جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تعیین جنسیت به روش Nested-PCR با استفاده از ژن آمیلوژنین

امیر عباس رحیمی[۱]، محمد حسن شاه حسینی[۲]، قاسم آهنگری[۳]، فرهاد شاهسوار[۴]، سید محسن سید رضایی تهرانی[۱]

یافته / سال ششم / شماره ۲۲

چکیده

مقدمه: تعیین جنسیت گذشته از اینکه از نظر والدین دارای ارزش خاصی است، در بیماریهای وابسته به جنس نیز از اهمیت زیادی برخوردار است. هدف از این مطالعه تعیین جنسیت جنین در موارد مشکوک به بیماریهای مغلوب وابسته به X در سه ماهه اول بارداری به روش مولکولی بود.

مواد و روشها: بعد از جمع آوری۷۴ نمونه از پرزهای کوریونیک (CV) و جدا کردن آنها از نمونه های مادری، DNA آنها استخراج شد و پس از انجام واکنش زنجیره ای پلیمر از (PCR)، جنسیت آنها تعیین شد. همچنین بعد از افزایش حساسیت، سیستم قادر به تعیین جنسیت یک سلول بیوپسی شده از جنین بود.آنالیز آماری با استفاده از آزمون دقیق فیشر انجام گرفت.

یافته ها: جنسیت نمونه هایCV بوسیله PCRتعیین شد. نتایج آن تعداد از نمونه هایی که موفق به ارتباط با خانواده های آنها شدیم، با جنسیت جنینهای متولد شده یکسان بود($p<0.001$). بعد از افزایش حساسیت سیستم، جنسیت ۱۳ نمونه جنینی که در مراحل مختلف سلولی بودند تعیین شد. همچنین جنسیت دو نمونه تخمک لقاح نیافته(سلول هاپلوئید) و یک تخمک بارور شده؛ ولی تقسیم نشده(سلول دیپلوئید)، تعیین شد.

نتیجه گیری: تعیین جنسیت جنین قبل از تولد در سه ماهه اول بارداری، از تولد کودکان بیمار جلوگیری کرده و همچنین از ارتباط عاطفی مادر با جنین در موارد سقط می کاهد. همچنین در موارد لقاح آزمایشگاهی(IVF) با شناسایی جنس جنین و انتقال جنین مونث به مادر در بیماریهای مغلوب وابسته به جنس می تواند کاربرد داشته باشد. کاربرد دیگر آن در کنترل جمعیت جوامع در مواردی است که زوجها تمایل به داشتن جنس خاصی از کودک را دارند. سیستم مولکولی اپتیمایز شده فوق که بر اساس ژن آمیلوژنین طراحی گردید، می تواند جنسیت را در نمونه های خون، CV و در مرحله تک سلولی IVF با حساسیت و ویژگی بالا تعیین نماید.

واژه های کلیدی: واکنش زنجیره ای پلیمراز،ژن آمیلوژنین،تعیین جنسیت،بیماریهای وابسته به X.

۱- شرکت سیناژن،گروه بیولوژی مولوکولی
۲- استادیار ـ عضو هیئت علمی دانشگاه امام حسین، دانشکده علوم، گروه بیولوژی
۳- استادیار ـ عضو هیئت علمی مرکز ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، گروه ایمنی شناسی
٤- مربی ـ عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی لرستان،گروه ایمنی شناسی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

