نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۳، زمستان ۱۳۹۵
ص‌ص: ۱۴۱~۱۵۰

تعیین جنسیت جنین گاو نژاد هلشتاین به کمک روش غیر تهاجمی DNA با منشأ جنینی شناور در پلاسمای گاو آبستن

- **آرش جوانمرد**
گروه مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
- **نادر اسدزاده** (نویسنده مسئول)
استادیار موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. کرج. ایران.
- **محمد حسین بناءبازی**
استادیار موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. کرج. ایران.
- **کریم حسن پور**
گروه مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
- **مختار غفاری**
گروه مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت : اسفند ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش : فروردین ۱۳۹۵

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۲۳۱۶۷۸
Email: naderasadzadeh4@gmail.com

چکیده

دستیابی به روش دقیق، آسان و اقتصادی پیش‌انتخاب جنسیت جنین در صنعت گاو شیرده دارای اهمیت خاصی می‌باشد. اخیراً DNA با منشأ جنینی شناور در پلاسما و سرم مادر آبستن، سوبسترای خوبی برای تعیین جنسیت جنین در اوایل دوره آبستنی پیشنهاد شده‌است. بدین منظور، تعداد ۱۶ گاو هلشتاین با دوره آبستنی بعداز هشت هفتگی، ٤ گاو هلشتاین غیرآبستن و دو گاو نر(کنترل منفی) انتخاب و پلاسمای آن‌ها برای استخراج ccfDNA تفکیک گردید. آغازگرهای این مطالعه بر اساس ژن DEAD box protein مستقر در هر دو کروموزوم X و Y طراحی و سنتز گردید. واکنش زنجیره پلی‌مراز با استفاده از روش‌های استاندارد موجود بهینه‌سازی شد. نتایج الگوهای الکتروفورزی محصولات حاصل از تکثیر بر روی ژل متافور آگارز شش درصد، وجود دو باند در جنین نر و یک باند در جنین ماده را نشان داد. ردیابی جنسیت جنین‌های تحت آزمایش پس از تولد، مطابقت نتایج مولکولی با جنسیت گوساله‌ها پیش از تولد را تأیید کرد. شاید بتوان از این روش در بررسی‌های مدیریتی تخمین تلیسه جایگزین در گله و یا کنترل فروش گاوهای هلشتاین آبستن مازاد استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تعیین جنسیت، گاو هلشتاین، ژن DEAD Box Protein.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 113 pp: 141-150

Sex determination in Holstein fetus using a non-invasive method of Cell-free fetal DNA (cffDNA) in plasma collected from pregnant cows

Arash Javanmard[1], Nader Asadzadeh[*2], Mohammad Hossein banabazi[2], Karim Hasanpur[3] and Mokhtar Ghaffari[4]
2*:Member of Scientific Board at Animal Science Research Institute of Iran
1: Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2: Member of Scientific Board at Animal Science Research Institute of Iran
3: Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
4: Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran

Received: March 2016 **Accepted: April 2016**

Discovery of accurate, easy and economic embryo sex determination in the dairy cattle industry assumed highly particular importance. cffDNA is novel potential material to determine the sex of the fetus in early gestation period has not imposed negative effect on embryo health. In this regard, in overall, 16 Holstein cows experiencing eight weeks of gestation and 4 non-pregnant Holstein cows, two bulls (negative control) were chosen as candidates for this present experiment and subsequently that plasma was separated to extract ccfDNA. Qiagene commercial kit was used to extract. DEAD box protein gene-based primers for this study based on both chromosomes X and Y and past articles were selected and were synthesized reported. Polymerase reaction and the required conditions were optimized using proposed standard. The results of electrophoresis PCR patterns male fetus's two bands and one band of female fetuses showed. Monitoring of birth of each gender embryos under the test after the birth of calves showed complete match the molecular results re-confirmed.

Key words: Sex determination, Holstein cows, DEAD Box Protein gene

مقدمه

دستیابی به روش دقیق، آسان و اقتصادی پیش انتخاب جنسیت در صنعت گاو شیرده دارای اهمیت خاصی می‌باشد و مدت‌هاست که از افق‌های تحقیقاتی متخصصان اصلاح‌نژاد به شمار می‌رود. (Bredbacka و همکاران، ۱۹۹۴). هر چند ظهور فناوری‌هایی نظیر تلقیح مصنوعی، انتقال جنین و اسپرم تعیین جنسیت شده تا حدودی دستیابی به این هدف را ممکن ساخته است اما در مقیاس بزرگ و از منظر تجاری شاید استفاده از اسپرم تعیین جنسیت شده مقرون به صرفه و عملی نباشد (Shea و همکاران، ۱۹۹۹). انتظار می‌رود پیشرفت آتی در تکنیک‌های تفکیک اسپرم و تعیین جنسیت جنین به جزئی ثابت از صنعت تلقیح مصنوعی و انتقال جنین تبدیل شوند.

