

## Koyunlarda Maternal Plazmadan Fötal Cinsiyet Tayininde Fenol-Kloroform İzolasyon Metodu İle İki Farklı Ticari İzolasyon Kitinin Kullanılabilirliği

Mehmet Salih KAYA<sup>1\*</sup>, Faruk BOZKAYA<sup>2</sup>, Mehmet KÖSE<sup>3</sup>, Şükrü DURSUN<sup>4</sup>, Mesut KIRBAŞ<sup>5</sup>, Bülent BÜLBÜL<sup>5</sup>, Nurettin AYDİLEK<sup>1</sup>, Tahir BAYRIL<sup>6</sup>, Mehmet Osman ATLI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye.

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>3</sup>Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye.

<sup>4</sup>Aksaray Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Aksaray, Türkiye.

<sup>5</sup>Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Konya, Türkiye.

<sup>6</sup>Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Zootehni Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye.

Geliş Tarihi:31.03.2016

Kabul Tarihi: 25.04.2016

**Özet:** Koyunlarda fötal cinsiyetin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biri maternal plazmadaki fötal DNA'ların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmasına dayanır. Ancak, maternal plazmadan izole edilen DNA miktarı ve kalitesi, kullanılan DNA izolasyon yöntemine göre önemli ölçüde değişebilmektedir. Bu çalışmada, üç farklı DNA izolasyon metoduyla koyun maternal plazmasından izole edilen DNA'ların PZR ile çoğaltılarak fötüs cinsiyetlerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, gebeliğin 20. haftasındaki 13 adet koyundan plazma örnekleri alındı ve doğum sonrası yavruların cinsiyetleri doğrulandı. Pozitif kontrol amacıyla iki adet koç plazması, negatif kontrol amacıyla ise iki adet gebe olmayan koyun plazması kullanıldı. Maternal plazmadan fenol-kloroform izolasyon metodu ve iki farklı ticari nükleik asit izolasyon kiti (QIAamp ve FitAmp) kullanılarak DNA izole edildi. İzole edilen DNA örneklerinden X ve Y kromozomları üzerindeki Amelogenin ve SRY (Sex-determining Region Y) genlerinin hedef bölgeleri PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Ticari nükleik asit izolasyon kitleriyle elde edilen DNA'lardan SRY ve Amelogenin primerleri ile yapılan farklı PZR işlemlerinde fötüs cinsiyetinin belirlenmesine yönelik spesifik PZR ürünleri elde edilemedi. Diğer taraftan, fenol-kloroform izolasyon metoduyla izole edilen DNA örneklerinden 10'unda (7 erkek ve 3 dişi fötal DNA içeren örnekte) fötüs cinsiyeti doğru bir şekilde teşhis edildi (10/13). Ancak erkek fötüs taşıyan üç koyundan elde edilen DNA örneklerinden erkek cinsiyet teşhisine özgü PZR ürünleri elde edilemedi (3/13). Çalışmanın sonuçları koyunlarda maternal plazmadan DNA izolasyonunda iki farklı ticari nükleik asit izolasyon kiti kullanıldığında fötal cinsiyetin tespit edilemediğini, diğer taraftan fenol-kloroform izolasyon metodu ile fötal cinsiyet teşhisi yapılabildiğini, ancak bu metodun da hatalı sonuçlara neden olabildiğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Fötal cinsiyet tayini, maternal plazma, nükleik asit izolasyonu, koyun

### Suitability of Two Different Commercial Isolation Kits and Phenol-Chloroform Isolation Method for Fetal Sex Determination from Maternal Plasma in Sheep

**Abstract:** One of the methods used for determining fetal sex in sheep depends on amplification of fetal DNA in maternal plasma by polymerase chain reaction (PCR). However, quantity and quality of the DNA isolated from the maternal blood plasma can vary significantly depending on the DNA isolation method used. In this study aimed to determine fetal sex in maternal blood plasma by using three different DNA isolation methods. Plasma samples were collected from 13 ewes at 20<sup>th</sup> week of pregnancy and the genders of the fetuses were confirmed after birth. Plasma samples were collected from two rams as positive control and from two non-pregnant ewes as negative control. Free circulating DNA in maternal plasma samples was isolated by using phenol-chloroform isolation method and two different commercial DNA isolation kits (QIAamp and FitAmp). The obtained free circulating DNA was used for amplifying the target regions of X- and Y-chromosome specific Amelogenin and SRY (Sex-determining Region Y) genes, respectively. Commercial isolation kits did not yield a PCR product of SRY or Amelogenin genes. On the other hand, the fetal sex correctly identified in 10 DNA samples (in three female and seven male fetal DNA including samples) isolated by using phenol-chloroform isolation method (10/13). However, in three samples including male fetal DNA fetal sex were incorrectly identified (3/13), because male sex specific PCR products were not obtained. The results of the study suggested that detection of fetal sex in sheep could not be achieved when two different commercial DNA isolation kits were used for DNA isolation from maternal plasma while phenol-chloroform isolation method was successful for this purpose, although incorrect results could also be obtained when this method was used.

