استفاده از Nested-PCR برای تعیین جنسیت جنین انسان

سیدعلیرضا مصباح نمین .Ph.D[☆♦]، علیرضا کاویانپور .M.Sc[☆]، سیدجواد مولی .Ph.D[☆]، تقی طریحی .Ph.D[☆]

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی و علوم تشریح

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

☆ پژوهشکده رویان، گروه ژنتیک

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، گروه بیوشیمی بالینی

پست الکترونیک: Email: mesbahna@modarres.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۴/۲۰، پذیرش مقاله: ۸۳/۱۱/۲۶

* **هدف:** تعیین غیرتهاجمی جنسیت جنین انسان بااستفاده از روش Nested-PCR، از طریق خون مادران باردار در ۸ تا ۱۲ هفته بارداری

* **مواد و روشها:** در مرحله اول مخلوطی از نمونه‌های خون افراد سالم مذکر و مونث به کار برده شد. بر روی این نمونه‌ها روش استخراج DNA و به دنبال آن روش PCR بهینه‌سازی گردید. سپس با کسب رضایت مادران باردار، در ۸ تا ۱۲ هفته بارداری، از آنان نمونه خون تهیه گردید. از سرم و پلاسما و گلبولهای سفید این نمونه‌ها، DNA استخراج و بر روی آنها روش Nested-PCR انجام گردید. در دور اول PCR این روش، با به‌کارگیری پرایمرهای خارجی ژن مخصوص کروموزوم Y یا ژن تعیین‌کننده جنسیت Y (SRY: Sex determining Region Y)، قطعه ۴۷۲ جفت بازی و در دور دوم PCR، قطعه ۲۵۴ جفت بازی DNA تکثیر یافت که حاکی از وجود جنین مذکر بود.

* **یافته‌ها:** در این مطالعه ۷۰ نمونه خون مادران آنالیز گردید و فقط ۳۲ مورد از زایمانها پیگیری و معلوم شد که ۱۸ مورد از نوزادان متولد شده مذکر بوده است. نتایج این پژوهش نیز نشان داد که در نمونه‌های سرم، ۲۱ مورد (۳ مورد خطا) و در نمونه‌های گلبولهای سفید خون، ۲۲ مورد (۴ مورد خطا) مذکر تشخیص داده شده بودند. به عبارت دیگر در مورد نمونه‌های سرم نتایج به میزان ۹۰/۶۲درصد و در گلبولهای سفید خون به میزان ۸۱/۲۵ درصد موفقیت‌آمیز بوده است که نزدیک به کارهای دیگران (۹۱/۵درصد) است. در این پژوهش از به‌کارگیری DNA آزاد پلاسما نتیجه مطلوبی حاصل نگشت.

* **نتیجه گیری:** صحت بیشتر این نتایج زمانی معلوم می‌گشت که امکان دست‌یابی به تمام این مادران وجود داشت. با این حال، این پژوهش نشان داد که سرم خون این مادران، منبع مناسبی برای تعیین جنسیت جنین است و می‌تواند در بررسیهای دیگر مربوط به تشخیص بیماریهای ژنتیکی قبل از تولد مورد توجه قرار گیرد.

گل واژگان: تعیین جنسیت، کروموزوم Y، Nested-PCR

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، زمستان ۸۳، شماره ۲۴، صفحات ۲۰۵ ـ ۲۰۲

مقدمه

یکی از اهداف ژنتیک جدید به کارگیری تستهای تشخیصی بی‌خطر قبل از تولد است. در سالیان گذشته، روشهای معمول برای ارزیابی وضعیت جنین، مستلزم دست‌یابی به بافت یا سلولهای جنینی نیاز داشت، که این امر احتمال بروز خطراتی برای جنین را دربر داشت.

از نظر تاریخی، در دهه‌های ۱۹۵۰ و ۱۹۶۰ روش استفاده از مایع آمنیوتیک (به نام آمنیوسنتز) برای تشخیص قبل از تولد معرفی و به کار برده شد (۱). در دهه ۱۹۸۰، نمونه برداری از پرزهای جنینی (CVS: Chorionic Villus Sampling) در هفته ۱۰ تا ۱۲ بارداری، امکان‌پذیر شد، که اطلاعات مهمی در مورد وضعیت جنین می‌داد ولی متاسفانه هر دوی این روشها تهاجمی بودند (۲، ۳).

