مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۱، شماره ۳ و ٤: از ۳۱-۳۹
پاییز و زمستان ۱۳۸۷

تشخیص حذف‌های ناشناخته‌های ژن‌های آلفا–گلوبین در ناقلین آلفا– تالاسمی با استفاده از روش Real-time PCR

سمیه جمالی[۱]، رضا مهدیان[۲]، مینا حیات‌نوسعید[۱]، صادق باباشاه[٤]، فرشته مریمی[٥]، مرتضی کریمی‌پور[۲]، بهناز زربخش[٦]، فائزه رحیمی‌نژاد[۷]، سیروس زینلی[۸*]

۱- کارشناس، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- کارشناس ارشد، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
٤- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، واحد علوم تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
٥- پزشک عمومی، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
٦- دکترای دامپزشکی، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۷- کارشناس، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۸- دانشیار، گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۷/۱۱/٦ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱

چکیده

هدف: آلفا–تالاسمی یکی از شایع‌ترین اختلالات هموگلوبین در جهان محسوب می‌شود و در اکثر موارد در نتیجه ایجاد حذف در یک یا هر دو ژن آلفا–گلوبین اتفاق می‌افتد. حذف‌های شناخته شده آلفا–گلوبین مانند حذف‌های ۳/۷، ٤/۲، ۲۰/٥ کیلوبازی و Med را می‌توان با روش PCR چندگانه تشخیص داد. با این وجود تعدادی از حذف‌های ناشناخته در این ژن وجود دارند که با استفاده از روش‌هایی مانند روش فوق و همچنین روش تعیین توالی قابل تشخیص نخواهند بود. در این تحقیق از روش Real-time PCR به‌منظور تشخیص وجود یا عدم وجود حذف‌های ناشناخته استفاده شده است.

مواد و روش‌ها: روش Real-time PCR مبتنی بر استفاده از رنگ سایبرگرین I به‌منظور تکثیر ژن‌های α_1، α_2 و همچنین ژن مرجع CLCN7 انجام پذیرفت و آنالیز داده‌ها با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه برای تعیین میزان ژنی انجام شد.

نتایج: نتایج به‌دست آمده با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه نسبت ۰/۹۰±۰/۱٦ را برای افراد نرمال و نسبت ۰/۳۲±۰/۱٥ را برای افراد ناقل حذف هتروزیگوت در ژن‌های α_1 و α_2 گلوبین نشان می‌دهد. همچنین آنالیز منحنی ذوب اختصاصیت تکثیر ژن‌های مورد نظر را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: روش Real-time PCR روشی ساده، سریع و مطمئن بوده و می‌توان از آن برای شناسایی حذف‌های ناشناخته در ناقلین آلفا–تالاسمی استفاده نمود.

کلیدواژگان: آلفا–تالاسمی، Real-time PCR، چرخه آستانه

* **نشانی مکاتبه:** گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، صندوق پستی: ۳۳۱-۱٤۱۱٥
Email: jalousian_f@yahoo.com

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۱- مقدمه

تالاسمی (Thalassemia) یکی از شایع‌ترین اختلالات ارثی در سنتز هموگلوبین است که با فقدان یا کاهش سنتز زنجیره‌های گلوبین همراه است. این بیماری در ٦٠ کشور جهان و با فراوانی بیشتر در مناطق مدیترانه، خاورمیانه، شبه قاره هند، آسیای جنوب شرقی و غرب آفریقا شیوع دارد [۱]. کشور ایران نیز از جمله کشورهای قرار گرفته روی کمربند تالاسمی در سطح جهان محسوب می‌شود؛ بنابراین تشخیص پیش از تولد این بیماری از اولویت‌های بهداشتی در ایران به‌منظور جلوگیری از تولد نوزادان مبتلا است و از سال ۱۳۷٦ به اجرا در آمده است [۲، ۳].

هرگاه سنتز زنجیره‌های آلفا یا بتا-گلوبین دچار اشکال شود، تعادل مقداری زنجیره‌های آلفا و بتا-گلوبین به هم خورده و با توجه به مقدار کاهش تولید از هر یک از این دو ژن، آثار فنوتیپی متفاوتی مشاهده می‌شود. در مقابل در صورت ایجاد نقص در ژن بتا-گلوبین، رابطه درصدی زنجیره‌های بتا و دلتا-گلوبین تغییر کرده و باعث افزایش سطح هموگلوبین A2 (Haemoglobin Adult-2: HbA2) (محصول ژن‌های آلفا و دلتا-گلوبین) می‌شود. چنین پدیده‌ای با کاهش محصول زنجیره‌ی آلفا-گلوبین اتفاق نمی‌افتد؛ یعنی در ناقلین آلفا-تالاسمی سطح HbA2 در حد طبیعی است. این در حالی است که اختلالات ژنتیکی در تولید زنجیره بتا-گلوبین، ساختن هر دو نوع هموگلوبین HbA و هموگلوبین جنینی (Haemoglobin Fetal: HbF) را مختل می‌کند. زنجیره‌های آلفا-گلوبین تجمع نیافته که در اثر عدم تعادل در سنتز زنجیره‌های آلفا-گلوبین و زنجیره فاقد آلفا-گلوبین ایجاد می‌شوند، به‌صورت ذرات متراکم (Inclusion) رسوب می‌کنند. این چنین ذرات حاوی زنجیره‌های آلفا-گلوبین به پیش‌سازهای اریتروئید در مغز استخوان و طحال آسیب رسانده و سبب خون‌سازی غیرمؤثرخواهند شد [۱، ٤].