دلیل عمده تعیین جنسیت این است که اغلب یک جنس ارزش بیشتری از جنس دیگر دارد. برای مثال در پرورش گاو هلشتاین، ارزش تجاری ماده‌ها به علت تولید شیر و تولید گوساله که مادران آتی در گله خواهند بود، بیشتر از نرها است و برعکس در پرورش گاو گوشتی ارجحیت با جنس حیوان نر است، زیرا سریع‌تر رشد نموده و گوشت بیشتری تولید می‌کنند (Sullivan و همکاران، ۱۹۹۳).کنترل جنسیت به متخصصان اصلاح نژاد اجازه می‌دهد جنس با ارزش‌تر را بیشتر از جنس دیگر تولید نمایند (Shea و همکاران، ۱۹۹۹). در صنعت گاو شیرده، تلیسه‌ها به عنوان جایگزین گله عمل می‌نمایند و به منظور برگشت سرمایه به فروش می‌رسند در حالی‌که گوساله‌های نر به جز آن‌هایی که استعداد به-کارگیری به عنوان نرهای جوان را دارند، ارزش کمی دارند. با دستیابی به فناوری تعیین جنسیت گوساله‌ها می‌توان عناصر کلیدی سهیم در معادله تغییر ژنتیکی را به طور مستقیم تغییر داد و در نتیجه منجر به افزایش سرعت پیشرفت ژنتیکی در صفات اقتصادی گردید (Thibier و همکاران، ۱۹۹۵).

به هر حال در حال حاضر، جداسازی اسپرم‌های حامل کروموزوم

X و حامل کروموزوم Y و تلقیح اسپرم تفکیک شده از طریق تلقیح مصنوعی، همچنان روش ایده‌آل تعیین جنسیت می‌باشد که سعی در تثبیت جنسیت گوساله آتی قبل از تلقیح مصنوعی دارد (Georg و همکاران، ۲۰۰۲). بنابازی (۱۳۸۳)، روش‌های مختلف تعیین جنسیت گونه‌های دامی را با تأکید بر استفاده از کاوشگرهای DNA اختصاصی کروموزوم Y مرور نموده‌است. در گذشته روش‌های تعیین جنسیت جنین بسته به این‌که به بیوپسی از جنین نیاز باشد یا نه، به ترتیب به دو گروه تهاجمی و غیر تهاجمی تقسیم می‌شدند. معیارهایی که در تکنیک‌های تعیین جنسیت بایستی مد نظر قرار گیرند، عبارتند از: درصد جنین‌هایی که می‌توان به طور دقیق تعیین جنسیت نمود و تأثیری که ممکن است روش تعیین جنسیت بر ماندگاری جنین بگذارد (Wildeman و همکاران، ۱۹۹۴). بنابراین مشکل اصلی در تعیین جنسیت مؤثر جنین‌ها، ضرورت رسیدن به روشی است که هم دقیق باشد و هم بعد از انتقال جنین‌ها نرخ آبستنی قابل قبولی داشته باشد. روش‌های غیر تهاجمی قبلی تعیین جنسیت جنین عبارتند از آنزیم‌های وابسته به کروموزوم X و روش‌های تشخیصی بر پایه آنتی‌ژن H-Y. روش‌های تهاجمی که به بیوپسی جنین نیاز دارند عبارتند از، آنالیز سیتوژنتیک و تهیه کاریوتایپ (Kitiyananta و همکاران، ۲۰۰۰)، استفاده از کاوشگرهای DNA اختصاصی کروموزوم Y و استفاده از نشانگرهای موجود در هر دو کرموزوم X و Y می‌باشد.

جمع بندی مطالعات پیشین و نتایج گزارش‌های موجود نشان می‌دهد که در تعیین جنسیت جنین با دو چالش عمده روبرو هستیم. اول؛ توسعه روشی که در ضمن دقیق بودن هیچ‌گونه آسیبی به جنین و بقای آن وارد نکند. دوم؛ ضمن دقیق بودن نشانگرهای DNA مورد استفاده، باید سریع و مقرون به صرفه باشند.

