مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۸، شماره ۱، زمستان ۸۷، صفحات ۱ تا ۶

Original Article

شناسایی جنسیت جنین انسان از طریق پلاسمای مادر باردار از هفته هشتم به بعد بوسیله Nested-PCR

مهرداد هاشمی[۱]، علی ناظمی[۲]، محبوبه صفوی[۳]، شهلا چایچیان[۴]، مسعود قانع[۵]، شهرآشوب شریفی[۶]

[۱] استادیار، دکترای ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۲] هیئت علمی، دکترای ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن
[۳] استادیار، دکترای مدیریت خدمات بهداشتی درمانی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۴] استادیار، گروه زنان و زایمان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۵] استادیار، دکترای تخصصی زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن
[۶] کارشناس، بخش بیولوژی مولکولی، آزمایشگاه پزشکی تنکابن

چکیده

سابقه و هدف: *تشخیص پیش از تولد(Prenatal Diagnosis) جنسیت جنین، نیازمند روش‌های تهاجمی نظیر نمونه‌گیری از طریق آمنیوسنتز و نمونه‌گیری از پرزهای کوریونی(CVS) می‌باشد. در سال‌های اخیر، یکی از روشهای غیر تهاجمی بررسی حضور DNA سلولهای هسته‌دار جنینی در پلاسمای خون مادر است که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، سیستم Nested-PCR برای تشخیص ژن SRY جنینی با بکارگیری DNA جنینی از پلاسمای خون مادر باردار طراحی و بهینه‌سازی گردید. نمونه‌های خونی ۳۲ زن باردار در هفته‌های ۱۳-۸ آبستنی جمع‌آوری و سپس DNA سلولها به روش فنل/کلرفرم استخراج گردید. در سیستم Nested-PCR، ژن SRY با دو جفت پرایمر طراحی شده تکثیر شد. حضور توالی‌های کروموزوم Y در پلاسمای خون مادر نشان‌دهنده جنسیت پسر جنین و در صورت فقدان آن نشان‌دهنده جنسیت دختر بود.*

یافته‌ها: *از ۳۲ زن باردار، پس از تکثیر ژن SRY به روش Nested-PCR، در ۱۴مورد نتیجه مثبت بود، بطوری‌که در ۱۸ زن دارای جنین دختر نتایج مثبت دیده نشد و نتایج به‌دست آمده حساسیت ۸۷/۵ درصد را نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *روش استخراج فنل/کلرفرم یک روش ساده و موثر برای جدا سازی DNA جنین از پلاسمای خون مادر می‌باشد و روش Nested-PCR روشی غیر تهاجمی ارزان و دردسترس برای برای تشخیص پیش از تولد می‌باشد .*

واژگان کلیدی: *تشخیص پیش از تولد، DNA جنینی در پلاسمای مادر ، Nested-PCR ، ژن SRY .*

مقدمه

در حال حاضردر اکثر کشورها تشخیص والدینی جنسیت جنین در چند ماه اولیه بارداری به منظور پیشگیری از بروز اختلالات ژنتیکی، در آزمایشگاههای ژنتیک پزشکی مورد توجه می‌باشد. بهرحال روشهای معمول تهیه سلول‌های جنینی برای بررسی ژنتیکی از جمله آمنیوسنتز و نمونه‌گیری از پرزهای کوریونی روش‌های تهاجمی بوده و خطر سقط و آسیب جنین وجود دارد (۱).

در سال ۱۹۹۷ ، Lo و همکارانش توانستند حضور DNA جنینی آزاد را در سرم و پلاسمای زنان باردار را شناسایی نمایند (۲). در تحقیقاتی دیگر، آنها نشان دادند که غلظت DNA جنینی با افزایش سن بارداری افزایش می‌یابد (۳) و DNA جنینی پس از زایمان بسرعت از پلاسمای مادر حذف می‌گردد (۴). با توجه به وجود DNA جنینی در میان انبوه

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه ژنتیک مولکولی دکتر مهرداد هاشمی (**email**: Hashemi_mehrdad@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۱۱/۱۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۲/۵

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-03]