برخلاف بتا-تالاسمی که اکثراً از جهش‌های نقطه‌ای ایجاد می‌شود، اکثر جهش‌های آلفا-تالاسمی ناشی از وقوع حذف در یک یا هر دو ژن آلفا-گلوبین هستند. شایع‌ترین حذف‌های معمول ایجاد کننده آلفا-تالاسمی، حذف‌های $-\alpha^{3.7}$، $-\alpha^{4.2}$، $-\alpha^{20.5}$، $--^{MED}$ و $--^{SEA}$ هستند. با استفاده از روش Gap PCR چندگانه (Multiplex Gap PCR) امکان تعیین حذف‌های مختلف در یک واکنش منفرد وجود دارد. جهش‌های نقطه‌ای را نیز می‌توان از طریق روش ARMS (Amplification Refractory Mutation System) یا روش‌های مشابه و همچنین تعیین توالی مستقیم DNA شناسایی نمود [٥- ٧].

در زمینه تشخیص مولکولی آلفا-تالاسمی موارد متعددی ناشی از وجود حذف‌های ناشناخته در ژن آلفا-گلوبین گزارش شده است که به‌علت عدم مشخص بودن دامنه حذف، با استفاده از روش Gap PCR قابل شناسایی نیستند. روش Real-time PCR به‌عنوان روشی مناسب در زمینه بررسی تعداد نسخه‌های ژنی در مورد حذف‌های ناشناخته در خوشه ژنی آلفا-گلوبین قابل بررسی است. اساس این سیستم مبتنی بر سنجش کمی نسخه‌های ژنی در طول مرحله تصاعدی از واکنش PCR از طریق سنجش میزان نشر نور فلورسانس است. در این سیستم تشخیصی یک رنگ فلورسنت طی واکنش تکثیر، متناسب با میزان محصولات هر چرخه آزاد شده و میزان نشر نور فلورسانس توسط نمایانگر شناسایی و ثبت می‌شود [۸].

در تحقیق حاضر، سیستم Real-time PCR برای آنالیز ژن‌های آلفا-گلوبین با استفاده از رنگ فلورسنت سایبرگرین I (SYBR Green-I) توسعه و بهینه‌سازی یافت و بررسی تعداد نسخه‌های ژنی در ژن‌های α_1 و α_2 در ناقلین‌های آلفا-تالاسمی با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold cycle: C_T) که به روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ نیز موسوم است، بررسی شد. آستانه نشان‌دهنده میزانی از محصول است که در آن همه نمونه‌ها به‌صورت تصاعدی تکثیر می‌یابند و C_T چرخه‌ای است که در آن افزایش معنی‌داری در علامت فلورسنت در طول مرحله تکثیر تصاعدی PCR مشاهده می‌شود. بدیهی است C_T به‌طور معکوس با مقدار اولیه DNA ژنومی متناسب است [۸، ۹].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

جدول ۱ شاخص‌های خون‌شناسی در افراد مطالعه شده

نمونه	تعداد	RBC* (میکرولیتر/$x10^6$)	Hb (دسی‌لیتر/گرم)	MCV (فمتولیتر)	MCH (پیکوگرم)	HbA2** (درصد)	HbF*** (درصد)
نرمال	۱۵	٤/٥٦±٠/٣٥	١٣/٤±١/٠٦	٨٦/٨٩±١/٩٤	٢٩/٣٦±٠/٩٧	٢/٩±٠/٨٥	١/٠٣±٠/٤٥
هتروزیگوت حذف Med	٤	٦/٠٢±٠/٦٥	١٢/٤٨±٠/٩٩	٦٩/٥±١/٦	٢٠/٩٥±٠/٥٥	٢/٢٦±٠/٥٥	٠/٣٣±٠/١١
هتروزیگوت حذف ٥/٢٠ کیلوبازی	٤	٦/٥٢±٠/٤٣	١٣/٥٢±١/٤٧	٦٩/٠٥±١/٨	٢٠/٧٤±١/١٢	٢/١٤±٠/٢٤	٠/٥٢±٠/٢٦
هتروزیگوت حذف ٢/٤ کیلوبازی	١	٥/٤٥±٠/٣٥	١٣/٩٥±١/٢	٧٧/٥±٣/١١	٢٥/٦٥±٠/٣٥	٢/٤±٠/١٤	٠/٣٥±٠/٢١
هتروزیگوت حذف ٣/٧ کیلوبازی	٨	٥/٢٧±٠/٥٦	١٣/٢٣±١/١٨	٧٩/٣٢±٣/٣١	٢٥/٣١±١/١٢	٢/٤٦±٠/٢٧	٠/٤٤±٠/١٨
هموزیگوت حذف ٣/٧ کیلوبازی	٣	٦/٢٤±٠/٧٦	١٢/٩٢±٢/٢٨	٧٠/٩٢±١/٨٧	٢١/٤٢±٢/٨٤	٢/٠٨±٠/٧١	٠/٣٢±٠/٠٨
موارد مشکوک به وقوع حذف	٦٠	٥/٦٤±٠/٩٥	١٣/٣١±١/٦٧	٧٠/٠٥±٣/٢	٢٠/٤٣±١/٥٦	٢/٠٥±٠/٣٢	٠/٣٦±٠/١

*RBC: سلول قرمز خونی؛ **HbA2: ($\alpha 2\delta 2$)؛ ***HbF: ($\alpha 2\gamma 2$)

مقادیر ذکر شده در جدول نمایانگر میانگین ± انحراف از معیار (mean ± SD) است.