تکنیک‌های مولکولی مورد استفاده در تعیین جنسیت در بیشتر گونه‌ها، بر پایه تشخیص توالی DNA در ژن‌های کاندیدا برای تعیین جنسیت همانندSRY، آملوژنین یا ZFX/ZFY با استفاده از PCR می‌باشد. آملوژنین در تعیین جنسیت انسان و گاو و ZFX/ZFY برای انسان، گاو، گوسفند، بز (Aasen وMedrano، ۱۹۹۰) و اسب (جوانمرد و همکاران، ۱۳۸۸)، استفاده شده‌است. چندشکلی‌های نوکلئوتیدی موجود در ژن آملوژنین مکان‌یابی شده بر روی کروموزوم‌های X/Y به تکثیر محصولات ژنی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز منجر می‌گردد که در طول قطعه باهم تفاوت دارند (Ennis وGallagher، ۱۹۹۴؛ Chen و همکاران، ۱۹۹۹؛ Fontanesi و همکاران، ۲۰۰۸). در سیستم ژنیZFX/ZFY، تفاوت در جنسیت نر و ماده مربوط به محل‌های پالیندرومیک شناسایی شده توسط آنزیم‌های برشی خاصی است که در یکی از دو جنس نر و ماده حضور و عدم حضور سایت برشی منجر به شناسایی جنسیت در روی ژل می‌گردد. همچنین نقش ژن ZFY در جلوگیری از اختلالات احتمالی در طی فرایند اسپرماتوژنز بررسی گردیده است (Kitiyananta و همکاران، ۲۰۰۰). کونور و همکاران (۲۰۰۳) و برخی از محققان به بررسی امکان تعیین جنسیت در پستانداران با استفاده از ژن‌های SRY و SOX9 پرداختند. طبق گزارش‌ها، سه تا شش درصد از کل DNA آزاد موجود در پلاسمای زنان باردار مربوط به جنین است (Knower و همکاران، ۲۰۰۳). در واقع شناسایی DNA جنین از اوایل دوران بارداری (از حدود هفته ششم بارداری) امکان‌پذیر بوده و به تدریج مقدار آن در پلاسمای مادر افزایش می‌یابد و با وقوع زایمان به سرعت از جریان خون مادر حذف می‌شود. تعیین، انتخاب و تشخیص جنسیت به کمک آزمایش قابل بررسی است. به همین دلیل استفاده از DNAآزاد جنینی در پلاسمای مادر می‌تواند به عنوان یک روش غیرتهاجمی و بدون احتمال هرگونه خطر برای جنین و مادر در هفته‌های اول بارداری جهت تعیین جنسیت جنین و همچنین تشخیص بیماری‌های ژنتیکی قبل از تولد به کار گرفته شود.

بعدها ccfDNA [1] به عنوان بیومارکر جدید برای شناسایی بیماری‌های جنین پیش از تولد معرفی گردید (Lo و همکاران، ۲۰۰۵). ccfDNA در واقع مربوط به سلول‌های با منشأ جنینی است که در خون مادر آبستن به‌صورت شناور هستند (Lichtenstein و همکاران، ۲۰۰۱). فرض بر این گرفته شده

[1] -Circulating cell free DNA

که ccfDNA مربوط به سلول‌های آپاپتوز شده هستند و با پروتئین‌های هیستونی در ارتباط هستند (Lichtenstein و همکاران، ۲۰۰۱؛ Rumore و همکاران، ۱۹۹۰). مقدار ccfDNA بعد از هفته هفتم دوره آبستنی پستانداران در خون مادر آبستن افزایش می یابد (Rumore و Steinman، ۱۹۹۰؛ Senese و همکاران، ۱۹۹۹). وجود ccfDNA، فرصت استثنایی برای توسعه روش‌های تشخیص جنسیت و یا تشخیص آبستنی مبتنی بر روش‌های غیرتهاجمی را برای محققان فراهم می‌سازد و در زمینه پزشکی انسانی امکان تشخیص اختلالات و ناهنجاری‌های ژنتیکی پیش از تولد را امکان پذیر می‌سازد (Shea، ۱۹۹۹؛ Sullivan و همکاران، ۱۹۹۳). همراه کردن ccfDNA با تکنیک توالی‌یابی نسل جدید، نویدبخش دستیابی به بسیاری از مشکلات پیشین تشخیص بیماری‌ها و اختلالات مادرزادی می‌باشد.

مزیت ژن‌های کاندیدای تعیین جنسیت همچون آمیلوزنین و ZFX و DEAD box protein به ژن‌های مانند SRY این است که ژن‌های مذکور در روی هر دو کروموزوم جنسی مستقر و مکان‌یابی شده‌اند. در نتیجه در تشخیص جنسیت با دقت بالاتری همواره اعتبارسنجی روش را بالا می برند (Pamilo و همکاران، ۱۹۹۳).

با توجه به برخی کاستی‌های روش‌های پیشین تعیین جنسیت جنین، هدف از تحقیق حاضر بررسی امکان تعیین جنسیت جنین گاو هلشتاین بعد از هفته هشتم آبستنی با استفاده از ccfDNA و DEAD box می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پس از بررسی تقویم تولیدمثلی و تشخیص دقیق حیوان آبستن و غیر آبستن ، تعداد ۱۶ گاو هلشتاین آبستن (مرحله آبستنی بعد از هشت هفتگی تا ۳۰ هفتگی) و ۴ گاو هلشتاین غیر آبستن و دو گاو نر(کنترل منفی) انتخاب و ۵ میلی‌لیتر خون از ورید وداج با استفاده از لوله‌های خلاءدار حاوی ماده ضد انعقاد اخذ و به آزمایشگاه منتقل گردید. بلافاصله پلاسمای آن‌ها برای استخراج ccfDNA جدا شد (۱۶۰۰۰×g به مدت ده دقیقه). کیفیت و کمیت نمونه‌ها با استفاده از دو روش نانودراپ و ژل مونیتورینگ در روی ژل آگارز هشت دهم درصد تعیین شد. برای استخراج ccfDNA ازکیت تجاری کیاژن استفاده شد. آغازگرهای این مطالعه بر اساس ژنDEAD box protein مستقر در هر دو کروموزوم X و Y و گزارش مقالات پیشین انتخاب و سنتز گردیدند. این ژن دارای هفده اگزون و ۶۶۰ اسیدآمینه در ساختار پروتئینی خود می-باشد. واکنش زنجیره پلی‌مراز و شرایط و برنامه مورد نیاز با استفاده از روش‌های استاندارد موجود بهینه سازی شد.