در دهه ۱۹۹۰، در حالی که از روش غیرتهاجمی اولتراسونوگرافی برای این منظور استفاده می‌گردید، کشف سلولهای جنینی موجود در جریان خون مادر موجب توجه پژوهشگران گردید (۴، ۵، ۶). از طرف دیگر با کشف مقادیر متنابهی از DNAهای آزاد در سرم و پلاسمای بیماران سرطانی (۷، ۸، ۹) و ترغیب بعضی از پژوهشگران مانند پروفسور Dennis Lo و پژوهش در خون مادران، منجر به کشف دیگری شد و اینکه در پلاسمای خون مادران باردار نیز، مقادیری از DNA آزاد جنینی وجود دارد که می‌توان آنها را با روشهای جدید مولکولی مورد شناسایی قرار داد (۱۰، ۱۱، ۱۲). همین گروه در پژوهشهای بعدی خود نشان دادند که DNA موجود در سرم و پلاسما خون مادران به طور شگفت‌انگیزی از مقادیر DNA جنینی استخراج شده از خون مادر بیشتر است (۱۳). این امر دیدگاههای جدیدی را برای تشخیص قبل از تولد، از نوع غیر تهاجمی، و کاربردهای آن را در کلینیک فراهم آورد (۱۴) و با اینکه اطلاعات حاصل از مطالعه بر روی این سلولها و DNA آنها، به همان صحت و دقت روشهای تهاجمی نبود ولی اهمیت و جایگاه مهم خود را در تشخیص غیرتهاجمی قبل از تولد، پیدا کرد و انتظار می‌رود در سالهای آینده بیشتر مورد توجه قرار گیرد. با توجه به اینکه نسبت

سلولهای جنینی موجود در جریان خون مادر به سلولهای خون مادری به میزان یک سلول در هر میلی‌لیتر خون مادر و به عبارت دیگر یک در یک‌صد هزار سلول برآورد می‌شود، لزوم استفاده از یک روش مناسب و حساس همچون PCR و روشهای مرتبط با آن در همان سالها مطرح و به کار برده شد (۱۵، ۱۶).

این مطالعه با هدف راه‌اندازی شیوه‌های جدید مولکولی در تشخیص قبل از تولد، موضوع تعیین غیرتهاجمی جنسیت جنین انسان مدنظر قرار گرفت. در این راستا تلاش گردید تا در این خصوص، راه رسیدن و استفاده این روشها در کلینیک هموار گردد.

بدین منظور با انتخاب ژنی بر روی کروموزوم Y به نام ژن تعیین کننده جنسیت (SRY) و تکثیر قطعه‌ای از آن در روشی به نام Nested-PCR که حضور و تکثیرش حاکی از وجود نوزاد مذکر و عدم تکثیر آن نشانی از وجود نوزاد مونث است، در نمونه‌های موردنظر، جنسیت جنین مورد شناسائی قرار گرفت. با توجه به اینکه هنوز هم در کشور ما، روشهای تهاجمی در مورد زنان بارداری که در ریسک بالایی از وجود جنین معیوب، قرار دارند استفاده می‌شود امید است این مطالعه، گام موثری را در به‌کارگیری این روشهای جدید بر داشته باشد.

مواد و روشها

بهینه سازی روش استخراج DNA

در این مطالعه تلاش گردید که قبل از نمونه‌گیری از مادران باردار، مخلوطهای دقیقی از نمونه خون افراد مونث و مذکر نرمال سالم و بالغ تهیه گردد و روشهای مختلف جداسازی DNA بر روی آن به کار رود، تا این پژوهش به یک روش استاندارد و مناسب نایل آید. برای این منظور مخلوطهای زیر از افراد مذکر (M) و افراد مونث (F) تهیه گردید: نمونه اول، ۱۰ میکرولیتر از M با یک میلی‌لیتر از F، نمونه دوم، ۱۰۰ میکرولیتر از M با یک میلی‌لیتر از F، نمونه سوم، یک میلی‌لیتر از M با یک میلی‌لیتر از F، نمونه چهارم، ۱۰۰۰ میکرولیتر از M تنها به عنوان نمونه کنترل مثبت و بالاخره نمونه پنجم، یک میلی‌لیتر از F تنها به عنوان نمونه کنترل منفی در نظر گرفته شد.

