

Designing a Rapid Screening Method for Detection of Four Common Beta Globin Gene Mutations in Iranian Population by High-Resolution Melting Analysis

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Hamid M.* PhD,
Morovati Sharif Abad S.¹ MSc

How to cite this article

Hamid M, Morovati Sharif Abad S. Designing a Rapid Screening Method for Detection of Four Common Beta Globin Gene Mutations in Iranian Population by High-Resolution Melting Analysis. Pathobiology Research. 2018;21(2):101-06.

*Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
¹Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Correspondence

Address: No. 69, Molecular Medicine Department, Pasteur Institute of Iran, 12 Farvardin Street, Pasteur Street, Tehran, Iran. Postal Code: 1316943551
Phone: +98 (21) 66480780
Fax: +98 (21) 66470870
hamid143@yahoo.com

Article History

Received: November 23, 2017
Accepted: February 7, 2018
ePublished: July 5, 2018

ABSTRACT

Aims Beta-thalassemia is a blood and genetic disorder. Prevalence of beta-thalassemia trait is high in Iranian population. Therefore, for detection of carriers' status in premarital screening we need to establish reliable and rapid scanning method. The aim of this study is development a rapid method to detect four common beta globin gene mutations in Iranian population by HRM (High-Resolution Melting Analysis).

Materials & Methods In this experimental study, eight samples of beta-thalassemic carriers and illness with IVSI-110 (G>A), IVSII-I (G>A), IVSI-5 (G>C) and CD36/37 (-T) genotypes in Homozygote and heterozygote conditions and one control sample (healthy person) were selected. After blood collection, DNA extraction was performed using salting out method. To ensure, the samples were run binary, and two control samples without DNA were used. Primers were designed with Gene Runner 6.0.28, Primer Express v 3.0.1 3/1) and Primer3 v. 0.4.0 and HRM method was used to determine the above mutations.

Findings The best concentration of DNA was obtained at 5ng/μl. In the difference plot step, the differences between the curves were clearly observed in heterozygous, normal and homozygous conditions. Unexpectedly, in the mutation IVSII-IG>A in the melting curve was seen two peaks in the samples; it was due to the presence of a polymorphism near the desired mutation.

Conclusion The HRM method is capable of detecting the four common beta globin gene mutations, and, it can differentiate between heterozygote and homozygous in a single mutation. This method is high throughput, which can analyze 96 samples of DNA in 2hours.

Keywords Beta- thalassemia; Mutation; Iran

CITATION LINKS

[1] The first report of a 290-bp deletion in β-globin gene in the South of Iran [2] Molecular analysis of gamma-globin promoters, HS-111 and 3'HS1, in beta-thalassemia intermedia patients associated with high levels of Hb F [3] Identification of α-globin chain variants: A report from Iran [4] The thalassaemia syndromes [5] Thalassemia in Iran: Epidemiology, prevention, and management [6] A national register for surveillance of inherited disorders: Beta thalassaemia in the United Kingdom [7] Carrier screening for beta-thalassaemia: A review of international practice [8] The survival analysis of beta thalassemia major patients in South East of Iran [9] Inherited haemoglobin disorders: An increasing global health problem [10] The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout its effect performance [11] The beta-thalassemia mutation spectrum in the Iranian population [12] β-Thalassemia mutations found during 1 year of prenatal diagnoses in Fars Province, Iran [13] Molecular spectrum of beta-thalassemia in the Iranian Province of Hormozgan [14] Mutation scanning using high-resolution melting [15] Rabbani B. Beta thalassemia in 31,734 cases with HBB gene mutations: Pathogenic and structural analysis of the common mutations; Iran as the crossroads of the Middle East [16] Rapid detection of pathological mutations and deletions of the haemoglobin beta gene (HBB) by High Resolution Melting (HRM) analysis and Gene Ratio Analysis Copy Enumeration PCR (GRACE-PCR) [17] Rapid screening of multiple beta-globin gene mutations by real-time PCR on the LightCycler: Application to carrier screening and prenatal diagnosis of thalassemia syndromes [18] Rapid identification of HBB gene mutations by high-resolution melting analysis [19] Assessment of high resolution melt analysis feasibility for evaluation of beta-globin gene mutations as a reproducible, cost-efficient and fast alternative to the present conventional method [20] High resolution melting analysis: A rapid screening and typing tool for common β-thalassemia mutation in Chinese population [21] Development of a high-resolution melting approach for scanning beta globin gene point mutations in the Greek and other Mediterranean populations and their components

طراحی روش غربالگری سریع چهار جهش شایع ژن بتاگلوبین در جمعیت ایران با استفاده از روش منحنی ذوب با تفکیک بالا