جدول ۲ توالی آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی به‌کار گرفته شده در Real-time PCR

آغازگر	توالی آغازگر	موقعیت آغازگر بر روی ژن	طول قطعه تکثیری (جفت‌باز)
α_1- F	5′-ACGCCTCCCTGGACAAGTTC-3′	اگزون III	١٣٩
α_1- R	5′-GGGTACGGGTGCAGGAAGG-3′	اگزون III	
α_2- F	5′-ACGCCTCCCTGGACAAGTTC-3′	اگزون III	١٣٨
α_2- R	5′-AGGGCCGGTGCAAGGAG-3′	اگزون III	
CLCN7- F	5′-CTCTTAGGCCAGGCGTTTGTG-3′	اینترون I	١٢٨
CLCN7- R	5′-ACCGTGCTCAGCGCTATGC-3′	اینترون I	

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- انتخاب ناقلین و استخراج DNA ژنومی

تعداد ٦٠ فرد مشکوک به ناقل حذف آلفا-تالاسمی (MCH<٢٧ پیکوگرم، MCV<٨٠ فمتولیتر HbA2 طبیعی یا بیش از ٣/٥ درصد، HbF طبیعی یا بالا و رد فقر آهن) و همچنین ١٥ ناقل قطعی آلفا-تالاسمی که به کلینیک ویژه تشخیص پیش از تولد انستیتو پاستور ایران و آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی در مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر مراجعه کرده بودند بعد از تکمیل فرم رضایت‌نامه وارد مطالعه شدند. شاخص‌های خون‌شناسی افراد بررسی شده در این مطالعه در جدول ١ آورده شده است. استخراج DNA از گلبول‌های سفید خون محیطی و با استفاده از روش نمک اشباع (Salting out) [١٠] انجام و غلظت و کیفیت آن توسط اسپکتروفتومتر NanoDrop® ND-1000 در طول موج‌های ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتر سنجیده شد. نمونه‌هایی که نسبت A٢٦٠/A٢٨٠ در آن‌ها بیش از ١/٥ بود، برای آنالیز کمی انتخاب شدند.

۲-۲- Gap PCR چندگانه

روش Gap PCR چندگانه برای شناسایی حذف‌های شناخته شده آلفا-تالاسمی ($-\alpha^{3.7}$، $-\alpha^{4.2}$، $-\alpha^{20.5}$، $--^{MED}$) با استفاده از آغازگرهای (Primers) مقاله تان (Tan) و همکارانش [٧] انجام پذیرفت. مخلوط واکنشی به حجم ٢٥ میکرولیتر شامل ٣/٥ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ٢٠٠ نانوگرم، ٠/٣ میکرولیتر از مخلوط آغازگرها، ٠/٣ واحد از آنزیم *Taq* پلیمراز و ٢١ میکرولیتر بافر PCR تهیه شد. واسرشتگی اولیه DNA (Initial Denaturation) در دمای ٩٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٥ دقیقه صورت پذیرفت، سپس برنامه تکثیر زیر برای ٣٥ چرخه انجام یافت: ٩٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١ دقیقه، ٦٠ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١ دقیقه و ٣٠ ثانیه و ٧٢ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢ دقیقه. همچنین واکنش برای مدت ٧ دقیقه در دمای ٧٢ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت و در انتها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ٠/٨ درصد با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) رنگ‌آمیزی شده و با استفاده از اشعه ماورای بنفش مشاهده شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۲-۳- مخلوط واکنش و برنامه Real-time PCR

آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی برای ژن‌های α_1، α_2 و همچنین ژن CLCN7 به‌عنوان ژن مرجع با استفاده از نرم‌افزار Primer Express نسخه ۳/۰ (Applied Biosystems, Foster City,CA) طراحی و توالی آن‌ها در پایگاه اطلاعاتی NCBI/BLAST تأیید شد. توالی آغازگرهای به‌کار گرفته شده در این مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است.

برای هر واکنش مخلوطی به حجم ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۱۲/۵ میکرولیتر SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems,UK)، ۵ پیکومول از هر آغازگر، ۶/۵ میکرولیتر آب و ۵ نانوگرم DNA ژنومی تهیه شد. واکنش‌های هر نمونه DNA برای هر سه ژن، سه سری و به‌صورت همزمان انجام و میانگین (C_T)های به‌دست آمده برای هر ژن محاسبه شد. برای انجام Real-time PCR در دستگاه ABI 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA) از برنامه زیر استفاده شد: مرحله شروع در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور واسرشت‌سازی اولیه DNA الگو در چرخه اول در مدت زمان ۱۰ دقیقه انجام و سپس دو برنامه دمایی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه. هر مرحله تکثیری کامل، توسط یک مرحله تفکیک به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ ثانیه، ۹۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ ثانیه به‌منظور آنالیز منحنی ذوب همراه شد.