از میان روشهای مختلف به کار رفته برای این منظور که شامل روش جوشانیدن، روش رسوب با نمک اشباع، روش استفاده از پروتیناز K بدون فنل و با فنل، روش دقیق‌تر و استاندارد استفاده از فنل-کلروفرم مورد توجه قرار گرفت (۱۷). سپس با اعلام و کسب رضایت مادران و رعایت تمام اصول اخلاق پزشکی، از ۷۰ مادر باردار، در هفته هشتم تا دوازدهم بارداری، به میزان ۲ تا ۵ میلی‌لیتر خون تام و خون لخته تهیه گردید و پس از جداسازی سرم و پلاسما و با به کارگیری روش فوق، DNA نمونه‌ها از ۲۰۰ تا ۴۰۰ میکرولیتر سلولهای سفید خون، سرم و پلاسما استخراج گردید.

بهینه سازی روش Nested-PCR

مجموعه محلولهای مورد نیاز برای انجام PCR، بافر مخصوص تریس ۲۰۰ میلی‌مولار با pH ۸/۴ و با غلظت X ۱۰، کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، مخلوط dNTP ۱۰ میلی‌مولار و آنزیم Taq پلیمراز با غلظت ۵ واحد در هر میکرولیتر، DNA مارکر با رده نردبانی یک‌صد جفت باز، از شرکت Fermentas با نمایندگی شرکت ایرانی سیناژن خریداری گردید. پرایمرهای مخصوص کروموزوم Y (SRY) نیز تهیه گردیدکه به شرح زیر است:

پرایمرجلو و بیرونی آن شامل:

"5 GAATATTCCCGCTCTCCGGA 3" و پرایمر عقب و بیرونی آن:'5 CTGGTGCTCCATTCTTGAG 3 بودند.

برنامه حرارتی دور اول روش PCR به شرح زیر بود: مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴درجه سانتی‌گراد برای دناتوره شدن اولیه DNA و سپس وارد شدن نمونه‌ها در چرخه حرارتی PCR با شرایط زیر به اجرا در آمد: مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴درجه سانتی‌گراد برای دناتوره شدن، مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۷درجه سانتی‌گراد برای هیبریداسیون، مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲درجه سانتی‌گراد برای فرآیند پلیمراسیون، تعداد دورهای تکراری ۲۲ دور و آخرین مرحله آن، قرار گرفتن نمونه ها در دمای ۷۲درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه تعیین شد. طول قطعه تکثیر یافته در این روش برابر با ۴۷۲ جفت باز بود. برای دور دوم PCR، ۲ میکرولیتر از محصول PCR رقیق شده تا ۵۰ بار، از دور اول را به عنوان DNA الگو به کار برده و توسط پرایمرهای داخلی زیر، قطعه ۲۵۴ جفت بازی شناسایی می گردید.

پرایمرجلو ودرونی آن شامل:

5' CTGCGGGAACGAAACGCAAATTCTT 3'

و پرایمر عقب و درونی آن شامل:

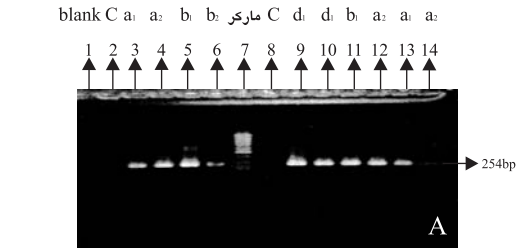
5' CATGAACGCATTCATCGTGTGGTC 3'

بودند. برنامه حرارتی دور دوم که با روش Hot-Start PCR به شرح زیر انجام شد: در این روش، تمام مواد مربوط به PCR و نمونه‌ها، به غیر از آنزیم Taq پلیمراز، افزوده شدند و در دستگاه PCR قرار گرفتند. سپس در آخرین لحظات مرحله دناتوره شدن اولیه DNA که به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴درجه سانتی‌گراد بود آنزیم Taq پلیمراز افزوده می‌شد. وارد شدن نمونه‌ها در چرخه حرارتی مانند دور اول و با شرایط زیر بود: مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴درجه سانتی‌گراد برای دنانوره شدن، مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۶درجه سانتی‌گراد برای هیبریداسیون، مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲درجه سانتی‌گراد برای فرآیند پلیمراسیون، تعداد دورهای تکراری ۴۰ دور و آخرین مرحله آن، قرار گرفتن نمونه‌ها در دمای ۷۲درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه تعیین شد. طول قطعه تکثیر یافته در این روش برابر با ۲۵۴ جفت باز بود.

