

روش اصلاح شده PCR-RFLP برای تشخیص جهش *JAK2 V617F* در بیماران مبتلا به نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو

علیرضا مرادآبادی^۱، علیرضا فارسی‌نژاد^۲، احمد فاطمی^۳

چکیده

سابقه و هدف

نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو، از جمله بدخیمی‌های خونی هستند که علائم بالینی بسیار متغیری دارند. تقسیم‌بندی بیماران میلوپرولیفراتیو به دو گروه دارای کروموزوم فیلادلفیا (Ph^+) و فاقد آن (Ph^-) می‌باشد. در گروه Ph^- ، بیماری‌های پلی‌سایتمی‌ورا، ترومبوسایتمی اساسی، میلو فیبروز اولیه و دیگر بیماری‌های نادر قرار می‌گیرد. این گروه از بیماران دارای جهش *JAK2 V617F* می‌باشند که با درصدهای مختلف دیده می‌شود. هدف از این مطالعه، اجرای روش اصلاح شده PCR-RFLP برای تشخیص جهش *JAK2 V617F* در بیماران مبتلا به نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی، ۴۷ بیمار با درخواست آزمایش *JAK2 V617F*، مورد بررسی قرار گرفتند. برای تمامی نمونه‌ها آزمایش تشخیصی *JAK2 V617F* با استفاده از روش استاندارد ARMS TaqMan Probe انجام شد. جهت تایید نهایی، برخی از نمونه‌ها مورد توالی‌یابی ژنی قرار گرفتند. برای شناسایی ناحیه جهش با استفاده از روش PCR-RFLP، آغازگرهای اختصاصی و آنزیم BsaXI استفاده شد. با توجه به این که در این مطالعه نمونه‌های منفی و مثبت به همراه یک روش استاندارد برای تعیین جهش وجود داشت، محاسبه حساسیت و ویژگی این روش ۱۰۰٪ تعیین گردید. تحلیل نتایج توسط آزمون t انجام شد.

یافته‌ها

نتایج PCR-RFLP جهش *JAK2 V617F* برای تمامی نمونه‌ها کاملاً مشابه و منطبق با نتایج روش‌های استاندارد ARMS TaqMan Probe و تعیین توالی بود.

نتیجه‌گیری

روش PCR-RFLP دارای حساسیت تشخیصی قابل مقایسه‌ای با روش‌های Real Time PCR و تعیین توالی بود. مزیت این روش اصلاح شده، توانایی آن در افتراق انواع هموزیگوت و هتروزیگوت بیماران، وجود کنترل داخلی برای عملکرد آنزیم و هم چنین سهولت و صرفه اقتصادی آن است.

کلمات کلیدی: اختلالات میلوپرولیفراتیو، PCR، نئوپلاسم، کروموزوم فیلادلفیا

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۱۶

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی و بانک خون - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کمیته تحقیقات دانشجویی - کرمان - ایران

۲- PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان - کرمان - ایران

۳- مؤلف مسئول: PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان - کرمان - ایران - کدپستی: ۷۶۱۹۷۹۴۴۳۵