تعیین جنسیت گذشته ازاینکه ازنظر والدین دارای ارزش خاصی است، در بیماریهای وابسته به جنس اهمیت خاصی دارد. در توارث وابسته به جنس، ژن یا ژنهای بیماری زا به روی کروموزوم X و Y قرار دارد وبه علت اینکه صفات وابسته به کروموزوم Y خیلی نادر هستند، غالبا صفات وابسته به کروموزوم X[1] را مترادف یا وابسته به جنس به کار می برند (۱). همچنین شناسایی جنس جنین در قبل از لانه گزینی در بیماریهای وابسته به X مغلوب کاربرد دارد. این بیماریها فقط جنین نر را درگیر کرده و ژن این بیماری روی کروموزومX وفقط از مادر به ارث می رسد. تعیین جنسیت مرحله مهم در تستهای دادگاهی (پزشکی قانونی) می باشد؛ مخصوصا در شناسایی افراد سوخته و لاشه پوسیده یا قسمتهایی از آن و همچنین برای تعیین جنسیت قاتل و یا اشخاص زخمی و خونهای خشک و... کاربرد فراوان دارد (۱، ۲). تعیین جنسیت در بقایای انسان در کارهای باستان شناسی در جمعیتهای گذشته کاربرد فراوان دارد، چون نقش مهمی در دوباره سازی ساختار اجتماعی جوامع گذشته دارد (۳، ۴).

روشهای مختلفی برای تعیین جنسیت وجود دارد که عبارتند از : الف)تعیین جنسیت با استفاده از کاریوتیپ، که در نرها به صورت XY و۴۶ و در ماده ها XX و۴۶ میباشد. ب)تعیین جنسیت با استفاده از جسم Y(Y-body)، که بعد از رنگ آمیزی سلولهای مرد با ترکیبات کیناکرین و مطالعه آنها با نور فلورسانت، در داخل هسته سلول نقطه ای براق دیده می شود که قسمتهای درخشان معادل بازوهای بلند کروموزوم Y می باشد (۱). ج) تعیین جنسیت با استفاده از جسم بار، که یکی از کروموزومهای X غیر فعال در خانمها می باشد که در کنار هسته قرار دارد و تعداد آن برابر با nx-1 می باشد. بنابراین مرد طبیعی فاقد کروماتین جنسی می باشد. د) روشهای مولکولی تعیین جنسیت مثل روش هیبریداسیون در جا[2] که در مقایسه با روش واکنش زنجیره ای پلیمر از (PCR)[3] از حساسیت کمی بر خوردار است (۵، ۶).

روشی که بیشتر برای تعیین جنسیت استفاده می شود واکنش زنجیره ای پلیمراز یا PCR می باشد که DNA را بین سکانس دو پرایمر تکثیر می کند تا نمونه مورد نظر به یک سطحی برسد که قابل مشاهده و انجام آنالیز ژنتیکی می باشد (۲). برای تعیین جنسیت می توانیم از سکانس یا سکانسهای که روی کروموزوم X و هم Y ویا منحصرا روی کروموزوم Y قرار دارد، استفاده کنیم. برای مثال می توان از ژنهایی مثل استروئید سولفاتاز، ژن آمیلوژنین، لوکوسهای ZFX و ZFY و... که هم روی کروموزوم X و Y قرار دارد و یا از لوکوسهای SRY،DYS14،DYZ1 و... که فقط روی کروموزوم Y قرار دارد استفاده کرد (۱۵-۷).

ژن آمیلوژنین یکی از دو کلاس پروتئین تشکیل دهنده ماتریکس مینای دندان را کد می کند. مینای دندان خارجی ترین پوشش دندانها و سخت ترین بافت در بدن مهرداران می باشد. در انسان ژن آمیلوژنین بر خلاف موش که فقط روی کروموزوم X قرار دارد، هم روی کروموزوم X (در ناحیه distal بازوی کوتاه کروموزوم X در ناحیه P22.3→(P22.1 و هم روی کروموزوم Y(در ناحیه proximal بازوی کوتاه در ناحیه YP11) قرار دارد (۳، ۱۱، ۱۶، ۱۷، ۱۸).

در این مطالعه جنسیت با استفاده از ژن آمیلوژن به روش Nested-PCR تعیین شد.