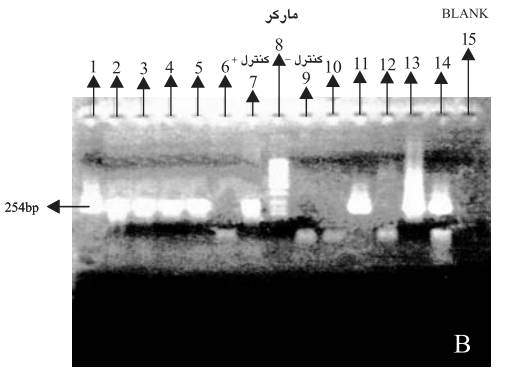
یافته‌ها

با کسب نتایج مطلوب از دور اول PCR بر روی DNA استخراج شده از مخلوط نمونه‌های کنترل مذکر و مونث، در وهله اول به نظر آمد که می‌توان این کار را بر روی نمونه‌های اصلی این پژوهش تعمیم داد و روش خود را به عنوان یک روش مناسب و ارزان، در اختیار مراکز درمانی قرار داد. اما متاسفانه این روش بر روی نمونه‌های خون مادران باردار پاسخ مناسبی نداد.

در شکلهای ۱A و ۱B نتایج مربوط به دومین دور PCR از نوع Hot-start و در روش Nested-PCR برای نمونه‌های کنترل و مادران باردار آورده شده است. در هر دو شکل قطعهٔ تکثیر یافته ۲۵۴ جفت بازی است. در شکل ۱A، تکثیر نمونه‌های افراد سالم مذکر و مونث را به شرح زیر نشان می‌دهد. نمونه‌های a_1 و a_2: دو نمونه از مخلوط ۱۰ میکرولیتری خون فرد مذکر با ۱۰۰۰ میکرولیتری خون فرد مونث است. نمونه‌های b_1 و b_2: دو نمونه از مخلوط ۱۰۰ میکرولیتری خون فرد مذکر با ۱۰۰۰ میکرولیتری خون فرد مونث است. نمونه C مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتری خون فرد مونث و نمونه‌های d_1 و d_2 مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتری خون فرد مذکر است. در این شکل نمونه‌ها ی ۲ و ۸ یا C، قطعهٔ تکثیر یافته ۲۵۴ جفت بازی را ندارند (نمونه‌های مونث) و نمونه شماره ۱۴ نوار ضعیفی از قطعهٔ تکثیر یافته ۲۵۴ جفت بازی دارد.



نتایج حاصل از دومین دور PCR نمونه های کنترل
روی ژل آگارز ۱/۶٪



دور دوم PCR برای نمونه های مادران باردار

شکل ۱A و ۱B: نمونه‌هایی از نتایج حاصل از دومین دور PCR در روش Nested-PCR با مشخصات درج شده در شکل، بر روی الکتروفورز ۱/۶درصد آگارز (رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید) نشان داده شده است.

در شکل ۱B، تکثیر نمونه‌های مادران باردار را به شرح زیر نشان می‌دهد. نمونه‌هایی مانند شماره ۶، ۱۰ و ۱۲ که در دور دوم PCR تکثیر نیافته‌اند جزو نوزادان مونث خواهند بود و مابقی نمونه‌ها حاکی از نوزادان پسر می‌باشند. نمونه شماره ۷، نمونه کنترل مثبت مذکر، نمونه شماره ۸، مارکر با رده نردبانی ۱۰۰ جفت بازی، نمونه شماره ۹ کنترل منفی مونث و نمونه شماره ۱۵، نمونه بدون DNA (شاهد) می‌باشد و قطعهٔ تکثیر یافته ۲۵۴ جفت بازی است.

