مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
دوره ۶۴، شماره ۲، اردیبهشت ۱۳۸۵، ۹۵-۹۹

استفاده از مولتی پلکس PCR در شناسایی حذف‌های شایع ژن آلفاگلوبین درحاملین آلفاتالاسمی

رؤیا کیانی شیرازی*، دکتر سیروس زینلی **، دکتر مرتضی کریمی‌پور، دکتر بهناز زربخش **، رضا علی بخشی*****

* بخش ژنتیک گروه علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
** بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
*** عضو هیئت علمی دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

چکیده

زمینه و هدف: آلفاتالاسمی شایع‌ترین اختلال توارثی سنتز هموگلوبین در دنیا می‌باشد. آلفاتالاسمی عمدتاً حاصل حذف یک یا هردو ژن آلفا موجود در کروموزوم ۱۶ می‌باشد. حاملین اشکال حذفی آلفاتالاسمی(αα/- - یا α-/α- , α-/αα) از نظر بالینی طبیعی بوده ولی کم خونی هیپوکروم، میکروسیتیک دارند. هتروزیگوت‌های مرکب (α-/ - -) کم‌خونی نسبتاً شدیدی دارند و بیماری HbH نامیده می‌شود. جنین‌هایی که هیچ ژن آلفایی به ارث نمی‌برند (--/--) (سندرم هیدروپس فتالیس) در دوران جنینی یا مدت کوتاهی بعد از تولد می‌میرند. بیش از ۹۵٪ آلفاتالاسمی‌های شناخته شده حذف یک یا هر دو ژن آلفاگلوبین موجود بر روی کروموزوم ۱۶ را دارند.

روش بررسی: آزمایش بر روی ۱۱۴ فرد ایرانی با MCV و MCH پایین و HbA2 نرمال که به درمان آهن هم پاسخی ندادند از طرف مراکز بهداشتی کشور به انستیتو پاستور ایران ارجاع داده شده بودند، انجام گرفت. DNA ژنومی از سلول‌های سفید خونی به روش Salting Out تخلیص گردید. در این تحقیق در یک لولهٔ منفرد Multiplex-PCR برای هفت حذف (-- ,--THAI -- SEA, -α3.7, -α4.2, --MED, -α20.5, FIL) آلفاتالاسمی انجام گردید.

یافته‌ها: DNA حاملین آلفاتالاسمی برای وجود انواع متفاوت جهش‌های ژن آلفاگلوبین مورد آزمایش قرارگرفتند. جهش‌های ژنی (حذفها) در تعدادی از نمونه‌های مورد مطالعه شناسایی گردیدند. این حذف‌ها شامل: حذف‌های تک ژن α3.7- و α4.2- و حذف‌های دو ژنی مدیترانه‌ای --MED و α20.5- بودند.

نتیجه‌گیری: حذف α3.7- شایع‌ترین حذف ژن آلفاگلوبین در نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد. Multiplex-PCR روشی ساده، سریع و حساس برای تعیین حذف‌های ژن آلفاگلوبین می‌باشد.

کلمات واژه‌ها: آلفا تالاسمی، مولتی پلکس PCR، ایران

زمینه و هدف

آلفا تالاسمی یکی از شایعترین اختلالات هموگلوبین در دنیاست. مجموعهٔ ژنی آلفاگلوبین انسانی با طولی در حدود

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-12]

۳۰ کیلو باز با ترتیب 5' ζ2-Ψα2-Ψα1-α2-α1 3' بر روی کروموزوم شمارهٔ ۱۶ قرار دارد. اساس مولکولی آلفا تالاسمی عمدتاً حاصل حذف قطعات متغیری از یک یا دو ژن آلفا در مجموعه ژنی آلفا گلوبین است (۱). موتاسیون‌های نقطه‌ای عملکردی که منجر به غیر فعال شدن ژن‌های آلفا می‌شوند، فراوانی کمی دارند (۳،۲). از آنجا که غربالگری جامعی برای آلفاتالاسمی در ایران صورت نگرفته است، سرویس‌های تشخیص مولکولی برای بیماران در دسترس نمی باشد، لذا تعداد قابل توجهی از بیماران با کم خونی میکروسیتیک و هیپوکرومی و سطوح HbA2 طبیعی ممکن است به اشتباه بتاتالاسمی خاموش تشخیص داده شوند (۳،٤).

آلفا تالاسمی یک مجموعه اختلالات خونی ژنتیکی است که از طریق کاهش تولید زنجیره‌های آلفا گلوبین بواسطه حذف یا جهش در یک یا چند ژن آلفا گلوبین که در کروموزوم ۱٦ قرار دارد، ایجاد می‌شود. زنجیره‌های آلفا برای تولید اشکال جنینی و بزرگسالی هموگلوبین لازم می‌باشند. اختلالات آلفا تالاسمی در طیفی از اختلالات بی خطر تا کشنده قرار دارند (٦-٤).