محمد حمید* PhD

بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

سمیه مروتی شریف آباد MSc

بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: تالاسمی بتا، یک بیماری خونی و ژنتیکی است، شیوع ناقلین این بیماری در جمعیت ایران بالاست. بررسی غربالگری قبل از ازدواج برای تعیین ناقلین تالاسمی بتا، به تشخیص سریع و قابل اعتماد نیاز دارد. هدف پژوهش حاضر طراحی روش غربالگری سریع چهار جهش شایع ژن بتا گلوبین جمعیت ایران با استفاده از روش ذوب با تفکیک بالا (HRM) بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر هشت نمونه از افراد مبتلا و ناقل تالاسمی بتا با ژنوتیپ‌های (G>A)، IVSI-110، IVSI-I (G>A)، IVSI-5 (G>C) و CD36/37 (-T) در شرایط هموزیگوت و هتروزیگوت و یک نمونه کنترل (فرد سالم) انتخاب شدند. بعد از گرفتن خون، استخراج DNA با روش نمکی انجام شد. برای اطمینان، نمونه‌ها به‌صورت دوتایی ران شدند و دو نمونه کنترل بدون DNA نیز به‌کار رفت. آغازگرها، با کمک نرم‌افزارهای Gene Runner Primer3 v. 0.4.0 و Primer Express v 3.0.1 3/1، 6.0.28 و روش HRM برای تعیین جهش‌های فوق به‌کار رفت.

یافته‌ها: بهترین غلظت مناسب DNA، ۵ نانوگرم بر میکرولیتر به‌دست آمد. در مرحله تفاوت نمودار به‌وضوح تفاوت منحنی‌ها در شرایط هتروزیگوت، نرمال و هموزیگوت مشاهده شد. در جهش IVSI-II-G>A در منحنی ذوب برخلاف انتظار دو قله در نمونه‌ها دیده شد، علت آن حضور یک پلی‌مورفیسم در نزدیکی جهش بود.

نتیجه‌گیری: روش HRM قابلیت تشخیص چهار جهش شایع ژن بتاگلوبین را دارد و می‌تواند بین فرد هتروزیگوت و هموزیگوت و فرد سالم نیز در یک جهش واحد افتراق ایجاد کند. روش HRM توان بالایی داشته و می‌تواند ۹۶ نمونه DNA را در مدت دو ساعت آنالیز کند.

کلیدواژه‌ها: بتا تالاسمی، جهش، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۸

*نویسنده مسئول: hamid143@yahoo.com

مقدمه

تالاسمی، گروهی از بیماری‌های خونی با توارث اتوزومی مغلوب است. در این بیماری نقص ژنتیکی می‌تواند به‌صورت جهش نقطه‌ای یا حذف ژن‌های گلوبین یا ترکیبی از آنها باشد. در تالاسمی در تولید زنجیره‌های گلوبین نقص وجود دارد که می‌تواند به‌صورت عدم تشکیل یا کاهش تشکیل زنجیره‌ها باشد. در تظاهرات بالینی بیماری‌های تالاسمی بسته به نوع جهش، در ژن و تعداد ژن‌های درگیر در گستره‌ای از یک کم‌خونی میکروسیت و هیپوکروم بسیار خفیف و بدون علائم بالینی تا کم‌خونی بسیار شدید و نیازمند به تزریق مکرر خون و تا مرگ داخل‌رحمی بروز می‌کند [1-3].

بیشترین شیوع بیماری تالاسمی در کشورهای مدیترانه‌ای، بخش‌هایی از شمال و غرب قاره آفریقا، منطقه خاورمیانه و کشورهای شرق دور دیده شده است، مجموعه این کشورها روی کمربند تالاسمی قرار دارند [4، 5]. براساس تخمین سازمان بهداشت جهانی تقریباً ۱/۵٪ جمعیت جهان ناقل تالاسمی بتا هستند، به‌عبارتی حدود ۸۰ تا ۹۰ میلیون نفر ناقل تالاسمی بتا وجود دارد و