جدول ۱ – جزئیات و مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

اندازه باندی مورد انتظار در دو جنس	توالی آغازگرها	نام اختصاری آغازگرها	کد شناسایی در بانک ژن	منبع مورد استفاده
M:208,184bp F:184bp	AGGAAGCCAGGAAAGTAA	DDX3-1F	NW_003104743.1	DEAD box protein gene Liu و همکاران (۲۰۰۵)
	CATCCA CGTTCTAAGTCTC	DDX3-1R		
M:171,147bp F:147bp	TGAGGAAGCCA GGAAAGTAAGTAT	DDX3-2F	NW_003104786.1	
	GCACCACCRTAWA CCACACAA	DDX3-2R		

برای تکثیر قطعه مورد نظر در حجم ۲۵ میکرولیتر از یک واحد آنزیم Taq Polymerase (Fermentas, Russia)، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۲۰۰ میکرومول $MgCl_2$، ۵ الی ۱۰ پیکومول 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 ۵ دقیقه، دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشته شدن DNA به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۵۳ و ۵۶ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال آغازگرها (به ترتیب جفت پرایمر اول و دوم) به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت سنتز به مدت یک دقیقه انجام گردید. جهت مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز یک‌ونیم درصد و ۱۰۰-۷۰ ولت جریان در سیستم الکتروفورز (شرکت اختریان – ایران) به مدت ۲ ساعت استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم‌بروماید ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر 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

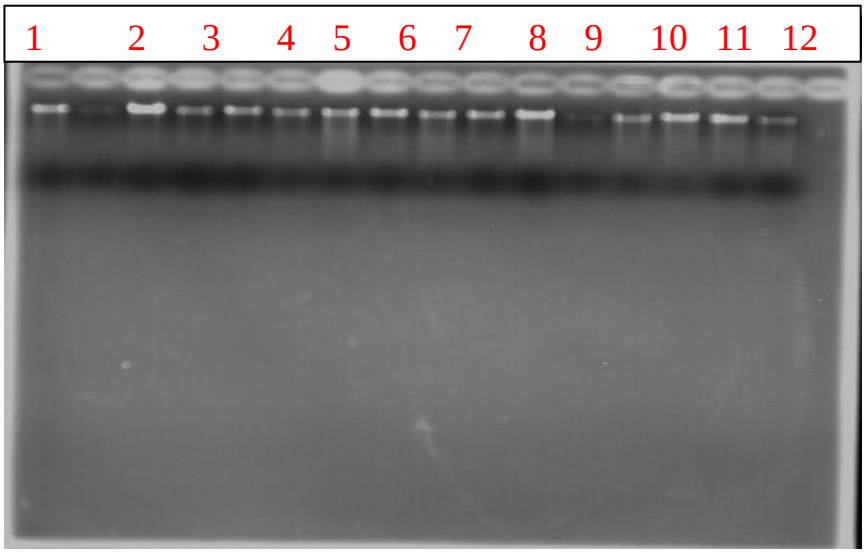
برای آنالیز آماری و مقایسه نسبت جنسیت جنین‌های مورد انتظار و پیش‌بینی شده از آزمون کای‌اسکور استفاده شد.