در هر فرد به طور طبیعی ٤ ژن وجود داشته که برای زنجیره‌های آلفا هموگلوبین کد می‌گذارند. اختلال در یک ژن زنجیره آلفا بی خطر است، اختلال در دو یا سه ژن زنجیره آلفا منجر به سندرم‌های حد واسط همراه با کم خونی متغیر و درجاتی از بیماری می‌شود (۸،۷). فرم‌های حد واسط آلفا تالاسمی سبب بد شکلی اسکلتی، رنگ پریدگی، یرقان و بزرگی طحال می‌شود. اختلال در هر ٤ ژن آلفا تالاسمی مانع تولید هموگلوبین جنینی یا بزرگسالی می‌شود. بدیهی است که حذف ٤ ژن زنجیره آلفا کشنده است (هیدروپس فتالیس). حالت کریر (حامل) برای آلفا تالاسمی را می‌توان از طریق غربالگری ژنتیکی تشخیص داد (۱). بسیاری از افراد ممکن است حامل آلفا تالاسمی و یا آلفا و بتا توأم باشند. بنابراین پیداکردن جهش‌های آلفا موجود در کشور برای مشخص کردن وضعیت افراد مشکوک به حامل بودن ضروری است. اختلالات آلفا تالاسمی عمدتاً در جمعیت‌هایی با منشاء مدیترانه ای و آسیای جنوب شرقی و سیاهان شایع می‌باشد (۹). در این تحقیق با استفاده از تکنیک Multiplex-PCR در یک تیوب منفرد به کمک پرایمرهای مختلف اکثر حذف‌های یک ژنی ((-α3.7 , -α4.2 یا دو ژنی MED, -α --) (20.5شایع در بیماری آلفاتالاسمی قابل تشخیص می‌باشد. سادگی و جامعیت این روش بطور قابل توجهی هزینه و پیچیدگی غربالگری برای حذف‌های شایع آلفاتالاسمی را کاهش می‌دهد (۱) و از آن می‌توان در شناسایی سریع ناقلین و تشخیص قبل از تولد استفاده کرد.

روش بررسی

نمونه‌ها از افرادی که از طرف مراکز بهداشتی کشور به انستیتو پاستور ایران ارجاع داده شده بودند و بعضی از آزمایشگاه‌های ژنتیک پزشکی در تهران، انتخاب گردیده‌اند. این افراد میکروسیتیک و هیپوکرومیک با MCV و MCH پائین و HbA2 نرمال یا کاهش یافته داشتند و تحت درمان آهن قرارگرفته و پاسخ نداده‌اند. برای نمونه‌گیری،۱۰-۵ میلی لیتر از خون محیطی هر فرد در داخل لوله‌ای که حاوی۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر EDTA می‌باشد، ریخته شد. DNA با روش نمک اشباع Salting Out استخراج گردید (۸). غلظت DNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید تا مقدار مناسبی از DNA استخراج شده جهت واکنش PCR استفاده شود. مرحلهٔ بعد شناسایی جهش‌های حذفی از طریق مولتی‌پلکس PCR می‌باشد که در این روش پرایمرهایی که جهت دو طرف نواحی حذفی طراحی شده‌اند استفاده گردید.

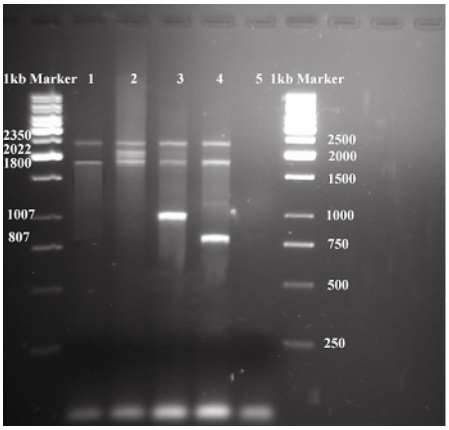
ابتدا پرایمرهای رفت و برگشت جهت هر حذفی به تنهایی بکار برده شد که جهت هر واکنش ۵۰ میکرولیتری، از هر پرایمر به غلظت 100 pmol (۱ میکرولیتر)استفاده گردید و شرایط و دمای PCR برای تمامی پرایمرها بصورت جفتی (رفت و برگشت) بهینه گردید. در مرحله بعد دو جفت پرایمر باهم استفاده شدند، در این مرحله میزان پرایمرهای مصرفی را کمتر نموده و از هر پرایمر به میزان ۰/۷ میکرولیتر استفاده شد. بدین ترتیب که پرایمرهای α3.7- و α4.2- را باهم و پرایمرهای MED-- و α20.5- با یکدیگر بکار برده شدند. سپس از تمامی پرایمرهای موجود هرکدام به میزان ۱۰ میکرولیتر در یک تیوب ریخته و مخلوطی از پرایمرها (Primer mix) تهیه می‌گردد. جهت هرواکنش ۵۰ میکرولیتری، مقدار ۷ میکرولیتر از مخلوط پرایمرها به یک تیوب ۰/۵ml اضافه می‌شود. به میزان 0.4µl (2U) از آنزیم