مواد و روشها

ابتدا سیستم با استفاده از خون ۸ فرد مذکر و ۸ فرد مونث، بهینه (optimize) گشت. سکانس پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است. در مرحله بعد ۷۴ نمونه از پرزهای کوریونیک(CV)[4] از مادرانی که در هفته های ۱۲-۹ بارداری بودند جمع آوری شد و

1. X – linked
2. In situ Hybridization
3. Polymerase Chain Reaction
4. Chorionic Villi

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

سپس در زیر میکروسکوپ استریو (لوپ)، از نمونه های مادری جدا شد. و چند تکه از CV (حدود ۳۰-۵ mg) در یک میکروتیوب گذاشته شد و به آن ۳۰۰ میکرو لیتر تریپسین ۰/۵٪ اضافه گردید. بعد از ورتکس و سانتریفیوژ و جدا کردن تریپسین، به آن ۱۰۰ میکرو لیتر سود ۵۰ میلی مولار اضافه گردید. بعد از ورتکس، تیوبها به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب جوش (۱۰۰ درجه سانتی گراد) قرار داده شد؛ سپس به آن تریس Hcl یک مولار با PH=۷/۵ اضافه و بعد از سانتریفیوژ، از مایع روئی به عنوان الگو[1] استفاده شد (هر ۵ میکرو لیتر از مایع روئی حاوی حدوداً یک میکروگرم DNA ژنومیک در یک میلی لیتر می باشد).

جدول شماره ۱ـ سکانس پرایمرهای استفاده شده در تعیین جنسیت به روش Nested-PCR با استفاده از ژن آمیلوژنین

پرایمر[2]	۵' →	خارجی	← ۳'
فوروارد[3]		CTG.ATG.GTT.GGC.TCA.AGC.CTG.TG	
رورس[4]		TAA.AGA.GAT.TCA.TTA.ACT.TGA.CTG	
پرایمر	۵' →	داخلی	← ۳'
فوروارد		TCC.TCC.TAA.ATA.TGC.C(T/C)G.TA	
رورس		AGA.AAA.(C/T)CT.TGC.CTC.A(G/A)A.(T/A)T	

برای تکثیر قطعه DNA مورد نظر از روش تغییر یافته PCR به نام Nested- PCR که دارای دو راند می باشد استفاده گردید. حجم کلی واکنش که PCR در آن انجام شد ۲۵ میکرولیتر بود. اجزاء، مقادیر و پارامترهابه صورت زیر بود:

۱)	بافر PCR (۱۰X)	۲/۵ µl
۲)	کلرید منیزیوم (۵۰ mM)	۰/۷۵ µl
۳)	دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ mM)	۰/۵ µl
۴)	فوروارد پرایمر (خارجی)	۱/۲۵ µl
۵)	رورس پرایمر (خارجی)	۱/۲۵ µl
۶)	Taq پلیمراز	۰/۲۵ µl
۷)	آب دو باتر تقطیر استریل	۱۳/۵ µl
۸)	DNA هدف	۵ µl

۳ دقیقه ۹۴ °C

۳۰ سیکل →
- ۱ دقیقه ۹۴ °C
- ۴۰ ثانیه ۵۶ °C
- ۱ دقیقه ۷۲ °C

۵ دقیقه ۷۲ °C

سپس از محصولات راند اول، به مقدار ۵ میکرو لیتر با رقت $۱۰^{-۲}$ به عنوان الگو در راند دوم، ولی با پرایمرهای داخلی (inner)، استفاده گردید. پارامترها به صورت زیر بود:

۲۰ سیکل →
- ۳ دقیقه ۹۴ °C
- ۴۰ ثانیه ۴۸ °C
- ۴۰ ثانیه ۷۲ °C

۵ دقیقه 72 °C

سپس جذب نوری DNAاستخراج شده در مرحله قبل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نا نومتر تعیین گردید. با علم به اینکه OD = 1 معادل ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر DNA دو رشته ای می باشد و با فرض اینکه DNA بدست آمده از یک سلول دیپلوئید ۱۰ پیکوگرم است، تعداد سلولها در سوپ بدست آمده از استخراج در مرحله قبل تعیین شد. با رقتهای متوالی[5] به DNA حاصل از یک سلول رسیدیم و با افزایش تعداد سیکلها در PCR (۴۰ سیکل در راند دوم)، حساسیت تا تکثیر یک سلول افزایش یافت. برای تائید کار در مرحله بعد، از سه تخمک لقاح نیافته