مقدمه

نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو (MPNs)، از جمله بدخیمی‌های خونی هستند که در علائم بالینی بسیار متغیر می‌باشند. از جمله علائم مشترک این بیماری‌ها، افزایش تمام رده‌های سلول‌های خونی بوده و مهم‌ترین ارگان خون‌ساز در این بیماران، مغز استخوان است (۱). بیماران میلوپرولیفراتیو بعد از شناسایی جابه‌جایی کروموزومی t(9;22) و کروموزوم فیلادلفیا (Ph)، به دو گروه دارای کروموزوم فیلادلفیا (Ph⁺) و فاقد آن (Ph⁻) تقسیم می‌شوند (۲، ۱). در بیماران فاقد کروموزوم فیلادلفیا (Ph⁻)، مهمترین اختلال ژنتیکی شناسایی شده جهش سوماتیک در آگزون شماره ۱۴ ژن جانوس کیناز ۲ (JAK2) می‌باشد. این جهش با جایگزینی نوکلئوتید T به جای نوکلئوتید G در نقطه ۱۸۴۹ (1849G>T) بوده و باعث تغییر کدون (GTC) به کدون (TTC) و در نتیجه تغییر اسید آمینه از والین به فنیل آلانین (V617F) می‌شود (۳). پروتئین JAK2 یکی از مهمترین پروتئین‌های دخیل در انتقال پیام می‌باشد که در انتقال پیام فاکتورهای رشد خون‌ساز از قبیل اریتروپوئین و ترومبوپوئین نقش دارد. جهش JAK2 V617F در دومین سودوکینازی که نقش مهارکنندگی در فسفوریلاسیون و انتقال پیام این پروتئین دارد، رخ می‌دهد. در نتیجه، انتقال خود به خودی پیام در عدم حضور فاکتور رشد رخ داده و باعث پرولیفراسیون سلول‌ها می‌شود. این جهش در بیماران MPN با شیوع بالا دیده می‌شود به طوری که در بیماران مبتلا به پلی‌سایتمی‌ورا (PV) این جهش در ۶۵٪ تا ۹۸٪ موارد، در بیماران با ترومبوسایتمی اساسی (ET) با شیوع ۲۳٪ تا ۵۷٪ و در بیماران مبتلا به میلو فیبروز اولیه (PMF) در حدود ۳۵٪ تا ۵۷٪ مشاهده می‌شود (۷-۳). این تفاوت در درصد‌های مشاهده شده در بیماران به دلیل استفاده از آزمایش‌های مولکولی با حساسیت‌های متفاوت می‌باشد و هم‌چنین در بسیاری از موارد، PMF نیز حاصل تغییر وضعیت بیماران پلی‌سایتمی‌ورا (PV) و تبدیل این بیماران به PMF است. استفاده از آزمایش‌هایی با حساسیت بالا باعث کاهش موارد منفی کاذب می‌شود در حالی که استفاده از روش‌هایی با حساسیت پایین نیز باعث عدم تشخیص برخی موارد مثبت می‌گردد (۸).

هدف از مطالعه حاضر، ارائه یک روش تغییر یافته PCR-RFLP جهت تشخیص جهش JAK2 V617F در بیماران مبتلا به MPN بود که کاربرد اصلی آن تشخیص راحت‌تر و دقیق‌تر با استفاده از روش PCR-RFLP می‌باشد. در این روش اصلاح شده، سعی در کاهش خطاهای آزمایش از قبیل عملکرد آنزیم بوده که با استفاده از کنترل‌های داخلی این موارد بررسی شدند.

مواد و روش‌ها**بیماران:**

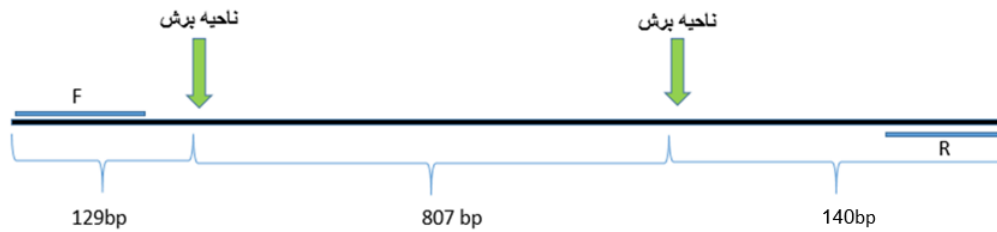
در این مطالعه توصیفی - مقطعی، ۴۷ بیمار مراجعه‌کننده به کلینیک امام رضای اراک که توسط پزشک معالج برای آن‌ها درخواست آزمایش JAK2 V617F شده بود، مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا نمونه خون بیماران در ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شده و سپس روی تمامی نمونه‌ها آزمایش تشخیصی JAK2 V617F با استفاده از روش ARMS Taqman Probe (کیاژن، آلمان) انجام شد. جهت تایید نهایی، برخی از نمونه‌ها مورد توالی‌یابی ژنی قرار گرفتند. در بین این نمونه‌ها تعداد ۲۳ نمونه جهش مثبت با‌آورده و مابقی نمونه‌ها منفی بودند. این روش‌ها به عنوان روش استاندارد جهت شناسایی جهش JAK2 V617F مد نظر بودند.