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-12]

Fast Start Taq DNA Polymerase به تیوب واکنش اضافه می‌گردد. ضمناً از بافر آنزیم با غلظت نهایی MgCl2 1.5mM و dNTP 200µM استفاده می‌گردد. در پایان مقدار DNA 100-200 ng جهت انجام واکنش PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد. پس از تغییرات در زمان، دما و تعداد چرخه شرایط PCR مطلوب بدین ترتیب برنامه ریزی گردید: 95°C به مدت ۱۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه بصورت دمای دناتوره شدن 95°C به مدت ۱دقیقه، دمای اتصال 60°C به مدت۱ دقیقه و دمای 72°C به مدت ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه تعیین گردید، در پایان 72°C به مدت ۵ دقیقه داده شد. محصول PCR را روی ژل آگارز ۱٪ برده و از 1kb ladder استفاده می‌شود. سپس ژل را با اتیدیوم بروماید رنگ کرده و پس از مشاهده زیر U.V ترانس لومیناتور عکس‌برداری بعمل می‌آید.

یافته‌ها

ابتدا جهت بهینه کردن دمای annealing از واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) بصورت گرادیانت استفاده کرده تا دمای مطلوب بدست آید. در این تحقیق دمای مطلوب اتصال برای حذف‌های ژن آلفاگلوبین 60°C مشخص گردید. در مرحلهٔ بعد هریک از حذف‌های شایع مانند α3.7- و α4.2- و MED-- و α20.5- ابتدا بصورت جفت پرایمرها (رفت و برگشت) PCR گردید و از این طریق از حذف اختصاصی آن نمونه بیمار اطمینان حاصل می‌شد. این افراد بعنوان کنترل‌های مثبت جهت انجام مراحل بعدی واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز چندتایی (Multiplex-PCR)، مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این مرحله علی رغم مهیا بودن شرایط در بعضی موارد PCR انجام نشده و باند اختصاصی مربوطه نیز مشاهده نمی‌گردید. مثلاً در تیوب حاوی پرایمرهای Lis1 که بعنوان کنترل داخلی واکنش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و همچنین تیوب حاوی پرایمرهای α 4.2- با فراهم شدن شرایطی مشابه پرایمرهای دیگر، تکثیری صورت نگرفته ولی با افزایش میزان پرایمر از 10 Pmol به 25 Pmol مشکل برطرف گردید و قطعات مربوطه هم تکثیر شدند. در مرحلهٔ بعد ابتدا پرایمرها بصورت دوجفتی و سپس همهٔ پرایمرها باهم در یک تیوب منفرد مورد استفاده قرار گرفتند. پس از ران محصولات PCR و مارکر بر روی ژل، باندهای اختصاصی و همچنین غیراختصاصی بصورت باندهای ضعیف و نازک دیده می‌شدند، ولی با تغییر دمای annealing و کم کردن غلظت MgCl2 و افزایش چرخه، باندهای اختصاصی بصورت باندهای قوی و واضح مشاهده و باندهای غیراختصاصی محو شدند (شرایط مطلوب در قسمت مواد و روشها ذکر شده است). در روش مولتی پلکس PCR نمونه هر فرد بیمار در یک تیوب قرار می‌گیرد و با داشتن هر نوع حذف باند مشخص آن حذف تکثیر می‌شود بطوری که در شکل۱ نشان داده شده است در Lane1 دو باند مشاهده می‌شود که مربوط به یک فرد سالم است. باند بالا کنترل مثبت می‌باشد و باند پایین بطول 1800 bp باندی است که ناحیه α2 را تکثیر می‌کند و نشان دهندهٔ ناحیه‌ای است که حذف صورت نگرفته و این فرد طبیعی می‌باشد(αα/αα).