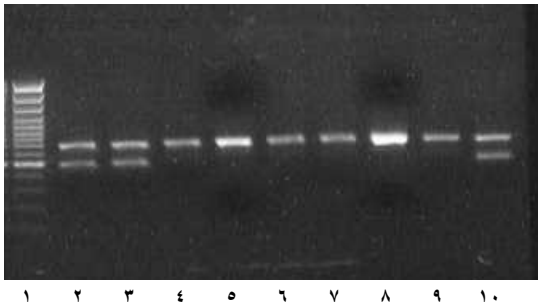
1. Template
2. Primer
3. Forward
4. Reverse
5. Serial Dilution

(سلولهای هاپلوئید) و همچنین یک تخمک لقاح یافته ولی تقسیم نشده (سلول دیپلوئید) استفاده شد، که در نتیجه این سیستم قادر به توانایی تکثیر یک سلول هاپلوئید بود. در ادامه تحقیق، جنینهای انسانی که در مراحل مختلف سلولی بودند (جنین ۴-۲ سلولی، جنین ۸-۴ سلولی و جنین ۱۶-۸ سلولی و...) جمع آوری شدند؛ سپس DNA آنها با یک بار فریز کردن در ۲۰- درجه سانتیگراد و سپس جوشاندن در ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، استخراج شد وتکثیر قطعه DNA مورد نظر با روشی که در قسمت قبل آمده صورت گرفت.

در نهایت محصولات راند دوم روی ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز شدند.بعد از انجام الکتروفورز قطعه ۴۸۴ جفت بازی ویژه کروموزوم Y و همچنین قطعه ۶۷۲ جفت بازی ویژه کروموزم X در یک نمونه، نشان دهنده جنسیت مذکر و مشاهده فقط باند ۶۷۲ جفت بازی ویژه کروموزوم X در یک نمونه نشان دهنده جنسیت مونث بود. اختلاف اندازه به دلیل حذف ۱۸۹ جفت بازی در اینترون شماره ۳ از کروموزوم Y می باشد (۱۹).

یافته ها

برای تحلیل یافته ها از آزمون Z فیشر استفاده شده، نتایج PCR ۱۶ فرد داوطلب دهنده خون، با جنسیت آنها کاملا مطابقت داشت. از تعداد ۷۴ نمونه CV، ۳۲ جنین مذکر و تعداد ۴۲ جنین مونث بودند. در مرحله بعد فقط موفق به ارتباط با ۴۰ خانواده از جنینها شدیم که نتایج PCR آنها با جنسیت نمونه ها بعد از تولد یکسان بود($P<0.001$). شکل شماره ۱ نشان دهنده جنسیت چند نمونه بعد از انجام الکتروفورز بر روی ژل آگاروز می باشد.



شکل شماره ۱ـ جنسیت چند نمونه پس از انجام الکتروفورز برروی ژل آگار(۲،۳و۱۰ مذکر و ۴ تا ۸ مونث)

همچنین بعد از افزایش حساسیت سیستم تا تکثیر DNA حاصل از یک سلول، از تعداد ۱۶ نمونه جنینی که در مراحل مختلف سلولی بودند، جنسیت ۱۳ جنین تعیین شد (۱۸/۲۵٪) و همچنین برای تائید توانایی تکثیر یک سلول در این سیستم، روی ۳ تخمک لقاح نیافته (سلول n کروموزومی)، و همچنین یک تخمک بارور شده ولی تقسیم نشده (سلول 2n کروموزومی) کار شد که از این ۴ نمونه، ۳ نمونه تعیین جنسیت شدند (۷۵ ٪).

