بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری حرفه‌ای رشته‌ی دامپزشکی

تعیین جنسیت جنین گوسفند با استفاده از DNA جنینی خون مادر در دوره قبل از تولد

استادان راهنما:
دکتر حسین حسن‌پور
دکتر علی کدیور

پژوهشگر:
جاسم امیری ده چشمه

بهمن ماه ۱۳۹۲

دانشکده دامپزشکی

گروه علوم پایه

پایان نامه آقای **جاسم امیری ده چشمه** جهت اخذ درجه دکتری رشته‌ی دامپزشکی با عنوان **تعیین جنسیت جنین گوسفند با استفاده از DNA جنینی خون مادر در دوره قبل از تولد** در تاریخ **۱۳۹۲/۱۱/۸** با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با رتبه / نمره ..... مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. استادان راهنمای پایان نامه:

دکتر حسین حسن‌پور با مرتبه علمی دانشیار **امضا**

دکتر علی کدیور با مرتبه علمی استادیار **امضا**

۲. استادان داور پایان نامه:

دکتر ابوالفضل شیرازی با مرتبه علمی دانشیار **امضا**

دکتر رحمت‌الله فتاحیان دهکردی با مرتبه علمی استادیار **امضا**

مسئولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ مسئولیتی را در این زمینه تقبل نمی‌نماید.

دکتر سعید حبیبیان دهکردی
معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی
دانشکده دامپزشکی

دکتر ناصر شمس اسفند آبادی
رئیس دانشکده دامپزشکی

کلیه حقوق مادی حاصل از نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

به نام او که نخستین است و پیش از او چیزی نبوده است و آخرین است و بعد از او چیزی نیست. دیده بینندگان، از مشاهده او ناتوان است و اندیشه گویندگان از وصف او عاجز است، به وسیله قدرت خود، آفریدگان را آفرید و با اراده خود آنها را از نیستی رهانید.

اکنون که این مجموعه گرد آمده است لازم می دانم از کلیه کسانی که در طی این مسیر مرا یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایم

از اساتید ارجمند راهنما آقایان دکتر حسین حسن پور و دکتر علی کدیور که با راهنمایی هایشان مرا در مسیر پیشبرد پایان نامه یاری نمودند کمال تشکر را دارم.

از کلیه اساتید دوره تحصیل که از محضرشان کسب فیض نمودم قدردانی می نمایم.

در نهایت از تمام دوستان و هم کلاسی هایم که دوران تحصیل در دانشگاه را برایم شیرین تر کردند ممنون و سپاسگزارم.

چکیده

هم سلول‌های کامل جنینی و هم نوکلئیک اسیدهای آزاد سلول‌های جنینی (cell-free fetal nucleic acids(cffDNA)) در طول دوران آبستنی از جفت عبور می‌کند و در جریان خون مادری در گردش می‌باشند. در مطالعه اخیر ما یک روش جدید، با استفاده از ژن آمیلوژنین (Amelogenin) برای تعیین جنسیت جنین در گوسفند را مورد بررسی قرار دادیم. و با استفاده از تکنیک quantitative Real Time PCR (RT-qPCR) میزان DNA جنینی در جریان خون مادری اندازه‌گیری شد. از ۴۵ گوسفند آبستن (با سن آبستنی ۸ تا ۱۸ هفتگی) خون‌گیری صورت گرفت. پرایمر مورد نیاز از روی ناحیه‌ی اینترون شماره ۴ ژن آمیلوژنین (یک منطقه اختصاصی متصل به ژن آمیلوژنین کروموزوم Y) طراحی گردید. در ۴۲ مورد (۹۳/۳ درصد) از میش‌ها تعیین جنسیت با استفاده از cffDNA با جنسیت هنگام تولد تطابق داشت. حساسیت، ویژگی و صحت آزمایش برای تعین جنسیت جنینی به ترتیب ۹۶/۵ درصد، ۸۷/۵ درصد و ۹۳/۳ درصد بود. نتایج کمی‌سازی نسبی نشان داد که مقدار cffDNA در میش‌های با سن آبستنی بیشتر از ۳ ماه به طور قابل‌توجهی نسبت به میش‌های کمتر از این سن آبستنی، بیشتر است. در نتیجه به وسیله یک قسمت متصل بر روی ژن آمیلوژنین کروموزوم Y گوسفند می‌توان جنسیت جنینی را با استفاده از cffDNA تعیین نمود.