DNA آزاد مادری موجود در پلاسما یک مانع بزرگ در راه کسب اطلاعات از این منبع، فقدان مارکرهای اختصاصی در تمایز این دو نوع DNA از نظر منشاء میباشد. با توجه به تمایز واقعی توالی‌های DNA کروموزوم Y از DNA پلاسمایی مادر، بررسی‌های زیادی بر پایه چنین توالی‌هایی بعنوان مارکرهای اختصاصی DNA جنینی انجام شده است. این کارهای تحقیقاتی، یک روش تعیین جنسیت با صحت بالا را فراهم ساخت که برای بررسی والدینی بیماری‌های وابسته به جنس مفید می‌باشد. بررسی DNA آزاد پلاسمای مادر برای تعیین غیرتهاجمی وضعیت گروه خونی RhD جنین در زنان باردار RhD منفی نیز مفید می‌باشد. تایید صحت این روش توسط تعداد زیادی ازگروه‌های تحقیقاتی باعث گردید که اداره ملی خون انگلستان (British National Blood Service) آن‌را بعنوان یک سرویس معمول از سال ۲۰۰۱ معرفی نماید. به تازگی بررسی DNA پلاسمای مادر به منظور تشخیص والدینی غیرتهاجمی بتا تالاسمی ماژور، HbE، میونیک دیسترفی، سیستیک فیبروزیس، بیماری هانتینگتون و هیپرپلازی مادرزادی آدرنال مورد استفاده قرارگرفته است (۶،۵) و چنین کاربردهایی در سالهای آینده گسترش بیشتری خواهد یافت. همچنین مدت کوتاهی پس از تعیین حضور DNA جنینی در خون مادران باردار، Lo و همکاران متوجه شدند که در آسیب‌ها و ناهنجاریهای جنینی، DNA جنینی موجود در پلاسمای مادر از نظر کمی متحمل تغییر می‌گردند (۷). اولین آسیب جنینی که با تغییرات کمی DNA جنینی مشاهده گردید، پره‌اکلامپسی بود که یک افزایش ۵ برابری در غلظت DNA جنینی در آن رخ می‌دهد. تغییر کمی DNA جنینی در جریان خون مادر همچنین در تغییرات تعدادی کروموزوم، زایمان پیش از موعد، هیپرامزیس گراویداروم و Placentation تهاجمی نیز مشاهده می‌گردد. بنابراین مکان استفاده از غلظت DNA جنینی در پلاسما یا سرم مادران باردار برای پیش بینی خطرات بارداری وجود دارد (۱۰-۸). هدف از این تحقیق توسعه روشی بی‌خطر برای تشخیص پیش از تولد جنسیت جنین می‌باشد.

مواد و روشها

در این تحقیق تجربی، بر اساس موارد ذیل Nested-PCR برای ژن SRY انسانی طراحی و بهینه سازی گردید. ما با مراجعه به بانک اطلاعات ژنی، مقرهای مختلف واقع بر کروموزوم Y را مورد بررسی و ارزیابی قرار دادیم که از میان آنها ژن تعیین‌کننده جنسیت (SRY) که در مقر Yp11.3 قرار دارد، تعیین گردید. ژن SRY (Sex determination region of Y) یک ژن فاقد اینترون بوده که فاکتور رونویسی از خانواده پروتئین‌های متصل شونده به DNA، HMG را رمز می‌نماید. این ژن ۳/۸Kb طول داشته و یک پروتئین ۲۰۴ اسید آمینه‌ای و ۲۴ کیلودالتونی را رمز می‌نماید. این پروتئین تعیین جنسیت مذکر در انسان را آغازمی نماید.

۵ میلی لیتر خون کامل همراه با ماده ضدانعقاد EDTA از ۳۲ زن باردار درسنین بارداری بین ۸ تا ۱۳ هفته به روش نمونه‌گیری قابل دسترس با اطلاع و کسب رضایت آنها جمع‌آوری گردید. خون هر فرد بلافاصله در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و پلاسما به میزان ۵۰۰ میکرولیتر درون میکروتیوب‌های استریل تقسیم گردید. به غیر از یکی مابقی میکروتیوب‌ها به منظور تکرار بررسی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