**Keywords:** Fetal sex determination, maternal plasma, nucleic acid isolation, sheep

### Giriş

Hayvancılık sektöründe fötal cinsiyetin belirlenmesinde geleneksel olarak transrektal

ultrasonografi metodu kullanılmaktadır (Coubrough ve Castell, 1998; De Freitas Neto ve

ark., 2010). Bununla beraber, hem oldukça detaylı bir muayene gerektirdiğinden zaman alıcı, hem de yüksek çözünürlükte ultrasonografi cihazlarına ihtiyaç duyduğundan maliyetli olması fetal cinsiyet tespitinde ultrasonografi yönteminin kullanılmasını sınırlandırmaktadır (Darin ve ark., 2009). Günümüzde üretim ve seleksiyon programlarında kapsamlı ve verimli sonuçlar alabilmek, sürüdeki genetik kazancı arttırmak ve soy testi maliyetini azaltmak için güvenilir ve düşük maliyetli bir fetal cinsiyet tayin stratejisi geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Chan ve ark., 2004; Resende ve ark., 2008).

Polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) dayalı maternal plazmadan izole edilen fetal DNA kullanılarak gerçekleştirilen moleküler cinsiyet tayini güvenilir, hassas ve pratik bir alternatif metot olarak bildirilmektedir (Breveglieri ve ark., 2016; Saberivand ve Ahsan, 2016; Kadivar ve ark., 2015). İnsanlarda maternal plazmada PZR işleminde kalıp olarak kullanılacak yeterli miktar ve kalitede serbest fetal DNA'nın mevcut olduğu ilk defa 1997 yılında yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (Lo ve ark., 1997). Gebelik esnasında maternal ve fetal dolaşım plasental membranlarla ayrılır. Bununla beraber, fetal dokuların gelişimine bağlı olarak ortaya çıkan düzenli apoptozis ve immünolojik veya fiziksel hasarlar sonucu oluşan hücre parçalanması sonucu açığa çıkan fetal DNA parçaları plasental membranlardan maternal dolaşıma geçer. Diğer taraftan çekirdekli fetal hücrelerin plasenta bariyeri boyunca annenin periferik dolaşımına geçtiği iyi bilinen bir olgudur. Böylece gebelik sırasında maternal plazmada fetal DNA bulunur. Bu fetal DNA doğumdan sonra hızla uzaklaştırılır (Lo ve ark., 1998). Gebelik sırasında gebe kadın plazmasındaki DNA'nın ortalama %10'unun fetal kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Lun ve ark., 2008). Bu sayede maternal plazmadaki Y kromozomunun spesifik dizilerinin analizi ve DNA çoğaltılmasıyla fetal cinsiyet tayini yapılabilir (Akolekar ve ark., 2010; Finning ve Chitty, 2008). Cinsiyet esas olarak Y kromozom varlığı ya da yokluğu ile belirlenir. Y kromozomu üzerindeki cinsiyet belirleyici gen (Sex-determining Region Y, SRY) eksprese edildiğinde, erkek gelişimi baskınken, SRY'nin yokluğunda gonadal gelişim kontrolünde dişi yolaklar hakimdir (Han ve ark., 2010; Piprek, 2010). Memelilerde SRY geninin tek bir kopyası bulunur ve bu gen koyunlarda maternal plazmadaki fetal DNA'ya dayanılarak fetal cinsiyetin belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Saberivand ve Ahsan, 2016; Breveglieri ve ark., 2016; Kadivar ve ark., 2013). Ancak deneysel hatalar negatif sonuçlara yol açabileceğinden sadece Y kromozomundaki spesifik dizilerin analiz sonuçlarına göre değerlendirme yapmak hatalı sonuçlar ortaya çıkarabilir. Bu

yüzden X ve Y kromozomlarının her ikisindeki spesifik dizilerin analizi daha doğru sonuçlar verebilmektedir (Pfeiffer ve Brenig, 2005). X ve Y kromozomunun her ikisinde de bulunan Amelogenin (AMEL) geni insanlarda (Sullivan ve ark., 1993), sığırlarda (Ennis ve Gallagher, 1994) ve koyunlarda (Saberivand ve Ahsan, 2016; Kadivar ve ark., 2015; Pfeiffer ve Brenig, 2005) fetal cinsiyeti tespit etmede kullanılmıştır. Non-invaziv prenatal tanının önemli avantajları olmasına rağmen maternal plazmada serbest dolaşan toplam fetal DNA miktarlarının farklı durumlarda değişiklik göstermesi ve düşük miktarlarda bulunması önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bu yüzden maternal plazmadan fetal DNA izolasyonu non-invaziv prenatal tanıda kritik bir basamak olup yüksek kalite ve miktarda fetal DNA eldesinin sonuçların güvenilirliğini arttırdığı bildirilmektedir (Clausen ve ark., 2007; Lo ve ark., 1997).