کلید واژه ها: آمیلوژنین، گوسفند، cell- free fetal nucleic acid، Real Time PCR

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

فصل اول- مقدمه ۵

فصل دوم- کلیات ۷

۲-۱- جنین‌شناسی دستگاه ادراری-تناسلی ۷

۲-۱-۱- دستگاه تناسلی ۷

۲-۱-۱-۱- گنادها (غدد جنسی اولیه) ۸

۲-۱-۱-۲- تکامل غدد جنسی ۹

۲-۱-۲- تکامل مجاری تناسلی ۹

۲-۱-۲-۱- مجاری مزونفریک ۹

۲-۱-۲-۲- مجاری پارامزونفریک ۹

۲-۱-۲-۳- تنظیم مولکولی تکامل مجرای تناسلی ۱۰

۲-۱-۳- اندام‌های اولیه تولیدمثل ۱۲

۲-۱-۳-۱- بیضه ۱۲

۲-۲- تعیین جنسیت ۱۳

۲-۲-۱- اهمیت تعیین جنسیت ۱۳

۲-۲-۲- روش‌های تعیین جنسیت ۱۳

۲-۲-۲-۱- نمونه‌گیری از پرزهای جفتی ۱۳

۲-۲-۲-۲- آمنیوسنتز (Amniocentesis) ۱۴

۲-۲-۲-۳- اولتراسونوگرافی ۱۴

۲-۲-۲-۴- تعیین جنسیت به کمک DNA آزاد جنینی در گردش خون مادری ۱۴

۲-۲-۳- توالی‌های مورد استفاده برای تعیین جنسیت ۱۵

۲-۲-۴- آمیلوژنین (Amelogenin) ۱۶

۲-۲-۵- تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۱۶

۲-۲-۶- Real–time PCR ۱۷

فصل سوم- مواد و روش کار ۱۹

۳-۱ نمونه‌گیری ۱۹

۳-۲- استخراج DNA ۲۰

۳-۲-۱- استخراج DNA از نمونه‌های پلاسما ۲۰

۳-۲-۲- استخراج DNA ژنومی از خون بره‌های گروه کنترل ۲۱

۳-۳- طراحی و توالی پرایمرهای مورد استفاده ۲۱

۳-۴- تنظیمات و بهینه‌سازی دستگاه Real–Time PCR ۲۳

۳-۴-۱- تنظیم و بهینه‌سازی غلظت پرایمرها ۲۳

۳-۴-۲- پرایمر دایمر ۲۳

۳-۴-۳- تنظیم و بهینه‌سازی دما و زمان ۲۴
۳-۴-۴- منحنی تکثیر ۲۴
۳-۵- مراحل عملی واکنش qRT-PCR (Quantitative Real-Time PCR) ۲۵
۳-۶- الکتروفورز ژل آگاروز ۲۶
۳-۷- آنالیز کمی داده‌ها ۲۷
۳-۷-۱- ارزیابی مطلق داده‌ها ۲۷
۳-۷-۲- ارزیابی نسبی داده‌ها ۲۷
۳-۷-۲-۱- آنالیز کمی نسبی داده‌ها به روش ΔΔCt ۲۷
۳-۸-محاسبات آماری ۲۸

فصل چهارم -نتایج ۲۹
۴-۱- نتایج حاصل از Real time PCR ۲۹
۴-۲- منحنی تکثیر حاصل از نمونه‌ها ۳۱
۴-۳- منحنی ذوب (Melting curve) نمونه‌ها حاصل از Real-Time PCR ۳۲
۴-۴- باندهای حاصل از Real time PCR بر روی ژل الکتروفورز ۳۲
۴-۵- نتایج حاصل از ارزیابی نسبی داده‌ها ۳۳

فصل پنجم -بحث ۳۴
۵-۱ بحث ۳۴

منابع ۳۸

فهرست شکل‌ها

عنوان **شماره صفحه**

شکل ۲-۱- شکل‌گیری ستیغ‌های تناسلی؛ الف و ب) مهاجرت سلول‌های زایای بدوی از دیواره کیسه زرده به دیواره پشتی شکم و تشکیل ستیغ‌های تناسلی ج) موقعیت ستیغ تناسلی و مجاری مزونفریک و مولرین ۸
شکل ۲-۲- مقایسه شکل‌گیری سیستم تناسلی مذکر و مونث ۱۰
شکل ۲-۳- نمای شماتیک ژن‌های مسئول تمایز بیضه و تخمدان در هر دو جنین مذکر و مونث ۱۱
شکل ۳-۱- مقایسه منحنی پرایمر دایمر و محصولات تکثیر یافته ۲۴
شکل ۳-۲- نمونه‌ای از منحنی تکثیر ایده‌آل که فازهای منحنی تکثیر را نشان می‌دهد ۲۵
شکل ۴-۱- منحنی تکثیر نمونه‌های با جنین نر و نمونه کنترل مثبت ۳۱
شکل ۴-۲- منحنی تکثیر نمونه‌های با جنین ماده و نمونه کنترل منفی ۳۱
شکل ۴-۳-منحنی ذوب نمونه‌ها ۳۲
شکل ۴-۴- باندهای آمیلوژنین و GAPDH مشاهده شده در ژل آگاروز ۳۳
نمودار ۴-۱- تفاوت میان متوسط CT در دو گروه میش‌های با سن آبستنی بیشتر و کمتر از ۳ ماه ۳۳

فهرست جدول‌ها

عنوان **شماره صفحه**

۳-۱- توالی پرایمرهای طراحی شده ۲۲
۳-۲- فرمول‌های مورد استفاده در روش $\Delta\Delta Ct$ ۲۸
۴-۱- فرمول محاسبه حساسیت و ویژگی آزمون ۲۹
۴-۲- نتایج حاصل از تشخیص جنسیت جنین ۳۰