برای استخراج DNA از روش فنلی استخراج گردید. به ۵۰۰ میکرولیتر پلاسما ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K (۱۰ mg/ml) اضافه کرده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس هم حجم آن به آن فنل تعادلی اضافه کرده و بخوبی مخلوط شد. سپس در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز آبی را جدا کرده و هم حجم آن کلروفرم اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه مخلوط گشت. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس فاز آبی جدا شده و نصف حجمش به آن استات آمونیوم ۷ مولار و برابر حجم کل به آن ایزوپروپانول اضافه شد. پس از ۱۵ بار سر و ته کردن نمونه، حداقل به مدت یک ساعت در دمای ۲۰- ذخیره شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب با ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده و پس از خشک کردن در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، به آن ۱۲ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد و پس از حل شدن ۱۰ میکرولیتر برای واکنش PCR استفاده شد. جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر نیز اندازه‌گیری شد.

برای استخراج DNA از روش Salting out نیز استفاده شد. به ۵۰۰ میکرولیتر پلاسما ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K(10mg/ml) اضافه کرده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلرید سدیم ۶ مولار به آن اضافه و مخلوط شد. سپس در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز آبی جدا شده و هم حجمش به آن ایزوپروپانول اضافه گشت. پس از ۱۵ بار سر و ته کردن

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-03]

نمونه، حداقل به مدت یک ساعت در دمای ۲۰- ذخیره شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب با ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده و پس از خشک کردن در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد، به آن ۱۲ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد و پس از حل شدن، ۱۰ میکرولیتر آن برای واکنش PCR استفاده شد. همین‌طور جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

برای استخراج DNA از روش Boiling اصلاح شده نیز استفاده شد. به ۵۰۰ میکرولیتر پلاسما، ۵۰ میکرولیتر سود ۲ مولار اضافه شد و پس از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از رسیدن دمای آن به دمای اتاق، ۱۰۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۶ مولار اضافه شد. سپس در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. فاز آبی جدا شده و هم حجم آن به آن کلروفرم اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه مخلوط و سپس در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز آبی جدا شده و هم حجمش به آن ایزوپروپانول اضافه شد. پس از ۱۵ بار سر و ته کردن نمونه، حداقل به مدت یک ساعت در دمای ۲۰- ذخیره شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب با ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده و پس از خشک کردن در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد، به آن ۱۲ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد و پس از حل شدن ۱۰ میکرولیتر برای واکنش PCR استفاده شد. همینطور جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

برای تعیین جنسیت جنین ما با استفاده از Nested-PCR بخشی از ژن SRY اختصاصی کروموزوم Y را تکثیر نمودیم. برای اپتیماسیون سیستم PCR، واکنش تکثیر بر روی DNA ژنومی استخراج شده از سرم مرد و زن بطور مجزا اجرا گردید و میزان مناسب اجزاء واکنش، زمان و دما تعیین گردید. شرایط اجرای واکنش بصورت زیر می‌باشد:

در دور اول واکنش PCR، ما یک قطعه ۳۴۳ bp از ژن اختصاصیSRY را به کمک جفت پرایمر

Y1(5'-TCG TGT GGT CTC GCG ATC AGA C-3')
Y2(5'-TGG CCT AGC TGG TGC TCC ATT G-3'

تکثیر نمودیم. مخلوط واکنش دور اول PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر DNA پلاسما، ۵ پیکومول هر یک ازپرایمرها،۵۰ میکرومول dNTPs، ۵ میلی‌مولار MgCl2، ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl pH 9، ۵۰۰ میلی‌مولار KCl، ۱٪ Triton X-100 و ۱ واحد Taq DNA polymerase بود. برنامه واکنش PCR دور اول به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به عنوان دناتوراسیون اولیه و سپس سیکل اصلی واکنش شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه ، ۴۳ دور تکرار گردید و مرحله آخر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به عنوان گسترش نهایی بوسیله سیستم ASTEC PCR (Japan) اجرا گردید.

