

استفاده از روش Real-Time PCR روی نمونه‌های آمیوسیت برای تشخیص پیش از تولد نشانگان داون

فهیمة شاهرخی^۱، سیدمجتبی محدث‌اردبیلی^۲، زهرا فردی‌آذر^۳، احمدرضا کامیاب^۴، المیرا شمسیان^۵، مینا حیات‌نوسعید^۶، زهرا کائینی‌مقدم^۶، رضا مهدیان^{۶*}

- ۱- کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک انسانی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
- ۲- دکتری، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
- ۳- استادیار، گروه زنان و مامایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
- ۴- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک انسانی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۵- کارشناس ارشد، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۶- استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۸/۰۸/۰۵

دریافت مقاله: ۸۸/۰۶/۰۳

چکیده

هدف: این مطالعه به منظور بررسی امکان تشخیص نشانگان داون پیش از تولد با روش Real-Time PCR انجام شد. در این راستا، تعیین روش مناسب برای تخلیص DNA از نمونه‌های آمیوسیت برای دستیابی به DNA با کیفیت بالا نیز مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ابتدا زنان بارداری که در غربالگری از طریق سنجش نشانگرهای بیوشیمیایی و سونوگرافی خطر بالای ابتلای جنین به نشانگان داون را داشتند، به مرکز آمیوسنتز معرفی شده و از مایع آمنیوتیک آن‌ها نمونه‌گیری شد. تخلیص DNA از ۵۹ نمونه مایع آمنیوتیک با روش‌های مختلف انجام شد که این روش‌ها شامل روش جوشاندن، روش رسوب‌دهی با نمک، دستورالعمل استخراج DNA از خون و بافت با کیت DNPTM (سیناژن)، دستورالعمل استخراج DNA از سلول با کیت DNA Isolation Kit for cells and tissues (Roche)، دستورالعمل استخراج DNA از بافت با کیت MagNa Pure DNA Isolation (Roche) و کیت QIAamp DNA Micro (Qiagen) بودند. سپس کیفیت و کمیت نمونه‌های تخلیص شده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ NanoDrop® ND-1000 ارزیابی شد. واکنش Real-Time PCR با استفاده از رنگ سایبرگرین I (Applied Biosystems, UK) به منظور تکثیر اختصاصی ژن‌های DSCAM و DYRK1A2 و ژن مرجع PMP22 روی نمونه‌های تخلیص شده انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه برای تعیین میزان ژنی و تعیین تعداد نسخه‌های کروموزوم ۲۱ صورت گرفت.

نتایج: این بررسی نشان داد که DNA استخراج شده از نمونه‌های مایع آمنیوتیک با استفاده از کیت QIAamp DNA Micro دارای کمیت و کیفیت مطلوب است. تکثیر اختصاصی ژن‌های هدف و مرجع انجام و تفاوت گروه طبیعی و گروه مبتلا بر اساس اختلاف در چرخه آستانه مشخص شد.

*نشانی مکاتبه: تهران، میدان پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش پزشکی مولکولی، صندوق پستی: ۱۶۶۷-۱۳۱۸۵

نتیجه‌گیری: تشخیص پیش از تولد با روش Real-Time PCR روی نمونه‌های DNA تخلیص شده از سلول‌های مایع آمنیوتیک با استفاده از کیت Qiagen امکان‌پذیر است. نتایج حاصل با نتایج مشابه حاصل از روش‌های متداول سیتوژنتیک قابل مقایسه است.

کلیدواژگان: تشخیص پیش از تولد، Real-Time PCR، نشانگان داون، تخلیص DNA، نانودراپ

۱- مقدمه

نشانگان داون (Down Syndrome) (تریزومی ۲۱) یکی از ناهنجاری‌های کروموزومی شایع در بین نوزادان بوده و از علل عمده عقب‌ماندگی ذهنی محسوب می‌شود [۱، ۲]. وجود یک نسخه اضافی از کروموزوم شماره ۲۱ انسانی موجب تغییرات آسیب‌شناختی ناشی از بیان غیرطبیعی ژن‌های مستقر بر این کروموزوم می‌شود [۳]. خطر بالای ابتلای جنین به نشانگان داون، معمول‌ترین دلیل برای تشخیص پیش از تولد است. از سوی دیگر در غربالگری و تشخیص پیش از تولد، تشخیص نشانگان داون با بالاترین درجه دقت و حساسیت ضرورت دارد [۴]. در حال حاضر با استفاده از روش‌های غربالگری ابتدا خانم‌های بارداری که در معرض خطر بیشتر ابتلای جنین به نشانگان داون قرار دارند مشخص می‌شوند که پس از آن از روش‌های سیتوژنتیکی و مولکولی برای تشخیص قطعی ابتلای یا عدم ابتلای جنین در بارداری‌های پرخطر استفاده می‌شود [۵]. روش‌های استاندارد سیتوژنتیکی و سیتوژنتیک مولکولی (Fluorescent In Situ Hybridization: FISH) روش‌هایی هستند که به صورت معمول برای تشخیص نشانگان داون استفاده می‌شوند. روش‌های سیتوژنتیکی بسیار دقیق بوده و در ۹۹ درصد موارد تشخیص این اختلال و سایر اختلالات کروموزومی امکان‌پذیر می‌شود، ولی این روش آزمایشگاهی زمان‌بر بوده و تشخیص پیش از تولد ناهنجاری‌های کروموزومی ۷ تا ۲۲ روز وقت می‌گیرد [۶]. با استفاده از روش FISH امکان تشخیص سریع نشانگان داون وجود دارد ولی این روش‌ها نیز پرهزینه بوده و نیاز به سلول زنده و مهارت تکنیکی است [۷، ۸]. روش مبتنی بر STR-PCR

نشانگان داون (Down Syndrome) (تریزومی ۲۱) یکی از ناهنجاری‌های کروموزومی شایع در بین نوزادان بوده و از علل عمده عقب‌ماندگی ذهنی محسوب می‌شود [۱، ۲]. وجود یک نسخه اضافی از کروموزوم شماره ۲۱ انسانی موجب تغییرات آسیب‌شناختی ناشی از بیان غیرطبیعی ژن‌های مستقر بر این کروموزوم می‌شود [۳]. خطر بالای ابتلای جنین به نشانگان داون، معمول‌ترین دلیل برای تشخیص پیش از تولد است. از سوی دیگر در غربالگری و تشخیص پیش از تولد، تشخیص نشانگان داون با بالاترین درجه دقت و حساسیت ضرورت دارد [۴]. در حال حاضر با استفاده از روش‌های غربالگری ابتدا خانم‌های بارداری که در معرض خطر بیشتر ابتلای جنین به نشانگان داون قرار دارند مشخص می‌شوند که پس از آن از روش‌های سیتوژنتیکی و مولکولی برای تشخیص قطعی ابتلای یا عدم ابتلای جنین در بارداری‌های پرخطر استفاده می‌شود [۵]. روش‌های استاندارد سیتوژنتیکی و سیتوژنتیک مولکولی (Fluorescent In Situ Hybridization: FISH) روش‌هایی هستند که به صورت معمول برای تشخیص نشانگان داون استفاده می‌شوند. روش‌های سیتوژنتیکی بسیار دقیق بوده و در ۹۹ درصد موارد تشخیص این اختلال و سایر اختلالات کروموزومی امکان‌پذیر می‌شود، ولی این روش آزمایشگاهی زمان‌بر بوده و تشخیص پیش از تولد ناهنجاری‌های کروموزومی ۷ تا ۲۲ روز وقت می‌گیرد [۶]. با استفاده از روش FISH امکان تشخیص سریع نشانگان داون وجود دارد ولی این روش‌ها نیز پرهزینه بوده و نیاز به سلول زنده و مهارت تکنیکی است [۷، ۸]. روش مبتنی بر STR-PCR

Short Tandem Repeat-PCR) یک روش انتخابی برای تشخیص مولکولی تریزومی ۲۱ است. مزایای این روش عبارتند از عدم نیاز به کشت سلولی، استفاده از مقادیر کم مایع آمنیوتیک، آسان و سریع بودن این روش تشخیصی. نقطه ضعف اصلی روش‌های مبتنی بر STR-PCR، امکان وقوع اشتباه در تشخیص پیش از تولد با استفاده از این روش‌ها است [۹].