Maternal plazmadan fetal DNA izolasyonu amacıyla silika jel teknolojisi kullanan hazır ticari nükleik asit izolasyon kitleri olduğu gibi bu amaç için fenol-kloroform izolasyon metodu gibi geleneksel metotlar da kullanılabilir. Ancak bu konuda üzerinde uzlaşmış herhangi bir standart metot bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı; koyunlarda maternal plazmadan fetal cinsiyet tayininde silika jel teknolojisi kullanan iki farklı ticari nükleik asit izolasyon kiti ile geleneksel fenol-kloroform izolasyon metodunun kullanılabilirliğini araştırmaktır.

## Materyal ve Metot

### Kan Örneklerinin Toplanması ve Plazmaların Ayırılması:

Gebeliğin 20. haftasındaki 13 adet koyunun (n=13) vena jugularisinden EDTA'lı tüplere 10 ml kan örneği alındı. Doğumları takiben doğan yavruların cinsiyetleri kaydedildi. Ayrıca negatif kontrol amacıyla 2 adet gebe olmayan dişi koyundan, pozitif kontrol amacıyla da 2 adet koçtan kan örnekleri alındı. Kan örnekleri +4 °C'lik ortamda dondurulmadan laboratuara, ulaştırıldı ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Elde edilen plazmalar DNA izolasyonundan önce -20 °C'de derin dondurucuda saklandı.

### Maternal Plazmadan DNA İzolasyonu:

Plazma örneklerinden DNA izolasyonu iki farklı ticari kit (QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit ve FitAmp Plasma/Serum DNA Isolation Kit) ve fenol-kloroform izolasyon metodu kullanılarak gerçekleştirildi. QIAamp nükleik asit izolasyon kiti ile maternal plazmadan DNA izolasyonunda üretici

firmanın uygulama prosedürüne uygun olarak kolonlara her bir örnek için 3 farklı hacimde (1 mL, 2 mL ve 3 mL) plazma yüklenerek izole edilen DNA'lar, 20 µL nihai hacimdeki AVE tamponu ile ayrıştırıldı. FitAmp DNA izolasyon kiti ile maternal plazmadan DNA izolasyonunda yine üretici firmanın uygulama prosedürüne uygun olarak her bir örnek için 0.5 mL plazma kolonlara yüklenerek izole edilen DNA, 10 µL nihai hacimdeki FA4 tamponu ile ayrıştırıldı. Fenol-kloroform izolasyon metoduyla DNA izolasyonu için gebe ve kontrol gruplarındaki koyunlardan elde edilen 1mL plazma örneği üzerine 100 µL 10X Lizis çözeltisi (%10 SDS, 100 mM Tris (base), 10 mM (pH 8.0) EDTA) ve 20 µL Proteinaz-K eklendikten sonra 56 °C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra lizat üzerine 700 µL fenol ve 200 µL kloroform eklendi. İki dakika boyunca ters düz edilerek çalkalandıktan sonra 12000 rpm de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Üst kısmı, mümkün olduğunca çok miktarda, başka bir tüpe aktarıldı. Yeni tüpe aktarılan süpernatant üzerine 800 µL kloroform eklenip 1 dakika altüst edildikten sonra +4 °C'de 12000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısmı yeni bir tüpe aktarıldı. Yeni tüpe aktarılan süpernatant üzerine 1/10 oranında 3 M'lık Sodyum asetat çözeltisi eklenerek karıştırıldı. Üzerine toplam hacme eşit miktarda izopropanol eklendi. Bir gece boyunca -20 °C'de bekletildi. Ertesi gün 13000 rpm de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısmı döküldü ve pelet üzerine 1000 µL %70-75'lik soğuk etanol eklendi. 13000 rpm de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısmı dökülerek hafifçe santrifüj edildi ve dipte kalan etanol pipet ile uzaklaştırıldı. Oda sıcaklığında kuruyuncaya kadar tüplerin ağzı açık olarak bekletildi. Peletler 20 µL nükleaz içermeyen su içerisinde çözdürüldü. Her üç metod ile izole edilen çözeltideki toplam DNA miktarları 260 nm dalga boyundaki bir spektrofotometre yardımıyla (Nanodrop 2000c) ölçüldü. DNA'ların saflığı ise 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri arasındaki oran (260/280) ile değerlendirildi. Numuneler kullanılacağı zamana kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