بحث

هدف اصلی تشخیص قبل از زایمان، تشخیصهای ژنتیکی و همچنین ارائه اطلاعات به خانواده های در معرض خطر، یا مطلع ساختن آنها و انتخاب در طی بارداری یا در مرحله IVF می باشد (۲۰). در نتیجه، تعیین جنسیت جنین در قبل از زایمان و حتی قبل از لانه گزینی در IVF مرحله مهم و تعیین کننده ای است.

تکنیکهای تهاجمی و غیر تهاجمی مختلفی برای نمونه برداری از جنین وجود دارد (۲۱،۲۲).

اخیرا نشان داده شده که DNA سلولهای جنینی در سرم یا پلاسمای مادری وجود دارد و منبع مفیدی برای تشخیص های غیر تهاجمی قبل از زایمان در برخی از ناهنجاریهای ژنتیکی می باشد. ردیابی DNA جنینی در پلاسما یا سرم مادری ساده تر و قوی تر از ردیابی سلولهای مجتمع جنینی در خون مادر می باشد چون احتیاج به غنی سازی از قبل ندارد (۲۱، ۲۳، ۲۴، ۲۵).

نمونه برداری از پرزهای کوریونیک تکنیکی است که به تازگی برای بدست آوردن موثر و ایمن بافت زنده تروفوبلاست برای تشخیص ژنتیکی در سه ماهه اول بارداری توسعه یافته است. نمونه برداری از پرزهای کوریون بین هفته ۱۲-۹ حاملگی خیلی زودتر از هفته ۱۵ در مورد آمینوسنتزیس می باشد. در نتیجه امکان سقط درمانی با کمترین آسیب به احساسات مادر

و کمترین خطر فیزیکی برای مادر امکان پذیر است (۲۶، ۲۷، ۲۸).

امروزه روشهای مولکولی برای تعیین جنسیت، جایگاه رفیع و بسیار مهمی دارد. تکنیک دورگه سازی در محل بر خلاف PCR از حساسیت کمی برخوردار است. واکنش زنجیره ای پلی مراز یا PCR یک قطعه DNA را بین دو سکانس پرایمر تکثیر می کند و معمولا این روش طوری طراحی شده که فقط اجازه انتخابی تکثیر به یک سکانس هدف ویژه روی DNA را در داخل مجموعه ای از سکانسهای ناجور DNA میدهد (۲، ۱۴). Nested-PCR روش تغییر یافته PCR می باشد که از دو جفت پرایمر در دو راند یا مرحله استفاده می کند که جفت دوم در دل جفت اول جای می گیرد و از محصولات راند اول به عنوان الگو در راند دوم استفاده می شود. این روند اغلب موفق است، چون اگر فرآورده صحیح در دور اول کمتر از مقداری با شد که به وسیله اتیدیوم برماید و ژل قابل آشکارسازی باشد، در راند دوم می توان محصول کافی برای آنالیز بدست آورد. از مزایای این تکنیک می توان به حساسیت بالای آن اشاره نمود که به دلیل وجود دو راند از حساسیت بالای برخوردار است. همچنین به دلیل استفاده از پرایمرهای داخلی در راند دوم، این روش از ویژگی بسیار بالای برخوردار است و مزیت دیگر این روش، رقیق شدن ممانعت کننده ها به دلیل انتقال محصول راند اول به راند دوم است. برای تعیین جنسیت می توانیم از سکانسها یا ژنهای که هم روی کروموزوم X و هم روی کروموزوم Y و یا اینکه منحصرا روی کروموزوم Y قرار دارند، استفاده کرد. معمولا از ژنهای استروئید سولفاتاز (۲۹)، ژن آمیلوژنین (۱، ۲، ۳، ۴، ۱۶، ۳۰، ۳۱، ۳۲)، لوکوسهای همولوگ ZFX، ZFY (۳۳، ۳۴) که روی هم کروموزومهای X و Y هستند و یا از لکوسهای DYZ1 (۱، ۲)، تکرارهای آلفوید که در ناحیه سانترومریک کروموزوم Y قرار دارند (۸)، ژن SRY (۷، ۱۰، ۳۵)، و لوکوس DYZ14 (۹) که منحصرا روی کروموزوم Y قرار دارند، استفاده می کنند.