۲-۴- آنالیز اطلاعات با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$

در ابتدا به‌منظور تعیین کارایی تکثیر ژن‌های α_1 و α_2 گلوبین و ژن مرجع CLCN7، به‌صورت همزمان سری رقت از DNA طبیعی (از ۵۰ تا ۳/۱۳ نانوگرم در میکرولیتر) تهیه شد و پس از انجام Real-time PCR، نمودار استاندارد برای هر قطعه ژنی ترسیم شد. محاسبه کارایی PCR برای هر سه ژن با تعیین شیب (Slope) نمودار استاندارد و با استفاده از فرمول کارایی (Efficiency) محاسبه شد:

کارایی =[$10^{(-1/\text{شیب})}$]-۱

پس از محاسبه کارایی به‌منظور استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ، این بار روش Real-time PCR روی ژن‌های α_1 و α_2 گلوبین و ژن مرجع CLCN7 در مورد نمونه‌های مشکوک به حذف انجام شد. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنش PCR یک نمودار رسم و سپس براساس آن C_T تعیین شد. در ادامه پس از تفاضل میانگین C_T ژن هدف برای هر دو نمونه طبیعی و آزمون از میانگین C_T ژن مرجع، شاخص ΔC_T در نمونه طبیعی و نمونه آزمون محاسبه و از تفاضل دو ΔC_T مربوط به نمونه طبیعی و نمونه آزمون، فاکتوری تحت عنوان $\Delta\Delta C_T$ مطابق فرمول زیر به‌دست آمد:

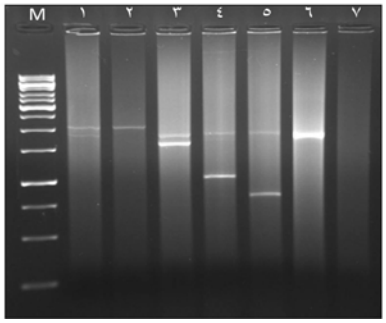
$\Delta\Delta C_T$= [$mC_{T\,\alpha}$ (نمونه نرمال) – $mC_{T\,CLCN7}$ (نمونه نرمال)] – [$mC_{T\,\alpha}$ (نمونه آزمون) – $mC_{T\,CLCN7}$ (نمونه آزمون)]

در نهایت تعداد نسخ ژن‌های هدف α_1 و α_2 گلوبین با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta C_T}$ مشخص شد [۱۱، ۱۲]. آنالیز داده‌های فوق با استفاده از نرم‌افزارهای SDS نسخه ۱/۲/۳ (Applied Biosystems,UK)، Excel 2007 (Microsoft corp) و SPSS نسخه ۱۶ (Chicago, IL, USA) انجام پذیرفت.

۳- نتایج

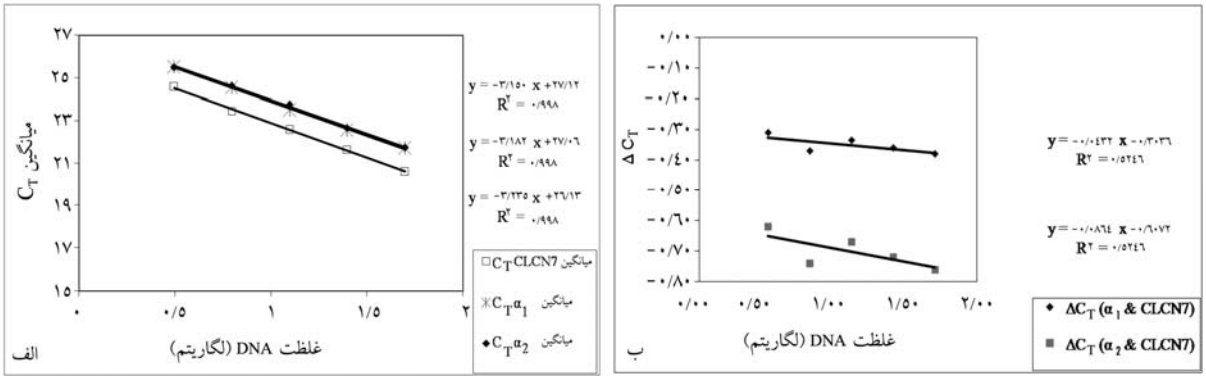
۳-۱- Gap PCR چندگانه

روش Gap PCR چندگانه امکان شناسایی حذف‌های شناخته شده را به‌صورت همزمان و در یک واکنش فراهم می‌سازد. با استفاده از این روش وجود حذف‌های شناخته شده $-\alpha^{3.7}$، $-\alpha^{4.2}$، $-\alpha^{20.5}$، $--^{MED}$، در ۲۰ فرد کنترل شناسایی شد (شکل ۱).