نتایج و بحث

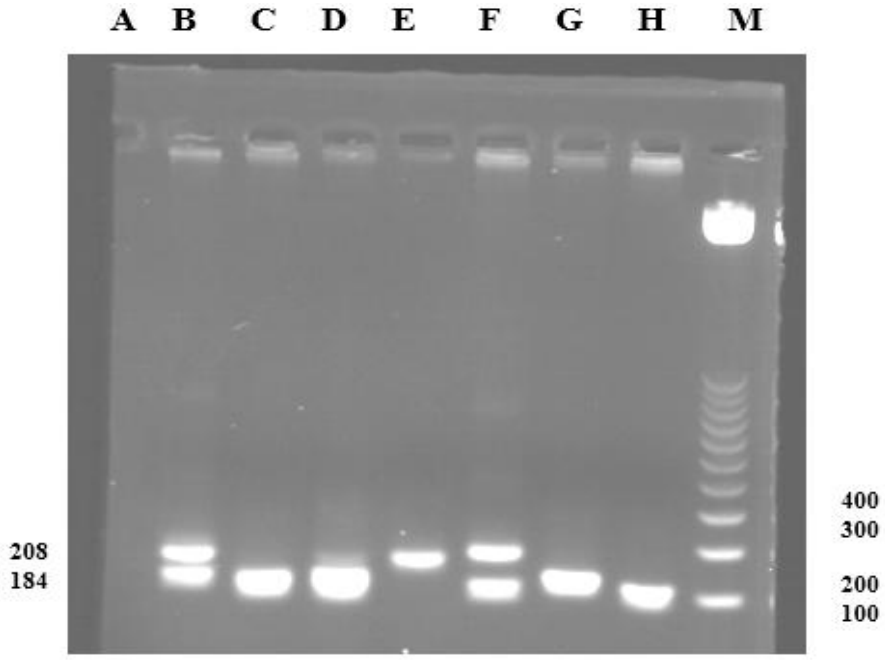
در مزارع پرورش گاو شیرده، دلیل عمده کنترل جنسیت، مسائل اقتصادی است ولی امکان اطلاع از جنس جنین پیش از موعد قطعاً بر تصمیمات مربوط به انتخاب و تلاقی تأثیر خواهد گذاشت. اگر مادران آبستن در این سیستم‌ها تنها دختر تولید کنند به طور قابل توجهی میزان کیلوگرم تولید شیر در نسل‌های آتی افزایش خواهد یافت و امکان جایگزینی تلیسه‌های جوان میسر خواهد بود و به منظور برگشت سرمایه به فروش می‌رسند در حالی‌که گوساله‌های نر به جز آن‌هایی که استعداد به‌کارگیری به عنوان نرهای جوان را دارند، بی ارزش بوده یا ارزش کمی دارند. در مطالعه حاضرکیفیت و کمیت ccfDNA استخراج شده در هفته‌های مختلف آبستنی نتایج جالبی را نشان داد، بدین صورت که با نزدیک شدن به هفته‌های آخر آبستنی، مقدار سلول‌های شناور آزاد با منشأ جنینی در خون مادر آبستن بیشتر شده و در نتیجه غلظت بالایی از ccfDNA را نشان داد.

```
DDX3X 09977 GATCTATGAGGAAGCCAGGAAAGTAAGTATGC--CTTTCAGGTTATTGGC 10024
            ||||||||||||||||||||||||||||||||  |||.|.|.|.||||.|
DDX3Y 07419 GATCTATGAGGAAGCCAGGAAAGTAAGTATGCGACTTGCTGATAATTGAC 07468

DDX3X 10025 CTTCTCATTGATTCTGATGAAGTGTA----TTATGACCATGTAAAAATCT 10070
            .||.|.||.||||||     ||||||    ||||||||||.|||
DDX3Y 07469 TTTTTAATAGATTCT-----AGTGTAATTTTTATGACCATCTAA------ 07507

DDX3X 10071 TGGTCTTAAATTTAATAAATTTTTCTTTGCTTATAGTTTTCATACCGATC 10120
                  ||||||             .||||||.||||||||||||||.||
DDX3Y 07508 ------TAAATT-------------ATTGCTTGTAGTTTTCATACCGGTC 07538

DDX3X 10121 TAGAGTTCGTCCTTGTGTGGTTTATGGTGGTGCTGATATTGGTCAGCAAA 10170
            |.||||||.||||||||||||.||.||||||||||||||||||||.||||
DDX3Y 07539 TCGAGTTCTTCCTTGTGTGGTATACGGTGGTGCTGATATTGGTCAACAAA 07588

DDX3X 10171 TTCGAGACTTAGAACGTGGATGCCATTTATTAGTTGCGACTCCAGGACGT 10220
            ||||||||||||||||||||||.||.||.||.||.||.||||||||||||.
DDX3Y 07589 TTCGAGACTTAGAACGTGGATGTCACTTGTTGGTGGCCACTCCAGGACGC 07638
```

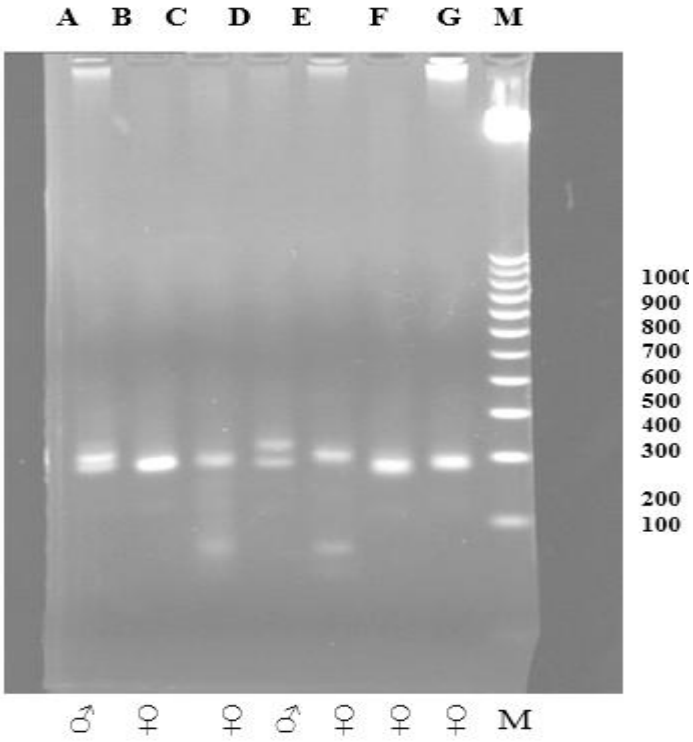
Alignment of the DDX3X and DDX3Y gene sequences (GenBank accession No. NW003104743.1 and NW003104786.1). The primers DDX3-1F and DDX3-1R are indicated by bold letters. Dashes indicate gaps in alignment.