شکل ۱

Lane 2 سه باند داده که از بالا به پایین کنترل مثبت، باند 3.7 و باند α می‌باشد. بنابراین این فرد یک حذف 3.7 دارد (-α.3.7/αα) و Lane 3 دارای سه باند می‌باشد که از بالا به پایین کنترل مثبت، α و باند 20.5 می‌باشد که طول آن 1007 bp می‌باشد و این فرد دارای یک حذف 20.5 می‌باشد (-α20.5/αα) و Lane 4 هم دارای سه باند می‌باشد که از بالا به پایین کنترل مثبت، باند α و باند MED-- می‌باشد که این بیمار دارای یک حذف MED می‌باشد(--MED/αα) . به این ترتیب با این روش می‌توان انواع حذف‌های شایع ژن آلفاگلوبین را تشخیص داد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-12]

بحث

آلفاتالاسمی با شیوع ژنی ۱٪ تا ۹۸٪ در مناطق استوایی و تحت استوایی شایع‌ترین اختلال ارثی ساخت هموگلوبین در سراسر دنیا است (۵). مجموعهٔ ژنی آلفاگلوبین انسانی با طولی در حدود ۳۰ کیلو باز با توالی '3 α1-α2-Ψα1-Ψα2 - ζ2 '5 است (٦). برخلاف بتاتالاسمی که جهش‌های غیرحذفی غالب هستند بیش از ۹۵٪ موارد شناخته شدهٔ آلفاتالاسمی به علت حذف در یک یا دو ژن آلفاگلوبین از کروموزوم ١٦ است (۱).

افرادی که پروتئین آلفا را به اندازهٔ کافی تولید نمی‌کنند، آلفاتالاسمی خواهند داشت. این بیماری عموماً در آفریقا، خاورمیانه، هند و جنوب شرقی آسیا و جنوب چین و گاهی در منطقهٔ مدیترانه یافت می‌شود. نوع و فراوانی جهش‌های آلفاتالاسمی از منطقه ای به منطقهٔ دیگر فرق می‌کند و هر جمعیتی طیف جهش‌های آلفاتالاسمی مربوط بخود را دارا است.

ایران در منطقه‌ای وجود دارد که آمار تالاسمی در آن زیاد می‌باشد، لذا لزوم شناسایی انواع جهش‌ها و فراوانی آنها در کشورمان ضروری می‌باشد. دکتر نیشابوری و همکاران در سال ۲۰۰۱ میزان فراوانی جهش α3.7- را ۳۱،٦ درصد در افراد ایرانی با کم خونی هیپوکرومیک و میکروسیتیک در شاخصهای خونی کاهش یافته تعیین نمودند و هیچ جهش α4.2- را مشاهده نکردند. (۳) برای تشخیص آلفاتالاسمی حتماً باید از آنالیز ژن α استفاده کرد. ولی در موارد مشکوک به توارث همزمان α و β تالاسمی، آزمایش سنتز زنجیره‌های گلوبین و آنالیز ژن گلوبین باید انجام پذیرد تا به تشخیص قطعی رسید.(۱۰)

روش‌های مولکولی جهت تشخیص قطعی تالاسمی‌ها: ARMS , SSCP , DGGE, Gap-PCR و ساترن بلات می‌باشد. در روش Multiplex PCR که همزمان هفت نوع حذف متفاوت ژن آلفاگلوبین در یک تیوب منفرد قابل تشخیص می‌باشد، سریع ،کم هزینه و دقیق بوده و می‌توان هر نوع حذفی را با یک واکنش PCR شناسایی کرد. در روش‌های قبلی جهت شناسایی حذف در مجموعهٔ ژنی آلفاگلوبین در یک فرد مشکوک به آلفاتالاسمی، ابتدا برای شایع‌ترین یعنی α3.7-، PCR انجام می‌شده است و چنانچه آن حذف وجود نداشته باشد (باندی تشکیل نگردد) جهت حذف 4.2 آزمایش تکرار شده و این روند تا شناسایی حذف ادامه پیدا می‌کند. استفاده از چنین روشی مستلزم صرف هزینه، زمان و کار مضاعف بوده که با مولتی پلکس PCR کلیهٔ مشکلات فوق مرتفع می‌گردند. آنزیم مورد استفاده در این روش Fast Start Taq DNA Polymerase بوده است. این آنزیم بسیار اختصاصی عمل کرده و دارای حساسیت بالایی می‌باشد. در واکنش مولتی پلکس PCR میزان پرایمرهای مصرفی نسبت به حالتی که یک جفت پرایمر استفاده می‌شود بسیار کمتر است. پیشنهاد می‌گردد تعدادی از این افراد که مشکوک به آلفاتالاسمی می‌باشند و هیچ یک از حذفها رانشان نمی‌دهند تحت آزمایشات کاملتری قرار گیرند بطوری که می‌توان از روش ساترن بلات و RFLP استفاده کرد و توالی ژن آلفاگلوبین آنها Sequence شود که اگر احتمالاً حذفی وجود دارد و تابحال شناسایی نگردیده مشخص شود.