شکل ۱ شناسایی حذف‌های شناخته شده توسط Gap PCR چندگانه؛ **ستون M**: نشانگر ۱ کیلوبازی، **ستون ۱**: هتروزیگوت حذف ۳/۷ کیلوبازی (۲۰۲۲ و ۱۸۰۰ جفت‌بازی)، **ستون ۲**: هموزیگوت حذف ۳/۷ کیلوبازی (۲۰۲۲ جفت‌بازی)، **ستون ۳**: هتروزیگوت حذف ۴/۲ کیلوبازی (۱۶۲۸ و ۱۸۰۰ جفت‌بازی)، **ستون ۴**: هتروزیگوت حذف ۲۰/۵ کیلوبازی (۱۰۰۷ و ۱۸۰۰ جفت‌بازی)، **ستون ۵**: هتروزیگوت حذف Med (۸۰۷ و ۱۸۰۰ جفت‌بازی)، **ستون ۶**: نرمال (۱۸۰۰جفت‌بازی)، **ستون ۷**: فاقد DNA الگو

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]



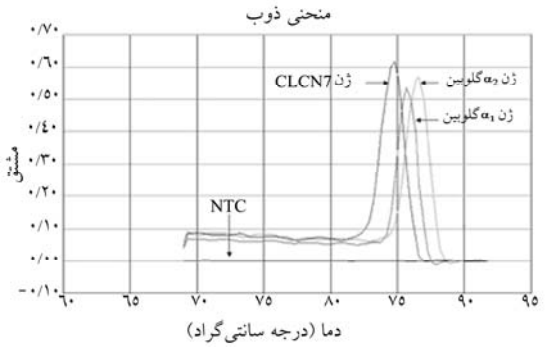
شکل ۲ مراحل بهینه‌سازی Real-time PCR؛ **الف:** منحنی استاندارد بر پایه سری رقت‌ها از DNA فرد نرمال برای ژن‌های α1 و α2 گلوبین و CLCN7 به‌منظور محاسبه کارایی، **ب:** ارزیابی همزمان شاخص‌های ΔC_T برای α1/CLCN7 و α2/CLCN7 بر پایه غلظت‌های متوالی از DNA ژنومی؛ معادله خطوط به‌ترتیب y = -۰/۰۴۳۲x-۰/۳۰۳۶ و y =۰/۰۸٦٤x-۰/٦۰۷۲ است. همگی خطوط دارای شیب کمتر از ۰/۱ هستند که یک شرط لازم در استفاده از روش C_T در سنجش‌های Real-time PCR محسوب می‌شود.

۳-۲- کارایی تکثیر در Real-time PCR

رسم منحنی استاندارد بر پایه سری رقت‌ها از نمونه DNA نرمال برای ژن‌های α_1 و α_2 گلوبین و ژن مرجع CLCN7، کارایی PCR را برای هر سه ژن تقریباً برابر دانست. شیب به‌دست آمده از منحنی‌های تکثیر ژن‌های α_1 و α_2 و CLCN7 به‌ترتیب ۳/۱۸-، ۳/۱۵- و ۳/۲۳- و همچنین ضریب همبستگی (R^2) برای ژن‌های مذکور معادل ۰/۹۹ است که نشانه وجود هماهنگی بین تغییرات غلظت DNA و اختلاف C_Tها است (شکل ۲ الف).

همچنین سازگاری و هماهنگی تمامی واکنش‌های PCR به‌واسطه دامنه وسیعی از غلظت‌های DNA الگوی طبیعی (از ۵۰ تا ۳/۱۳ نانوگرم در میکرولیتر) با رسم نموداری بر مبنای شاخص‌های ΔC_T ژن‌های آلفا-گلوبین و CLCN7 در مقابل لگاریتم غلظت DNA ارزیابی شد. شیب ۰/۱≤ این نمودار پس از تعدیل شدن ژن هدف توسط ژن مرجع CLCN7 نیز صحت ارزیابی نسبی و روش مقایسه‌ای C_T را می‌رساند (شکل ۲ ب).

همچنین به‌واسطه تغییرات دمایی که در آنالیز منحنی ذوب (Melting curve) صورت می‌پذیرد، هر قطعه DNA دو رشته‌ای موجود در محصول براساس طول و محتوای بازهای GC در دمای ذوب اختصاصی خود، تک رشته‌ای شده و این تغییر حالت توسط سیستم به‌صورت یک قله (Peak) نمایش داده می‌شود. همان‌گونه که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، وجود تنها یک قله مرتبط با هر ژن، نشانه عدم وجود مواردی چون محصول غیراختصاصی و آغازگر دایمر است.