تقریباً ۶۰ تا ۷۰ هزار کودک مبتلا به تالاسمی بتا سالیانه متولد می‌شوند [5-7]. ایران یکی از کشورهای قرار گرفته روی کمربند تالاسمی در سطح جهان است. شیوع بیماری در حاشیه دریای خزر، خلیج فارس و دریای عمان، شامل استان‌های مازندران، گیلان، خوزستان، فارس، بوشهر، هرمزگان، سیستان و بلوچستان و کرمان است، به‌طوری که در کناره‌های دریای خزر و در جنوب کشور ۱۰٪ مردم ناقل ژن تالاسمی هستند و در سایر نواحی، این میزان بین ۴٪ تا ۸٪ متغیر است. در اصفهان و شیراز شیوع این ژن به ۸٪ می‌رسد [8]. در سال ۲۰۰۷ شیوع تالاسمی در مناطق مختلف ایران بین ۳ تا ۱۰۰ نفر در هر ده هزار نفر گزارش شده است [5]. این میزان در گزارش سال ۲۰۰۱ سازمان بهداشت جهانی در مورد تعداد ناقلین تالاسمی بتا در ایران بین ۴٪ تا ۵٪ گزارش شد [9، 10]. شایع‌ترین جهش تالاسمی بتا در ایران جهش IVSII-1 می‌باشد که در شمال ایران بیشتر از سایر مناطق است [11]. در حالی که IVSI-5 بیشترین جهش جنوب و جنوب شرقی ایران را تشکیل می‌دهد [12]. این در حالی است که جهش‌های شایع استان تهران IVSII-1، استان فارس، استان سیستان و بلوچستان و استان هرمزگان IVSI-5، استان خوزستان و استان لرستان کدون ۳۷/۳۶ CD36-37 است [13].

اولین کوشش‌ها برای تشخیص تالاسمی بتا، قبل از تولد با نمونه‌گیری خون از جنین در ۱۸ تا ۲۰ هفته‌گی حاملگی و سنجش سرعت سنتز زنجیره‌های گلوبین شکل گرفت. علی‌رغم مشکل‌بودن این روش و داشتن خطای گزارش و دربرداشتن عوارضی مانند مرگ جنین این روش توانست ۳ تا ۴٪ تولد نوزادان مبتلا به تالاسمی شدید را کاهش دهد.

با ظهور تکنولوژی DNA و تکثیر آن روش‌های جدیدی با ضریب خطر کمتر و اطمینان بیشتر به وجود آمدند، از مهمترین این روش‌ها می‌توان به روش‌های تعیین توالی، آرمز- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (ARMS-PCR) و تفاوت قطعات طولی محدودشونده- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR-RFLP) اشاره کرد. روش بررسی منحنی ذوب با تفکیک بالا (HRM) یک روش آنالیز جدید تغییرات ژنتیکی بعد از PCR است که براساس توالی، طول و میزان سینتوزین-گوانین (GC) در قطعات تکثیرشده، تمایز ایجاد می‌کند. آنالیز HRM براساس تفاوت در شکل منحنی و میزان دمای ذوب (Tm) است. در نمونه DNA حاوی جهش در مقایسه با DNA نرمال، شکل منحنی HRM و Tm با DNA نرمال تفاوت دارد. روش HRM برای توالی‌های متفاوت DNA متغیر بوده، به‌طوری که تفاوت در یک جفت باز قابل شناسایی است [14].

به‌دلیل متداول‌بودن ازدواج‌های فامیلی در قومیت‌های مختلف ایرانی و شیوع بالای ناقلین تالاسمی بتا، تشخیص افراد ناقل به‌منظور پیشگیری از تولد کودکان مبتلا به تالاسمی ضروری است، بنابراین یافتن راهی کم‌هزینه، سریع و با ضریب اطمینان بالا برای تشخیص به موقع این بیماران در محقق‌شدن این هدف بسیار کارآمد می‌باشد.

پژوهش حاضر با هدف طراحی روش غربالگری سریع چهار جهش شایع ژن بتاگلوبین جمعیت ایران با استفاده از روش ذوب با تفکیک بالا انجام شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی از نوع مورد- شاهی حاضر، پس از اخذ رضایت‌نامه از بیماران و ناقلین تالاسمی بتا و کسب مجوز از کمیته

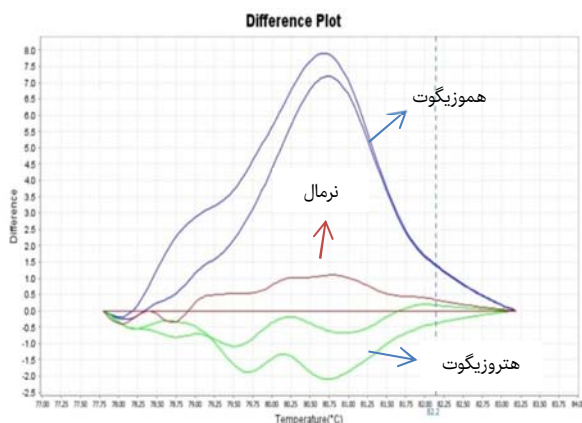
از اتمام کار دستگاه، و به دست آوردن منحنی های حاصله، سه مرحله شامل منحنی ذوب، عادی سازی و تفاوت نمودار (Difference plot) مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله منحنی ذوب، در زمان ذوب و پس از زمان ذوب به دست آمد که محدوده مورد بررسی برای این مطالعه محدوده ذوب بود زیرا در این محدوده DNA حداکثر میزان واسرشتگی را دارد. در مرحله عادی سازی، نرم افزار برای تجزیه و تحلیل ساده تر به کاربر اجازه می دهد که منحنی های بسیار نزدیک به هم را یک منحنی در نظر گیرد تا نتایج حاصله بهتر آنالیز شوند. در شرایط جهش هتروزیگوت منحنی سبز، جهش هموزیگوت منحنی آبی شده و نمونه نرمال با منحنی قرمز مشخص می شود. در مرحله تفاوت نمودار نرم افزار به کاربر اجازه می دهد از منحنی مرحله قبل مشتق گرفته تا تجزیه و تحلیل ساده تری براساس مطالعه خود داشته باشد.