نتیجه‌گیری

در بعضی ترکیب‌های متفاوت الل‌های جهش یافته آلفاگلوبین امکان بوجود آمدن بچه‌های Hb H Disease و هیدروپس فتالیس وجود دارد(۱۰). بعلاوه مادر حامل این نوع بچه‌ها در معرض خطر بوده و نگهداری از افراد مبتلا به تالاسمی از لحاظ اقتصادی و هم از لحاظ روانی برای خانواده‌های آنها و جامعه بسیار مشکل می‌باشد. اگر نوع جهش در یک فرد حامل دقیقاً مشخص نشود ،پی بردن به نحوهٔ توارث و چگونگی انتقال آن به نسل‌های بعد مشکل خواهد بود و در نتیجه توصیه‌هایی که برای کمک به چنین افرادی انجام می‌گیرد عاری از خطا نخواهد بود.

ترکیب α تالاسمی و β تالاسمی می‌تواند عوارض هر دو بیماری به تنهایی را تشدید یا تضعیف کند یا بطور کلی تغییر دهد. مثلاً ترکیب یک جهش خاص (تریپلت شدن ژن α) می‌تواند یک β تالاسمی مینور را به بتاتالاسمی ماژور تبدیل کند یا حذف یک ژن آلفا می‌تواند علائم بتاتالاسمی ماژور را تعدیل نماید (۷). براساس همین ضرورت‌ها تحقیق ما در زمینهٔ تشخیص سریع و دقیق و کم هزینه انواع حذف‌های α تالاسمی صورت گرفت و این امکان را فراهم نمود تا با انجام Multiplex-PCR در یک لولهٔ منفرد انواع حذف‌های شایع

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-12]

در ایران را تشخیص داد. این روش جهت تشخیص ناقلین و تشخیص قبل از تولد (PND) از اهمیت خاصی برخوردار است. همچنین با تشخیص سریع حذف‌ها از تولد افراد HbH و هیدروپس فتالیس پیشگیری می‌شود.

سادگی و جامعیت این روش بطور قابل توجهی هزینه و پیچیدگی غربالگری برای حذف‌های شایع آلفاتالاسمی را کاهش می‌دهد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از کلیهٔ پرسنل محترم بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران کمال تشکر و قدردانی را داریم که در این تحقیق ما را یاری نمودند. همچنین از رؤسا و کارکنان محترم مراکز بهداشتی سراسر کشور و رؤسا و کارکنان آزمایشگاه‌های ژنتیک پزشکی دکتر زینلی و دکتر اکبری که در رابطه با دادن بعضی از نمونه‌های خونی افراد حامل آلفاتالاسمی همکاری صمیمانه داشته‌اند، تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

REFERENCES

1. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR; 2000 Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α-thalassemia; Blood Vol. 95, No. 1: 360-364.
2. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR; 2000; Simplified Multiplex-PCR diagnosis of common southeast Asian deletional determinants of α-thalassemia. Clinical chemistry Vol 46, No. 10: 1692-1695.
3. Neishabury.M,L. Abbasi-Moheb, H Nanjma badi, et al., 2001; Alpha-thalassemia deletion analysis in IRNA archives of Iranian Medicine: 4(4): 160-164.
4. Harrison's principles of internal Medicine 1994. Trans lated by: Hooman Oktai M.D.
5. El-Hamzi, MA; Warsy, As; Alswailem, AR; 1995: the fre quency of 14 Beta thalassemia among a rabs, Babrain Medical Bulletion, Nol. 10, No 1, PP 14-18.
6. Bow den DK, Vickers MA, Higgs DR: 1992; A PCR-based strategy to detect the common severe determinants of a thalassemia Br J hematol 81: 104-108.
7. Weatherrall D.J. & clegg J.B. 2001; the thalassemia syndromes. Blackwell scinence publication.
8. Miller SA, Dg Kes DD, Polesky HF. 1988 A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells Nucleic Acids Res 16:12115.
9. Santos, CD, Duartea A. SS, et al., 2004 ; Expression of α-hemoglobin stabilizing protein gene during human erythropoiesis. Experimental Hematology 32, 157-162.
10. Shaji. R.V., Srivastava. A, chandy. M, Krishnamoorthy. R, 2000; A single tube multiplex PCR method to detect the common α + thalassemia alleles. Blood, vol 95, Number 5.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-12]