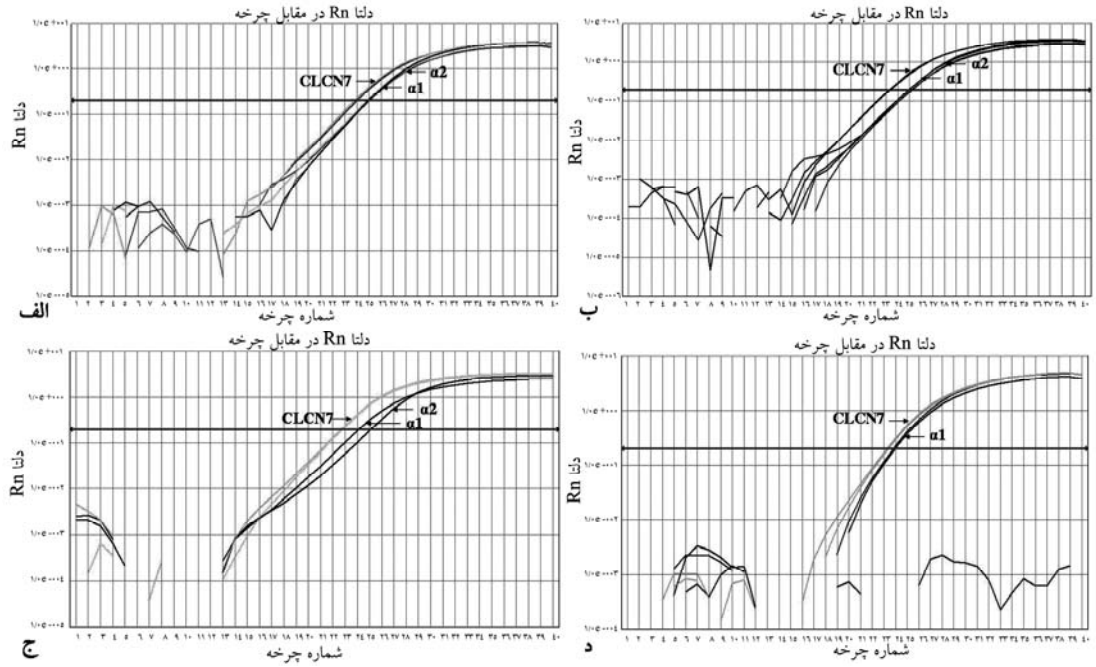
شکل ۳ آنالیز منحنی ذوب برای ژن‌های α_1 و α_2 گلوبین و ژن مرجع CLCN7؛ هریک ازقله‌ها نمایانگر دمای ذوب یک محصول PCR است.

۳-۳- شناسایی حذف‌های ژنی آلفا-گلوبین توسط Real-time PCR

با انجام Real-time PCR برای ژن‌های α_1 و α_2 و CLCN7 در ٦۰ فرد مشکوک به حذف در ژن‌های آلفا-گلوبین که هیچ‌کدام از حذف‌های شناخته شده برای آن‌ها شناسایی نشده بود، وجود حذف در ٤۰ نفر بدون هیچ اطلاعی از سرحدات دقیق حذف شناسایی شد. از این تعداد ۱۰ فرد دارای حذف در ژن α_1 و α_2 به‌صورت همزمان، و ۲۵ فرد دارای حذف در ژن α_2 به‌صورت هتروزیگوت و ۵ فرد دارای حذف در ژن α_2 به‌صورت هموزیگوت هستند. همچنین وجود حذف در تمامی ۱۵ نمونه افراد کنترل حذف که وجود حذف شناخته شده در آن‌ها توسط Gap PCR چندگانه شناسایی شده بود، توسط Real-time PCR تأیید شد که نشانه دقت و حساسیت این روش کمی است.

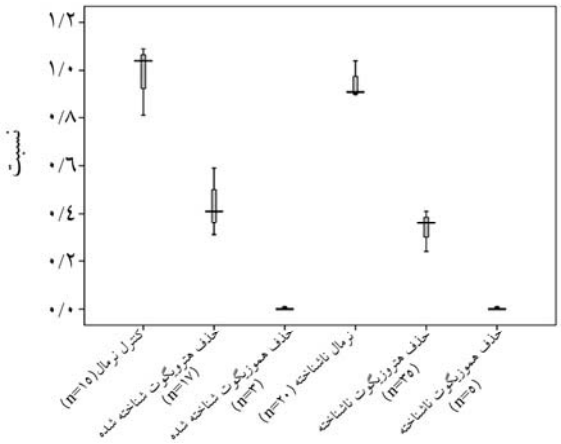
همان‌گونه که در شکل ٤ ملاحظه می‌شود منحنی‌های

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]



شکل ٤ منحنی تکثیر DNA برای ژن‌های α1 و α2 گلوبین و ژن مرجع CLCN7؛ **الف:** منحنی تکثیر DNA مربوط بـه فـرد سـالم؛ ژن‌هـای α1 و α2 در چرخـه ۲۵ و ژن مرجـع CLCN7 در چرخه ۲٤ وارد مرحله تصاعدی تکثیر شده و به آستانه رسیده است؛ **ب:** منحنی تکثیر DNA مربوط به فـرد ناقـل حـذف در ژن‌هـای α1 و α2؛ ژن‌هـای α1 و α2 در چرخه ۲۵ و ژن مرجع CLCN7 در چرخه ۲۳ وارد مرحله تصاعدی تکثیر شده است؛ **ج:** منحنی تکثیر DNA مربوط به فرد ناقل حذف در ژن α_2 ژن α1 در چرخه ۲٤ و ژن α2 در چرخه ۲۵ و ژن مرجع CLCN7 در چرخه ۲۳ وارد مرحله تصاعدی تکثیر شده است؛ **د:** منحنی تکثیر DNA مربوط به حذف هموزیگـوت در ژن α2، ژن α1 در چرخـه ۲٤ و ژن مرجع CLCN7 در چرخه ۲۳ وارد مرحله تصاعدی تکثیر شده است. واکنش تکثیر ژن α2 در فرد هموزیگوت رخ نداده است.