برای آنالیز نمودار ذوب به دست آمده از جهش IVSI-110 (G>A)، IVSII-I (G>A)، IVSI-5 (G>C) و CD36/37 (-T) محدوده ای از دماهای مختلف در نظر گرفته شد. در این محدوده بیشترین واسرشتگی در DNA حاصل می شود. با افزایش دما و تکرار شده ای شدن DNA، رنگ متصل به DNA دورشته ای آزاد شده و در دمای ذوب، قله ایجاد می شود، که تکرار شده ای شدن نیمی از DNA دورشته ای را نشان می دهد. برای مثال برای باز شدن دو رشته DNA در منطقه هدف در شرایط نرمال به دمایی در حدود ۷۰°C بیشتر از دو نمونه دارای جهش هتروزیگوت و هموزیگوت جهش CD36/37 (-T) نیاز است و به عنوان نقطه صفر در نظر گرفته می شود، در صورتی که در نمونه هتروزیگوت به دلیل داشتن جهش حذف T در یک آلل دمای کمتری برای باز شدن دو رشته DNA و این دما در نمونه بیمار هموزیگوت که دو جهش حذف T دارد کمتر از نمونه بیمار هتروزیگوت است، این اختلاف دمایی موجب ایجاد منحنی های متفاوت و مشخص شدن اختلاف جهش ها در این بیماران شد.

یافته ها

بهترین غلظت مناسب DNA برای HRM غلظت ۵ نانوگرم بر میکرولیتر به دست آمد.

در مرحله تفاوت نمودار با ایجاد مشتق از منحنی ها، به وضوح تفاوت منحنی ها در شرایط هتروزیگوت، نرمال و هموزیگوت مشاهده شد (نمودارهای ۱، ۲، ۳ و ۴).



نمودار ۱) تفاوت نمودار مشتق منحنی های جهش CD36/37 (-T) در شرایط هتروزیگوت، نرمال و هموزیگوت

اخلاق انستیتو پاستور ایران، هشت نمونه از افراد مبتلا و ناقل تالاسمی بتا با ژنوتیپ های IVSI-110 (G>A)، IVSII-I (G>A)، IVSI-5 (G>C) و CD36/37 (-T) در شرایط هموزیگوت و هتروزیگوت و یک نمونه کنترل (فرد سالم) انتخاب شدند. برای اطمینان، نمونه ها به صورت دوتایی ران شدند و دو نمونه کنترل بدون DNA نیز به کار رفت. جهش ها از قبل با استفاده از تعیین توالی تایید شده بودند.

نمونه خون در حدود ۲ میلی لیتر در لوله های حاوی ضد انعقاد جمع آوری شد و استخراج DNA با روش نمکی صورت گرفت. از دستگاه نانودراپ برای خواندن غلظت DNA بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد.

آغازگرهای مورد نیاز برای HRM به منظور تکثیر ناحیه دربرگیرنده جهش، با استفاده از نرم افزارهای Gene Runner 6.0.28، Primer Express v3.0.1 3/1 و Primer3 v. 0.4.0 طراحی (جدول ۱)، شرایط ویژه PCR مربوط به HRM و برنامه دستگاه StepOnePlus™ Real-Time PCR (ترموفیشر؛ ایالات متحده) استفاده شد (جدول های ۲ و ۳).