ژن آمیلوژنین هم روی کروموزوم X و هم روی کروموزوم Y قرار داشته و شدیدا حفاظت شده است. این دو ژن همولوژی قابل ملاحظه ای با همدیگر دارند (۱۱) منتها اختلاف اصلی در حذف ۱۸۹ جفت بازی در اینترون شماره ۳ در ژنی که روی کروموزوم Y قرار دارد می باشد (۳۱). در نتیجه بعد از انجام PCR با یک جفت پرایمر دو محصول با اندازه متفاوت داریم و بر خلاف ژنهای دیگر احتیاج به مراحل بعدی مثل برش با آنزیمهای تحدیدی نمی باشد. از مزایای دیگر استفاده از این ژن، این می باشد که احتیاج به ژن دیگری به عنوان کنترل سیستم داخلی[1] سیستم نمی باشد، چون این سیستم واجد یک کنترل مثبت داخلی می باشد. حضور باند اختصاصی X نشان دهنده موفقیت روش و حضور باند اختصاصی Y نشان دهنده جنسیت مذکر می باشد (۱).

کاربرد دیگر تعیین جنسیت در بیماریهای ژنتیکی قبل از لانه گزینی واکسیناسیون لقاح آزمایشگاهی (IVF)[2] می باشد. بدین صورت که با تعیین جنسیت جنین در بیماریهای ژنتیکی مغلوب وابسته به X فقط جنینهای ماده به رحم مادر منتقل می شوند تا از خاتمه بارداری متعاقب تشخیص با روشهای رایج در مراحل بعد جلوگیری شود. برای زوجهای در خطر مخصوصا آنهایی که یک یا چند فرزند بیمار دارند، تشخیص قبل از لانه گزینی، یک روش با ارزش برای آنها می باشد (۳۶، ۳۷). چندین مذهب از قبیل یهودیت و اسلام مخالف سقط در مراحل بعد از باروری هستند اما هیچ اعتراضی نسبت به تشخیص قبل از لانه گزینی ندارند؛ زیرا آنها معتقدند که بارداری وقتی ایجاد می شود که مادر حرکت جنین را احساس کند (۳۶).

در تعیین جنسیت بلاستومرهای بیوپسی شده در IVF، DNA های خارجی از اسپرم یا سلولهای مجتمع مادری، منابع

1. Internal contron
2. In Vitro Fertilization

بالقوه آلودگی هستند و قبل از انجام استخراج DNA و PCR، باید سلولهای مادری جدا شده و همچنین جنین چندین بار شسته، و برای رفع آلودگی با اسپرم، تخمکها باید به روش تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)[1] بارور شوند (۱۴). برای استخراج DNA از بلاستومرهای بیوپسی شده روشهای مختلفی وجود دارد. استخراج DNA به طریقه KOH روش موثرتری می باشد به دلیل اینکه محلول قلیائی باعث هیدرولیز RNA می شود و دی تیوترینیتول (DTT)[2] باعث شکسته شدن باند های دی سولفیدی در پروتئینها می شود که در نتیجه پروتئینها از DNA جدا شده و DNA در دسترس آنزیم Taq پلیمراز قرار می گیرد، همچنین می توان DNA جنینی را با یک بار فریز کردن جنین در 20- ºC و تشکیل بلورهای یخ که باعث پاره شدن غشاء سلولها می شود و جوشاندن در ۱۰۰ درجه سانتی گراد انجام داد، همچنین این روش احتیاج به ساخت محلولها و بافرهای خاصی ندارد و سریع و کم هزینه می باشد. در هنگام PCR برای جلوگیری از تکثیر ترجیحی یا تکثیر فقط یک الل، می توان از بافر لیز کننده استفاده کرد و یا اینکه دمای اولیه جدا شدن دو رشته DNA را در سیکل اول و یا چند سیکل اول که باعث کاهش ADO[3] می شود، افزایش داد (۳۰، ۳۸).