Real-Time PCR یکی از روش‌های مولکولی است که می‌تواند در تشخیص نشانگان داون به کار گرفته شود. از این روش می‌توان به عنوان یک روش سریع، دقیق و حساس در تشخیص پیش از تولد نشانگان داون استفاده کرد تا از میزان بروز این ناهنجاری و هزینه‌های اجباری ایجاد شده در این راستا کاست. سیستم Real-Time PCR مبتنی بر سنجش کمی نسخه‌های ژنی از طریق سنجش میزان نشر نور فلورسنت در طول مرحله تصاعدی از واکنش PCR است. در این سیستم از یک رنگ فلورسنت ویژه متصل‌شونده به DNA نظیر سایبرگرین I (SYBR Green I) استفاده می‌شود که تنها پس از اتصال به DNA دو رشته‌ای، علامت (Signal) فلورسنت قوی منتشر می‌کند [۱۰، ۱۱]. این رنگ فلورسنت طی واکنش، متناسب با میزان محصولات تولید شده از هر چرخه، نور فلورسنت ساطع کرده و میزان نشر فلورسانس آن توسط نمایانگر دستگاه شناسایی و ثبت می‌شود. داده‌های اولیه حاصل از انجام Real-Time PCR می‌توانند با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (C_t) بررسی شوند. چرخه آستانه (C_t) چرخه‌ای است که در آن افزایش

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌گیری و استخراج DNA

در طرح حاضر، زنان بارداری که در غربالگری از طریق سنجش نشانگرهای شیمیایی AFP، β -hCG و free و سونوگرافی، خطر بالای ابتلای جنین به نشانگان داون را داشتند، به مرکز آمنیوسنتز معرفی شدند. پس از اخذ رضایت‌نامه از هر بیمار، ۱۵-۲۰ میلی‌لیتر مایع آمنیوتیک توسط پرناتولوژیست تحت شرایط استریل گرفته شد که بعد از انتقال به آزمایشگاه ۱۲-۱۵ میلی‌لیتر آن برای کشت آمنیوسیت (Amniocyte) مورد استفاده قرار گرفت. ۳ تا ۵ میلی‌لیتر مایع آمنیوتیک برای استخراج DNA درون لوله‌های فالتکن (Falcon) در فریزر (دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر) نگهداری شد. تخلیص DNA از ۵۹ نمونه مایع آمنیوتیک با روش‌های مختلف انجام شد. این روش‌ها شامل روش جوشاندن (Boiling)، روش رسوب‌دهی با نمک (Salting out)، دستورالعمل استخراج DNA از خون و بافت با کیت DNPTM (سیناژن)، دستورالعمل استخراج DNA از سلول با DNA Isolation Kit for cells and tissues (Roche)، دستورالعمل استخراج DNA از بافت با کیت (Roche) MagNa Pure DNA Isolation و کیت (Qiagen) QIAamp DNA Micro بودند. سپس کیفیت و کمیت نمونه‌های تخلیص شده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ ارزیابی شدند.

۲-۲- Real-Time PCR

واکنش Real-Time PCR در دستگاه ABI 7300 (Applied Biosystems, Sequence Detection Systems Foster City, CA) انجام شد. درون هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای مخلوطی به حجم ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط اصلی سایبرگرین (SYBR Green Master Mix) (Applied Biosystems, UK)، ۲ میکرولیتر از آغازگرهای

معنی‌داری در میزان فلورسانس در طول مرحله تکثیر تصاعدی PCR مشاهده می‌شود. بدیهی است C_t به‌طور معکوس با مقدار اولیه DNA ژنومی متناسب است [۱۲]. با توجه به سرعت، حساسیت و قدرت تشخیصی بالای Real-Time PCR، این سیستم به‌عنوان روشی مناسب برای تشخیص پیش از تولد نشانگان داون پیشنهاد شده است [۴].

از آن جایی‌که این روش دارای دقت و حساسیت بالایی است، بنابراین DNA نمونه‌های تخلیص شده، باید علاوه بر کمیت مناسب، کیفیت مطلوبی نیز داشته باشند تا بتوان نمونه‌ها را به‌وسیله دستگاه Real-Time PCR ارزیابی کرد. با توجه به وجود پروتئین زیاد و تعداد کم سلول‌های جنینی در مایع آمنیوتیک، تخلیص DNA از آن مشکل بوده و نیاز به استفاده از یک روش مناسب و بهینه است تا بتوان علاوه بر غلظت بالا، کیفیت مطلوبی را به‌دست آورد. به‌منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ NanoDrop® ND-1000 استفاده می‌شود که علاوه بر غلظت DNA، میزان خلوص و کیفیت مولکول DNA تخلیص شده را نیز تعیین می‌کند. دستگاه نانودراپ می‌تواند مقادیر کم نمونه را با دقت و حساسیت بالا اندازه‌گیری کند. این اطلاعات از طریق جذب نوری (Optical Density: OD) در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به‌دست می‌آید. به‌طور کلی اسیدهای نوکلئیک (DNA و RNA) در طول موج ۲۶۰ نانومتر و پروتئین‌ها در ۲۸۰ نانومتر بیشترین OD را دارند. OD زیاد در طول موج ۲۳۰ نانومتر نشان‌دهنده آلودگی با بافرهای استخراج DNA یا سایر مواد غیرآلی است. از این رو سنجش DNA تخلیص شده با محاسبه نسبت OD ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ صورت می‌گیرد. برای داشتن نمونه‌هایی با کیفیت مطلوب، عدد حاصل از نسبت OD ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ بایستی بین ۱/۷ تا ۱/۹ باشد. اگر عدد حاصل از نسبت OD ۲۶۰/۲۸۰، پایین‌تر از ۱/۷ باشد نشانگر آلودگی با پروتئین، و اگر بالاتر از ۱/۹ باشد بیانگر آلودگی با RNA است [۱۳].

موجود در پایگاه داده‌های Gene Bank در سایت اینترنتی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> و با استفاده از نرم‌افزارهای Gene Runner و Primer Express نسخه ۳/۰ (Applied Biosystems, Foster City CA) طراحی شد (جدول ۱). برای بررسی عملکرد و ویژگی آغازگرها، واکنش‌ها به صورت دوتایی (Duplicate) به همراه یک واکنش بدون DNA الگو (NTC) برای هر ژن انجام شد. سپس برای تعیین غلظت بهینه واکنش رقت‌های متوالی برای آغازگرها صورت گرفت. بهینه‌سازی و تنظیم غلظت برای آغازگرهای ژن‌های DSCAM، DYRK1A2 و PMP22 محاسبه شد. برای تعیین منحنی استاندارد واکنش رقت‌های متوالی با پنج غلظت (۳/۱۳، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) از DNA ژنومی به صورت سه‌تایی (Triplikat) در پلیت ۹۶ چاهکی انجام شد و شیب خط منحنی استاندارد مربوط به ژن‌های نامبرده تعیین شد. سپس واکنش Real-time PCR برای ژن‌های هدف و مرجع در نمونه‌های داون و طبیعی به صورت سه‌تایی و همزمان در پلیت ۹۶ چاهکی انجام گرفت و میانگین چرخه‌های آستانه (C_t) برای هر ژن محاسبه شد. براساس چرخه‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های جنینی مبتلا به داون و طبیعی و قرار دادن آن‌ها در فرمول‌های $\Delta\Delta C_t$ و $2^{-\Delta\Delta C_t}$ نسبت میزان ژن‌های هدف و مرجع با یکدیگر مقایسه شد.