بحث

در این پژوهش تمام تلاش بر این بود که بتوان با تکیه بر روشهای ساده و ارزان و در عین حال استاندارد (۱۸) به نتیجه مورد نظر رسید. مطالعات قبلی حاکی از این بود که از میان ژنهای مختلفی که در کروموزوم Y و کروموزوم X به طور مشترک، حتی با اندازه‌های مختلفی، وجود دارد ژن تعیین کننده جنسیت یا مارکر SRY که فقط در کروموزوم Y وجود دارد برای تعیین جنسیت جنین در ماههای اول تشکیل آن مناسب‌تر است (۱۹). اما با به کار گیری این مارکر، تشخیص قبل از تولد جنسیت جنین وقتی تحقق می‌یابد که قطعه مورد نظر در روش PCR تکثیر یابد که در این صورت می‌توان گفت که نوزاد مذکر است و تکثیر نیافتن قطعه، دلالت بر مونث بودن نمونه دارد. برای اطمینان از حصول نتایج باید از روشهای دقیق استفاده می‌گردید. با کسب نتایج مطلوب از دور اول PCR بر روی DNA استخراج شده از مخلوط نمونه‌ها ی کنترل مذکر و مونث، به نظر رسید که می‌توان این کار را بر روی نمونه‌های اصلی این پژوهش تعمیم داد و روش کوتاه‌تری را ارایه داد. مدتها برای این منظور و بهینه کردن روش PCR بر روی نمونه‌های خون مادران باردار صرف شد اما پاسخ مناسبی به دست نیامد. در نهایت از روش حساس Nested-PCR استفاده گردید که نوع Hot-start آن پاسخ مناسب را داد. از میان ۷۰ نمونه‌ای که ظرف یک‌سال و نیم در اختیار این پژوهش قرار گرفت و با روش یاد شده مورد ارزیابی نهایی قرار گرفت، تنها ۳۲ نمونه از آنها ردیابی و معلوم گشت که فرزندانشان چه بوده است و اطلاعات مربوط به مابقی مادران به دلایل مختلف در اختیار ما قرار نگرفت. در این پی‌گیری مشخص گردید که ۱۸ پسر و ۱۴ دختر متولد شده‌اند. در این پژوهش علی‌رغم همه تدابیری که در به کارگیری وسایل استریل و مواد با کیفیت، در کنترل آلودگی شده بود و در هر آزمایش یک نمونه شاهد (Blank) و یک نمونه کنترل مثبت و یک نمونه کنترل منفی به کار برده شد، نتایج به طور کامل هم‌خوانی نداشت. به طوری که در این پژوهش معلوم گردید که نمونه‌های پلاسما هیچ پاسخ مناسبی نمی‌دهند و در مقابل از آنالیز نمونه‌های سرم، به جای ۱۸ مورد، ۲۱ مورد (۳ مورد خطا) و نمونه‌های گلبولهای سفید، ۲۲ مورد (۴ مورد خطا) مذکر تشخیص داده شده است به عبارت دیگر در مورد نمونه‌های سرم نتایج به میزان ۹۰/۶۲درصد و در نمونه‌های خون به میزان ۸۱/۲۵درصد صحت داشته است که البته در مقایسه با اولین کارهای انجام شده دیگران نتایج در خور تامل است. به طوری که Kao و همکاران همین کار را بر روی ۳۶ زن باردار در هفته‌های ۸ تا ۱۲ هفته بارداری انجام دادند. البته آنها با تکثیر ژن ZFY در روش Nested-PCR و هضم آنزیمی قطعه تکثیر