تقدیر و تشکر:

با تشکر از مدیریت محترم و کلیه پرسنل شرکت سیناژن، بخصوص دپارتمان بیولوژی مولکولی،خانم مقدم کارشناس بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور تهران، خانمها نگارش و آذرپور کارشناسان بخش IVF مرکز پزشکی صارم، آقای شیخی کارشناس جنین شناسی مرکز درمان ناباروری و ناتوانی جنسی که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند.

References

1. Akane A, Seki S, Shiono H, Hiroaki N, Hasegawa M, Kagawa M, et al. Sex determination of forencic sample by dual PCR amplification of X-Y homologus gene. Forinsic Scince International, 1992; 52: 143-148
2. Akane A, Shiono H, Matsubara, K, Nakahori Y, Seki S, Nagafuchi S, et al. Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR) : two alternative methods. Forinsic Science International, 1991; 49: 81-88
3. Sivagami AV, Rao AR, Varshney U. A simple and cost- effective method for preparing DNA from the hard tooth tissue, and its use in polymares chain reaction amplifiction of amelogenin gene segment for sex determination in an Indian poplution. Forinsic science international, 2000; 110: 107-115
4. Faerman M, Filon D, Kahila G, Greenblatt, CL, Smith P, Oppenheim A. Sex identification of archaeological human remain based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. Gene, 1995; 167: 327-332

1. Intracytoplasmic Sperm Injection
2. Dithiothreitol
3. Allele Dropout

5. Coonen E, Dumoulin JCM, Ramaekers F, Hopman AHN. Optimal preparation of preimplantation embryo interphase nuclei for analysis by fluorescence in-situ hybridization. Human Reproduction, 1994; 9(3): 533-537
6. Lewis R. Human genetics, 1999
7. Griffith R, Tiwari B. The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. Proc. Natl. Sci, 1993; 90: 8324-8326
8. Kontogianni EH, Griffin DK, Handyside, AH. Identifying the sex of human preimplantation embryos in X-linked disease: Amplification efficincy of a Y-specific alphoid repeat from single blastomer with two lysis protocols." Journal of assisted reproduction and genetics, 1996; 13(2): 125-132
9. Lagona F, Smid M, P apsergio N, Ferrari M, Cremonesi L. Multiple testing in fetal gender determination from maternal blood by polymerase chain reaction. Hum Genet, 1992; 102: 687-690
10. Palmirotto G, Joris H, Devroey P, Van Steirtechem AC. Pregnancy after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyt. Lance 1992; 340: 17-18
11. Salido EC, Yen PH, Koprivniar K, Chung L, Shapiro LJ. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y choromosomes. Am J Hum Genet, 1992; 50: 303-316
12. Snabes MC, Chong SS, Subramanian B, Kristjansson K, Disepio D, Hughes MR. Preimplantation single-cell analysis of multiple genetic loci by whole-genome amplification. Proc. Natl. Acad. Sci, 1994; 91: 61-6185
13. Thomas MR, Williamson R, Craft I, Rodeck CH. The time of appearance, and quantitation, of fetal DNA in the maternal circulation. Annals New York academy of science, 1996: 217-224
14. Welis D, Sherlock JK. Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. Prenat. Diagn, 1998; 18: 1389-1401
15. Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubret R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell : Implication for genetic analysis. Proc. Natl. Acad. Sci, 1992; 89: 5847- 5851
16. Buel E, Wang G, Schwartz M. PCR amplification of animal DNA with human X-Y amilogenin primers used in gender determination. Journal of Forinsic Science 1995; 40(4): 641-644
17. Lafountain M, Schwartz M, Cormier J, Buel E. Validation of capillary electrophoresis for analysis of the X-Y homologues amelogenin gene. Journal of Forinsic, 1998; 43(6): 1188-1194
18. Lau EC, Mohandas TK, Shapiro LJ, Slavkin HC, Snead ML. Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosome. Genomic, 1989; 4: 162-168
19. Hart PS, hart TC, Simmer GP, and Wright JT. Anomeenclature for X-linked amelogenesis imperfecta. Arch. Oral boil, 2000; 47(4): 255-260
20. Jorde LB, Cary JC, Bamshad MJ, White RL. Medical genetics, 1999; PP: 275-282
21. Lo YMD. Detection of single copy fetal DNA sequcnce from maternal blood. Lancet 1990; 335: 768-775
22. Lo YMD, Wainscoat JS, Gillmer MDG, Patel P, Sampitro M, Fleming KA. Prenatal sex determination by DNA