(Primers) اختصاصی هر ژن، ۴ میکرولیتر از DNA ژنومی و ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. برنامه زمانی و دمایی واکنش انجام شده در دستگاه Real-Time PCR مدل ABI 7300 در سه مرحله عبارت است از:

مرحله اول در یک چرخه به منظور فعال‌سازی آنزیم *Taq* پلیمرز شروع داغ (Hot start *Taq* polymerase) و واسرشت‌سازی (Denaturation) اولیه DNA الگو با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم به صورت متناوب در طول ۴۰ چرخه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. در مرحله سوم، به منظور رسم منحنی تفکیک یک چرخه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اعمال شد. در این مرحله کاهش دما از ۹۵ درجه سانتی‌گراد به ۶۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۰/۰۳ درجه سانتی‌گراد بر ثانیه انجام شد و حدوداً ۲۰ دقیقه طول کشید. پس از اتمام مرحله سوم، منحنی‌های تکثیر و تفکیک با استفاده از نرم‌افزار SDS ABI 7300 آنالیز شد.

در این مطالعه، ژن‌های DSCAM و DYRK1A2 به عنوان ژن هدف روی کروموزوم ۲۱ و ژن PMP22 به عنوان ژن مرجع روی کروموزوم ۱۷ انتخاب شدند. آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی برای این سه ژن براساس توالی

جدول ۱ توالی آغازگرهای طراحی شده برای ژن‌های هدف و مرجع

نام ژن	نوع الیگو	ترتیب توالی	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)	درصد GC	طول آغازگر (جفت‌باز)
DSCAM	جلویی	5'-CCGGGCAGTCTAATCCAGAAC-3'	۶۰/۸	۵۵	۲۲
DSCAM	برگشتی	5'-AGTATGTGCACTCAGAAACCAGCTG-3'	۶۰/۷	۴۸	۲۵
DYRK1A	جلویی	5'-AATGGTGTGCACAGGATGTGAAC-3'	۶۰/۷	۴۸	۲۳
DYRK1A	برگشتی	5'-ATTCGGTGAACAAGTCATGAAG-3'	۶۰/۲	۴۲	۲۴
PMP22	جلویی	5'-GGAGGAGAGAAGGCTTGAATGC-3'	۶۰/۳	۵۵	۲۲
PMP22	برگشتی	5'-GTTCCACATGCACACAGAAACG-3'	۶۰/۰	۵۰	۲۲

۳- نتایج

۳-۱- نتایج حاصل از ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ

با توجه به نتایج حاصل از ارزیابی نمونه‌ها با دستگاه نانودراپ (جدول ۲)، نمونه‌های تخلیص شده با روش

رسوب‌دهی با نمک به‌علت عدم امکان تخلیص DNA Isolation Kit for cells and tissues (Roche) و کیت MagNa Pure DNA Isolation (Roche) به‌علت کیفیت و کمیت نامطلوب DNA در ارزیابی با روش Real-Time PCR به‌کارگرفته نشدند.

جدول ۲. ارزیابی نمونه‌های تخلیص شده با روش‌های مختلف به‌وسیله نانودراپ

جذب نوری ۲۶۰/۲۳۰	جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰	غلظت DNA (نانوگرم در هر میکرولیتر)	تعداد نمونه (n)	روش استخراج DNA
۰/۲۹	۱/۰	۱۳۸/۲	۱۰	روش جوشاندن
		-	۲	روش رسوب‌دهی با نمک
۰/۰۹	۳/۱	۳۸/۱	۱	دستورالعمل استخراج DNA از بافت با کیت DNP™ (سیناژن) با اضافه شدن آنزیم پروتئاز و پروتئاز بافر
۰/۱۴	۱/۶	۴۰	۱	دستورالعمل استخراج DNA از بافت با کیت DNP™ (سیناژن) با افزایش میزان آنزیم پروتئاز و پروتئاز بافر
۰/۷۱	۱/۸	۲۹/۱	۱	دستورالعمل استخراج DNA از بافت با کیت DNP™ (سیناژن) با افزایش میزان آنزیم پروتئاز و پروتئاز بافر و انکوبه کردن نمونه به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد
۰/۱۹	۰/۹۳	۱/۳	۲	روش استخراج DNA از سلول با DNA Isolation Kit for cells and tissues (Roche)
۰/۰۵	۰/۶۶	۱۷/۷	۲	روش استخراج DNA از بافت با کیت (Roche) MagNa Pure DNA Isolation
۱/۵	۱/۸	۱۳/۰۶	۴۰	کیت (Qiagen) QIAamp DNA Micro

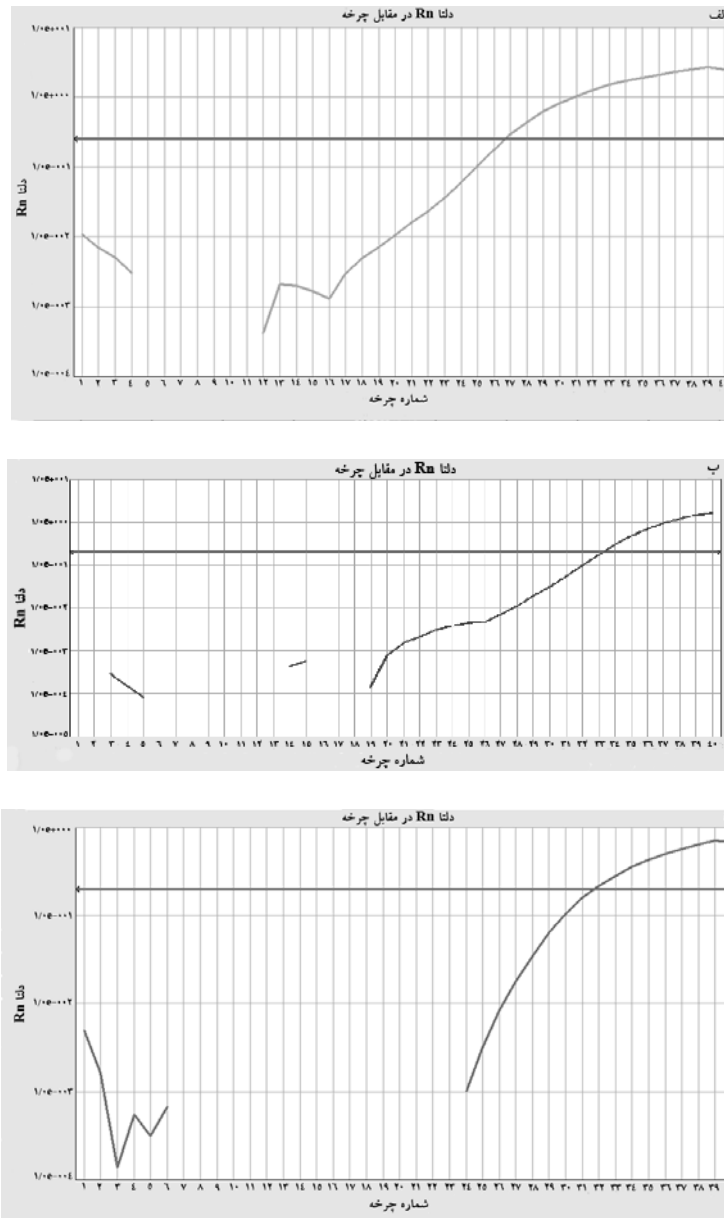
شده با کیت DNP™ (سیناژن) و روش جوشاندن در چرخه‌های ۳۱-۳۲ است، در حالی که C_t برای این ژن‌ها در نمونه‌های تخلیص شده با کیت QIAamp DNA Micro (Qiagen) در چرخه ۲۵ است (شکل‌های ۱-۳). این موضوع نشان‌دهنده کیفیت بسیار خوب DNA تخلیص شده با این روش است. به عبارتی دیگر کیفیت عملکرد تکثیر در غلظت‌های مساوی از DNA تا ۲^۵ برابر بهبود یافته است. همچنین به‌واسطه