در دور دوم واکنش PCR، ۳ میکرولیتر از محصول PCR دور اول بعنوان DNA الگو در حجم کل ۲۵ میکرولیتر با مقادیر یکسان با دور اول از نظر اجزاء واکنش همراه با پرایمرهای زیر اجراء گردید:

Y3 (5'-AATTACAGGCCATGCACAC-3')
Y4 (5'-ATTCTTGAGTGTGTGGCTTTG-3')

برنامه واکنش دور دوم PCR شامل دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، سپس ۴۰ دور سیکل حرارتی اصلی، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و یک مرحله گسترش ۵ دقیقه‌ای در دمای، ۷۲ درجه سانتی‌گراد اجراء شد. قطعه تکثیری دور دوم واکنش یک قطعه bp ۱۹۰ بود.

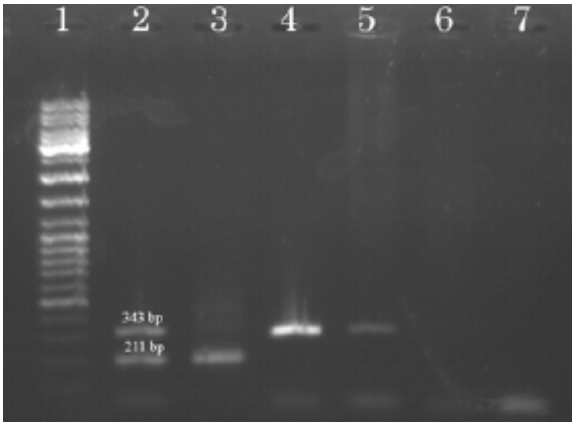
یافته‌ها

روی پلاسمای ۳۳ زن باردار در هفته های ۸ تا ۱۳ بطور مجزا سه روش استخراج DNA یعنی روش‌های فنلی، Salting out و Boiling انجام شد. پیش از اجرای واکنش PCR روی آنها میزان جذب نوری هر نمونه در هر روش در طول موج‌های ۲۸۰، ۲۶۰ و ۲۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. متوسط DNA استخراج شده به روش Boiling، Salting out و فنلی از حجم یکسان پلاسمای ۳۳ زن باردار به ترتیب معادل ۱/۳۵، ۱/۸۵ و ۳/۳۶ بود. میزان پروتئین و پلی‌ساکارید در رسوب نهایی در روش Salting out بیشتر از روش Boiling و در روش Boiling بیشتر از روش فنلی بود.

نتایج بهینه‌سازی سیستم بصورت Multiplex PCR روی DNA ژنومی زن و مرد در شکل ۱ نمایش داده شده است. در این سیستم PCR باند اختصاصی X و Y حضور این کروموزوم را در مخلوط DNA نشان می‌دهد. در این تصویر همچنین تکثیر قطعات اختصاصی کروموزوم X و Y بصورت Single PCR نیز اجرا گردیده است. بطوری‌که حضور قطعه bp ۳۴۳ نشان دهنده کرموزوم Y و حضور قطعه bp ۲۱۱ نشان دهنده کروموزوم X می‌باشد. زمانی‌که DNA یک مرد تحت واکنش

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-03]

فوق قرار گیرد، بدلیل داشتن هر دو کروموزوم X و Y در محصول تکثیری هر دو قطعه bp ۳۴۳ و bp ۲۱۱ مشاهده می‌گردد. در حالی که وقتی DNA یک زن مورد بررسی قرار می‌گیرد، بدلیل داشتن تنها کروموزوم X در محصول واکنش تنها قطعه bp ۲۱۱ مشاهده می‌گردد.



شکل۱- محصول Multiplex PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد.
ستون شماره ۱: حاوی 100 bp DNA Lader.
ستون شماره ۲: Multiplex-PCR روی DNA ژنومی فرد مذکر.
ستون شماره ۳: Single-PCR با پرایمر های X1,X2.
ستون شماره ۴: Single-PCR با پرایمر های Y1,Y2.
ستون شماره ۵: Single-PCR با پرایمرهای Y1,Y2 روی DNA فرد مذکر.
ستون شماره ۶: Single-PCR با پرایمرهای Y1,Y2 روی DNA فرد مونث.
ستون شماره ۷: کنترل منفی.

