

تشخیص جنسیت قبل از تولد با انجام PCR و با استفاده از سکانس‌های اختصاصی کروموزم Y در پلاسمای مادر

نفیسه پاکروان، قاسم رستگار لاری و فریدون علاء
درمانگاه جامع کودکان هموفیل آزمایشگاه ژنتیک

چکیده

نتایج یک پژوهش نشان می‌دهد که DNA جنین در پلاسمای مادر وجود دارد. به دنبال آن تلاش‌هایی صورت گرفت تا روشی جهت تشخیص جنسیت جنین بدون دستکاری جنین^۱ ایجاد شود. در این پژوهش ما DNA را از پلاسمای ۲۵ زن باردار، ۳ مرد و ۳ زن غیر باردار استخراج کردیم. سپس با انجام PCR سکانس‌های اختصاصی کروموزم Y را شناسایی، و نتیجه را با استفاده از اکتروفورز روی ژل اکریل آمید ۸٪ بررسی کردیم. نتایج با جنسیت نوزاد پس از تولد مطابقت داده شد. مجموعه نتایج نشان داد که سکانس‌های اختصاصی کروموزم Y در ۱۱ زن باردار با جنین پسر و سه مرد شناسایی شدند و در دو نمونه از زنان باردار با جنین پسر در سه ماهه اول و دوم بارداری سکانس‌های اختصاصی کروموزم Y شناسایی نشد. همچنین در یک زن باردار با جنین دختر این سکانس‌ها شناسایی شدند. در بقیه زنان باردار با جنین دختر و زنان غیر باردار سکانس‌های اختصاصی کروموزم Y شناسایی نشدند. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که تشخیص جنسیت قبل از تولد با PCR معمولی پس از ۱۹ هفته قابل انجام است ولی تشخیص در ۱۲ هفته اول بارداری نیاز به استفاده از متدهای دقیق‌تری چون PCR کمی^۲ دارد.

مقدمه

در چندین پژوهش تشخیص قبل از تولد با استفاده از سلول‌های جنینی، مانند گلبول‌های قرمز هسته‌دار (NRBCs) استفاده شده است. از این روش که در واقع بدون دستکاری جنین انجام می‌گیرد و «روش غیرتهاجمی» نامیده می‌شود، به عنوان روش معمولی آزمایشگاهی استفاده نمی‌شود؛ زیرا با وجود بررسی‌ها و تلاش‌های بسیاری که انجام گرفته، مشکلاتی در جداسازی سلول‌های جنینی از گردش خون مادر وجود دارد که هنوز برطرف نشده است. همین امر باعث شده است که حساسیت تشخیص جنسیت با این روش % ۵۵-۸۶ باشد [۱]، [۲]، [۳]. در نتیجه تعیین جنسیت جنین با این روش اطمینان بخش نیست.

در یک پژوهش با انجام PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی کروموزم Y وجود DNA جنین در سرم و پلاسمای زنان باردار نشان داده شد [۴]. این پژوهندگان هم چنین نشان دادند که غلظت DNA جنینی در

۱-noninvasive

۲-Quantitative PCR

خون مادر به مراتب بیش از میزان NRBCs جنینی در خون مادر است. به علاوه در بررسی‌های بعدی نشان داده شد که میزان DNA جنینی در پلاسمای مادر برابر $3/4\%$ و $6/2\%$ به ترتیب در سه ماهه اول و سوم بارداری است [۵].

هدف از این آزمایش‌ها یافتن پاسخ این پرسش بود که: «آیا امکان تشخیص جنسیت جنین قبل از تولد با استفاده از DNA جنینی موجود در خون زنان بارداری که ناقل بیماری‌های وابسته به کروموزوم X هستند وجود دارد؟»

در این پژوهش ما پلاسمای زنان باردار را مورد آزمایش قرار دادیم. با انجام PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی کروموزوم Y وجود DNA جنینی را شناسایی کردیم.