#### *PZR Stratejisi*

Koyunlarda fotal cinsiyetin belirlenmesinde kullanılan hem X hem de Y kromozomu üzerinde yer alan Amelogenin gen bölgesine ait primer dizisi ile sadece Y kromozomu üzerinde yer alan SRY geninin gen bölgesine ait primer dizisi sırasıyla forward, 5'-CAGCCAAACCTCCCTCTGC-3'(SE47) ve reverse, 5'-CCCGCTGGTCTTGTCTGTTC-3'(SE48) (Ennis ve Gallagher 1994), ile forward, 5'-GCGCCATTCTTTGAGGAGGCA-3' ve reverse, 5'-TGTCAGCTGCTGTGATGCTCC -3' (Kadivar ve ark., 2013) şeklindeydi. PZR analizleri 2X Maxima SYBR Green qPCR Master Miks (ThermoFisher Scientific)

kullanılarak Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) cihazında gerçekleştirildi. PZR reaksiyonu için, her bir primerden 5 pmol, kalıp DNA'dan 3 µL, PZR master miksinden 12 µL alınıp nihai volümü 20 µL ye nükleaz içermeyen su ile tamamlandı. Kademeli sıcaklık düşürme PZR (Touchdown PCR) protokolü iki basamakta uygulandı. Birinci basamakta başlangıç denaturasyonu için 95 °C de 10 dak tutulduktan sonra 94 °C de 40 sn'lik denaturasyonu takiben primerlerin bağlanması 5 siklus boyunca her siklusta 1 derece azalacak şekilde 64-60 °C'de 35 sn, primerlerin uzaması ise 72 °C de 32 sn'de gerçekleştirildi. İkinci basamakta 30 siklus boyunca 94 °C'de 40 sn, 58 °C de 35 sn, 72 °C'de 32 sn uygulandı.

#### **Elektroforez ve Fotal Cinsiyetin Belirlenmesi:**

PZR ürünleri 0.5µg/mL etidyum bromid ile boyanarak %2'lik agaroz jelde 1.5 saat boyunca 10V/cm uniform elektrik alanında ayrıştırılarak transillüminatör üzerinde görüntülendi. Fötüs cinsiyetinin belirlenmesinde Y kromozomuna özgü SRY ve Amelogenin gen bölgelerinin varlığı esas alındı. Buna göre Y kromozomuna özgü gen bölgeleri içeren numunelerin erkek fötüse, gebe olduğu bilindiği halde Y kromozomuna özgü gen bölgeleri içermeyen numunelerin ise dolaylı olarak dişi fötüse sahip olduğu kabul edildi. Amelogenin lokusunun çoğaltılması erkeklerde 280 ve 217 bp de iki farklı ürün verirken, dişilerde 280 bp uzunluğunda tek ürün vermektedir. SRY lokusunun çoğaltılması sadece erkeklerde 286 bp de tek ürün vermektedir. Fötüs cinsiyetleri jel görüntülerinden elde edilen bulgular doğrultusunda değerlendirildi.

#### **Bulgular**

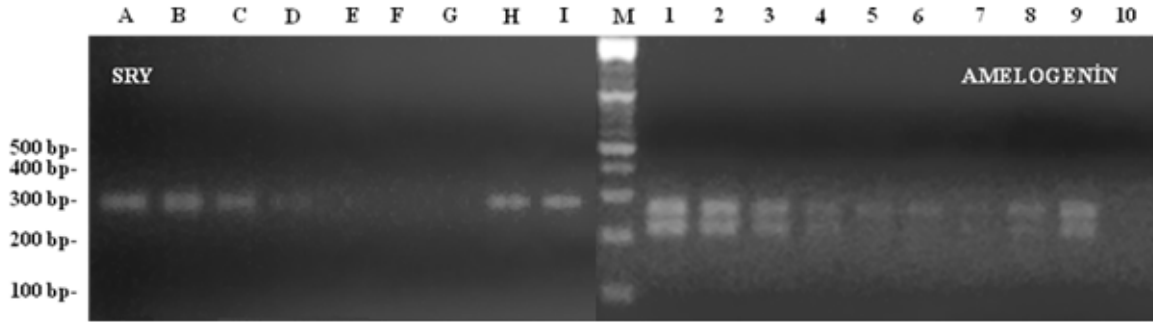
Farklı hacimlerdeki maternal plazma (1, 2 ve 3 mL) örneklerinden QIAamp ve FitAmp nükleik asit izolasyon kitleriyle elde edilen DNA örnekleri kullanıldığında SRY ve Amelogenin primerleri ile gerçekleştirilen PZR reaksiyonlarının hiçbirinde cinsiyet belirlenmesine yönelik fotal DNA kaynaklı spesifik ürünler elde edilemediğinden cinsiyet tespiti yapılamamıştır. Fenol-kloroform izolasyon metodu ile maternal plazmadan DNA izolasyonu gerçekleştirilerek SRY ve Amelogenin primerleri ile yapılan PZR reaksiyonları sonucu toplam 13 gebe koyundan 10'nunda fotal cinsiyet doğru bir şekilde tespit edilirken üç adet erkek fötüse sahip koyunun DNA örneklerinden erkek cinsiyet tespitine özgü PZR ürünleri elde edilemedi (Tablo 1). Buna göre; gebe olmayan koyunlar ile dişi fötüse sahip koyunların plazmalarından izole edilen DNA örneklerinden SRY primeri ile yapılan PZR