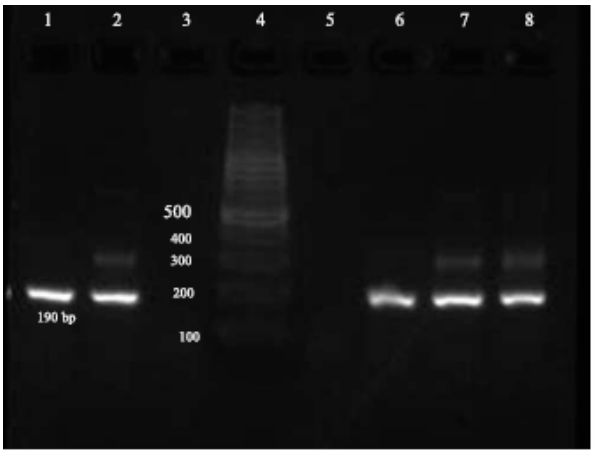
نتایج حاصل از بررسی غیر تهاجمی ژن SRY اختصاصی کروموزوم Y روی DNA آزاد پلاسمای مرد، زن و مادران باردار از طریق سیستم Nested-PCR در شکل ۲ نمایش داده شده است. در این تصویر نتایج تکثیر بر نمونه‌های DNA استخراجی از پلاسمای زنان باردار در هفته‌های هشتم تا دوازدهم و پلاسمای فرد مونث و مذکر به ترتیب بعنوان کنترل منفی و مثبت نشان داده شده است. قطعه تکثیری ۱۹۰ جفت بازی در نمونه زنان باردار حمل کننده جنین مونث و نمونه کنترل منفی (پلاسمای زنان) مشاهده نمی‌گردد، در حالی‌که این باند ۱۹۰ جفت بازی در نمونه زنان باردارحمل کننده جنین مذکر و کنترل مثبت (پلاسما مرد) مشاهده می‌گردد. صحت نتایج بوسیله پیگیری افراد پس از زایمان در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- مقایسه جنسیت جنین نمونه ها بر اساس یافته‌های و پس از زایمان

سن حاملگی	Nested-PCR	پس از زایمان
۱۰	مونث	مونث
۸	مذکر	مذکر
۱۰	مذکر	مذکر
۱۱	مونث	مونث
۸	مذکر	مونث
۹	مونث	مونث
۱۰	مذکر	مونث
۱۲	مونث	مونث
۸	مذکر	مونث
۱۱	مذکر	مونث
۱۰	مذکر	مذکر
۹	مذکر	مذکر
۱۲	مونث	مونث
۹	مونث	مونث
۹	مذکر	مذکر
۱۰	مذکر	مذکر
۱۰	مذکر	مذکر
۱۱	مونث	مونث
۱۲	مونث	مونث
۹	مذکر	مذکر
۱۳	مونث	مونث
۱۱	مونث	مذکر
۱۰	مونث	مونث
۱۰	مونث	مونث
۹	مذکر	مذکر
۸	مونث	مونث
۱۰	مذکر	مذکر
۹	مذکر	مذکر
۹	مذکر	مذکر
۱۰	مونث	مونث
۱۰	مونث	مونث
۱۰	مونث	مونث

با توجه به پیگیری تمامی زنان باردار پس از زایمان، نتایج بدست آمده آنها در ماه سوم با نتایج نهایی مقایسه گردید. صحت تشخیص جنسیت مذکر در پلاسمای ۱۵ زن باردار به سه روش استخراج DNA Boiling، Salting out و فنلی به ترتیب ۳۷، ۴۴ و ۹۳ درصد بود. همچنین هیچ قطعه تکثیری ۱۹۰ جفت بازی در ۱۸ نمونه زن باردار با جنین مونث در سه روش ذکر شده مشاهده نشد.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-03]



شکل ۲- نتایج دور دوم PCR ژن SRY Y روی DNA آزاد پلاسمای مرد، زن و مادران باردار از طریق سیستم Nested-PCR.

ستون شماره ۱: پلاسمای یک زن باردار در هفته نهم.

ستون شماره ۲: پلاسمای مرد (کنترل مثبت).

ستون شماره ۳: پلاسمای زن غیرباردار (کنترل منفی).

ستون شماره ۴: 100 bp DNA Ladder.

ستونهای شماره ۵ تا ۸: پلاسمای زنان باردار بین هفته های هشتم تا دوازدهم.