مواد و روش‌ها

۱- آماده سازی نمونه‌ها

نمونه‌های خون محیطی از ۲۵ زن باردار که از ۱۱ تا ۳۹ هفته بارداری بودند گرفته شد [جدول ۱]. زنان باردار به طور تصادفی انتخاب شدند و با رضایت آنان نمونه‌گیری به عمل آمد. هم چنین نمونه‌های خون محیطی از سه مرد و سه زن غیر باردار گرفته شد و به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد. در هر مورد ۵ میلی‌لیتر خون محیطی در لوله‌های حاوی EDTA گرفته شد. نمونه‌های خون محیطی در ۳۰۰۰g سانتریفوژ، پلاسما از سلول‌های خون جدا و به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتر پلی پروپیلن منتقل شد. نمونه‌های پلاسما جدا شده مجدداً در ۳۰۰۰g سانتریفوژ و قسمت رویی به تیوب‌های پلی پروپیلن تمیز منتقل شدند و تا زمان استخراج DNA، نمونه‌ها در 20°C - نگهداری شدند.

۲- استخراج DNA از نمونه‌های پلاسما جدا شده

DNA از نمونه‌های پلاسما با استفاده از کیت کیاژن^۱ پروتوکل «خون و مایعات بدن» با اصلاحات جزئی انجام گرفت. ما DNA را از $400\mu\text{l}$ هر نمونه پلاسما استخراج کردیم. حجم محلول DNA استخراج شده معمولاً $50\mu\text{l}$ بود.

۳. PCR

PCR با استفاده از پرایمرهای DY14 (سکانس اختصاصی کروموزوم Y) برای شناسایی DNA جنینی از پلاسمای مادر انجام شد. جفت پرایمر Y17/Y18 در این بررسی استفاده شد [۶]. PCR در حجم کلی $25\mu\text{l}$ که حاوی DNA استخراج شده، $200\mu\text{M}$ از dNTP، 20Pmol از هر پرایمر (Y17/Y18)، $1\times$ بافر

^۱-QIAamp DNA blood Mini method Qiaagen

Taq پلی مرز، (حاوی ۱/۵ Mm کلرید منیزیم)، U ۰/۵ از Taq پلی مرز^۱.

جدول ۱. لیست زنان باردار استفاده شده در آزمایش‌های تشخیص جنسیت با استفاده از پلا سما. هر نمونه که در دو بار آزمایش یک بار باند ۱۹۸bp را تولید می‌کرد تحت عنوان Male/Female و یا Female/Male در ستون نتیجه آزمایش ذکر شده است.

ردیف	سن بارداری (هفته)	نتیجه آزمایش	نتیجه زایمان
۱	۱۱	Male/Female	پسر
۲	۱۲	Female/Male	دختر
۳	۱۳	Female	دختر
۴	۱۵	Male	پسر
۵	۱۶	Female	دختر
۶	۱۹	Male/Female	پسر
۷	۱۹	Femle	دختر
۸	۲۰	Female	دختر
۹	۲۲	Female	دختر
۱۰	۲۴	Female	دختر
۱۱	۲۵	Male	پسر
۱۲	۲۵	Male	پسر
۱۳	۲۵	Female	دختر
۱۴	۲۸	Male	پسر
۱۵	۳۱	Female	دختر
۱۶	۳۲	Male	پسر
۱۷	۳۴	Male	پسر
۱۸	۳۶	Male	پسر
۱۹	۳۶	Male	پسر
۲۰	۳۶	Male	پسر
۲۱	۳۶	Male	پسر
۲۲	۳۷	Male	پسر
۲۳	۳۷	Male	پسر
۲۴	۳۹	Male	پسر
۲۵	۳۹	Male	پسر

^۱-Roche Biochemicals

برنامه PCR عبارت بود از: دناتوراسیون در 94°C به مدت ۵ دقیقه، سپس 40 سیکل شامل 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، 57°C به مدت ۱ دقیقه و 72°C به مدت ۲ دقیقه و انکوباسیون نهایی در 72°C به مدت ۷ دقیقه، محصول PCR روی ژل اکریل آمید ۸٪ اکتروفوند شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برمید با استفاده از لامپ UV بررسی شد.