فصل اول

مقدمه

تعیین صحیح جنسیت جنین، در دام‌های اهلی، به ویژه در سیستم‌های صنعتی دامپروری دارای کاربردهای مختلف تحقیقاتی و تجاری است [۵۸، ۳۲]. به طور مثال می‌توان مواردی مثل افزایش قیمت فروش دام آبستن براساس کاربرد تجاری جنسیت مشخصی از جنین، کمک به تصمیم حذف یا عدم حذف دام‌های آبستن مشکل‌دار و کمک به انجام پیش‌بینی‌های لازم برای دام‌های جایگزین را نام برد. اولتراسونوگرافی ابزاری است که به طور معمول برای تشخیص جنسیت جنین در انسان و دام مورد استفاده می‌گیرد (براساس تعیین موقعیت برآمدگی جنسی (Genital Tubercule) در یک سوم ابتدایی و براساس ظاهر اندام تناسلی خارجی در یک سوم میانی آبستنی). استفاده از این تکنیک نیاز به تهیه دستگاه سونوگرافی و حضور آن در محل و هم‌چنین تجربه زیاد فرد معاینه‌کننده در امر تعیین جنسیت دارد [۲۰]. کشف این نکته که مقدار کمی از DNA جنینی در طی آبستنی در خون مادر حضور دارد منجر به ایجاد راهکارهای جدیدی برای تعیین جنسیت و تشخیص ناهنجاری‌های ژنتیکی جنین در دوره قبل از تولد در انسان گردید [۴۹، ۲۵]. روش مولکولی تعیین جنسیت جنین با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction (PCR)) و بر روی DNA آزاد جنینی موجود در خون مادر (Crculating cell free fetal DNA) صورت می‌پذیرد که یک جایگزین عملی، سریع و با نتایج قابل اعتماد برای روش سنتی سونوگرافی می‌باشد و امکان تعیین جنسیت جنین را برای تعداد زیادی از افراد در مدت زمانی نسبتا کوتاه و فقط با استفاده از نمونه خون فراهم می‌سازد. DNA آزاد جنینی موجود در خون مادر برای اولین بار در انسان کشف شد [۴۹]. در طی آبستنی، پرده‌های جفت خون جنین و مادر را از هم تفکیک می‌کنند و در انسان و گونه‌ی اهلی خون جنین و مادر با هم مخلوط نمی‌شوند. در ارتباط با منشاء این DNA گفته می‌شود که لیز سلولی ناشی از تخریب فیزیکی و ایمنولوژیک و هم‌چنین مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی در بافت‌های جنین در طی تکامل آن، احتمالا سبب عبور DNA جنین از خون مادر می‌گردد [۴۹]. کشف این DNA فرصت جدیدی را برای تشخیص‌های ژنتیکی مربوط به جنین در دوره قبل از تولد فراهم ساخته است ولی در عین حال اطلاعات

موجود در مورد ویژگی‌های فیزیکی و بیولوژیکی این DNA بسیار ناچیز است [۲۷]. به تازگی نشان داده شده است که در طی آبستنی حدود ۱۰ درصد از DNA موجود در پلاسما در زنان باردار دارای منشاء جنینی است [۵۱]. اگرچه از این DNA می‌توان به خوبی برای تعیین جنسیت قبل از تولد جنین انسان از حدود ۵ هفتگی آبستنی و با استفاده از توالی‌های خاص موجود بر کروموزوم Y استفاده کرد [۱۶، ۶۹]، ولی هم اکنون دانش بسیار اندکی در ارتباط با این نوع خاص از DNA و چگونگی استفاده از آن در دام‌های اهلی در دست است.
در این مطالعه با استفاده از تکنیک Real Time PCR، حضور DNA آزاد جنینی در پلاسمای خون مادری در میش‌های آبستن مورد بررسی قرار گرفت؛ و جنسیت جنین در دوران قبل از تولد با استفاده از ژن آمیلوژنین تشخیص داده شد.

فصل دوم

کلیات

۲-۱- جنین‌شناسی دستگاه ادراری-تناسلی

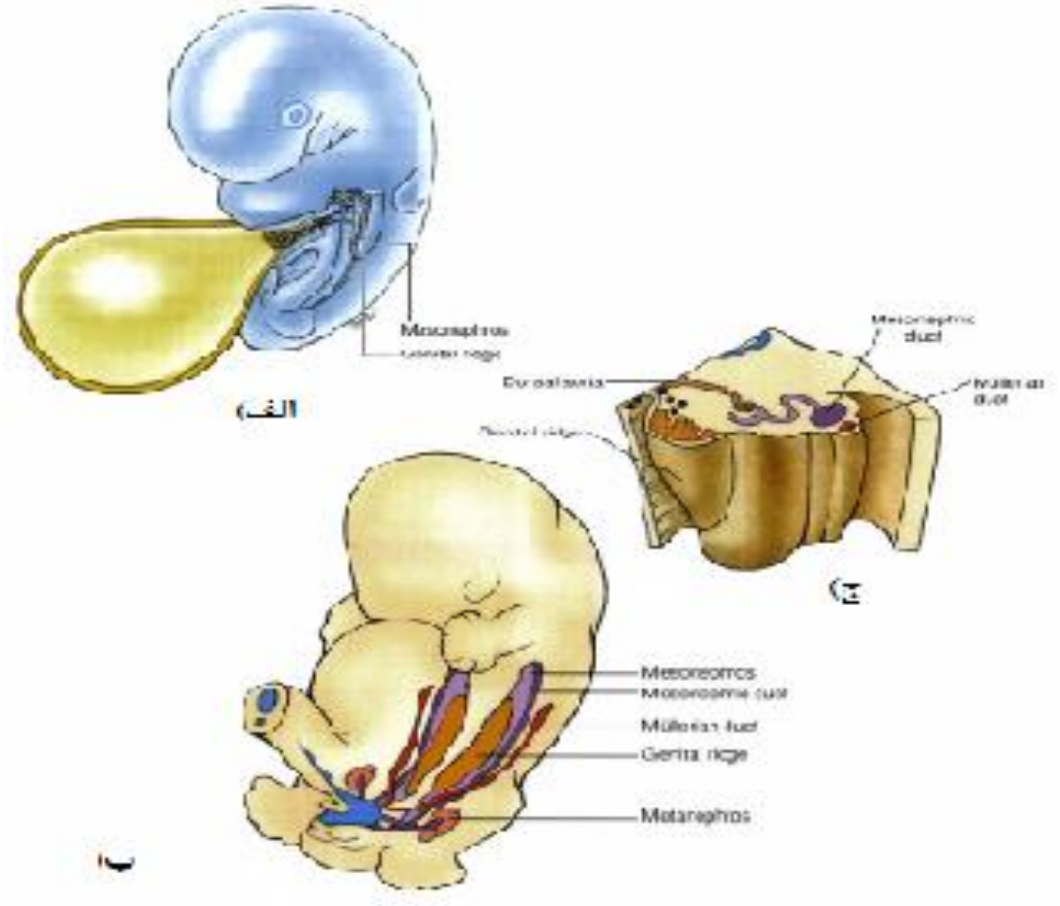
دستگاه ادراری-تناسلی را از لحاظ نوع فعالیت می‌توان به دستگاه ادراری (Urinary system) و دستگاه تناسلی (Genital system) تقسیم کرد. اما از نظر جنین‌شناسی و تشریحی در ارتباط نزدیکی با هم هستند. در افراد مذکر نیز ارتباط این دو بسیار است، چون پیشابراه مسیری برای عبور ادرار و مایع منی می‌باشد. در افراد مونث این دو دستگاه مجزا هستند ولی پیشابراه (Urethra) و واژن (Vagina) هر دو به داخل یک فضای مشترک میان لب‌های کوچک به نام دهلیز واژن (Vestibule of the vagina) باز می‌شوند [۵].