جدول ۱) آغازگرهای HRM طراحی شده برای جهش های مورد بررسی

اندازه قطعه ذوب (جفت باز) (°C)	نقطه ذوب	توالی	نام آغازگر
۵۸/۲	۱۱۹	5'-TTGCCACACTGAGTGAGCTG-3'	IVSII-I (G>A) زفت
۶۰		5'-TGGACAACCTCAAGGGCACC-3'	IVSII-I (G>A) برگشت
۶۰	۱۲۴	5'-GTCTGCCGTTACTGCCCT-3'	IVSI-5 (G>C) زفت
۶۰/۷		5'-AGAGTCAGTCCTATAAACCC-3'	IVSI-5 (G>C) برگشت
۵۹/۴	۹۸	5'-AATAGAACTGGGCATGTGGAGAC-3'	IVSI-110 (G>A) زفت
۵۹/۸		5'-GCAGCCTAAGGGTGGGAAAAT-3'	IVSI-110 (G>A) برگشت
۶۰/۶	۹۷	5'-GTCTATTTTCCACCCCTTAGGCT-3'	CD36/37 (-T) زفت
۵۹/۶		5'-CATAACAGCATCAGGAGTGGACA-3'	CD36/37 (-T) برگشت

جدول ۲) مقادیر لازم برای تهیه مخلوط واکنش HRM

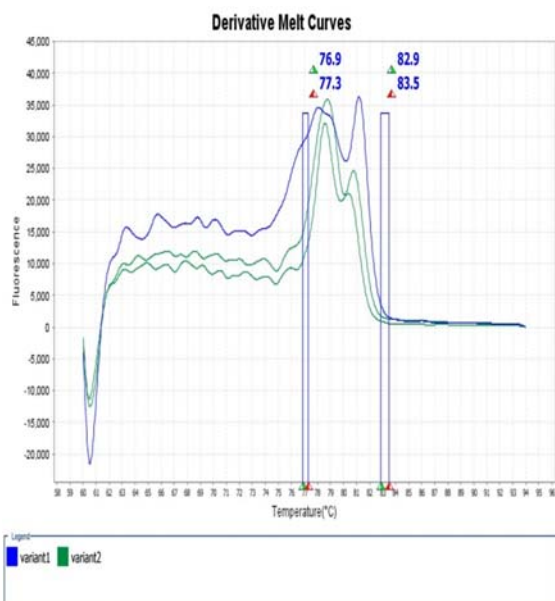
مواد	حجم (میکرولیتر)
مخلوط واکنش HRM	۱۰
آغازگر زفت	۰/۸
آغازگر برگشت	۰/۸
ژنوم	۵
آب دیونیزه	۳/۴
حجم کل	۲۰

جدول ۳) برنامه PCR در زمان واقعی برای تکثیر قطعات دارای جهش مورد نظر

چرخه	زمان	دما (°C)	مرحله
۱	۱۰ دقیقه	۹۵	فعالیت آنزیم
۴۰	۱۵ ثانیه	۹۵	واسرشتگی
۱	۱ دقیقه	۶۰	اتصال
۱	۱ دقیقه	۹۵	واسرشتگی

تجزیه و تحلیل نتایج با نرم افزار منحنی ذوب با تفکیک بالا نسخه v3.0، به سادگی و به صورت هم زمان و به صورت چندگانه در طول مراحل کار در دستگاه PCR در زمان واقعی بازبینی شد تا از خطاهای پیش بینی نشده در مراحل کار جلوگیری به عمل آید و بعد

تمامی نمونه‌ها با شرایط مختلف هموزیگوت، هتروزیگوت و نرمال با روش تعیین توالی تایید شدند، در واقع این روش با حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ جهش‌های مورد مطالعه را تشخیص داد.



نمودار (۵) منحنی ذوب مربوط به جهش IVSII-I (G>A) به همراه پلی مورفیسم

بحث

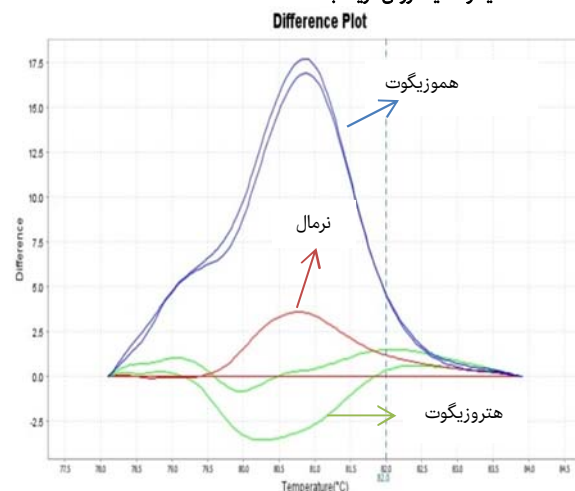
پژوهش حاضر با هدف طراحی روش غربالگری سریع چهار جهش شایع ژن بتاگلوبین جمعیت ایران با استفاده از روش ذوب با تفکیک بالا انجام شد.