۳-۲- مقایسه نتایج Real-Time PCR حاصل از نمونه‌های تخلیص شده با روش جوشاندن، کیت DNP™ (سیناژن) و کیت QIAamp DNA Micro (Qiagen)

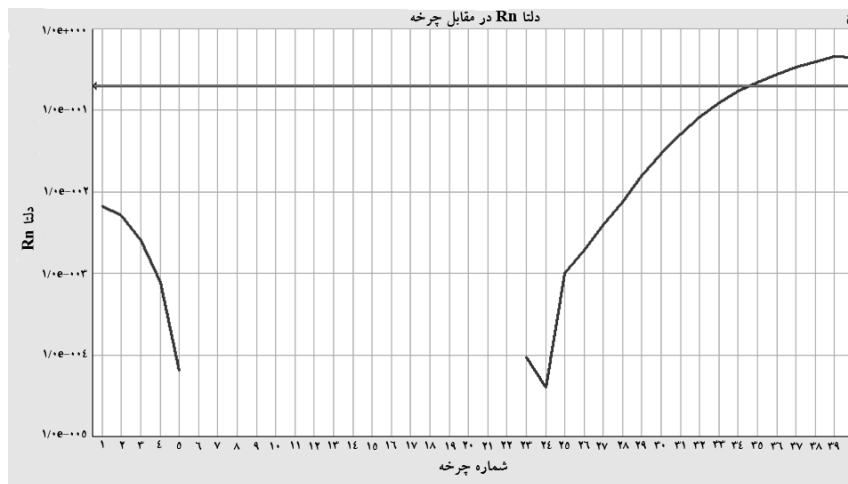
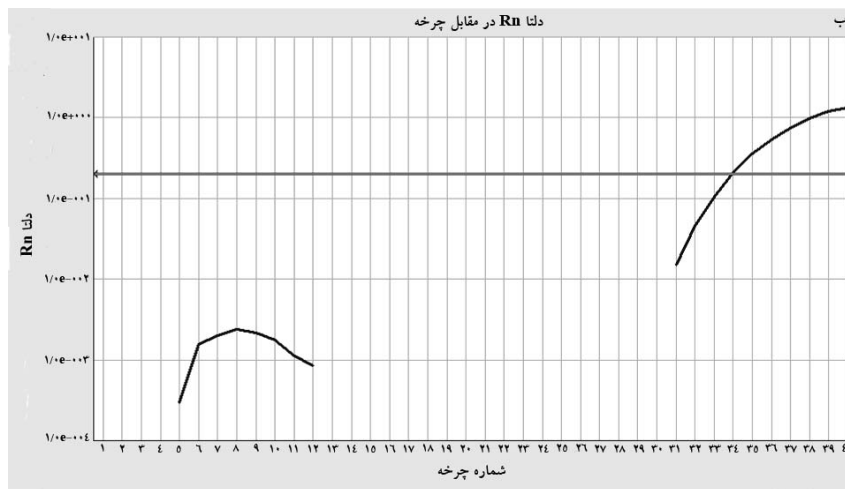
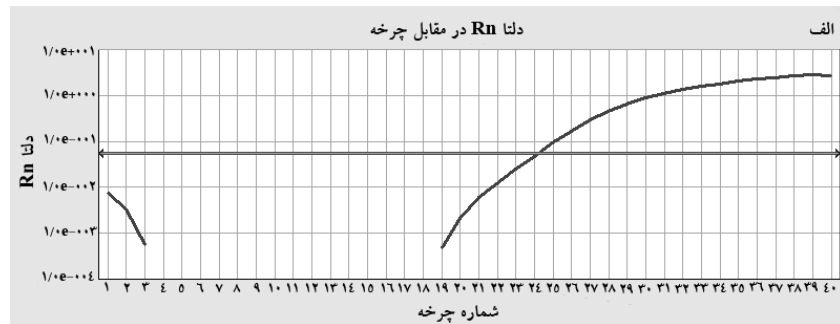
C_t حاصل از Real-Time PCR برای ژن‌های DSCAM، DYRK1A2 و PMP22 در نمونه‌های تخلیص

سیستم به صورت یک قله (Peak) نمایش داده می شود. نتایج به دست آمده از آنالیز منحنی ذوب در این مطالعه نشان می دهد که محصول هر سه ژن به صورت اختصاصی و فاقد محصولات غیراختصاصی نظیر آغازگر دایمر است (شکل ۴).

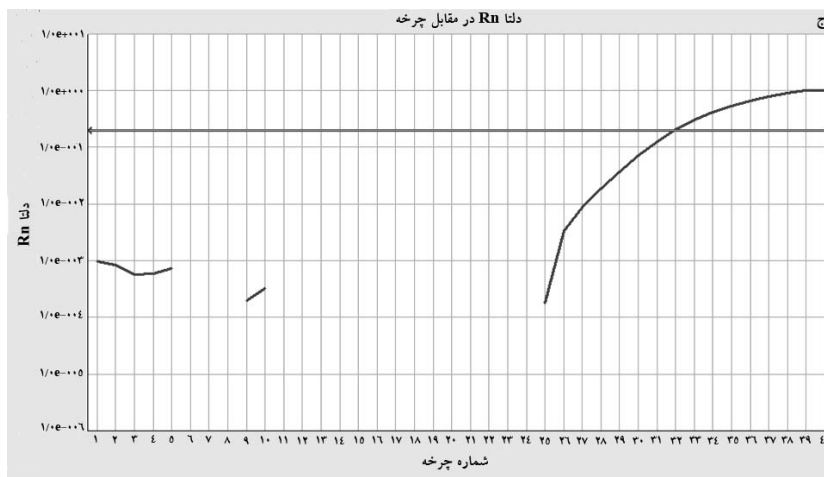
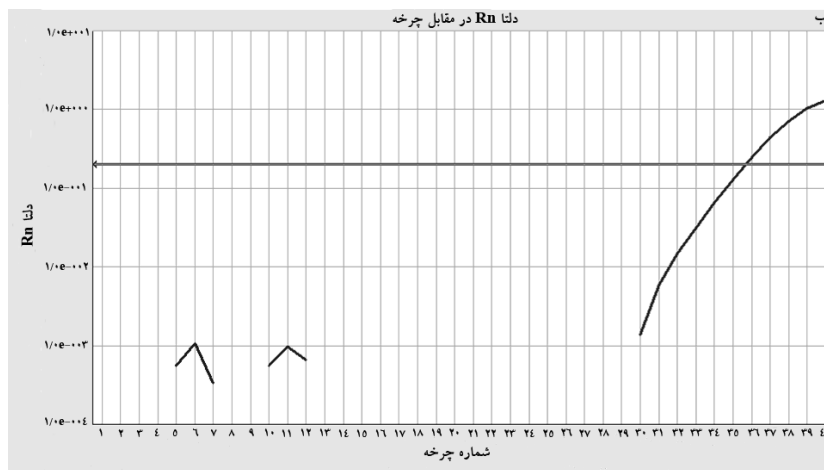
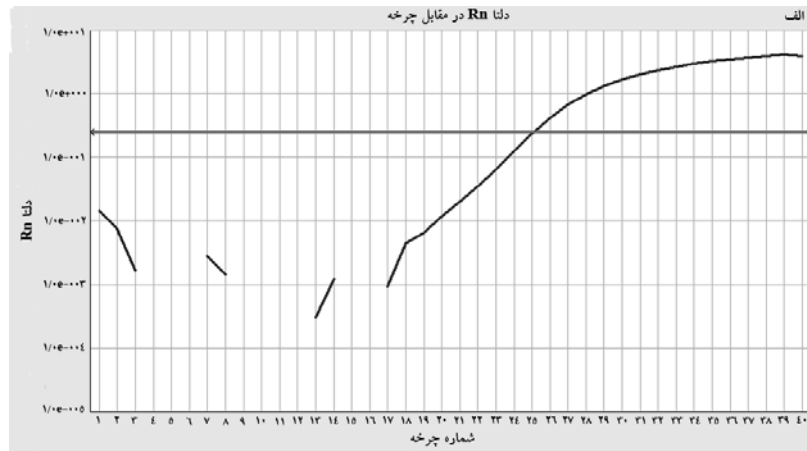
تغییرات دمایی که در آنالیز منحنی ذوب (Dissociation curve) صورت می پذیرد، هر قطعه DNA دو رشته ای موجود در محصول براساس طول و محتوای بازهای CG در دمای ذوب اختصاصی خود، تک رشته ای شده و این تغییر حالت توسط