هر نمونه که در دو بار آزمایش باند 198bp را تولید می‌کرد به عنوان جنین پسر در نظر گرفته می‌شد. نتیجه محصول PCR با جنسیت بچه پس از زیمان منطبق شد. نمونه‌های DNA که باند مورد نظر را تولید نمی‌کردند با استفاده از پرایمرهای فاکتور VIII، PCR شدند تا وجود DNA در آن‌ها نشان داده شود.

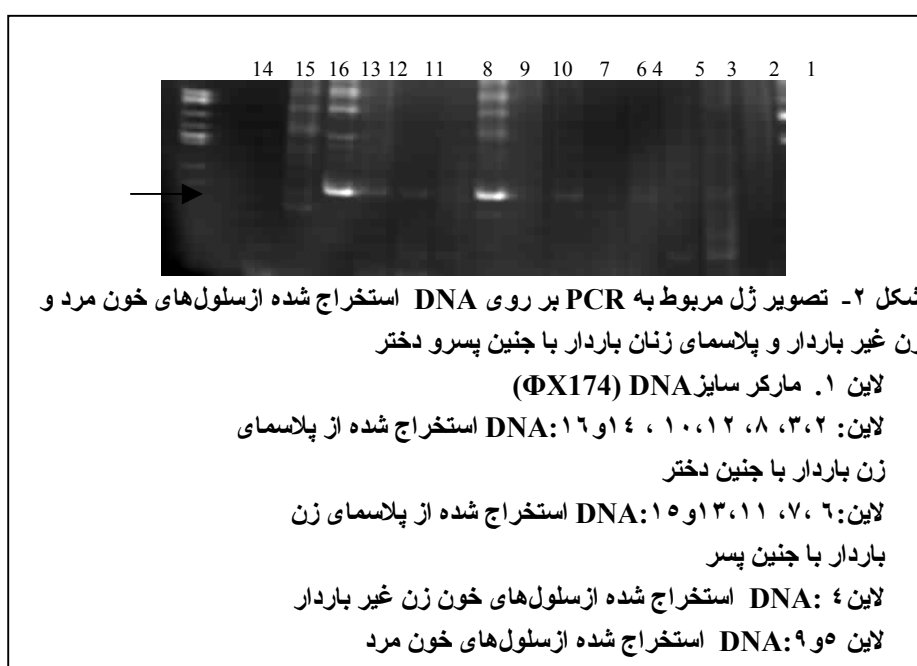
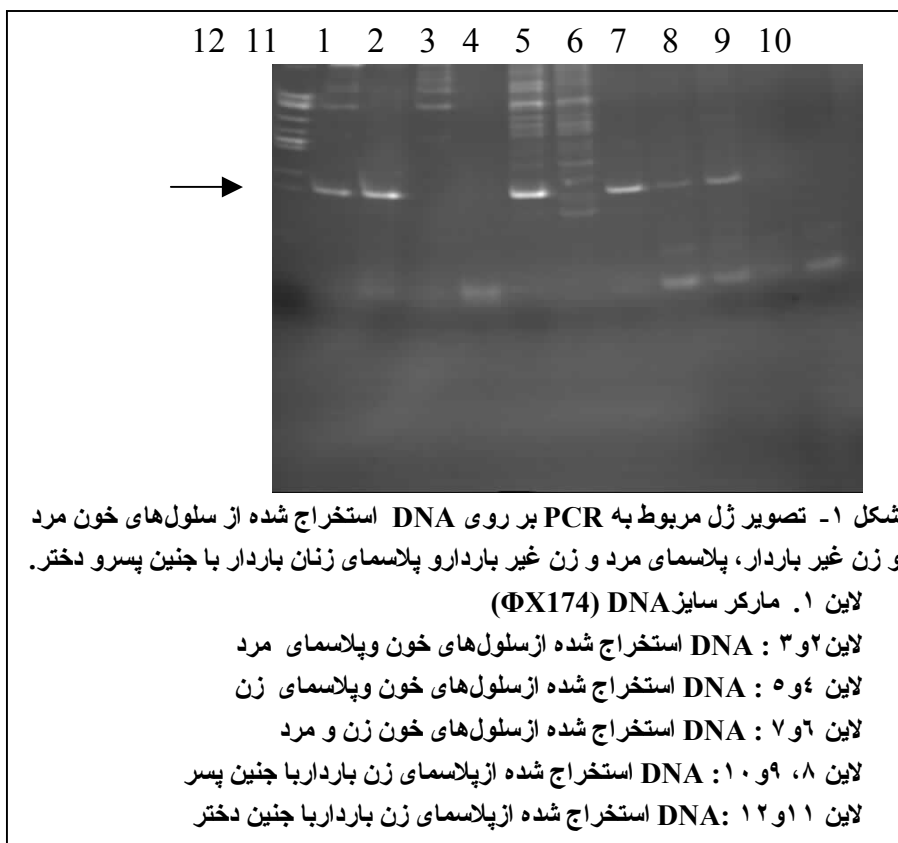
نتایج