مرتبط با تکثیر ژن‌های α_1 و α_2 در فـرد ناقـل حـذف بـه‌علـت فقدان یک نسخه از ژن هـدف، یـک چرخـه دیرتـر از منحنـی متنـاظر در فـرد سـالم بـه آسـتانه رسـیده‌انـد. محاسـبه نـسبت $2^{-\Delta\Delta C_T}$ که در واقع میزان نسبی ژن را در نمونه ناشناخته نسبت به نمونه طبیعی تعیین مـی‌نمایـد، نـسبت ۰/۹۰±۰/۱٦ را بـرای افراد سـالم و نـسبت ۰/۳۲±۰/۱۵ را بـرای افـراد ناقـل حـذف هتروزیگوت در ژن‌های α_1 و α_2 گلوبین نشان داد (شکل ۵).



شکل ۵ مقایسه نسبت‌های به‌دست آمده در گروه‌های مختلف

٤- بحث

در مسیر غربـالگری تالاسـمی قبـل از ازدواج و شناسـایی جهش‌ها، تعداد زیادی از مراجعین به آزمایـشگاه‌هـای ژنتیـک، به‌صورت موارد مشکوک یا نامشخص باقی می‌مانند. این افـراد دارای MCV (Mean Corpuscular Volume) و MCH (Mean Cell Haemoglobin) پـایین (کمتـر از ۸۰ و ۲۷) هستند. در اکثر موارد این افراد دارای سطح HbA2 طبیعـی یـا نزدیک آستانه هستند (۳/۵ درصد یا کمتر) که تعیـین وضـعیت این افراد از اهمیت زیادی برخوردار است. دلایل قـرار گـرفتن این افراد در گروه موارد مشکوک بـه چنـد دلیـل اسـت؛ ابتـدا این‌که فرد ممکن است دارای جهش خفیف باشد کـه در دسـته ناقلین خاموش طبقه‌بندی می‌شـود. وقـوع حـذف در ژن بتـا و دلتا-گلوبین یا جهش در ژن دلتا-گلوبین مـی‌تواننـد از عوامـل دیگر ایجاد سطح HbA2 طبیعی باشند. علت دیگر را می‌تـوان به دلیل همزمانی وجود آلفـا و بتـا-تالاسـمی در فـرد دانـست. همچنین وقوع حذف در خوشـه ژنـی بتـا-گلـوبین کـه ناحیـه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

گاما-گلوبین را نیز درگیر کرده باشد یا حتی ارائه نتایج اشتباه در آزمایش‌های خون‌شناسی (Cell Blood Count: CBC) و تعیین دقیق سطح HbA2 یا فقر آهن می‌توانند از دلایل دیگر قلمداد شوند [۱، ۱۳، ۱٤]. بنابراین می‌بایست با استفاده از روش‌های متعدد ناقل آلفا یا بتا-تالاسمی بودن افراد مشکوک را مشخص نمود. در صورتی که احتمال وجود حذف داده شود، باید با به‌کارگیری روش‌های نوین وجود حذف در ژن‌های آلفا یا بتا-گلوبین را مشخص و سپس با به‌کارگیری روش‌های مولکولی دامنه حذف را تشخیص داده و در ادامه برای آن‌ها روش‌های تشخیص سریع و دقیق راه‌اندازی نمود.

روش Real-time PCR در شناسایی بازآرایی‌های ژنی در مورد بیماری‌های متعددی همچون نشانگان ویلیام-برن (Williams-Beuren syndrome) [۱۵]، نشانگان آنجلمن (Angelman syndrome) [۱٦] و بیماری پلی‌زائوس-مرزباچر (Pelizaeus-Merzbacher) [۱۷] استفاده شده است. همچنین استفاده از این روش در مورد شناسایی تعدادی از حذف‌های شناخته شده آلفا-تالاسمی نیز گزارش شده است [۱۸] که البته روش Gap PCR چندگانه به‌عنوان روشی مناسب و سریع برای شناسایی حذف‌های شناخته شده آلفا-تالاسمی نیز قادر به شناسایی این دسته از حذف‌ها است. بدیهی است این روش توانایی شناسایی حذف‌هایی با دامنه نامشخص را ندارد. اخیراً روش کمی تکثیر وابسته به اتصال شناسگرهای چندگانه (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification: MLPA) از کاربرد وسیعی در زمینه تشخیص حذف و مضاعف‌شدگی ژنی برخوردار شده است. در این روش توانایی تکثیر تعداد زیادی از جایگاه‌ها توسط یک جفت آغازگر وجود دارد [۱۹]. البته جداسازی محصولات تکثیر شده توسط الکتروفورز موئین توسط دستگاه توالی‌یابی و صرف زمان و هزینه زیاد و همچنین دقت کمتر نسبت به آن‌چه که در آنالیز Real-time PCR وجود دارد از نقاط ضعف روش MLPA محسوب می‌شود.

استفاده از رنگ‌های متصل‌شونده به DNA همچون سایبرگرین (SYBR Green I) در مطالعات میزان ژنی توسط Real-time PCR حساسیت بیشتری را نسبت به استفاده از شناساگرها در این روش ایجاد می‌کند. بدیهی است این ویژگی رنگ سایبرگرین I با اتصال مولکول‌های زیاد رنگ به DNA دو رشته فراهم می‌شود. همچنین استفاده از این رنگ‌ها از نظر اقتصادی نسبت به استفاده از شناساگرها در Real-time PCR مقرون به صرفه است و امکان تشخیص سریع همراه با حساسیت بالا در شناسایی حذف در خوشه ژنی آلفا-گلوبین را فراهم می‌آورند [۲۰].