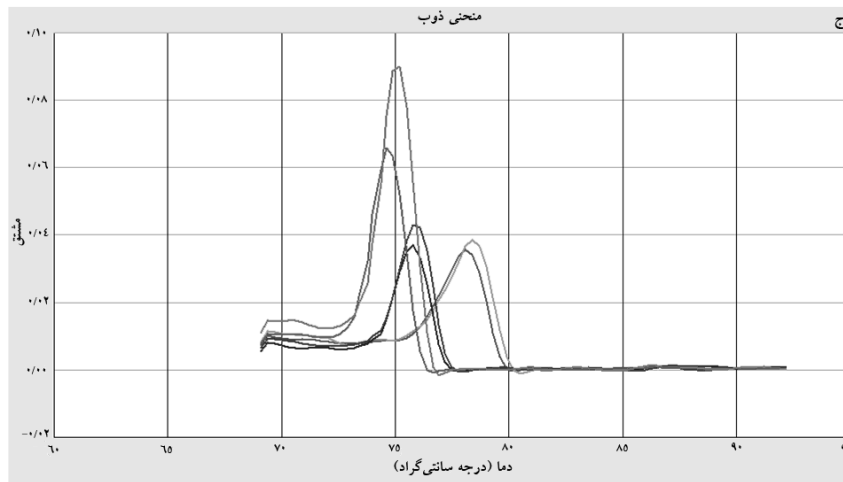
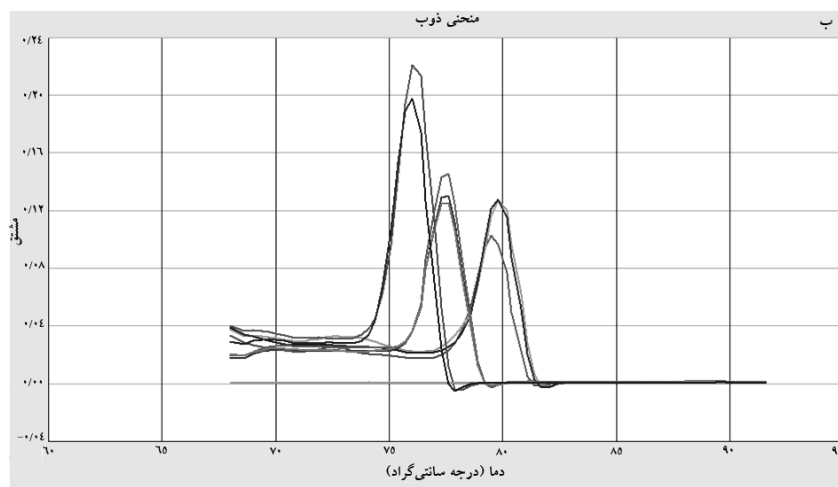
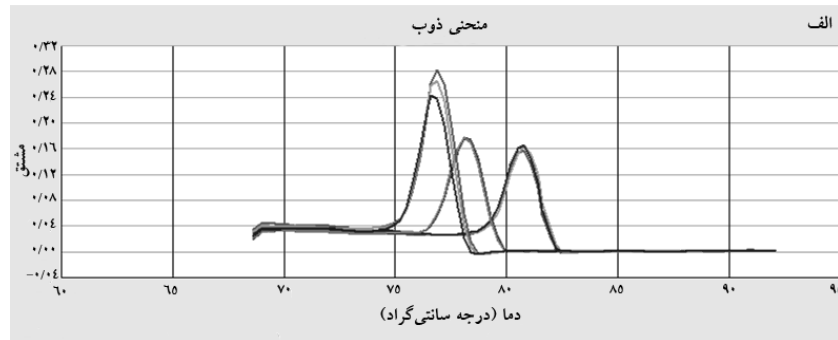
شکل ۱ الف) Ct ژن DSCAM نمونه تخلیص شده با کیت Qiagen QIAamp DNA Micro (چرخه آستانه ۲۶ و ۲۷)، ب) Ct ژن DSCAM نمونه تخلیص شده با روش جوشاندن (چرخه آستانه ۳۳ و ۴۸)، ج) Ct ژن DSCAM نمونه تخلیص شده با کیت DNP™ (سیناژن) (چرخه آستانه ۳۳ و ۴۸)



شکل ۲ الف) ژن Ct DYRK1A2 نمونه تخلیص شده با کیت (Qiagen) QIAamp DNA Micro (چرخه آستانه ۲۴ و ۴۷)، ب) ژن Ct DYRK1A2 نمونه تخلیص شده با روش جوشاندن (چرخه آستانه ۱۲ و ۳۴)، ج) ژن Ct DYRK1A2 نمونه تخلیص شده با کیت DNPTM (سیناژن) (چرخه آستانه ۳۴ و ۶۲)



شکل ۳ الف) Ct ژن PMP22 نمونه تخلیص شده با کیت (Qiagen) QIAamp DNA Micro (چرخه آستانه ۱۳ و ۲۵)، ب) Ct ژن PMP22 نمونه تخلیص شده با روش جوشاندن (چرخه آستانه ۳۵ و ۸۴)، ج) Ct ژن PMP22 نمونه تخلیص شده با کیت DNPTM (سیناژن) (چرخه آستانه ۲۷ و ۳۲)



شکل ۴ الف) آنالیز منحنی ذوب برای ژن‌های DSCAM، DYRK1A2 و PMP22 در نمونه‌های تخلیص شده با کیت (Qiagen) QIAamp DNA Micro، ب) آنالیز منحنی ذوب برای ژن‌های DSCAM، DYRK1A2 و PMP22 در نمونه‌های تخلیص شده با روش جوشاندن، ج) آنالیز منحنی ذوب برای ژن‌های DSCAM، DYRK1A2 و PMP22 در نمونه‌های تخلیص شده با کیت DNP™ (سینازن)