استخراج DNA:

DNA با استفاده از کیت کمپانی کیاژن (کیارژن، آلمان، Mini Kit)، از نمونه‌های خون کامل استخراج شد. تعیین غلظت DNA به وسیله دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۶۰ نانومتر انجام شد. جهت تعیین خلوص DNA، نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (۲۶۰/۲۸۰) (A) برای همه نمونه‌های استخراج شده بررسی گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR):

تکثیر ژن JAK2 با استفاده از روش PCR انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده برای تشخیص جهش JAK2 V617F عبارت بودند از:

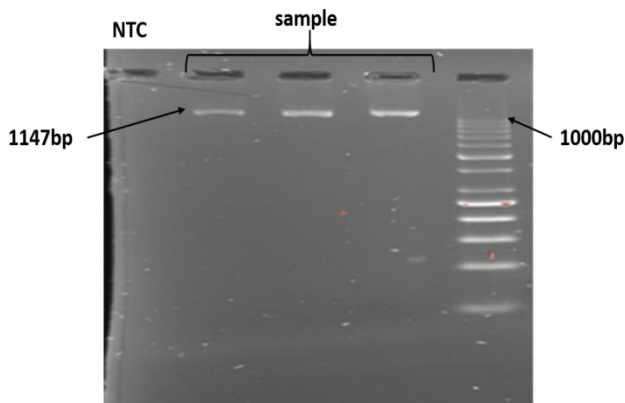


شکل ۱: نواحی برش آنزیم BsaXI و قطعات حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR

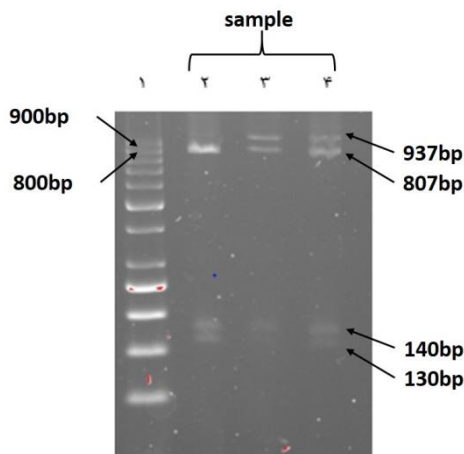
رنگ آمیزی نقره صورت گرفت.

تحلیل آماری:

با استفاده از آزمون t نتایج تحقیق تجزیه و تحلیل شدند. $p \leq 0/05$ معنادار در نظر گرفته شد.



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۲٪ در کنار راهنمای ۱۰۰bp



شکل ۳: قطعات حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل آگاروز. ۱: راهنمای ۵۰ bp، ۲: نمونه منفی، ۳ و ۴: نمونه های هتروزیگوت

5'-AGG ACT TTT CTG AGG ATA CA-3' (آغازگر جلوبرنده) و 5'-ATA GTT TAC ACT GAC ACC TA-3' (آغازگر معکوس). آغازگرها به گونه ای طراحی شدند که محصول PCR دارای طول ۱۱۴۷ bp بوده و دارای دو ناحیه برش برای آنزیم BsaXI (بیولب - انگلستان) می باشد؛ یک ناحیه برش مربوط به جهش JAK2 V617F و دیگری به عنوان کنترل داخلی هضم آنزیمی (اشکال ۱ و ۲).

واکنش هضم آنزیمی (RFLP):

برای واکنش هضم آنزیمی بعد از تکثیر ناحیه مورد نظر، محصول PCR تحت هضم آنزیمی با BsaXI قرار گرفت. با توجه به حضور نواحی شکست آنزیم در محصول PCR، قطعات مختلفی ایجاد می شود (شکل ۲). در این روش با توجه به وجود یک ناحیه برش اضافی برای آنزیم، یک باند ۱۴۰ نوکلئوتیدی به عنوان کنترل داخلی عملکرد آنزیم عمل نموده و بایستی در همه نمونه ها حاضر باشد. در حالتی که نمونه دارای جهش باشد، ناحیه دوم شناسایی تغییر می کند که با حذف باند ۱۳۰ نوکلئوتیدی همراه می شود. در این روش اصلاح شده به دلیل وجود دو ناحیه برش برای آنزیم، امکان افتراق حالت های هموزیگوت و هتروزیگوت جهش وجود دارد.