بر اساس بررسی‌های صورت گرفته میزان DNA جنینی در پلاسمای مادر $3/4\%$ و $6/2\%$ به ترتیب در سه ماهه اول و سوم بارداری است. بر همین اساس در ابتدای کار قبل از نمونه‌گیری از زنان باردار، ما ابتدا پلاسمای زن باردار را به وسیله رقیق کردن پلاسمای مرد در پلاسمای زن به میزان 5% شبیه‌سازی و DNA آن را استخراج کردیم. به دنبال آن PCR انجام شد و باند 198bp در این آزمایش دیده شد (تصویر ژل نشان داده شده است).

پس از آزمایش‌های اولیه، PCR با استفاده از پرایمرهای DYS14 روی DNA استخراج شده از سلول‌های خون و یا پلاسمای مرد و زن غیر باردار و DNA استخراج شده از پلاسمای زنان باردار در سه ماهه آخر بارداری و با سونوگرافی پسر انجام شد؛ زیرا میزان DNA در سه ماهه آخر بارداری حداکثر و به علاوه زمان زیمان نزدیک بود (شکل ۱). در این آزمایش باند مورد نظر 198bp در مورد DNA استخراج شده از سلول‌های خون مرد، پلاسمای مرد و پلاسمای زنان باردار با جنین پسر دیده شد. البته زیر باندهایی در مورد DNA استخراج شده از سلول‌های خون مرد دیده شد که احتمالاً به علت غلظت زیاد DNA و اتصال غیراختصاصی پرایمرها است. در آزمایش انجام شده بر روی DNA استخراج شده از سلول‌های خون زن غیر باردار و پلاسمای زنان باردار با جنین دختر باند 198bp دیده نشد.

در آزمایش‌های بعدی DNA استخراج شده از زنان باردار PCR شد و در دو مورد از زنان باردار با جنین پسر در هفته ۱۱ و ۱۹ بارداری در دو بار آزمایش، تنها یک بار باند 198bp مشاهده شد. بقیه نمونه‌های DNA استخراج شده از زنان باردار با جنین پسر باند 198bp را تولید کردند اگر چه همان طور که در شکل ۲ دیده می‌شود باند 198bp در مورد زنان باردار با جنین پسر با سن بارداری کمتر از ۱۹ هفته ضعیف‌تر دیده می‌شود. در آزمایش‌های انجام شده بر روی زنان باردار با جنین دختر در یک مورد زن باردار با جنین دختر در هفته ۱۲

بارداری در دو بار آزمایش، یک بار باند ۱۹۸bp مشاهده شد. بقیه نمونه‌های DNA استخراج شده از زنان باردار با جنین دختر باند ۱۹۸bp را تولید نکردند.