۲-۱-۱- دستگاه تناسلی

تمایز جنسی فرآیند پیچیده‌ای است که ژن‌های بسیاری از جمله ژن‌های اتوزومال (Autosomal genes) در آن دخیل هستند. کلید دو جنسی بودن کروموزوم Y است که حاوی ژن تعیین کننده بیضه (testis-determinig gene) است که ژن SRY (Sex-determinig Region on Y) نام دارد و بر روی بازوی کوتاه آن (Yp11) قرار دارد. پروتئین SRY عامل مشخص کننده بیضه است؛ تحت اثر آن تکامل جنسی اتفاق می‌افتد. غیاب آن باعث تکامل جنس مونث می‌شود [۴].

۲-۱-۱-۱- گنادها (غدد جنسی اولیه)

با وجود این‌که جنسیت رویان از نظر ژنتیکی در زمان باروری مشخص می‌شود، اما گنادها تا هفته هفتم تکامل ویژگی‌های ریخت‌شناسی ماده یا نر را به‌دست نمی‌آورند. گنادها در ابتدا به صورت یک جفت شیار طولی (ستیغ‌های تناسلی یا گنادال (Gonadal)) ظاهر می‌شوند. این ستیغ‌ها از تزاید اپی‌تلیوم و متراکم شدن مزانشیم زیرین شکل می‌گیرد. سلول‌های زایا (germ cells) تا هفته ششم تکامل در ستیغ‌های تناسلی ظاهر نمی‌شوند. سلول‌های زایای بدوی از اپی‌بلاست (Epiblast) منشا می‌گیرند و از طریق شیار اولیه حرکت می‌کنند و تا هفته سوم در بین سلول‌های اندودرم (Endoderm) در جدار کیسه زرده (Yolk sac) در نزدیکی آلانتوئیس (Allantois) قرار می‌گیرند. این سلول‌ها در طول هفته چهارم با حرکات آمیبی شکل خود در امتداد مزانتر پشتی پسین‌روده حرکت می‌کنند و در آغاز هفته پنجم به گنادهای اولیه می‌رسند و در هفته ششم به ستیغ‌های تناسلی نفوذ می‌کنند. اگر این سلول‌ها به ستیغ‌ها نرسند، گنادها تکامل پیدا نمی‌کنند (شکل ۲-۱). از این‌رو سلول‌های زایای بدوی نقش القایی در تمایز گناد به تخمدان یا بیضه دارند [۳].



شکل ۲-۱- شکل‌گیری ستیغ‌های تناسلی؛ الف و ب) مهاجرت سلول‌های زایای بدوی از دیواره کیسه زرده به دیواره پشتی شکم و تشکیل ستیغ‌های تناسلی ج) موقعیت ستیغ تناسلی و مجاری مزونفریک و مولرین [۳].

۲-۱-۱-۲- تکامل غدد جنسی

تا هفته ششم گنادها در هر دو جنس مشابه و دارای یک بخش قشری و یک بخش مرکزی می‌باشند. در ۸-۷ هفتگی، اگر جنین از لحاظ ژنتیکی مذکر باشد (دارای مجموعه کروموزومی جنسی XY باشد)، تحت اثر ژن SRY کروموزوم Y (که فاکتور تعیین‌کننده بیضه (Testis determining factor) را کد می‌کند)، بخش مرکزی گناد به بیضه تمایز می‌یابد و بخش قشری آن تحلیل می‌رود. در جنین مونث با مجموعه کروموزومی جنسی XX، بخش قشری گناد به تخمدان تمایز می‌یابد و بخش مرکزی تحلیل می‌یابد [۱]. بنابراین می‌توان گفت که جنسیت ژنتیکی جنین در زمان باروری بسته به این که اسپرماتوسیت کروموزوم X دارد یا Y، تعیین می-شود [۳].