۳-۳- رسم منحنی استاندارد و محاسبه کارایی واکنش تکثیر

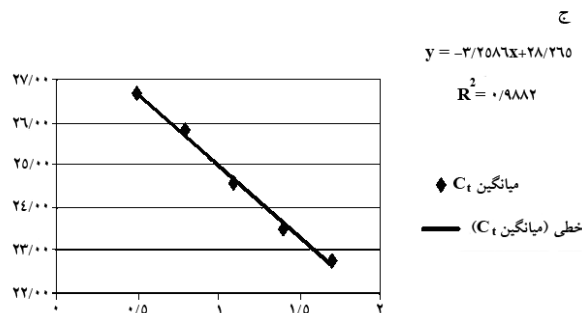
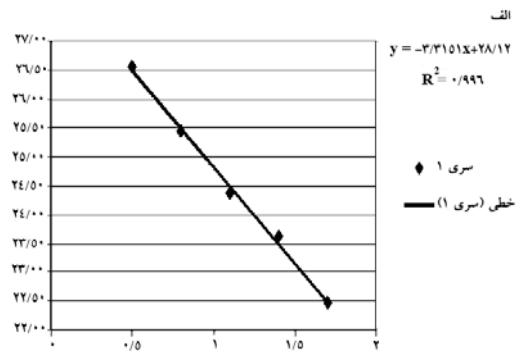
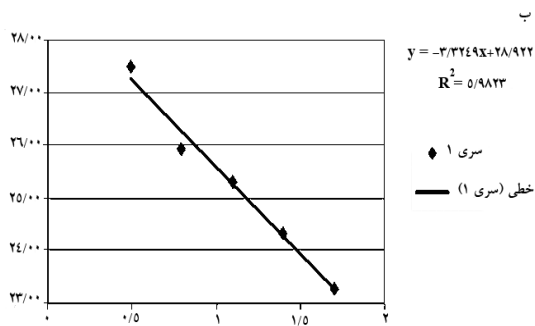
پس از پایان آزمایش، در بیشتر نرم‌افزارها منحنی استاندارد برای هر کدام از ژن‌ها به صورت نموداری روی محور XY ترسیم می‌شود. در این نمودار لگاریتم مقدار نمونه الگو روی محور X ها و چرخه آستانه (C_t) روی محور Y ها قرار دارد؛ در نمودارهای منحنی استاندارد بایستی شیب خط به دست آمده بین $3/6$ تا $3/1$ باشد که در مطالعه حاضر برای هر سه ژن در این محدوده قرار داشت. شیب خط منحنی استاندارد برای ژن DSCAM برابر $3/315$ (شکل ۵- الف)، برای ژن

DYRK1A2 برابر $3/324$ (شکل ۵- ب) و برای ژن PMP22 برابر $3/258$ به دست آمد (شکل ۵- ج). با توجه به نتایج حاصل از نمودار منحنی استاندارد، کارایی واکنش برای هر یک از ژن‌های DSCAM، DYRK1A2 و PMP22 به صورت زیر محاسبه شد:

$$-1 = [10^{(-1/-3/315)}] = \text{کارایی واکنش PCR ژن DSCAM} = 100\% = 1/002 \times 100 = 2/002 - 1$$

$$-1 = [10^{(-1/-3/324)}] = \text{کارایی واکنش PCR ژن DYRK1A2} = 99/1007\% = 0/997 \times 100 = 1/997 - 1$$

$$-1 = [10^{(-1/-3/258)}] = \text{کارایی واکنش PCR ژن PMP22} = 100\% = 1/027 \times 100 = 2/027 - 1$$



شکل ۵ الف) نمودار منحنی استاندارد ژن DSCAM که با برنامه Excel ترسیم شده است ($Y=mX+b$). چرخه آستانه Y ، شیب خط m ، لگاریتم مقدار نمونه الگو X ، Y ، عرض از مبدا b ؛ ضریب ثابت R^2 نیز بایستی در نظر گرفته شود. ب) نمودار منحنی استاندارد ژن DYRK1A2 که با برنامه Excel ترسیم شده است ($Y=mX+b$). چرخه آستانه Y ، شیب خط m ، لگاریتم مقدار نمونه الگو X ، Y ، عرض از مبدا b ؛ ضریب ثابت R^2 نیز بایستی در نظر گرفته شود. ج) نمودار منحنی استاندارد ژن PMP22 که با برنامه Excel ترسیم شده است ($Y=mX+b$). چرخه آستانه Y ، شیب خط m ، لگاریتم مقدار نمونه الگو X ، Y ، عرض از مبدا b ؛ ضریب ثابت R^2 نیز بایستی در نظر گرفته شود.

۳-۴- آنالیزها و محاسبات آماری برای تشخیص

پیش از تولد نشانگان داون در نمونه‌های جنینی

پس از محاسبه میانگین چرخه‌های آستانه (C_t) برای هر سه ژن، ΔC_t مطابق با فرمول: «ژن مرجع» $C_t - C_t$ (ژن هدف) $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t$ ، «نمونه طبیعی» $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t$ و نسبت ژنی به وسیله فرمول: «نسبت ژنی» محاسبه و امکان تفکیک نمونه‌های جنینی طبیعی و داون فراهم شد. نتایج حاصل از سه آزمایش مستقل در ۳ جنین مبتلا به نشانگان داون و ۳ جنین طبیعی در جدول ۳ نمایش داده شده است. این نسبت در نمونه‌های طبیعی در محدوده

۰/۸۵ - ۱/۱ و در نمونه‌های مبتلا به نشانگان داون در محدوده ۱/۴۰ - ۱/۹۵ قرار داشت (جدول ۳). به منظور بالا بردن دقت آزمایش، از نسبت‌های مربوط به دو ژن هدف میانگین گرفته شد و از این میانگین به عنوان مبنای تفکیک نمونه‌های طبیعی از مبتلا استفاده شد که باعث محدودتر شدن دامنه تغییرات نسبت‌ها به ۰/۹۵ - ۱/۱ در نمونه‌های طبیعی و ۱/۸ - ۱/۴۰ در نمونه‌های مبتلا به تریزومی ۲۱ شد. سپس در نمونه‌های آزمایش شده با Real-Time PCR میانگین نسبت ژنی و میزان انحراف از استاندارد (SD)، تعیین شد. با استفاده از نرم‌افزار Excel و با انجام آنالیز آماری t-test (P value = ۰/۰۲) تفاوت معنی‌داری به دست آمد (جدول ۴).

جدول ۳ مقایسه نتایج آنالیزها و محاسبات آماری برای تشخیص پیش از تولد در نمونه‌های جنینی طبیعی و مبتلا به نشانگان داون

میانگین	نسبت	$-\Delta \Delta C_t$	طبیعی		ناشناخته		DSCAM	نمونه مبتلا به نشانگان داون - ۱
			هدف	PMP22	هدف	PMP22		
۱/۴۷	۱/۵۲	۰/۶۰	۲۷/۴۲	۲۷/۵۷	۲۶/۲۵	۲۵/۸۰	DSCAM	نمونه مبتلا به نشانگان داون - ۱
			۲۷/۴۲	۲۸/۳۳	۲۶/۲۵	۲۶/۶۶		
۱/۵۹	۱/۶۵	۰/۷۲	۲۷/۴۲	۲۷/۵۷	۲۴/۲۱	۲۳/۶۴	DSCAM	نمونه مبتلا به نشانگان داون - ۲
			۲۷/۴۲	۲۸/۳۳	۲۴/۲۱	۲۴/۵۱		
۱/۷۶	۱/۹۱	۰/۹۳	۲۷/۴۲	۲۷/۵۷	۲۶/۸۲	۲۶/۰۴	DSCAM	نمونه مبتلا به نشانگان داون - ۳
			۲۷/۴۲	۲۸/۳۳	۲۶/۸۲	۲۷/۰۵		
۱/۰۱	۰/۹۴	-۰/۰۹	۲۷/۴۲	۲۷/۵۷	۲۸/۷۰	۲۸/۹۴	DSCAM	نمونه طبیعی - ۱
			۲۷/۴۲	۲۸/۳۳	۲۸/۷۰	۲۹/۵۰		
۱/۰۳	۱/۰۱	۰/۰۱	۲۷/۴۲	۲۷/۵۷	۲۳/۸۲	۲۳/۹۶	DSCAM	نمونه طبیعی - ۲
			۲۷/۴۲	۲۸/۳۳	۲۳/۸۲	۲۴/۶۷		
۰/۹۷	۱/۰۵	۰/۰۷	۲۷/۴۲	۲۷/۵۷	۲۹/۷۴	۲۹/۸۲	DSCAM	نمونه طبیعی - ۳
			۲۷/۴۲	۲۸/۳۳	۲۹/۷۴	۳۰/۸۳		