reaksiyonları sonucu elektroforez jel görüntülerinde herhangi bir bant elde edilmezken (3/3), koç ve erkek fötüse sahip koyun plazmalarından izole edilen örneklerin PZR reaksiyonları sonucu elektroforez jel görüntülerinde erkek cinsiyet teşhisine özgü 286 bp'lik tek bant elde edildi (7/10) (Şekil 1). Benzer şekilde, gebe olmayan koyunlar ile dişi fötüse sahip koyunların plazmalarından izole edilen DNA örneklerinden Amelogenin primeri ile yapılan PZR

reaksiyonları sonucu elektroforez jel görüntülerinde 280 bp'de tek bant elde edilirken (3/3), erkek fötüse sahip koyun ve koç plazmalarından izole edilen örneklerin PZR ürünlerinin elektroforez jel görüntülerinde 280 ve 217 bp'lik iki bant elde edildi (7/10) (Şekil 1). Dolayısıyla fötal cinsiyeti belirlemede SRY geni ile Amelogenin geninin etkinliği arasında bir fark bulunamadı.

**Tablo 1.** Koyunlarda maternal plazmadan fenol-kloroform izolasyon metoduyla izole edilen fötal DNA'ların SRY ve Amelogenin primerleri ile yapılan PZR reaksiyonlarının agaroz jel elektroforezi sonuçlarına göre elde edilen fötüs cinsiyet durumları.

| Örnek No | SRY PZR sonucu | Amelogenin PZR sonucu | Doğum sonucu |
|----------|----------------|-----------------------|--------------|
| 1        | Dişi           | Dişi                  | Dişi         |
| 2        | Erkek          | Erkek                 | Erkek        |
| 3        | Dişi           | Dişi                  | Dişi         |
| 4        | Erkek          | Erkek                 | Erkek        |
| 5        | Dişi           | Dişi                  | Erkek        |
| 6        | Dişi           | Dişi                  | Erkek        |
| 7        | Dişi           | Dişi                  | Erkek        |
| 8        | Erkek          | Erkek                 | Erkek        |
| 9        | Erkek          | Erkek                 | Erkek        |
| 10       | Erkek          | Erkek                 | Erkek        |
| 11       | Dişi           | Dişi                  | Dişi         |
| 12       | Erkek          | Erkek                 | Erkek        |
| 13       | Erkek          | Erkek                 | Erkek        |



**Şekil 1.** Koyun SRY ve Amelogenin gen fragmanlarının amplifikasyonlarını gösteren etidyum bromid ile boyanmış agaroz jel görüntüsü. A-B koç plazması (SRY geni için pozitif kontrol); C, D, H, I erkek fötüse sahip koyun plazması; E, dişi fötüse sahip koyun plazması; F gebe olmayan koyun plazması (negatif kontrol); G numune yok. 1, 2 koç plazması (Amelogenin geni için pozitif kontrol); 3, 4, 8, 9 erkek fötüse sahip koyun plazması; 5, 6 dişi fötüse sahip koyun plazması; 7 gebe olmayan koyun plazması (negatif kontrol); 10 numune yok.

## Tartışma ve Sonuç

Büyük koyun sürülerine sahip çiftliklerde dişi:erkek oranının istenen seviyede tutulabilmesi yoluyla sürü yönetiminin etkin bir şekilde sağlanabilmesinde fötüs cinsiyetinin belirlenmesi büyük önem arz etmektedir. Memelilerde gebelik sonrası embriyonik dönemde Sitogenetik yöntem, İmmunolojik yöntem (HY antijeninin belirlenmesi), X kromozomuna bağlı enzim aktivasyonlarının saptanması, Embriyonik gelişim dönemi (erkek ve dişi embriyolar arasındaki metabolik aktivite

farklılıklarının saptanması) ve Y kromozomuna özgü DNA zincirlerinin kullanılması gibi farklı yöntemlerle prenatal embriyo cinsiyeti belirlenebilirken (Espinasse, 1990); amniosentez (Kamimura ve ark., 1997) ve ultrasonografi (Stroud, 1996; De Freitas Neto ve ark., 2010) yöntemi ile fötal dönemde prenatal cinsiyet teşhisi yapılabilmektedir. Geleneksel olarak fötüs cinsiyetini belirlemede kullanılan metotlar hem zaman alıcı hem de sonuçları kesin değildir. Üstelik