۲-۱-۲- تکامل مجاری تناسلی

در ابتدا هر دو جنین مذکر و مونث، دو جفت مجرای جنسی یا تناسلی دارند:

الف) مجاری مزونفریک (Mesonephric ducts یا مجاری ولفین (Wolffian Duct)) که نقش مهمی در تکامل دستگاه تناسلی مرد دارد.

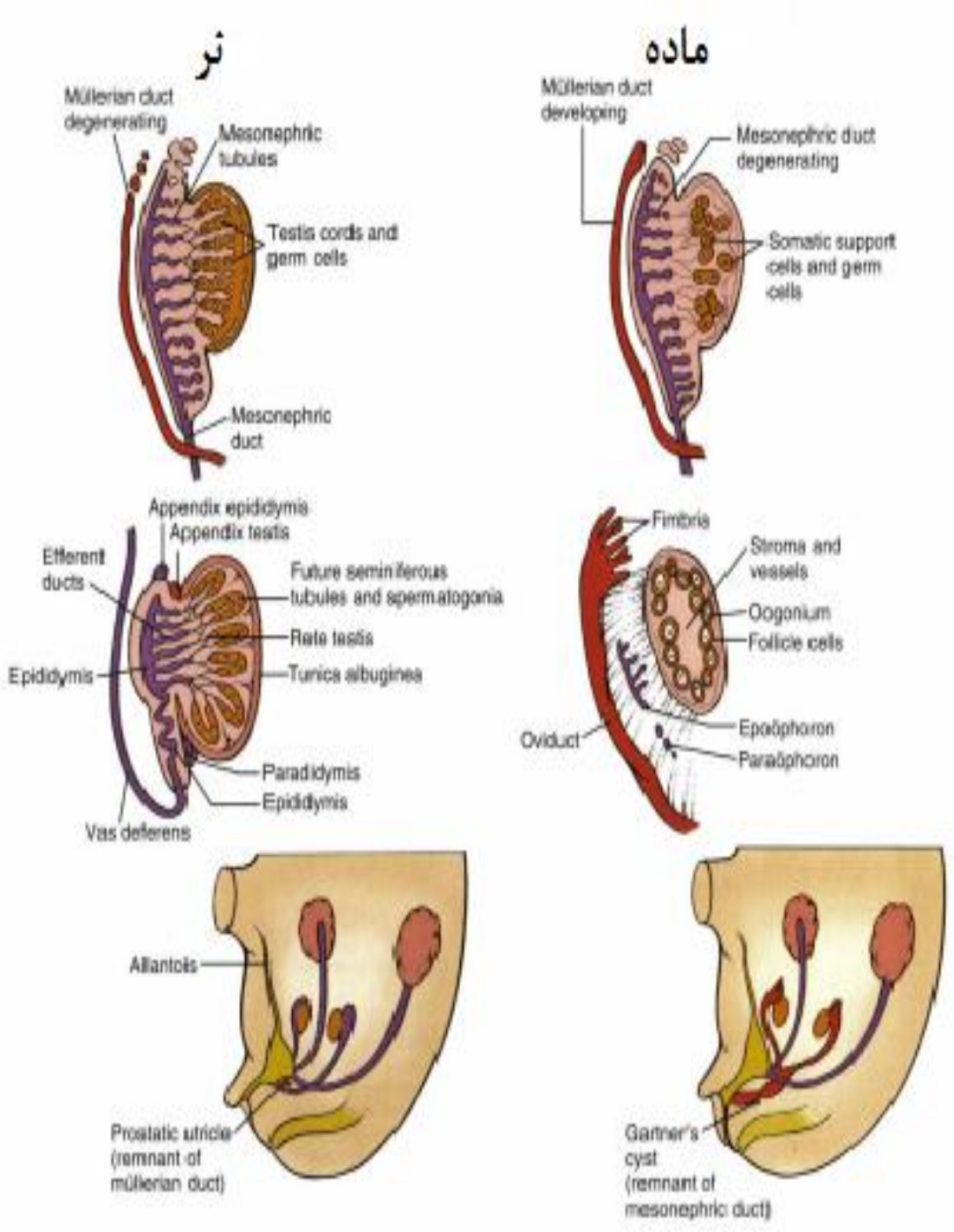
ب) مجاری پارامزونفریک (Paramesonephric ducts یا مجاری مولرین (Mollerian)) که نقش مهمی در تکامل دستگاه تناسلی زن دارند [۲]. شکل ۲-۲ مقایسه شکل‌گیری سیستم تناسلی مذکر و مونث را نشان می‌دهد.

۲-۱-۲-۱- مجاری مزونفریک

نیمه‌ی فوقانی مجاری مزونفریک به میزان زیادی درهم پیچیده شده و اپی‌دیدیم (Epididymis) را تشکیل می‌دهد و باقیمانده‌ی آن مجاری دفران (Ductus deferens) و مجاری انزالی (Ejaculatory ducts) را تشکیل می‌دهند. در جنین مونث، مجاری مزونفریک تقریبا به‌طور کامل از بین رفته و فقط مقداری از بقایای آن برجا می‌ماند [۵].