بحث و نتیجه‌گیری

از روش‌های تشخیص جنسیت جنین که تا سال ۱۹۹۷ در زنان باردار ناقل بیماری‌های وابسته به X بکار می‌رفتند میتوان به این موارد اشاره کرد:

سونوگرافی [۷]، آمینوسنتز [۸]، نمونه‌گیری از جفت^۱ [۹] و گرفتن نمونه خون جنین [۱۰]. سونوگرافی در هفته‌های اول بارداری مشکل است و به علاوه دقت لازم را ندارد. آمینوسنتز به طور معمول پس از حدود هفته ۱۵ بارداری قابل انجام است در حالی که نیاز اصلی تشخیص جنسیت جنین در اوائل بارداری است و به علاوه برای مادر و جنین مشکل ساز است [۱۱]. در روش CVS اگر چه تشخیص در اوائل بارداری را ممکن می‌سازد ولی برای مادر و جنین خطرناک و مشکل ساز است [۱۲]. همچنین اگر آزمایش‌ها درست انجام نگیرد، نمونه‌گیری مجدد مایع آمینیوتیک و CVS مشکل است. به علاوه اگر جنین دختر باشد به این آزمایش‌های پرهزینه نیازی نیست. نمونه‌گیری از خون جنین معمولاً پس از ۱۸ هفته‌گی انجام می‌شود. این تکنیک اگر چه آسان‌تر، سریع‌تر و کم‌خطرتر از آمینوسنتز و CVS است، ولی نیاز به تشخیص جنسیت جنین تا قبل از حدود ۱۲ هفته را بر طرف نمی‌کند. به علاوه مشکلات و خطراتی (اگر چه کمتر) برای مادر و جنین در بر دارد [۷]. بررسی‌هایی انجام گرفت که نشان داد مقادیری از سلول‌های جنین، مانند گلبول‌های قرمز هسته‌دار (NRBCs)، در خون مادر وجود دارد [۶]، [۱۳]، [۱۴]. آزمایش‌های انجام شده برای تشخیص جنسیت جنین با استفاده از خون کامل زنان باردار با انجام PCR تو در تو (Nested PCR) با استفاده از سکانس‌های اختصاصی کروموزوم Y حساسیتی برابر ۸۳ تا ۹۴٪ را نشان داده است [۱۵]، [۱۶]، [۱۷] در حالی که حساسیت روش^۲ برابر ۵۵ تا ۸۶٪ بوده است [۱]، [۲]، [۳]. این روش‌ها بسیار زمان‌گیر و از نظر کاربردی مشکل هستند و در عین حال حساسیت آن‌ها برای کاربرد کلینیکی کم است.

نتایج یک بررسی در سال ۱۹۹۷ نشان داد که DNA جنین در پلاسمای مادر وجود دارد [۴] و از آن به نام سلول آزاد DNA^۳ یاد شد. در این پژوهش ما از پلاسمای زنان باردار استفاده کردیم و حساسیت حدود ۸۸٪ را گزارش کردیم. حساسیت نسبتاً بالای شناسایی سکانس‌های اختصاصی کروموزوم Y در خون زنان باردار با استفاده از PCR معمولی دلالت بر غلظت بالای DNA جنینی در خون مادر دارد.

از طرف دیگر در نتایج ارائه شده در شکل ۲، نشان داده شد که با کاهش سن بارداری (کمتر از ۱۹ هفته)، باند ۱۹۸bp ایجاد شده با PCR قدرت کمتری دارد. در واقع PCR معمولی در تشخیص جنسیت جنین پس از ۱۹ هفته قابل اطمینان است ولی هدف اصلی تشخیص دقیق در ۱۲ هفته اول بارداری است بنا بر این نیاز است که از روش‌های دقیق‌تری چون PCR کمی^۴ استفاده شود تا با قطعیت بیشتری بتوان جنسیت جنین را تعیین کرد.