جدول ۴ محاسبه میانگین نسبت ژنی همراه با انحراف از استاندارد (SD) در نمونه‌های جنینی طبیعی و مبتلا به نشانگان داون و آنالیز t-test

t-test	میانگین \pm انحراف از استاندارد	تعداد	
P value= ۰/۰۲	۱/۶۱ \pm ۰/۰۹	۵	نمونه نشانگان داون
	۱/۰۳ \pm ۰/۰۵	۲۹	نمونه طبیعی

۴- بحث

در این مطالعه نمونه‌های جنینی مبتلا به نشانگان داون و طبیعی برای سنجش نسبت ژنی توسط روش Real-Time PCR با استفاده از ماده فلورسنت سایبرگرین I مطالعه شدند. ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق شامل ژن‌های هدف DYRK1A2 و DSCAM واقع بر ناحیه اساسی کروموزوم ۲۱ انسانی و ژن مرجع PMP22 واقع بر کروموزوم ۱۷ هستند. از نظر تئوری در افراد بیمار سه کپی (تری‌زومی) از کروموزوم ۲۱ و در افراد طبیعی دو کپی (دیزومی) وجود دارد. بنابراین نسبت ژن‌های موجود بر کروموزوم ۲۱، ۱/۵ برابر افراد طبیعی است [۴]. در مطالعه حاضر، نسبت‌های به‌دست آمده برای ژن‌های فوق امکان تفکیک نمونه‌های بیماران مبتلا به نشانگان داون از گروه کنترل طبیعی را فراهم آورد و حضور سه نسخه از کروموزوم ۲۱ در گروه بیماران تأیید شد. این یافته با روش‌های استاندارد متداول شامل آنالیز کروموزومی سیتوزنتیک [کاریوتیپ (Karyotype)] مقایسه و نتایج حاصل تأیید شد.

به‌منظور بهینه‌سازی استخراج DNA از نمونه‌های مایع آمنیوتیک (Amniotic)، روش‌های مختلف شامل روش جوشاندن، روش رسوب‌دهی با نمک دست‌ورالعمل استخراج DNA از خون و بافت با کیت DNPTM (سیناژن)، دست‌ورالعمل استخراج DNA از سلول با DNA Isolation (Roche) Kit for cells and tissues، دست‌ورالعمل استخراج DNA از بافت با کیت‌های MagNa Pure DNA Isolation (Roche) و (Qiagen) QIAamp DNA Micro بررسی شدند. روش استخراج DNA از سلول با DNA Isolation (Roche) Kit for cells and tissues براساس یکنواخت کردن نمونه، لیز سلولی در حضور دترژنت آبیونی

(Anionic detergent) قوی و پروتئیناز K، حذف RNA با Rnase و از بین بردن پروتئین به‌وسیله رسوب دادن آن و سانتریفیوژ صورت می‌گیرد. کاربرد این روش برای تخلیص DNA از بافت جفت و مایع آمنیوتیک است ولی به‌علت حجم کم مایع آمنیوتیک در دسترس، استفاده از این روش نتایج مطلوبی نداشت [۱۴]. استخراج DNA از سلول با کیت Roche MagNa Pure DNA Isolation براساس لیز سلولی، غیرفعال کردن نوکلئازها، اتصال DNA به ذرات شیشه‌ای آهن‌ریبا (Magnetic Glass Particle: MGP)، شستشوی DNA و رقیق‌سازی است. این روش نیز برای تخلیص DNA از بافت جفت و مایع آمنیوتیک به‌کار می‌رود و PCR بر نمونه‌های تخلیص شده نتیجه مطلوبی دارد، اما به‌علت حساسیت زیاد Real-Time PCR به کیفیت DNA به‌کار رفته در واکنش، با وجود غلظت مطلوب DNA تخلیص شده، استفاده از این روش مناسب نبود [۱۵]. برنامه استخراج DNA از خون و بافت با کیت DNPTM (سیناژن)، براساس لیز سلولی و سپس رسوب DNA است که در نهایت DNA نامحلول شسته شده و نمک‌زدایی می‌شود. استفاده از این کیت در تخلیص DNA از خون و بافت برای به‌دست آوردن کیفیت و کمیت مطلوب DNA مؤثر بوده اما برای استخراج DNA از مایع آمنیوتیک نتیجه مطلوبی نداشت. تخلیص DNA با روش رسوب‌دهی با نمک، براساس لیز سلولی و رسوب DNA با نمک است. این روش برای استخراج DNA از خون، روش بسیار مفید و مؤثری بوده و برای استخراج DNA از مایع آمنیوتیک با حجم ۱۰ میلی‌لیتر نیز گزارش شده است [۴، ۱۶]؛ ولی استفاده از این روش در طرح حاضر به‌علت حجم کم نمونه‌های مایع آمنیوتیک نتیجه مطلوبی نداشت. در روش

اعتماد نباشد. از طرفی هرچه در آزمایش‌ها C_t کمتر باشد یعنی کارایی و عملکرد PCR بالاتر بوده، دقت نتایج به‌دست آمده بالاتر خواهد بود.

در مطالعه حاضر امکان تفکیک نمونه‌های جنینی مبتلا به نشانگان داون از نمونه‌های جنینی طبیعی تنها با استفاده از DNA تخلیص شده توسط کیت Qiagen QIAamp DNA Micro میسر شد. بنابراین با مقایسه نتایج به‌دست آمده از ارزیابی نمونه‌های تخلیص شده با نانودراپ و انجام Real-Time PCR بر نمونه‌های ذکر شده، استفاده از کیت Qiagen QIAamp DNA Micro به‌عنوان روش قابل قبول برای تخلیص DNA از نمونه‌های مایع آمنیوتیک برای تشخیص پیش از تولد با روش Real-Time PCR در نظر گرفته شد. این یافته در هماهنگی با نتایج مطالعه انجام شده توسط یونینگ ژو (Yu-ning Zhu) و همکارانش است که روی ۵۶۳ زن باردار در معرض خطر بیشتر ابتلای جنین به نشانگان داون و در کشور چین انجام شده و در آن از کیت Qiagen, Germany QIAamp mini (or midi) برای تخلیص DNA استفاده شده است که نتایج دقیق و قابل اعتمادی در تشخیص پیش از تولد تریزومی ۲۱ داشته است. در آن مطالعه از سیستم پروب‌های (Probes) نشان‌دار و واکنش‌های دوگانه به‌منظور تعیین کپی اضافه کروموزم ۲۱ استفاده شده است [۱۷].

