آزمایشگاهی کلروفرم-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 مونیتورینگ الکتروفورز ژل آگارز ۸ دهم درصد و دستگاه نانودراپ صورت گرفت.

انتخاب پرایمرها

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

توالی آغازگر جلوبر:

5'-CCGCCCAGCAGCCCTTCCAG-3'

توالی آغازگر برگشتی:

5'-ACCTCTGCCTTCAATATTCCCCA-3'

وابسته به X و روش های تشخیصی بر پایه آنتی ژن H-Y و کلیات روش های 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 می باشد (۱۳). تکنیک های مولکولی مورد استفاده در تعیین جنسیت در بیشتر گونه ها بر پایه تشخیص توالی DNA (۱۲) در ژن های کاندیدا برای تعیین جنسیت همانند SRY، آمیلوژنین یا ZFX/ZFY (۲۰) با استفاده از PCR می باشد (۳۰).

کلیه قطعات DNA موجود در جریان خون که محدود یا محصور نشده باشند، به عنوان DNA آزاد شناور ۱ شناخته می شوند (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 مکانیسم هایی همچون آپوپتوز، نکروز یا آزادسازی فعال سلول ها، نشأت می گیرد (۲۸). حدس زده می شود که انتقال سلول های جنین به خون مادر از طریق جفت منشا پیدایش cfDNA در پلاسما می باشد. در واقع این قطعات وارد شده به خون مادر سلول های بیگانه یا خارجی (Foreign) هستند (۱۷). در نتیجه، سیستم ایمنی بدن مادر با از بین بردن این سلول ها از خود واکنش نشان می دهد و ماکروفاژها بقایای سلول های متلاشی شده را تمیز می کند.

طول این قطعات cfDNA تقریباً ۱۷۰ جفت باز، می باشد. است (۱۷). ctDNA نیمه عمر تقریباً دو ساعت دارد و در بیماری غلظت cfDNA در طول آبدستی با ورود سلول های بیشتری به جریان خون مادر افزایش می یابد (۲۱)، اما، پس از تولد نوزاد به سرعت تصفیه می شود. تحقیقات پیشین نشان می دهد که، غلظت های نرمال cfDNA بسیار متفاوت است و بین ۱ تا ۱۰۰۰۰۰ قطعه در میلی لیتر پلاسما وجود دارد. با پیشرفت آبدستی با افزایش ناگهانی ۱/۶۷ برابر در دو ماه پس از شروع دوران آبدستی، افزایش تدریجی در پلاسمای مادر را مشاهده کرد. فرضیاتی تأیید 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 می کند (۲۱).

روند مرور منابع مرتبط (بین سال های ۲۰۰۰-۲۰۱۱) در این خصوص در نشخوارکنندگان، نشان می دهد (۱۴،۱۵،۱۶) که در اوایل، فرضیاتی وجود داشت که وجود cfDNA در گردش خون دام ماده که در انسان یافت می شود قابل تعمیم به نشخوارکنندگان نیست و علت آن گپ های اطلاعات و وجود تفاوت های ساختاری جفت انسان و نشخوارکنندگان می باشد. 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 cfDNA در پلاسمای مادر ناامید کرد. با این حال، لموس و همکاران (۲۰۱۱) نه تنها حضور cfDNA 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 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 استخراج شده $75 \pm 20 \text{ ng}$ تعیین شد. شکل ۲ یک نمونه ژل استخراج DNA از نمونه‌های پلاسمای فقط ماده‌های آبستن را نشان می‌دهد و کیفیت هم بطور خلاصه بین $1/2 \pm 0/7$ 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 (۱۷۱bp و ۱۱۱bp) و همچنین جنین بزغاله‌های 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 چاهک‌ها جنسیت ماده (یک باند الکتروفورزی) منتسب می‌شود.

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

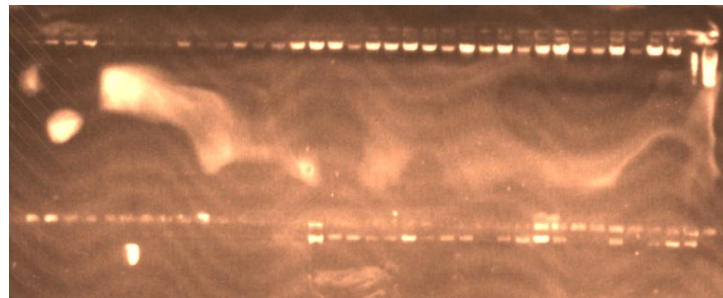
نحوه انجام واکنش زنجیره پلی مراز

برای تکثیر قطعه مورد نظر در حجم $25 \mu\text{L}$ از یک واحد آنزیم Taq Polymerase (Fermentas, Russia)، $200 \mu\text{M}$ MgCl_2 ، $200 \mu\text{M}$ dNTP، از هر $10 \mu\text{M}$ میکرومول مخلوط آغازگرها، $50-100 \text{ ng}$ DNA و بافر استاندارد استفاده گردید.