۲-۱-۲-۲- مجاری پارامزونفریک

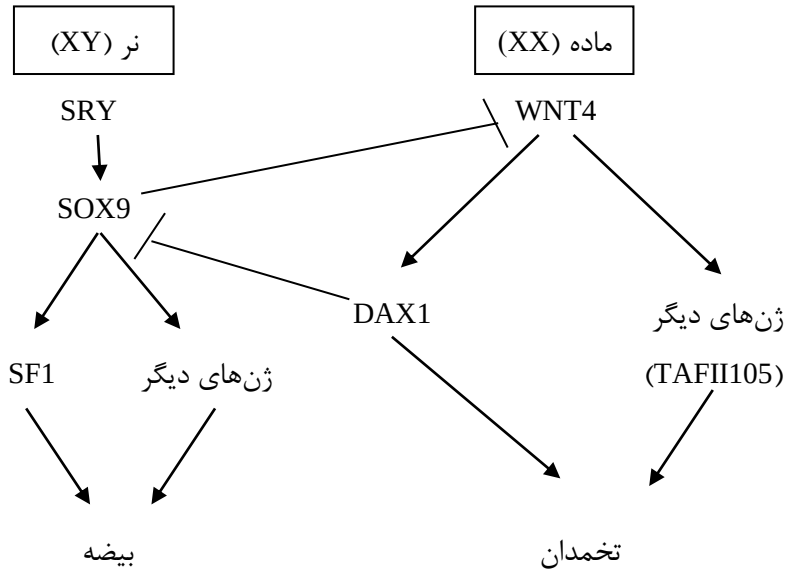
مجاری پارامزونفریک در جنین مونث به لوله‌های رحمی (Fallopian tubeS)، رحم (Uterus)، سرویکس (Cervix) و قسمت فوقانی واژن تمایز می‌یابد. در جنین مذکر مجاری پارامزونفریک تقریبا تحلیل می‌روند ولی در تشکیل برخی قسمت‌ها مثل زایده‌ی بیضه (Appendix of testis)، زایده‌ی اپی‌دیدیم (Appendix of epididymis) و اوتریکل پروستاتی (Prostatic utricle) نقش دارند [۲، ۵].



شکل ۲-۲- مقایسه شکل‌گیری سیستم تناسلی مذکر و مونث [۳۰].

۲-۱-۲-۳- تنظیم مولکولی تکامل مجرای تناسلی

SRY یک فاکتور رونویسی و ژن اصلی تکامل بیضه‌ها است [۳، ۴]. به نظر می‌آید در تعامل با ژن اتوزومال SOX9 (یک تنظیم‌کننده رونویسی) عمل می‌کند، که این ژن نیز می‌تواند تمایز بیضه‌ها را القاء کند (شکل ۲-۳: یک مسیر بالقوه برای این ژن‌ها).



شکل ۲-۳ نمای شماتیک ژن‌های مسئول تمایز بیضه و تخمدان در هر دو جنین مذکر و مونث [۳].

معلوم شده است که SOX9 به ناحیه پروموتور ژن آنتی‌مولرین ((Antimollerian Hormone (AMH) (که ماده مهارکننده مولرین (MIS) نیز گفته می‌شود) متصل می‌شود و احتمالا بیان این ژن را تنظیم می‌کند. در ابتدا، SRY و یا SOX9 بیضه را به ترشح FGF9 وادار می‌کند که به‌عنوان یک عامل کموتاکتیک عمل کند و باعث می‌شود لوله‌های مزونفریک به ستیغ گنادال نفوذ کنند. بدون نفوذ این لوله‌ها، تمایز بیضه ادامه نمی‌یابد. بعدا، SRY نیز به طور مستقیم و یا غیرمستقیم (از طریق SOX9) تولید استروئیدوژنیک فاکتور ۱ (Stroidogenic Factor 1) را افزایش می‌دهد (این ماده تمایز سلول‌های لایدیگ (Leydig cells) و سرتولی (Sertoli cells) را تحریک می‌کند). عمل SF1 همراه با SOX9 غلظت AMH را بالا می‌برد و باعث تحلیل رفتن مجاری مولرین می‌شود. در سلول‌های لایدیگ، SF1 بیان ژن‌های آنزیم‌های سنتزکننده تستوسترون را افزایش می‌دهد. تستوسترون (Testostrone) وارد سلول‌های بافت هدف می‌شود و در آنجا ممکن است دست-نخورده باقی بماند و یا توسط آنزیم ۵-آلفا ردوکتاز به دی‌هیدروتستوسترون (Dehydrotestostrone) تبدیل شود [۳]. تستوسترون و دی‌هیدروتستوسترون به گیرنده اختصاصی داخل سلولی با قابلیت اتصال بالا متصل می‌شوند. سپس این مجموعه هورمون-گیرنده به هسته انتقال داده می‌شود تا در آنجا به DNA متصل شود و رونویسی از ژن‌های اختصاصی بافت و محصولات پروتئینی آنها را تنظیم کند. مجموعه‌های گیرنده تستوسترون، مردانه شدن (Virilization) مجاری مزونفریک را سبب می‌شوند، تا مجاری دفران، سمینال وزیکول‌ها (Seminal vesicles)، مجاری وابران (Ductus eferens) و اپی‌دیدیم ساخته شوند. مجموعه‌های گیرنده‌های دی‌هیدروتستوسترون تمایز دستگاه تناسلی خارجی مذکر را واسطه‌گری می‌کنند [۳، ۴].