از سوی دیگر، در اکثر مطالعات انجام شده از ژن مرجع (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) GAPDH یا سایر ژن‌های خانه‌دار (Housekeeping) که بیشتر در مطالعات بیان ژنی به‌کار برده می‌شوند به‌عنوان ژن مرجع استفاده شده است [۲۰]. این ژن‌ها مناسب مطالعات ژنومی و سنجش میزان ژنی نیست. انتخاب ژن مرجع در مطالعات سنجش میزان ژنی اهمیت بسیاری دارد زیرا میزان ژن هدف نسبت به این ژن مقایسه و محاسبه می‌شود. بنابراین بایستی میزان ژن مرجع همواره ثابت و به‌صورت دایزومی باشد. از این رو در مطالعه انجام شده ژن PMP22 به‌عنوان ژن مرجع انتخاب شد. این ژن دارای ویژگی‌های لازم به‌عنوان ژن مرجع

جوشاندن، ترپسین بافت را سست کرده و جوشاندن سبب لیز سلولی می‌شود. این روش برای تخلیص DNA از بافت جفتی و مایع آمنیوتیک و سپس انجام PCR استفاده می‌شود ولی کیفیت نامطلوب DNA تخلیص شده سبب به‌کارنبردن این روش در این مطالعه شد. استخراج DNA با کیت Qiagen QIAamp DNA Micro براساس لیز سلولی، اتصال DNA به ستون MinElute، شستشو و رقیق شدن DNA با بافر AE (Adames-Evans Buffer) است. این کیت برای استخراج DNA از نمونه‌های با مقادیر کم کاربرد داشته و استفاده از آن در تخلیص DNA از نمونه‌های مایع آمنیوتیک نتیجه کمی و کیفی مطلوبی داشت [۱۷].

در ارتباط با تشخیص مولکولی تریزومی ۲۱ با استفاده از روش Real-Time PCR مطالعات محدودی صورت گرفته است. در مطالعات انجام شده توسط برنارد زیمرمن (Bernhard Zimmermann) و همکارانش، از کیت Roche High-pure PCR template برای تخلیص DNA از مایع آمنیوتیک استفاده شده است [۱۸]، یالی هو (Yali Hu) و همکارانش، با استفاده از حجم ۱۰ میلی‌لیتری مایع آمنیوتیک از روش رسوب‌دهی با نمک [۴] و یونگ هو یانگ (Young Ho Yang) و همکارانش از کیت Promega purification برای استخراج DNA از مایع آمنیوتیک استفاده کرده‌اند [۱۹]. در این مطالعه، زمانی که DNA به‌دست آمده از روش‌های مختلف با غلظت‌های یکسان مورد استفاده قرار گرفتند، نتایج Real-Time PCR آن‌ها تفاوت واضحی را نشان داد. این موضوع ناشی از کیفیت DNA تخلیص شده بوده و نشانگر خرد شدن DNA و افت کیفیت آن در اکثر روش‌های فوق است. اگرچه DNA با کیفیت متوسط و پایین می‌تواند در اکثر روش‌های مولکولی قدیمی‌تر مانند PCR معمولی و سایر روش‌های مبتنی بر آن به‌کار گرفته شود ولی ناهمگون بودن DNA و وجود درصد بالایی از ناخالصی و عوامل مهارکننده PCR باعث می‌شود که نتایج روش حساس Real-Time PCR قابل تکرار و قابل

سیتوژنتیک متداول، برای تشخیص پیش از تولد نشانگان داون و سایر ناهنجاری‌های کروموزومی پیشنهاد می‌شود. اگرچه مطالعات گسترده‌تری برای تأیید حساسیت و ویژگی این روش به‌منظور کاربردهای بالینی لازم است.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به کلیه خانم‌های باردار و خانواده‌های محترم آن‌ها و نیز تمامی همکاران بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران و مرکز آمیوسستز بیمارستان الزهراء تبریز اعلام می‌دارند. این طرح با پشتیبانی مالی انستیتو پاستور ایران (طرح شماره ۴۱۷) انجام شد.

است: نخست آن‌که، فاقد ژن‌های کاذب (Pseudogenes) بوده و از سوی دیگر، هرگونه تغییر در میزان ژنی (حذف یا اضافه شدن یا جهش‌های نقطه‌ای) در یک نسخه از آلل‌های این ژن به‌صورت فنوتیپ بیماری مشاهده می‌شود و نیازی به آزمایش‌های ژنتیک مولکولی برای این ژن به‌منظور شناسایی افراد طبیعی نیست. حذف در ژن PMP22 منجر به بیماری HNPP (Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies) و مضعف شدن ژن منجر به بیماری شارکوت-ماری توت (Charcot marie tooth) می‌شود.

در مجموع، با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات انجام شده قبلی، روش Real-Time PCR به‌عنوان روش مولکولی سریع و دقیق در کنار سایر روش‌های

۶- منابع

- [1] Basu S, Pooniya V, Kumar A, Das BK. Down syndrome with cerebral arteriovenous malformation. *Ann Trop Paediatr* 2009; 29(1): 61-5.
- [2] Visootsak J, Sherman S. Neuropsychiatric and behavioral aspects of trisomy 21. *Curr Psychiatry Rep* 2007; 9(2): 135-40.
- [3] Myslek-Prucnal M, Sadowska L, Gruna-Ozarowska A. [The diagnostics and developmental stimulation of small children with 21 trisomy in compliance with thyroid function]. *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw* 2008; 14(4): 243-7.
- [4] Hu Y, Zheng M, Xu Z, Wang X, Cui H. Quantitative real-time PCR technique for rapid prenatal diagnosis of Down syndrome. *Prenat Diagn* 2004; 24(9): 704-7.
- [5] Eiben B, Glaubitz R. First-trimester screening: an overview. *J Histochem Cytochem* 2005; 53(3): 281-3.
- [6] Lee MH, Ryu HM, Kim DJ, Lee BY, Cho EH, Yang JH, Kim MY, Han JY, Park SY. Rapid prenatal diagnosis of Down Syndrome using quantitative fluorescent PCR in uncultured amniocytes. *J Korean Med Sci* 2004; 19(3): 341-4.
- [7] Acar H, Yildirim MS, Kaynak M. Reliability and efficiency of interphase-fish with alpha-satellite probe for detection of aneuploidy. *Genet Couns* 2002; 13(1): 11-7.
- [8] Tsujie T, Takemura M, Kimura T, Shimoya K, Tsutsui T, Ogita K, Ozaki M, Murata Y. Rapid detection of trisomy 21 by gene dosage analysis using quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Obstet Gynaecol Res* 2006; 32(4): 368-72.
- [9] Dudarewicz L, Holzgreve W, Jeziorowska A, Jakubowski L, Zimmermann B. Molecular methods for rapid detection of aneuploidy. *J Appl Genet* 2005; 46(2): 207-15.

- [10] 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.
- [11] Vaerman JL, Saussoy P, Ingargiola I. Evaluation of real-time PCR data. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18(2): 212-4.
- [12] 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.
- [13] Hansen TV, Simonsen MK, Nielsen FC, Hundrup YA. Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: comparison of the response rate and quality of genomic DNA. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(10): 2072-6.
- [14] Lahiri DK, Schnabel B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochem Genet* 1993; 31(7-8): 321-8.
- [15] Kirchgesser M, Schlagenhauer R, Kirchner B, Adem C, Malmberg W, Tgetgel A, Huber I, Nieswandt V, Walter T. The New MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kits – Fast and Flexible Fully Automated Sample Preparation. *Biochemica* 2003; No. 4: 12-4.
- [16] 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.
- [17] Zhu YN, Lu SM, You JF, Zhu B, Yu MY. Novel real-time PCR assay for rapid prenatal diagnosis of Down syndrome: a prospective study of 563 amniocytes. *Clin Biochem* 2009; 42(7-8): 672-5.
- [18] Zimmermann B, Levett L, Holzgreve W, Hahn S. Use of real-time polymerase chain reaction for the detection of fetal aneuploidies. *Methods Mol Biol* 2006; 336: 83-100.
- [19] Yang YH, Nam MS, Yang ES. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 by real-time quantitative polymerase chain reaction with amplification of small tandem repeats and S100B in chromosome 21. *Yonsei Med J* 2005; 46(2): 193-7.
- [20] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25(2): 169-93.