اگرچه بیش از ۲۰۰ نوع جهش تاکنون در ارتباط با تالاسمی بتا گزارش شده است اما شیوع جهش‌های بیماری تالاسمی بتا در کشورها و جمعیت‌های مختلف متفاوت است، در جمعیت ایران جهش‌های IVSI-110 (G>A)، IVSII-I (G>A)، IVSI-5 (G>C) و CD36/37 (-T) شیوع بالاتری دارند [15].

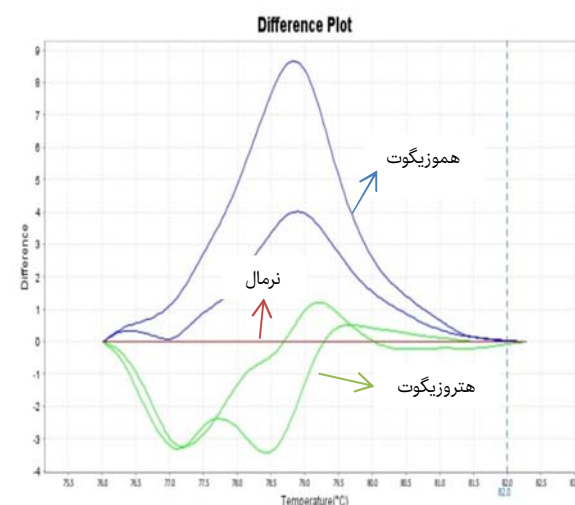
امروزه برای تعیین جهش‌های بیماری‌زای ژن بتاگلوبین از روش‌های مستقیم و غیرمستقیم مانند PCR-RFLP استفاده می‌شود در روش‌های مستقیم می‌توان به روش‌هایی مانند ARMS-PCR به صورت تکی یا چندتایی، دات‌بلات معکوس (RDB) و تعیین توالی اشاره کرد. اگرچه تعیین توالی به عنوان یک روش مستقیم استاندارد برای تعیین جهش‌ها است، اما گران قیمت و زمان‌بر می‌باشد، همچنین ARMS-PCR و RDB برای انجام دادن و الکتروفورز محصول PCR به چندین ساعت زمان نیاز دارند و خطر آلودگی در این روش‌ها نیز بیشتر است [16, 17].

تعیین جهش در خانواده ناقل تالاسمی بتا به ویژه در آنهایی که با بارداری در هفته‌های بالا همراه هستند، به روش‌هایی نیاز دارد که در حداقل زمان ممکن و با دقت بالا صورت گیرند. بنابراین در مراکز تشخیص قبل از تولد، استفاده از روشی با سرعت و حساسیت بالا و همچنین هزینه کم، ضروری به نظر می‌رسد.

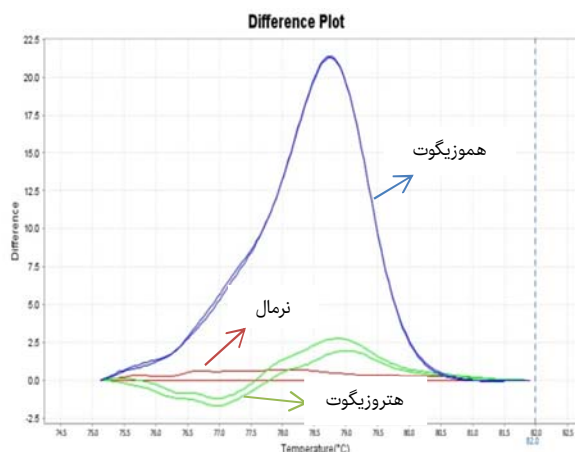
در مطالعات گذشته، جهش‌های مختلف ژن بتاگلوبین براساس شیوع جهش در جمعیت‌های تایوان، ابوظبی، چین، یونان، تایلند و یک مطالعه ایرانی با استفاده از HRM بررسی شدند. از چهار جهش بررسی شده در این مطالعه جهش‌های IVSI-110 (G>A)، IVSI-5 (G>C) و IVSII-I (G>A) نیز مطالعه شده بودند. اگرچه بررسی همزمان جهش‌های IVSI-110 (G>A)، IVSII-I (G>A)،



نمودار (۲) تفاوت نمودار مشتق منحنی‌های جهش IVSII-I (G>A) در شرایط هتروزیگوت، نرمال و هموزیگوت



نمودار (۳) تفاوت نمودار مشتق منحنی‌های جهش IVSI-110 (G>A) در شرایط هتروزیگوت، نرمال و هموزیگوت



نمودار (۴) تفاوت نمودار مشتق منحنی‌های جهش IVSI-5 (G>C) در شرایط هتروزیگوت، نرمال و هموزیگوت

در جهش IVSII-I (G>A) در منحنی ذوب برخلاف انتظار، دو قله در نمونه‌ها دیده شد. بعد از تکرار آزمایش باز هم همین نتیجه مشاهده شد. با بررسی‌های بیشتر مشخص شد که علت این نتیجه حضور یک پلی مورفیسم در نزدیکی جهش مورد نظر بود (نمودار ۵).