bu metotların çoğu invaziv olup, gebelik hasarı oluşturma potansiyel riskleri vardır. Maternal plazmadan elde edilen fetal DNA'ya dayalı moleküler cinsiyet tayin metodu ise güvenilir, hassas ve pratik bir alternatif metot olarak fütüs cinsiyetinin belirlenmesinde kullanılabilir. Maternal plazmadan fetal DNA izolasyonu gerçekleştirmeye yönelik çalışmalar ilk kez sığırlarda yapılmış, ancak gebeliğin erken ve geç dönemlerinde maternal plazmada fetal DNA tespit edilememiştir (Kadokawa ve ark., 1996). Bunun aksine Y spesifik bir fetal DNA parçasının sığırlarda gebeliğin 150. günü civarında maternal dolaşıma geçtiği bildirilmiştir (Turin ve ark., 2007). Benzer şekilde Wang ve ark. (2010) sığır kan plazmasındaki fetal DNA'yı kullanarak fetal cinsiyet tayini yapabilmişlerdir. Diğer taraftan DeLeon ve ark. (2012) ise gebe kısırakların kan plazmasından izole ettikleri fetal DNA'dan SRY genini kullanarak fetal cinsiyet tayini yapmışlardır. Davoudi ve ark. (2011) sığırlarda 8 haftadan ileri gebeliklerde sığır Amelogenin genini kullanarak fütüs cinsiyetini doğru olarak tahmin edebilmişlerdir. DaCruz ve ark. (2012) ise sığırlarda gebeliğin 5-35. haftalarında Y kromozomuna özgü diziler kullanarak fetal cinsiyet tespiti yapabilmişlerdir. Koyunlarda maternal plazmadan izole edilen fetal DNA kullanılarak cinsiyet teşhisi ilk kez Kadivar ve ark. (2013) tarafından gerçekleştirilmiş olup gebe koyunların plazmalarındaki fetal DNA miktarının gebelik boyunca önemli oranda arttığı bildirilmiştir. Bu bilgiler ışığında bu çalışmada koyunlarda maternal plazmada fetal DNA miktarının en fazla olabileceği dönem olan 20. hafta seçilmiştir. Yine maternal plazmadan cinsiyet teşhisinde sadece Y kromozomuna özgü gen bölgelerinin incelenmesinin hatalı sonuçlara neden olabileceği bu nedenle hem X hem de Y kromozomu üzerinde ortak olarak bulunan gen bölgelerinin incelenmesinin daha doğru sonuçlar verebileceği ifade edilmiştir (Kadivar ve ark., 2015). Çalışmada bu noktaya alınarak koyunlarda maternal plazmadan cinsiyet tespitinde sadece Y kromozomu üzerinde bulunan SRY gen bölgesi değil, hem X hem de Y kromozomu üzerinde bulunan Amelogenin gen bölgesi de incelenmiştir. Gebe koyunların maternal plazmalarında fetal DNA'nın en fazla bulunabileceği 20. haftada örnekler alınmasına ve hem SRY hem de Amelogenin gen bölgelerine ait primer dizileri ile PZR reaksiyonları gerçekleştirilmesine rağmen QIAamp ve FitAmp nükleik asit izolasyon kitlerinden izole edilen örneklerden fetal cinsiyet teşhisi yapılamamıştır. Bu durum gebeliğin son dönemlerinde bile olsa koyunlarda fetal cinsiyeti tespit edebilmek için QIAamp ve FitAmp nükleik asit izolasyon kitleri ile yeterli miktarda fetal DNA izole edilemediğini yada izole edilen fetal

DNA'nın fetal cinsiyetin belirlenmesini mümkün kılacak büyüklükte olmadığını göstermektedir. Maternal plazmadan fetal DNA izolasyonunda en temel sorunun nükleik asit fragmanlarının büyüklüğü ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Kimura ve ark., 2011). Diğer taraftan, yapılan bazı çalışmalarda maternal plazmadan fetal DNA izolasyonunda fenol-kloroform izolasyon metodunun diğer kolon-tabanlı izolasyon kitlerine göre daha etkili olduğu belirtilmekte ve bu durumun sebebinin kitlerin büyük fragmanlı DNA parçalarını izole ettiği ve maternal plazmadaki fetal DNA gibi 300 bp'den küçük DNA fragmanlarının silika membrana tutunmadığından kaybedildiği bildirilmektedir (Keshavarz ve ark., 2015). Nitekim çalışmamızda aynı plazmalardan fenol-kloroform izolasyon metoduyla yapılan izolasyonlar sonucu fütüs cinsiyetinin tespit edilebilmiş olması bu iddiayı destekler niteliktedir.