یافته با آنزیمهای برش‌گر Mae II و Nde I موفق به تعیین جنسیت جنین با صحت ۹۱/۶۷درصد (۳ مورد خطا در ۳۶ نمونه) شدند (۲۰). پروفسور Lo و همکاران با استفاده از روش جوشانیدن در استخراج DNA خون، سرم و پلاسما و با استفاده از روش Nested-PCR و پرایمرهای مخصوصی از کروموزوم Y، تعیین جنسیت جنین را بر روی ۴۳ زن باردار در ۱۲ تا ۴۰ هفته بارداری انجام دادند. آنها توالی Y را در ۲۴ نمونه از ۳۰ نمونهٔ پلاسمای مادران (۸۰درصد) و ۲۱ نمونه از ۳۰ نمونه سرم مادران (۷۰درصد) متولد کننده فرزندان ذکور شناسایی کردند (۱۰). با اینکه نتایج گروه اخیر در مورد نمونه‌های پلاسمایی بسیار بهتر است ولی در مورد نمونه‌های سرمی، پژوهش حاضر به نتیجه مطلوب‌تری رسیده است. لازم به ذکر است که در سالهای بسیار اخیر با استفاده از کیتهای مناسب استخراج DNA، موفق به شناسایی ۱۰۰درصد نمونه‌ها هم شده‌اند (۱۸) ولی باید توجه داشت که در صورتی که امکان دست‌یابی به تمام این مادران مورد مطالعه در این پژوهش وجود داشت صحت بیشتر این پژوهش معلوم می‌گشت. امید است که با این پژوهش، گامهای اولیه را برای تشخیص قبل از تولد جنینهای با ریسک ابتلا به بیماریهای ارثی، در کشور ایران، فراهم آید.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از مدیریت محترم پژوهشکده رویان که امکانات مادی و تجهیزاتی انجام این طرح را فراهم نمودند و همچنین از همکاریهای صمیمانه آقای دکتر شاهوردی و از خدمات ارزنده سرکار خانم افشاریان و سرکار خانم ملامحمدی سپاسگزاری و کمال تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Fuchs F, Riis P: Antenatal sex determination. Nature 1956; 117, 330

2. Elias S, Simpson J L, Martin AO: Chorionic Villus Sampling for first trimester prenatal diagnosis: Northwestern University program. Am J Obstet Gynecol, 1985, 152 : 214

3. Kulive AM, Modell L, Jackson G: Risk evaluation of CVS. Prenat Diagn 1993; 13; 197-210

4. Lo YMD, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MDG, Fleming KA: Preanatal sex determinatipn by DNA amplification from maternal peripheral blood. Lancet. 1989; ii, 1363-1365

5. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti NF, Knoll JH, Latt SA: Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3279-3283

6. Bianchi DW: Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. Br J Haematol, 1999; 105; 573-83

7. Chen XQ, Stroun M, Magenet JL, Nicod LP, kurt AM, Lyantey J: Microsatellite alteration in plasma DNA of small lung. Nat Med 1996; 2 : 1033-5

8. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D: Microsatellite alteration in serum DNA of head and neck cancer patients. Nat Med 1996; 2 : 1035-7

9. Anker P, Lyantey J, Lederrey C, Stroun M: Circulating nucleic acids in plasma or serum. CLinica Chemica Acta, 2001, 143-146

10. Lo YMD, Corbatta N, Chamberlain PF , Sargent JL : Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 1997; 350; 458-462

cells from the maternal circulation. Obstet Gynecol Sur 1997; 52; 433-7

11. Lo YMD: Noninvasive prenatal diagnosis using fetal cells in maternal blood. J Clin Pathol 1994b; 47; 1060-5

12. Lo YMD: Detection of minority nucleic acid populations by PCR- a review. J pathol 1994a; 174; 1-6

13. Lo YMD: Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications. Clin. Chem. 2000; 46 : 1903-6

14. Bianchi DW: Circulating fetal DNA : its origin and diagnostic potential- a review. Placenta, 2004; 25: S93-S101 cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis.

15. Bianchi DW, Williams JM , Sullivan LM ,Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. Am J Hum Genet. 1997; 61: 822-9

16. Lamvu G, Kuller JA: Prenatal diagnosis using fetal

17. Sambrook J Russel DW: Molecular cloning; A Laboratory Manual. 3rd Ed Cold spring Harbor Laboratory. NY. 2001; 6.4-6.12

18. Tungwiwat W, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Fucharoen S: Non-invasive fetal sex determination using a conventional nested PCR analysis of fetal DNA in maternal plasma. Clin Chim Acta 2003; 334: 173-7

19. Guilbert J, Benachi A, Grebille AG, Ernault P. Zorn JR, Costa JM: Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique.Hum Reprod 2003;18:1733-6

20. Kao SM, Tang GC, Hsieh TT, Young KC, Wang HC, Pao CC: Analysis of peripheral blood of pregnant women for the presence of fetal Y chromosome- specific ZFY gene deoxyribonucleic acid sequences. Am J Obstet Gynecol 1992;166 ; 1013-1019