WNT4 ژن تعیین‌کننده تخمدان است. این ژن بیان DAX1 را که عضوی از خانواده گیرنده هورمون هسته‌ای (Nuclear Hormone) است و عملکرد SOX9 را مهار می‌کند، افزایش می‌دهد. علاوه بر آن WNT4 بیان سایر

ژن‌های مسئول تمایز تخمدان را نیز تنظیم می‌کند اما این ژن‌های هدف هنوز مشخص نشده‌اند. یکی از این ژن‌های هدف، ژن TAFII105 است که محصول پروتئینی آن زیرگروهی از پروتئین اتصال‌دهنده TATA برای RNA پلی‌مراز سلول‌های فولیکولی تخمدان است. در موش‌های ماده که این زیرگروه ساخته نمی‌شود، تخمدان به‌وجود نمی‌آید [۳]. استروژن‌ها (Estrogens) در تمایز جنسی دخیل هستند و تحت اثر آنها، مجاری پارامزونفریک تحریک می‌شوند تا لوله‌های رحمی، رحم، گردن‌رحم و بخش فوقانی واژن را بسازند. علاوه برآن استروژن‌ها در تمایز دستگاه تناسلی خارجی مونث (شکل‌گیری لب بزرگ (Labia majora)، لب کوچک (Labia minora)، کلیتوریس (Clitoris) و بخش تحتانی واژن) هم موثر می‌باشند.

۲-۱-۳- اندام‌های اولیه تولیدمثل

همان‌طور که در حیوان ماده تخمدان‌ها اندام‌های اولیه تولیدمثل هستند، بیضه‌ها نیز اندام‌های اولیه تولیدمثل در حیوان نر می‌باشند. بیضه‌ها به این دلیل اندام‌های اولیه تولیدمثل هستند که سلول‌های جنسی نر (اسپرم-ها) و هورمون‌های جنسی نر (آندوژن‌ها) را تولید می‌کنند. یکی از تفاوت‌های بیضه‌ها با تخمدان‌ها این است که در آنها تمام سلول‌های جنسی بالقوه در هنگام تولد موجود نیست. سلول‌های زاینده‌ی موجود در مجاری اسپرم‌ساز دستخوش تقسیمات سلولی مداوم شده و اسپرم‌های جدیدی را در تمام طول عمر تولیدمثل طبیعی حیوان نر (بعد از بلوغ تا زمان مرگ) تشکیل می‌دهند. بیضه‌ها، همچنین از این نظر که در حفره داخلی بدن باقی نمی‌مانند با تخمدان‌ها تفاوت دارند. بیضه‌ها از محل اصلی خود، یعنی، نزدیک کلیه‌ها، از طریق مجرای کشاله ران (مجرای مغابنی Inguinal Canal) به داخل کیسه بیضه نزول می‌کنند [۳، ۷]. پایین آمدن بیضه‌ها به این دلیل اتفاق می‌افتد که کاهش چشمگیری در طول رباطی که از ناحیه مغابنی امتداد یافته است، بوجود می‌آید. کوتاه شدن به این دلیل اتفاق می‌افتد که سرعت رشد این رباط به اندازه سرعت رشد دیواره بدن نیست. بیضه نزدیک مجرای مغابنی کشیده شده و فشار داخل شکمی به عبور آنها از طریق این مجرا و ورود آن‌ها به داخل کیسه بیضه کمک می‌کند. پایین آمدن بیضه‌ها تحت کنترل هورمون‌های گنادوتروپیک و آندروژن‌ها می‌باشد [۷].

۲-۱-۳-۱- بیضه

درتمام گونه‌ها بیضه‌ها بوسیله یک لایه سروزی به نام غشای مهبلی (Tunica vaginalis) پوشیده شده‌اند. این لایه در واقع ادامه‌ی پرده صفاق است که در هنگام نزول بیضه‌ها به داخل کیسه بیضه کشیده شده و در امتداد خط جنب بیضه قرار می‌گیرد. لایه خارجی بیضه‌ها غشایی سفید و نازک از بافت همبند قابل ارتجاع به نام غشاء آلبوژینه بیضه (Tunica albuginea) است که بلافاصله در سطح زیر آن رگ‌های خونی زیادی وجود دارد. زیر لایه خارجی بیضه، لایه پارانشیمی قراردارد‌که زرد رنگ بوده و توسط دیواره ناقصی از جنس بافت همبند به بخش‌هایی تقسیم شده است. مجاری موجود در داخل این بخش‌ها لوله‌های اسپرم‌ساز نامیده می-

شوند. لوله‌های اسپرم‌ساز از طناب‌های اولیه‌ی جنسی بوجود آمده و حاوی سلول‌های زاینده و سلول‌های سرتولی می‌باشند سلول‌های سرتولی بزرگ‌تر بود و تعدادشان خیلی کمتر از سلول‌های زاینده است. با تحریک سلول‌های سرتولی توسط هورمون FSH، این سلول‌ها می‌توانند پروتئین جاذب آندروژن و هورمون Ihibin تولید کنند [۷].

۲-۲- تعیین جنسیت

۲-۲-۱- اهمیت تعیین جنسیت

تعیین صحیح جنسیت جنین قبل از تولد در حیوانات اهلی به‌خصوص در سیستم‌های صنعتی دامپروری کاربردهای اقتصادی و پژوهشی متفاوتی دارد [۴۷]. در گونه گوسفند، تعیین جنسیت جنین قبل از زایش می‌تواند در تصمیم‌گیری‌های مدیریتی از جمله، برنامه‌های اصلاح نژادی، انتخاب جنس در برنامه‌های تولیدمثلی و کاهش قیمت آزمایش‌های آبستنی مفید باشد. نسل پدری گوسفندان تحت یک برنامه انتخابی (تخمک‌گذاری چندتایی و انتقال جنین Multiple Ovulation and Embryo Transfer)(MOET)) قرار می-گیرد تا چند قلو زایی را افزایش دهند. این تکنیک زمانی موثر خواهد بود که جنسیت جنین قبل از انتقال و یا انجماد تشخیص داده شود [۷۵].