۱-Chorionic Villus Sampling

۲-fluorescence in situ hybridization

۳-Cell-free DNA

۴-Quantitative PCR

در آزمایش‌های بعدی سعی داریم تا با استفاده از Light Cycler بتوانیم « مشخصات و میزان حساسیت^۱ » را به صد درصد برسانیم.

تشکر و قدردانی

از سرکار خانم دکتر فرهادی، ریاست محترم بیمارستان خیریه الغدیر، و پرسنل محترم درمانگاه زنان و اتاق زایمان این بیمارستان، برای همکاری در زمان اجرای این پژوهش سپاسگزاریم. همچنین از دکتر دنیس Lo YM Dennis و دکتر Laura Cremonesi به خاطر مساعدت و راهنمایی در طی این پژوهش بسیار متشکریم.

منابع

1. Valerio D, Aiello R, Altieri V. Isolation of fetal erythroid cells from maternal blood based on expression of erythropoietin receptors. *Mol. Hum. Reprod.* (1997) 3:451-455.
2. Sohda S, Arinami T, Hamada H, Nakauchi H, Hamaguchi H, Kubo T. The proportion of fetal nucleated red blood cells in maternal blood: estimation by FACS analysis. *Prenat. Diagn.* (1997) 17:743-752.
3. Little MT, Langlois S, Wilson RD, Lansdorp PM. Frequency of fetal cells in sorted subpopulations of nucleated erythroid and CD34+ hematopoietic progenitor cells from maternal peripheral blood. *Blood* (1997) 89:2347-2358.
4. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* (1997) 350:485-487.
5. Lo YMD, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.* (1998) 62:768-775.
6. Lo YMD, Patel P, Sampietro M, Gillmer MDG, Fleming KA, Wainscoat JS. Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood. *Lancet* (1990) 335:1463-1464.
7. Bruno Bramati. Prenatal diagnosis of genetic diseases. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* (2000) 90:165-169.

^۱-Specificity and Sensitivity

8. Henkel M, Akutes Hydramnion, Leberkompressdion, enges Becken. Punktion des Hydramnion. Zentralblatt fur Gynakologie (1919) 43:841-846.
9. Old JM, Ward RHT, Karagozlu F, Petrou M, Modell B, Weatherall DJ. First-trimester fetal diagnosis for haemoglobinopathis:three cases. Lancet (1982) 2:1414-1416.
10. Daffos F, Capella-pavlovsky M, Forestier. Fetal blood sampling via the umbilical cord using a needle guided by ultrasound. Report of 66 cases. Prenat. Diag. (1983) 3:271-277.
11. Sundberg K, Bang J, Smidt-Jensen S, Brocks V, Lundsteen C, Parner J, Keiding N, Philip J. Randomised study of risk of fetal loss related to early amniocentesis versus chorionoc villus sampling. Lancet (1997) 350:697-703.
12. WHO Working Group. Fetal diagnosis of hereditary diseases. Bull WHO (1984) 62:345-355.
13. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. Lancet (1969) 1:119-122.
14. Lo YMD, Patel P, Wainscot JS, Sampietro M, Gillmer MDG, Fleming KA. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. Lancet (1989) 2:1363-1365.
15. Lo YMD, Patel P, Baigent CN, Gillmer MDG, Chamberlain P, Sampietro M, et al. Prenatal sex determination from maternal peripheral blood using the polymerase chain reaction. Hum. Genet. (1993) 90:483-488.
16. Smid M, Lagona F, Papasergio N, Ferrari A, Ferrari M, Cremonesi L. Influence of gestational age on fetal deoxyribonucleic acid retrieval in maternal peripheral blood. Am. J. Obstet. Gynecol. (1997) 177:1517-1522.
17. Thomas MR, Tutschek B, Frost A, Rodeck CH, Yazdani N, Craft I, et al. The time of appearance and disappearance of fetal DNA from the maternal circulation. Prenat. Diagn. (1995) 15:641-646.