واکنش PCR به تعداد ۳۴ چرخه در دستگاه ترموسایکلر (Techno Thermocycler, Germany) با برنامه حرارتی مناسب دمای 94°C درجه سانتی‌گراد جهت واسرشته شدن اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه، (دمای 94°C درجه سانتی‌گراد جهت واسرشته شدن DNA به مدت ۴۵ ثانیه دمای 65°C درجه سانتی‌گراد جهت اتصال آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه و دمای 72°C 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 $100-70 \text{ V}$ ولت جریان در سیستم الکتروفورز (شرکت اختریان - ایران) به مدت ۲ ساعت استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید $0.5 \mu\text{g/mL}$ انجام گرفت. قطعه تکثیر و برش داده شده زیر لامپ UV با طول موج 230 nm مشاهده شد و عکس‌برداری توسط دستگاه Gel Documentation (مدل Biometra) صورت گرفت.

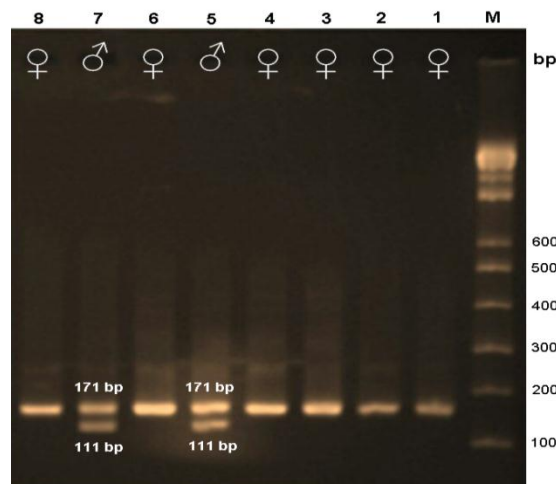


شکل ۱- کمیت و کیفیت cffDNA استخراج شده در طول هفته‌های مختلف آبستنی (با افزایش مرحله‌ی آبستنی از چپ به راست، مقدار DNA نیز افزایش می‌یابد)

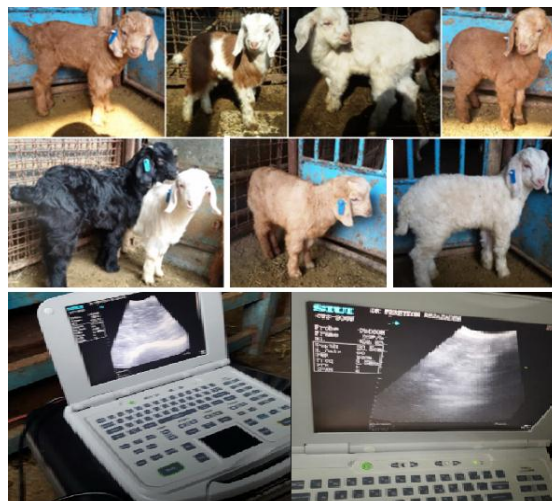
Figure 1. Quantity and quality of extracted cffDNA during different week of pregnancy (With increasing pregnancy time DNA quantity increased)

DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrev	Group Name		
1. Forward primer			
2. AMLX-Bovine			
3. AMLX-Bovine			
4. AMLX-Sheep			
5. AMLX-Sheep			
6. AMLX-Goat			
7. AMLX-Goat			
8. Revised primer			
1. Forward primer			
2. AMLX-Bovine			
3. AMLX-Bovine			
4. AMLX-Sheep			
5. AMLX-Sheep			
6. AMLX-Goat			
7. AMLX-Goat			
8. Revised primer			

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



شکل ۳- نتایج حاصل از PCR و مشاهده الگوهای بانندی 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 ایستنی 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	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 کاذب، d: منفی حقیقی

استخراج DNA و کیفیت آن

در این تحقیق، از cfDNA شناور و آزاد در پلاسمای خون بز آبستن 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 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 آخر ابستنی نزدیک می‌شویم و یا در داخل رحم تعداد بیشتر از یک جنین وجود داشته باشد به علت آزاد شدن بیشتر cfDNA 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، 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 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 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 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 cfDNA و ژن آمیلوژنین اسدیور 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 آنها همخوانی داشت. رضایی و همکاران (۲۳) مشابه متدولوژی این تحقیق را در مادیان ابستن نژاد ترکمن با ژن کاندیدی SRY انجام دادند و دقت صحت و ویژگی 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 آزاد 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 آوردند (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 تغییرات شاخص صحت از ۶۰ الی ۱۰۰ درصد متغیر

ژن آمیلوژنین مورد آزمون مولکولی قرار گرفت. در مجموع، وجود دو باند در جنین نر (باند ژن AMELX با اندازه‌ی ۱۷۱ bp و باند ژن AMELY با اندازه‌ی ۱۱۱ bp) و یک باند در جنین ماده (باند ژن AMELX با اندازه‌ی ۱۷۱ bp) 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 آبستن با جنین دوقلو بسته به جنسیت جنین‌ها با اربابی روبرو است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله، از کارکنان محترم ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان و از دانشگاه تبریز برای فراهم آوردن 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 را می‌توان به انتخاب ژن کاندیدای متفاوت، گونه دامی و نژاد متفاوت، زمان نمونه‌گیری در طول ابستنی دام ماده، اندازه نمونه و تفاوت مدت تعیین الگوی الکتروفورزی و دقت دستگاه مورد استفاده (PCR و ریل تایم PCR)، استفاده از ساب‌گرین 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 آزمایشگاه 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 آسیب به بقاء و زنده‌مانی جنین، با بازدهی مناسب جنسیت جنین را پیش‌بینی کند. در این پژوهش سوبسترای مطالعاتی استفاده از دی ان ای شناور آزاد با منشأ 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. Elzaïat 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-Woszek, 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 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