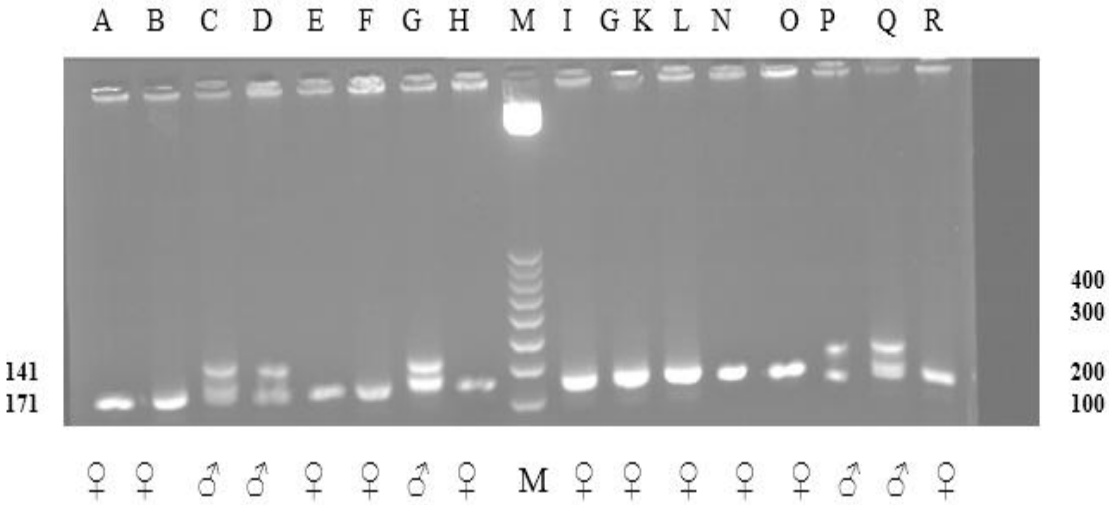
شکل ۱- کیفیت و کمیت ccfDNA استخراج شده در مرحله آبستنی ۸ تا ۳۰ هفتگی، در گاو نر و گاو غیر آبستن به عنوان کنترل ccfDNA دیده نشد



شکل ۲- تکثیر پرایمرهای DDX3-1R -DDX3-1F و تولید الگوهای باندی متفاوت در جنین‌های هلشتاین نر و ماده (گاو ماده غیر آبستن محصولی را در روی ژل نشان نداد). در یک قسمت کروموزوم Y که در آن ژن‌های هولاندریک قرار دارد همتای ژنی در کروموزم X انتخاب شده لذا در فرد نر دو باند را انتظار داریم.



شکل ۳- بهینه سازی و تأئید مجدد روش مورد استفاده برای بررسی دقت و تکرار پذیری روش



شکل ۴- تکثیر پرایمرهای DDX3-2R -DDX3-2F و تولید الگوهای باندی متفاوت در جنین‌های هلشتاین نر و ماده

ارزیابی روش‌های تعیین جنسیت

در مطالعه حاضر، نتایج الگوهای الکتروفورزی محصولات حاصل از تکثیر، وجود دو باند در جنین نر و یک باند در جنین ماده را نشان داد. مونیتورینگ و ردیابی جنسیت جنین‌های تحت آزمایش پس از تولد، مطابقت نتایج مولکولی با جنسیت گوساله‌ها قبل از

تولد را دوباره تأئید کرد. از مزایای روش پیشنهادی الکتروفورز یک مرحله‌ای، عدم نیاز به آنزیم برشی یا ژن کنترل، ژل اکریل‌آمید، دقت و سرعت آن می‌باشد. شاید بتوان از این روش در بررسی‌های مدیریتی تخمین تلیسه جایگزین در گله و یا کنترل فروش گاوهای هلشتاین آبستن مازاد استفاده کرد. تعیین جنسیت را می‌توان برای تحت تأثیر قرار دادن عناصر کلیدی معادله تغییر ژنتیکی و افزایش سرعت پیشرفت ژنتیکی مورد استفاده قرار داد.

نتایج مطالعه حاضر با نتایج تحقیقات مشابه در گاو و گوسفند هم خوانی داشتند. صابری‌وند و همکاران (۲۰۱۵)، از دو روش مختلف مولکولی و از روی DNA شناور در پلاسمای گوسفند نژاد قزل ایرانی تعیین جنسیت را انجام دادند. داودی و همکاران (۲۰۱۲)، از روش مذکور برای تعیین جنسیت جنین گاو استفاده کردند. تفاوت تحقیق حاضر با مطالعات دیگر در نوع ژن کاندیدا برای بررسی تعیین جنسیت و پرایمرهای مورد استفاده بود.در جدول ۲ به طور اجمالی روش تعیین جنسیت با استفاده از ccfDNA با روش‌های دیگر تعیین جنسیت مقایسه شده‌اند.