Yine koyun türleri trofoblast ile maternal kan arasında doğrudan bir temasın olmadığı epiteliyo-koryal (epithelio-chorial) plasenta yapısına sahiptirler (Wooding, 1992). Dolayısıyla kullanılan hazır ticari kitler ile koyunlarda yeterince fetal DNA'nın izole edilememesinin diğer bir nedeni de bu farklı plasenta yapısından kaynaklanabilir. Çalışmada ayrıca fenol-kloroform izolasyon metodu ile maternal plazmadan fetal DNA izolasyonu gerçekleştirilerek SRY ve Amelogenin primeri ile yapılan PZR reaksiyonları sonucu 13 gebe koyundan 10'unda doğru bir şekilde fetal cinsiyet teşhisi yapılabilmiş, üç adet erkek fütüse sahip koyunda ise hatalı sonuç elde edilmiştir. Fenol-kloroform izolasyon metoduyla yaptığımız analizlerde çıkan bazı hatalı sonuçlar plazma örneklerinden fetal DNA ile birlikte izole edilen bazı PZR inhibitörlerinin mevcudiyetinden (protein kontaminasyonu) kaynaklanmış olabilir. Nitekim son olarak koyunlarda cinsiyet tayinine yönelik yapılan bir çalışmada da benzer hatalı sonuçlar gözlemlenmiştir (Asadpour ve ark., 2015).

Koyunlarda maternal plazmadan cinsiyet teşhisinde hem SRY (Kadivar ve ark., 2013) hem de Amelogenin genlerinin (Pfeiffer ve Brenig, 2005) güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi ifade edilmiş ve aynı deney düzeneğinde bu iki gen bölgesinin cinsiyet teşhisindeki test performansı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Saberivand ve Ahsan, 2016). İnsanlarda maternal plazmadan fetal cinsiyetin belirlenmesinde 5 farklı Y kromozom dizisi (SRY, DYS14, DYS1/DAZ, DY3 ve AMELY) kullanılmış ancak bunların test performansları arasında bir fark bulunmamıştır (Devaney ve ark., 2011). Çalışmamızda da koyunlarda maternal plazmadan cinsiyet teşhisinde kullanılan SRY ve Amelogenin gen bölgelerinin

cinsiyet teşhisindeki etkinlikleri arasında bir fark bulunmamıştır.

Sonuç olarak, koyunlarda maternal plazmadan fötal DNA izolasyonu ile fötal cinsiyet teşhisinde QIAamp ve FitAmp nükleik asit izolasyon kitlerinin yetersiz kaldığı; fenol-kloroform izolasyon metodu ile maternal plazmadan fötal cinsiyet teşhisinin yapılabileceği ancak bunun bazı hatalı sonuçlara neden olabileceği ve koyunlarda fötal cinsiyetin belirlenmesinde kullanılan SRY ve Amelogenin gen bölgelerinin cinsiyet belirlemedeki etkinlikleri arasında fark olmadığı kanısına varıldı.

## Teşekkür

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı (DUBAP) tarafından 12 VF 137 proje numarasıyla desteklenmiştir.

## Kaynaklar

Akolekar R, Farkas DH, VanAgtmael AL, Bombard AT, Nicolaidis KH, 2010: Fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA) at 11 to 13 weeks of gestation. *Prenat Diagn*, 30, 918–23.

Asadpour R, Asadi MH, Jafari-Joozani R, Hamidian GH, 2015: Ovine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA) and cervical mucous secretions. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4, 65-69.

Breviglieri G, Bassi E, Carlassara S, Cosenza LC, Pellegatti P, Guerra G, Finotti A, Gambari R, Borgatti M, 2016: Y-chromosome identification in circulating cell-free fetal DNA using surface plasmon resonance. *Prenatal Diagnosis*, DOI: 10.1002/pd.4788.

Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, Lo KW, Huang DW, Lo YM, 2004: Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem Acta*, 50, 88–92.

Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Dziegiel MH, 2007: Improvement in fetal DNA extraction from maternal plasma. Evaluation of the NucliSens Magnetic Extraction system and the QIAamp DSP virus kit in comparison with the QIAamp DNA blood mini kit. *Prenatal Diag*, 27, 6-10.

Coubrough CA, Castell MC, 1998: Fetal sex determination by ultrasonically locating the genital tubercle in ewes. *Theriogenology*, 50, 263–267.

DaCruz AS, Silva DC, Costa EO, De M-Jr P, da Silva CC, Silva DM, da Cruz AD, 2012: Cattle fetal sex determination by polymerase chain reaction using DNA isolated from maternal plasma. *Anim Reprod Sci*, 131, 49-53.

Darin H, Angelica MG, Joel AC, Glen TG, Kenneth RB, Robert AG, 2009: Sex Ratio of Bovine Embryos and Calves Originating from the Left and Right Ovaries. *Biol Reprod*, 81, 933-938.

Davoudi A, Seighalani R, Aleyasin SA, Tarang A, Radjabi R, Tahmoressi F, 2011: The application of amplified TSPY and Amelogenin genes from maternal plasma as a non-invasive bovine fetal DNA diagnosis. *EurAsian Journal of BioSciences*, 5, 119–26.

De Freitas Neto, LM, dos Santos MHB, de Aguiar Filho, CR, de Almeida Jr JM, Caldas ELC, Neves JP, Lima PF, de Oliveura MAL, 2010: Ultrasonographic fetal sex identification in pregnant sheep derived from natural mating and embryo transfer. *J Reprod Dev*, 56, 347–350.