تاییدیه اخلاقی: این مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران قرار گرفته است.

تعارض منافع: تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

سهم نویسندگان: محمد حمید (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روشناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۶۰٪)؛ سمیه مروتی شریف آباد (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۴۰٪).

منابع مالی: مطالعه حاضر با گرنت شماره ۶۸۷ انستیتوی پاستور ایران حمایت مالی شد.

منابع

- 1- Hamid M, Dawoodi Nejad L, Shariati G, Galehdari H, Saberi A, Mohammadi-Anaei M. The first report of a 290-bp deletion in β -globin gene in the South of Iran. *Iran Biomed J.* 2017;21(2):126-8.
- 2- Hamid M, Mahjoubi F, Akbari MT, Arab A, Zeinali S, Karimipoor M. Molecular analysis of gamma-globin promoters, HS-111 and 3'HS1, in beta-thalassemia intermedia patients associated with high levels of Hb F. *Hemoglobin.* 2009;33(6):428-38.
- 3- Akbari MT, Hamid M. Identification of α -globin chain variants: A report from Iran. *Arch Iran Med.* 2012;15(9):564-7.
- 4- Birgens H, Ljung R. The thalassaemia syndromes. *Scand J Clin Lab Invest.* 2007;67(1):11-25.
- 5- Abolghasemi H, Amid A, Zeinali S, Radfar MH, Eshghi P, Rahiminejad MS, et al. Thalassemia in Iran: Epidemiology, prevention, and management. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2007;29(4):233-8.
- 6- Modell B, Khan M, Darlison M, King A, Layton M, Old J, et al. A national register for surveillance of inherited disorders: Beta thalassaemia in the United Kingdom. *Bull World Health Organ.* 2001;79(11):1006-13.
- 7- Cousens NE, Gaff CL, Metcalfe SA, Delatycki MB. Carrier screening for beta-thalassaemia: A review of international practice. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(10):1077-83.
- 8- Roudbari M, Soltani-Rad M, Roudbari S. The survival analysis of beta thalassemia major patients in South East of Iran. *Saudi Med J.* 2008;29(7):1031-5.
- 9- Samavat A, Modell B. Iranian national thalassaemia screening programme. *BMJ.* 2004;329(7475):1134-7.
- 10- Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: An increasing global health problem. *Bull World Health Organ.* 2001;79(8):704-12.
- 11- Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S, Pourfaraz F, Teimourian S, Sahebjam F, et al. The beta-thalassemia mutation spectrum in the Iranian population. *Hemoglobin.* 2001;25(3):285-96.
- 12- Rahiminejad MS, Zeinali S, Afrasiabi A, Valeshabad AK. β -Thalassemia mutations found during 1 year of prenatal diagnoses in Fars Province, Iran. *Hemoglobin.* 2011;35(4):331-7.
- 13- Yavarian M, Harteveld CL, Batelaan D, Bernini LF, Giordano PC. Molecular spectrum of beta-thalassemia in the Iranian Province of Hormozgan. *Hemoglobin.* 2001;25(1):35-43.
- 14- Taylor CF. Mutation scanning using high-resolution melting. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(Pt 2):433-7.
- 15- Mahdiah N, Rabbani B. Beta thalassemia in 31,734 cases with HBB gene mutations: Pathogenic and structural analysis of the common mutations; Iran as the crossroads of the Middle East. *Blood Rev.*

IVSI-5 (G>C) و CD36/37 (-T) در مطالعات قبلی گزارش نشده بود [16, 18-21].