جدول۲ - نرخ تعیین جنسیت و نرخ آبستنی پس از آن در ۵ روش تعیین جنسیت

گونه	موفقیت آبستنی(٪)	بازده تعیین جنسیت(٪)	تعداد جنین	مرحله رشد جنین	روش
موش	۳۵	۶۴	۵۱۶	مورولاتا	آنزیم های وابسته به X
موش	۷۱	۹۳	۲۱	بلاستوسیست ۸ سلولی	
گاو	خیلی کم	۸۵	۱۰۰۰	۸ تا ۱۶ سلولی	آنتی ژن H-Y
گاو	گزارش نشده	۸۷	۲۵۸	۴ سلولی تا بلاستوسیست	
گاو	۸۷	۸۶	۸	مورولا	
گوسفند	۶۳	۸۵	۶۸	گزارش نشده	
خوک	گزارش نشده	۸۱	۵۹	۸ سلولی تا بلاستوسیست	
گاو	۳۳	۶۸	زیاد	بلاستوسیست تفریخ نشده	آنالیز سیتوژنتیک
گاو	گزارش نشده	۶۳	گزارش نشده	مورولا	
گاو	۶۰	۶۰	۸	مورولای- تازه	
گاو	۲۳	۶۰	۲۸	دونیم -منجمد	
انسان	n/a	۱۰۰	تا ۷۷	سه ماه اول	کاوشگرهای اختصاصی Y
گاو	۴۴	۷۶	۱۰۱	مورولا	
گاو	گزارش نشده	۵۷	۱۵۰	مورولا	
گاو	گزارش نشده	۸۵	۷	بلاستوسیست تفریخ نشده	
گوسفند	صد درصد	۹۶	۲۰	ماه هشتم آبستنی	استفاده از ccfDNA
گاو	صد درصد	۱۰۰	۱۵	ماه پانزدهم آبستنی	
گوسفند	صد درصد	۱۰۰	۳۰	ماه سی ام آبستنی	
گاو	صد درصد	۱۰۰	۱۸	ماه سی و هشتم	

موضوع استفاده از DNA آزاد موجود در گردش خون مادری با منشاء جنینی (cffDNA)، از سال ۱۹۹۷ مطرح شده است. منشاء cffDNA از سلول‌های تروفوبلاست جفت بوده و به دنبال پوسته‌ریزی سلول‌های جفتی وارد گردش خون مادر می‌شود و ۱۳-۳ درصد کل cell free maternal DNA مادر را تشکیل می‌دهد. در سه ماهه سوم بارداری این نسبت ۱۰ الی ۲۰٪ افزایش می‌یابد. cffDNA در هفته ۷ بارداری در خون مادر ظاهر شده و بلافاصله بعد از تولد از گردش خون وی پاک می‌شود، طوری که دو ساعت پس از زایمان دیگر در خون مادر قابل تشخیص نمی‌باشد. از نظر اندازه، این مولکول خیلی کوچک‌تر از cell free maternal DNA بوده و اندازه‌ای در حدود ۳۰۰bp-۲۰۰ دارد و این خاصیت اساس بسیاری از تکنیک‌های افتراق cffDNA از cell free maternal DNA را تشکیل می‌دهد. بر خلاف دانش پیشینیان مبنی بر این‌که جفت یک سد نفوذ ناپذیر بین مادر و جنین ایجاد می‌کند، مطالعات فراوانی نشان داده‌اند که هم سلول‌های جنینی و هم DNA مخصوص جنینی می‌توانند به راحتی درون گردش خون مادر جریان یابند. با کشف DNA آزاد جنینی درون جریان خون مادری (CffDNA)، امکان تشخیص بسیاری از بیماری‌ها به طریق غیر تهاجمی (NIPD) به‌وجود آمد. به دلیل گرانی و خطر روش‌های تهاجمی همانند آمنیوسنتز و CVS برای مادر و جنین، روش‌های غیر تهاجمی جهت غربالگری و تشخیص قبل از تولد، در حال گسترش می‌باشد (Rumore و Steinman، ۱۹۹۰؛ Senese و همکاران، ۱۹۹۹). در بیشتر مطالعات صورت گرفته برای تعیین جنسیت جنین با استفاده از CffDNA، از روش PCR به منظور تشخیص ژن‌های روی کروموزوم Y اغلب از ژن SRY (اگر چه گاهی ژن‌های DSY ، DYZ و DAZ) استفاده گردیده است. (Ennis وGallagher، ۱۹۹۴؛ Chen و همکاران، ۱۹۹۹؛ Fontanesi و همکاران، ۲۰۰۸).

با توجه به نتایج تحقیق حاضر و مرور منابع مطالعات پیشین، روش مورد استفاده در این مطالعه، متعاقب واکنش زنجیره پلی‌مراز، به هضم آنزیمی نیاز ندارد و به جای اکریلامید، در ژل آگارز قابل رویت می باشد. لذا علاوه بر صرفه جویی در زمان و صرفه اقتصادی، ایمنی بالا این روش برای کاربر می باشد، چرا که به اکریلامید و نیترات نقره که جزء مواد سرطان‌زا می‌باشد احتیاج ندارد. مزیت دیگر این تکنیک، دقت و صحت نتایج بالا و تکرارپذیری صددرصدی می‌باشد که به نوعی به اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده بر می‌گردد. استفاده از روش ccfDNA با توجه به این‌که کاملاً غیر تهاجمی می‌باشد هیچ‌گونه آسیبی به جنین وارد نمی‌نماید و در نتیجه این روش قابلیت تجاری سازی را دارد.