DeLeon PMM, Campos VF, Dellagostin OA, Deschamps JC, Seixas FK, Collares T, 2012: Equine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA). *Theriogenology*, 77, 694–8.

Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW, 2011: Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA. *J Am Med Assoc*, 306, 627–636.

Ennis S, Gallagher TF, 1994: A PCR-based sex determination assay in cattle based on the bovine Amelogenin locus. *Anim Genet*, 25, 425-427.

Espinasse J, 1990: Biotechnologien und buiatrik. *Tierärztl Umschau*, 45, 666-677.

Finning KM, Chitty LS, 2008: Non-invasive fetal sex determination: Impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonatal Med*, 13, 69 –75.

Han SH, Yang BC, Ko MS, Oh HS, Lee SS, 2010: Length difference between equine ZFX and ZFY genes and its application for molecular sex determination. *J Assist Reprod Genet*, 27, 725–8.

Kadivar A, Hassanpour H, Mirshokraei P, Azari M, Gholamhosseini K, Karami A, 2013: Detection and quantification of cell-free fetal DNA in ovine maternal plasma; use it to predict fetal sex. *Theriogenology*, 79, 995–1000.

Kadivar A, Hassanpour H, Dehcheshmeh JA, 2015: A novel approach to prenatal fetal sex diagnosis by detecting an insertion in the Y-chromosome of ovine Amelogenin gene. *Small Ruminant Research*, 123, 218–223.

Kadokawa H, Takusari N, Minezawa M, Takahashi H, Kariya T, 1996: Absence of fetal cells in bovine jugular and uterine vein blood at a level of 1 in 10,000. *J Reprod Dev*, 42, 205–8.

Kamimura S, Nishiyama N, Ookutsu S, Goto K and Hamana K, 1997: Determination of bovine fetal sex by PCR using fetal fluid aspirated by transvaginal ultrasound-guided amniocentesis. *Theriogenology*, 47, 1563-1569.

Keshavarz Z, Moezzi L, Ranjbaran R, Aboulizadeh F, Behzad-Behbahani A, Abdullahi M, Sharifzadeh S, 2015: Evaluation of a Modified DNA Extraction Method for Isolation of Cell-Free Fetal DNA from Maternal Serum. *Avicenna J Med Biotechnol*, 7, 85-8.

Kimura M, Hara M, Itakura A, Sato C, Ikebuchi K, Ishihara O, 2011: Fragment size analysis of free fetal DNA in maternal plasma using Y-STR loci and SRY gene amplification. *Nagoya J Med Sci*, 73, 129-135.

- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS, 1997: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350, 485-487.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Priscilla MK, Poon James, SW, Philip J, Johnson AMZ, Chang HN, Magnus HN, 1998: Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*, 62, 768-775.
- Lun FM, Chiu RW, Allen Chan KC, Yeung LT, Kin LT, Dennis Lo YM, 2008: Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*, 54, 1664-72.
- Pfeiffer I, Brenig B, 2005: X- and Y-chromosome specific variants of the Amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and European red deer (*Cervus elaphus*). *BMC Genetics*, 6, 16.
- Piprek RP, 2010: Molecular and cellular machinery of gonadal differentiation in mammals. *Int J Dev Biol*, 54, 779-86.
- Resende MV, Moreira-Filho CA, Leal CLV, Ramalho MFPD, Almeida AO, Vantini R, Hossepian LVFM, 2008: Falha na sexagem por inibição do desenvolvimento de embriões bovinos produzidos in vitro com anticorpos anti H-Y. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 60, 594-599.
- Saberivand A, Ahsan S, 2016: Sex determination of ovine embryos by SRY and Amelogenin (AMEL) genes using maternal circulating cell free DNA. *Animal Reproduction Science*, 164, 9-13.
- Stroud B, 1996: Using ultrasonography to determine bovine fetal sex. *Food Anim Pract*, 7, 663-672.
- Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P, 1993: A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene Amelogenin. *Biotechniques*, 15, 636-641.
- Turin L, Invernizzi P, Woodcock M, Grati FR, Riva F, Tribbioli G, Laible G, 2007: Bovine fetal microchimerism in normal and embryo transfer pregnancies and its implications for biotechnology applications in cattle. *Biotechnol J*, 2, 486-91.
- Wang G, Cui Q, Cheng K, Zhang X, Xing G, Wu S, 2010: Prediction of fetal sex by amplification of fetal DNA present in cow plasma. *J Reprod Develop*, 56, 639-42.
- Wooding F, 1992: Current topic: the synepitheliochorial placenta of rumi-nants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*, 13,101-113.

**\*Yazışma Adresi:** Mehmet Salih KAYA  
Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Fizyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye.  
e-mail: salihkaya@hotmail.com