در مطالعه حاضر روش HRM برای جهش‌های تالاسمی بتا شایع ایران شامل IVSI-5, IVSII-I, IVSI-110 و CD36/37 با موفقیت تنظیم شد و طبق یافته‌ها روش HRM این قابلیت را داشت که جهش‌های مورد مطالعه را نسبت به فرد نرمال تشخیص دهد و از طرف دیگر توانست بین فرد هتروزیگوت و هموزیگوت در یک جهش واحد افتراق ایجاد کند، بنابراین می‌تواند جایگزین مناسب و کم‌هزینه و کاربردی‌تر و آسانتری نسبت به روش‌های تعیین توالی و ARMS-PCR باشد. البته در این روش برای رسیدن به پاسخی دقیق، انتخاب منطقه هدف مناسب الزامی است. زیرا اگر طول محصول افزایش یابد تفاوت بین منحنی نرمال و منحنی هموزیگوت در منطقه مورد نظر سخت می‌شود. در جهش IVSII-IG>A در منحنی ذوب برخلاف انتظار دو قله در نمونه‌ها دیده شد. با بررسی‌های بیشتر مشخص شد که علت این یافته حضور یک پلی‌مورفیسم در نزدیکی جهش مورد نظر بود بنابراین اگرچه HRM یک ابزار قدرتمند برای تشخیص است، اما حضور پلی‌مورفیسم‌های غیره منتظره و نزدیک به جهش‌های مورد نظر ممکن است در نتایج حاصله تداخل ایجاد کند، از این رو باید در طراحی پرایمر دقت لازم را به کار برد، ولی این روش مزایای متعددی از جمله کاهش اتلاف وقت مراجعین، کاهش نیروی انسانی و تجزیه و تحلیل حجم بالای نمونه‌های بیمار و حامل را دارد که نسبت به تکنیک‌های دیگر مقرون به‌صرفه‌تر نیز است.

به‌طور کلی در پژوهش حاضر تمامی نمونه‌ها با شرایط مختلف هموزیگوت، هتروزیگوت و نرمال با روش تعیین توالی مورد تایید قرار گرفتند. بنابراین، تعیین ژنوتیپ با استفاده از روش HRM نشان داد که این روش با حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ می‌تواند جهش‌های مورد مطالعه را تشخیص دهد.

می‌توان گفت HRM یک روش سریع، دقیق، ارزان و قابل‌اعتماد برای تشخیص جهش‌های تالاسمی بتا است. از طرفی می‌تواند ۹۶ نمونه DNA را در مدت ۲ ساعت تجزیه و تحلیل کند، در نتیجه این تکنیک می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های امروزی به‌منظور تشخیص پیش از تولد برای بیماری تالاسمی بتا باشد. پیشنهاد می‌شود که روش HRM روی جهش‌های دیگر شایع تالاسمی بتا در ایران بررسی شود، همچنین در رابطه با محدودیت این مطالعه می‌توان به عدم امکان تهیه دستگاه StepOnePlus™ Real-Time PCR در مراکز ژنتیک به‌منظور انجام روش HRM به‌دلیل هزینه بالا اشاره نمود.

نتیجه‌گیری

روش HRM قابلیت تشخیص جهش‌های مورد مطالعه نسبت به فرد نرمال را دارد و می‌تواند بین فرد هتروزیگوت و هموزیگوت در یک جهش واحد افتراق ایجاد کند. این روش توانایی بررسی ۹۶ نمونه DNA را در عرض دو ساعت را دارد و می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌هایی همانند تعیین توالی، ARMS-PCR به‌منظور تشخیص سریع پیش از تولد برای بیماری تالاسمی بتا باشد.

تشکر و قدردانی: از کلیه افراد شرکت‌کننده در این تحقیق و همکاران بخش پزشکی مولکولی انستیتوپاستور ایران تشکر و تقدیر به‌عمل می‌آید.

17):1667-76.

19- Ramezanzadeh M, Salehi M, Salehi R. Assessment of high resolution melt analysis feasibility for evaluation of beta-globin gene mutations as a reproducible, cost-efficient and fast alternative to the present conventional method. *Adv Biomed Res.* 2016;5:71.

20- Lin M, Jiao JW, Zhan XH, Zhan XF, Pan MC, Wang JL, et al. High resolution melting analysis: A rapid screening and typing tool for common β -thalassemia mutation in Chinese population. *PloS One.* 2014;9(8):e102243.

21- Chassanidis C, Boutou E, Voskaridou E, Balassopoulou A. Development of a high-resolution melting approach for scanning beta globin gene point mutations in the Greek and other Mediterranean populations. *PloS One.* 2016;11(6):e0157393.

2016;30(6):493-508.

16- Turner A, Sasse J, Varadi A. Rapid detection of pathological mutations and deletions of the haemoglobin beta gene (HBB) by High Resolution Melting (HRM) analysis and Gene Ratio Analysis Copy Enumeration PCR (GRACE-PCR). *BMC Med Genet.* 2016;17:75.

17- Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetis M, Malamis G, Kanavakis E. Rapid screening of multiple beta-globin gene mutations by real-time PCR on the LightCycler: Application to carrier screening and prenatal diagnosis of thalassemia syndromes. *Clin Chem.* 2003;49(5):769-76.

18- Shih HC, Er TK, Chang TJ, Chang YS, Liu TC, Chang JG. Rapid identification of HBB gene mutations by high-resolution melting analysis. *Clin Biochem.* 2009;42(16-