آن‌چه در آنالیز Real-time PCR و استفاده از روش مقایسه‌ای C_T حائز اهمیت است این است که درستی و دقت تعیین تعداد نسخه‌های ژنی با میزان کارایی تکثیر ژن‌های هدف و ژن مرجع دارای ارتباط مستقیم است. بنابراین شیب منحنی استاندارد رسم شده برای هر ژن و ضریب همبستگی (R^2) خط رسم شده براساس رقت‌های متوالی DNA، باید در محدوده قابل پذیرش (شیب بین ۳/۱- تا ۳/٦- و R^2>۰/۹۵) بوده و در ژن‌های مورد بررسی تا حد امکان یکسان باشند [۱۲، ۲۱].

در تحقیق حاضر تمامی موارد ناقل قطعی که وجود حذف شناخته شده در آن‌ها توسط Gap PCR چندگانه شناسایی شده بود، با روش Real-time PCR به‌درستی تشخیص داده شدند که این می‌تواند تأییدی بر صحت نتایج حاصل شده برای موارد ناشناخته باشد. مطالعه حاضر نشان داد که این روش می‌تواند برای تعین وضعیت نهایی موارد مشکوک به حذف آلفا-تالاسمی کاملاً کارساز باشد.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به کلیه بیماران و خانواده‌های محترم آن‌ها و نیز تمامی همکاران بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر اعلام می‌دارند. این طرح با پشتیبانی مالی انستیتو پاستور ایران (طرح شماره ٤٤۱) و نیز صندوق حمایت از پژوهشگران انجام شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

٦- منابع

[1] Weatherall DJ, Clegg JB, Gibbons R. The thalassaemia syndromes. 4th ed. Oxford, Malden, MA: Blackwell Science, 2001; p:484-525.

[2] Abolghasemi H, Amid A, Zeinali S, Radfar MH, Eshghi P, Rahiminejad MS, Ehsani MA, Najmabadi H, Akbari MT, Afrasiabi A, Akhavan-Niaki H, Hoorfar H. Thalassemia in Iran: epidemiology, prevention, and management. J Pediatr Hematol Oncol 2007; 29(4): 233-8.

[3] Samavat A, Modell B. Iranian national thalassaemia screening programme. BMJ 2004; 329(7475): 1134-7.

[4] Harteveld CL, Yavarian M, Zorai A, Quakkelaar ED, van Delft P, Giordano PC. Molecular spectrum of alpha-thalassemia in the Iranian population of Hormozgan: three novel point mutation defects. Am J Hematol 2003; 74(2): 99-103.

[5] Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. Clin Lab Haematol 2004; 26(3): 159-76.

[6] Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. Blood Rev 2003; 17(1): 43-53.

[7] Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. Blood 2001; 98(1): 250-1.

[8] Ruiz-Ponte C, Carracedo A, Barros F. Duplication and deletion analysis by fluorescent real-time PCR-based genotyping. Clin Chim Acta 2006; 363(1-2): 138-46.

[9] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29(9): e45.

[10] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16(3): 1215.

[11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001; 25(4): 402-8.

[12] Vaerman JL, Saussoy P, Ingargiola I. Evaluation of real-time PCR data. J Biol Regul Homeost Agents 2004; 18(2): 212-4.

[13] Eram SM, Azimifar B, Abolghasemi H, Foulady P, Lotfi V, Masrouri M, Hosseini M, Abdolhosseini A, Zeinali S. The IVS-II-1 (G-->a) beta0-thalassemia mutation in cis with HbA2-Troodos [delta116(G18)Arg-->Cys (CGC-->TGC)] causes a complex prenatal diagnosis in an Iranian family. Hemoglobin 2005; 29(4): 289-92.

[14] Zeinali S, Mohammad Eram S, Azimifar SB, Lotfi V, Foulady P, Masrouri M. First report on the co-inheritance of (beta) IVS I-1 (G-->T) Thalassemia with the (gamma) CD85 [Phe-->Ser (F1) (TTT-->TCT)] HbA2 Etolia in Iran. Haematologica 2006; 91(6 Suppl): ECR15.

[15] Schubert C, Laccone F. Williams-Beuren syndrome: determination of deletion size using quantitative real-time PCR. Int J Mol Med 2006; 18(5): 799-806.

[16] Raca G, Buiting K, Das S. Deletion analysis of the imprinting center region in patients with Angelman syndrome and Prader-Willi syndrome

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

by real-time quantitative PCR. Genet Test 2004; 8(4): 387-94.

[17] Mikesová E, Baránková L, Sakmaryová I, Tatarková I, Seeman P. Quantitative multiplex real-time PCR for detection of PLP1 gene duplications in Pelizaeus-Merzbacher patients. Genet Test 2006; 10(3): 215-20.

[18] Liu J, Yan M, Wang Z, Wang L, Zhou Y, Xiao B. Molecular diagnosis of alpha-thalassemia by combining real-time PCR with SYBR Green1 and dissociation curve analysis. Transl Res 2006; 148(1): 6-12.

[19] Harteveld CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, den Dunnen JT, White SJ, Giordano PC. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha- and beta-thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. J Med Genet 2005; 42(12): 922-31.

[20] Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, Markham AF. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. BMC Biotechnol 2003; 3: 18.

[21] Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics 2006; 7: 85.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]