پیشنهادات

با توجه به نبود روشی که به تنهایی بتواند معیارهای یک روش تعیین جنسیت جنین تجاری را برآورده سازد، نتایج حاصل از مطالعات جاری حکایت از این دارد که ممکن است با انجام تحقیقات بیشتر در آینده‌ای نزدیک، یک روش تعیین جنسیت جنین تجاری برای صنعت دامپروری در دسترس قرار گیرد.

منابع

بناءبازی، م.ح. (۱۳۸۳). تعیین جنسیت گونه‌های دامی با استفاده از کاوشگرهای DNA اختصاصی کروموزوم Y و برتری های آن بر سایر روش‌ها. نشریه جهان دامپروری (دو ماهانه تخصصی علوم دامی و بیوتکنولوژی)، سال اول. شماره پنجم، صفحات ۷-۱۲.

جوانمرد، آ.، اسدزاده، ن.، بناءبازی، م.ح. و غفاری لاله، و. (۱۳۸۸). تأئید جنسیت با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در ژن ZFX-ZFY اسب نژاد عرب. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۵. شماره ۲. صفحات ۲۱-۱۷.

Aasen, E. and Medrano, J.F. (1990). Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex: Identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology*. 8: 1279–1281.

Davoudi, A., Tarang, A., Aleyasin, S. A., Salehi., A. (2012). Evaluation of two DNA extraction methods from maternal plasma for using in non-invasive bovine fetus gender determination. *Iranian Journal of Reprodive Medicine*. Vol. 10. No. 6. pp: 523-530

Bredbacka, P., Kankaanpaa, A. and Peippo, J. (1995). PCR-sexing of bovine embryos: A simplified protocol. *Theriogenology*. 44: 167-176.

Chen ,CM., Wang ,Hu ,CL, Hung , CH., Wu HK, CM,.Choo, KB, et al. (1999) Gender determination in single bovine blastomeres by polymerase chain reaction amplification of sex-specific polymorphic fragments in the amelogenin gene. *Mole Reprod Dev*; 54(3): 209-214.

Ennis, S. and Gallagher, T.F. (1994). A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Animal Genetics*. 25: 425–427.

Fontanesi ,L., Scotti, E. and Russo, V. (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

Georg, E.; Seidel. J. and Duane, L. (2002). Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction*. 124: 733-743.

Kitiyananta, Y., Saikhun, J., Siriaroonrat, B. and Parvasuthipaisit, K. (2000). Sex determination by polymerase chain reaction and karyotyping of bovine embryos at first cleavage in vitro. *Science Asia*. 26: 9-13.

Knower, K.C., Kellya, S., and Harleya, V.R. (2003). Turning on the male – SRY, SOX9 and sex determination in mammals. *Cytogenet Genome Res*.101:185–198

Lichtenstein, A.V., Melkonyan, H.S., Tomei, L.D. and Umansky, S, R. (2001). Circulating nucleic acids and apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 945:239–49.

Liu, W.S., Wang, A., Yang, Y., Chang, T.C., Landrito, E. and Yasue, H. (2009). Molecular characterization of the DDX3Y gene and its homologs in cattle. *Cytogenetic and Genome Research*; 126:318–328.

Lo, Y.M. (2005). Recent advances in fetal nucleic acids in maternal plasma. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*; 53:293–6.

Pamilo, P., Kelly, S. and Harley, V.R. (1993). Evolution of the ZFX and ZFY genes: Rates and interdependence between the genes. *Molecular Biology and Evolution*. 10(2): 271-281.

Rumore, P.M. and Steinman, C.R. (1990). Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *Journal of Clinical Investigation*; 86:69–74.

Saberivand,A., Ahsan. S.(2015). Sex determination of ovine embryos by SRY andamelogenin (AMEL) genes using maternal circulating cell free DNA. *Animal Reproduction Science.* Volume 164, Pages 9–13

Senese, C., Penedo, M.C.T., Shiue, Y.L., Bowling, A.T. and Millon, L.V. (1999). A Hae III PCR-RFLP in the ZFX / ZFY gene of horses. *Animal Genetics*; 30(5): 390-391.

Shea, B.F. (1999). Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year study. *Theriogenology*. 51: 841-845.

Sullivan, K.M.; Mannucci, A.; Kimpton, C.P. and Gill, P. (1993). A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X–Y homologous gene amelogenin. *Bio Techniques*. 15: 636–641.

Thibier, M. and Nibart, M. (1995). The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology*. 43: 71-80.

Wildeman, A. (1994). Molecular approaches for embryo sexing. *Proceeding of the 5th World congress on genetic applied livestock production. University of guelph, Canada*. 21: 98-1.