بحث

در این طرح ما با استفاده ازروش بسیار حساس Nested-PCR که قادر به شناسایی مقادیر جزئی DNA می‌باشد و استخراج DNA به روش فنلی، سعی کردیم مقادیر جزئی DNA جنینی که از هفته هشتم وارد جریان خون مادر می‌شود را شناسایی نماییم. برای این منظور، ما پرایمرهایی برای ژن SRY که تنها بر روی کروموزوم Y وجود دارد، طراحی نمودیم. پس از بهینه‌سازی روش روی DNA ژنومی فرد مذکر و مونث، روش روی پلاسمای فرد مذکر، مونث و زنان باردار اجرا گردید. نتیجه Nested-PCR روی پلاسمای ۳۲ زن با سن آبستنی ۸ تا ۱۲ هفته‌ای و مقایسه آنها با نتیجه پس از زایمان میزان حساسیت ۸۷/۵ درصدی این روش را نشان داد. از میان این ۳۲ مورد، ۴ مورد نتیجه کاذب وجود داشت، بطوری‌که سه مورد جنین مونث، مذکر و یک مورد جنین مذکر، مونث تشخیص داده شده بود. نتایج بدست آمده با نتایج Lo و Birch (۹،۴) که به حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰ درصدی دست یافته بودند، کمی کمتر است. نتایج بدست آمده نشان می دهد که روش استخراج فنلی هم از نظر مقدار DNA حاصله و هم از نظر عدم حضور سایر ماکرومولکول‌ها همچون پروتئین و پلی‌ساکاریدها که بعنوان مهار کننده‌های واکنش عمل می‌نمایند، در وضعیت بسیار مطلوبی قرار دارد. در حقیقت مقدار DNA بدست آمده در روش فنلی بیش از دو برابر روش‌های Salting out و Boiling می‌باشد. با توجه به استخراج دستی DNA آزاد پلاسما در این بررسی، شاید بتوان با استفاده از کیت‌های استخراج DNA با کارایی بالا به نتایج بهتری دست یافت. در ضمن، از آنجایی‌که جنس مونث، مذکر تشخیص داده شده و این موضوع ممکن است به خاطر آلودگی سرسمپلرها با نمونه‌های DNA جنس مذکر باشد و همچنین با توجه به اینکه اکثر قطعات DNA جنینی در جریان خون مادر طولی کمتر از ۳۰۰ جفت باز (۱۱،۲) دارند، با انجام آزمایش در شرایطی با استریلیتی بالاتر و با طراحی پرایمرهایی که قطعات کوچکتری را شناسایی می‌نمایند، شاید بتوان حساسیت روش را بهبود بخشید. بطوری‌که دست‌یابی به این مهم می‌تواند به ما در گشایش راه جدیدی برای تشخیص پیش از تولد و کاملا بی‌خطر طیفی از اختلالات ژنتیکی کمک نماید.

تشکروقدردانی

باتشکرازحوزه معاونت پژوهشی واحدپزشکی تهران جهت حمایت های لازم در اجرای طرح پژوهشی

REFERENCES

1. Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgrere W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. Clinical Chemistry 2004;50:1002-11.
2. Leo LMp, Dennis YML. Circulating fetal DNA in maternal plasma. Clinica Chimica Acta 2001;313:151-55.
3. Lo YMD, Tein Ms, Lau TK. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 1998;62:768-75.
4. Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DN from maternal plasma. Am J Hum Genet 1999;64:218-24.
5. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. Clin Chem 2000;46:301-302.
6. Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. N Engl J Med 1998;339:1734-38.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-03]

7. Lo YMD, Leung TN, Tein Ms. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. Clin Chem 1999;45:184-88.

8. Leung TN, Zhang J, Lau Tk, Hjelm NM, LO YMD. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. Lancet 1998;352:1904-5.

9. Birch L, English CA, Donoghue K, Barigye O, Fisk NM, Keer JT. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. Clin Chem 2005; 51:312-20.

10. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 1997;350:485-87.

11. Tungwiwat W, Fucharoen G. Non- invasive fetal sex determination using a conventional nested PCR analysis of fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem Acta 2003;334:173-77.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-03]