amplification from maternal prepheral blood. Lancet 1989: 1363-1364
23. Lo YMD. Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic application. Clinical chemistry 2000; 46(12): 1903-1906
24. Lo YMD, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AMZ, Hjelm NM, et al. Increased fetal DNA concentration in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. Clinical chemistry, 1999; 45(10): 1741-1751
25. Smid M, Lagona F, De benassuti L, Ferrari A, Ferrari M, Cremonesi L. Evaluation of different approchs for fetal DNA analysis from maternal plasma and nucleated blood cell. Clinical chemistry, 1999; 45(8): 1570-1572
26. Behrman MC, Cohen HL. Diagnostic medical sonography obstetric and gynecology, 1997: 579-591
27. Brambati B, Terzian E, Tonogoni G. Randomized clinical trail of transabdominal versus transcervical chorionic villus sampling method. Prenat. Diagn, 1991; 11: 285-293
28. Fortuny A, Borrell A, Soler A, Casals E, Costa D, Carrio A, et al. Chorionic villus sampling by biopsy forceps. Result of procedures from a single center. Prenat Diagn, 1995; 15: 541-550
29. Liu J, Lissens W, Devroey P, Steirteghem A.V, Libaers I. Amplification of X and Y-chromosome specific region from single human blastomers by polymerase chain reaction for sexing of preimplantation embryos. Human reproduction, 1994; 9(4): 716-720
30. Findlay I, Quirke P. Flurescent polymerase chain reaction: part 1. Anew method allowing genetic diagnosis and DNA finger printing of single cells. Human Reproduction, 1996; 2(2): 137-152
31. Nakagome Y, Seki S, Nagafuchi S, Nakahori Y, Sato K. Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homolougs primer. American journal of medical genetics, 1991; 39: 472- 473
32. Strom CM, Rechitsky S. Use of nested PCR to identify charred human remains and minute amounts of blood. Journal of Forinsic science 1998; 43 (3): 696-700
33. Jobling MA, Tyler-Smith C. New uses for new haplotypes the human Y-chromosome, disease and selection. TIG 2000; 16(8): 357-362
34. Stacks B, Witte MW. Sex determination of dried blood stain using the polymerase chain reaction (PCR) with homologous x-y primers of the zinc finger protein gene. Journal of forensic scince, 1996; 41(2): 287-290
35. Massari A, Novelli G, Colosimo A, Sangiuolo F, Palka G, Calabrese G, and et al. Non-invasive early prenatal molecular diagnosis using retrieved transcervical trophoblast cells. Hum. Gen, 1996; 97: 150-155
36. Handyside AH, Delhanty JDA. Preimplantation genetic diagnosis: strategies and surprise. TIG, 1997; 13(7): 270-275
37. Ray P, Ao A, Taylor DM, Winston RML, Handyside AH. Assessment of the reliability of single blastomer analysis for preimplantation diagnosis of the ΔF508 deletion casuing cyctic fibrosis in clinical practice. Prenat. Diagn, 1998; 18: 1402-1412
38. Harper JC. Preimplantation diagnosis of in herited disease by embryobiopsy: an update of the world figures. Journal of assisted reproduction and genetics, 1996; 13(2): 90-95