درکنار مدیریت مناسب گله، تعیین جنسیت جنین قبل از تولد به‌طور مستقیم در فروش گوساله قبل از تولد آن ارزش اقتصادی آن را افزایش می‌دهد [۱۸].

۲-۲-۲- روش‌های تعیین جنسیت

تا به حال روش‌های کمی برای تعیین جنسیت جنین قبل از تولد در حیوانات پیشنهاد شده است [۱۸]. تشخیص پیش از تولد (Prenatal Diagnosis) جنسیت جنین، به دو روش انجام می‌شود:

الف) روش‌های تهاجمی مانند نمونه‌گیری از طریق آمنیوسنتز و نمونه‌گیری از پرزهای کوریونی Chorionic) Villous Sampling(CVS))

ب) روش‌های غیرتهاجمی مانند اولتراسونوگرافی و تعیین جنسیت به کمک DNA جنینی آزاد در گردش خون مادری می‌باشد [۷۹].

۲-۲-۲-۱- نمونه‌گیری از پرزهای جفتی

یکی از روش‌های تعیین جنسیت که دقت ۱۰۰ درصد دارد به نام نمونه‌گیری از پرزهای جفتی یا CVS نامیده می‌شود. هدف اصلی آن همیشه مشاهده مشکلات ژنتیک است. معمولا ده روز طول می‌کشد تا نتیجه تست مشخص شود البته گاهی ممکن است زودتر از موعد آماده شوند. این کار با مثانه پر تحت سونوگرافی انجام

می‌گیرید. سونوگرافی می‌تواند به‌صورت واژینال، سرویکال و یا شکمی صورت گیرد. در این روش احتمال مرگ و یا سقط جنین (۱ در ۲۰۰ تا ۱ در ۱۰۰ مورد) می‌باشد [۲۱، ۵۵].

۲-۲-۲-۲- آمنیوسنتز (Amniocentesis)

آزمایش دیگر که هم برای تعیین جنسیت و هم تست ژنتیک استفاده می‌شود، آمنیوسنتز می‌باشد. اولین عامل تعیین‌کننده برای این‌که کدام تست توصیه شود مسئله زمان است. آمنیوسنتز در مراحل بعدی بارداری انجام می‌شود. به‌نظر می‌رسد آمنیوسنتز در یک‌سوم ابتدایی آبستنی برای جنین و بارداری نسبت به یک‌سوم میانی آبستنی که معمولا زمان قابل قبول برای آن است، خطر بیشتری دارد. در این روش خطر مرگ و یا سقط جنین در سه‌ماهه دوم ۱ در ۴۰۰ مورد تا ۱ در ۲۰۰ مورد می‌باشد [۵۵].

۲-۲-۲-۳- اولتراسونوگرافی

به طور معمول برای تعیین جنسیت جنین قبل از تولد چه در انسان و چه در حیوانات از اولتراسونوگرافی (که بر اساس تعیین موقعیت برآمدگی تناسلی جنسیت را مشخص می‌کند) استفاده می‌شود. در گوسفند از روز ۶۰ تا ۶۹ آبستنی [۱۷، ۲۸]، در گاو از روز ۵۶ تا ۹۸ آبستنی [۳۵] و در مادیان از روز ۵۹ تا ۶۸ به‌وسیله اولتراسونوگرافی از طریق مقعد می‌توان جنسیت جنین را مشخص کرد. همچنین در مادیان در بین روزهای ۱۲۰ تا ۲۱۰ به وسیله اولتراسونوگرافی از طریق شکم یا مقعد با مشاهده عکس‌های دستگاه تناسلی خارجی جنین می‌توان جنسیت را تشخیص داد [۱۲].

این روش اگرچه به صورت معمول استفاده می‌شود ولی محدودیت‌هایی نیز از جمله نیاز به تجهیزات و هزینه-های بالا، نگرانی از سلامت حیوان و فرد عامل، مشکل در دسترسی به جنین با پیشرفت آبستنی و همچنین نیاز به یک فرد ماهر و متخصص را دارد. این محدودیت‌ها تعیین جنسیت جنین در مراحل انتهایی آبستنی را بسیار مشکل و یا حتی گاهی اوقات غیر ممکن می‌سازد [۹، ۳۵].

۲-۲-۲-۴- تعیین جنسیت به کمک DNA آزاد جنینی در گردش خون مادری

Lo و همکاران در سال ۱۹۹۷ توانستند برای اولین بار نشان دهند که مقداری از DNA جنین از جفت عبور کرده و وارد گردش خون مادران سالم آبستن می‌شود. آنها تعیین جنسیت جنین را با استفاده از DNA آزاد جنینی در گردش خون مادری ((cell free fetal DNA (cffDNA)) موفقیت‌آمیز گزارش کردند [۴۹]. Kadokawa و همکاران در سال ۱۹۹۶، اقدام به جداسازی سلول‌های جنینی از خون گاوهای آبستن کردند و نشان دادند که سلول‌های جنینی در گردش خون مادری گاوها کم هستند و یا اصلا وجود ندارند؛ و از آنها نمی‌توان برای تشخیص جنسیت جنینی قبل از تولد به‌روش PCR استفاده کرد [۳۹]. برخلاف آنها Turin و