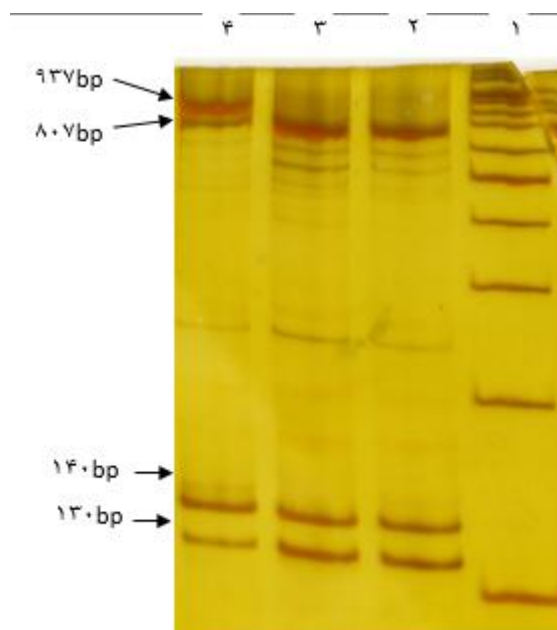
الکتروفورز نمونه های هضم شده:

الکتروفورز قطعات حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل آگاروز ۳٪ و ژل پلی آکریل آمید انجام شد (شکل ۳). شناسایی باندها در ژل آگارز با استفاده از رنگ SYBR SAFE (سیناژن) و در ژل پلی آکریل آمید با استفاده از

مقایسه با روش Real Time و تعیین توالی بود. هنگ کوکائو و همکارانش روش‌های مختلفی را جهت شناسایی جهش *JAK2 V617F* مورد مقایسه قرار داده و روش PCR-RFLP را به عنوان روش قطعی و مناسب برای تشخیص این جهش معرفی کردند. در این مطالعه روش‌هایی از قبیل ARMS PCR و دیگر روش‌های مولکولی برای شناسایی جهش استفاده شده و تعیین توالی به عنوان روش مرجع انتخاب شد. در مطالعه حاضر روش اصلاح شده PCR RFLP توانست حضور جهش را به اندازه روش تعیین توالی تشخیص دهد (۹). در مطالعه دیگری که توسط زی کینگ و همکارانش برای شناسایی جهش *JAK2 V617F* ارائه شد، روش PCR RFLP به عنوان یک روش مرجع برای تایید سایر روش‌ها مطرح گردید. آن‌ها PCR RFLP را به عنوان روشی مناسب اما وابسته به اپراتور برای شناسایی این جهش معرفی کرده‌اند (۸). در این مطالعه نیز روش PCR RFLP دارای حساسیت تشخیصی قابل مقایسه‌ای با روش‌های Real Time PCR و تعیین توالی بود. مزیت دیگر این روش وجود کنترل داخلی برای تایید عملکرد آنزیم و هم چنین ارزان و مقرون به صرفه بودن آن نسبت به روش تعیین توالی و سایر روش‌ها است. در مطالعه‌ای که توسط آمی جونز و همکارانش جهت بررسی انواع روش‌های شناسایی جهش *JAK2 V617F* انجام شد، روش‌هایی مانند ARMS PCR را به عنوان روش‌هایی با صرفه اقتصادی و مناسب جهت بررسی دقیق وجود جهش معرفی کردند (۱۰).

نتیجه‌گیری

روش PCR-RFLP دارای حساسیت تشخیصی قابل مقایسه‌ای با روش‌های Real Time PCR و تعیین توالی بود. از دیگر مزایای این روش اصلاح شده می‌توان به توانایی آن در افتراق انواع هموزیگوت و هتروزیگوت بیماران، وجود کنترل داخلی برای عملکرد آنزیم و هم چنین سهولت و صرفه اقتصادی آن اشاره کرد. این روش اصلاح شده می‌تواند به عنوان یک روش مناسب و مقرون به صرفه برای اجرا در آزمایشگاه‌های تشخیص مولکولی



شکل ۴: قطعات حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل پلی‌آکرلیل آمید ۱: راهنمای ۱۰۰ bp، ۲ و ۳: نمونه‌های منفی، ۴: نمونه هتروزیگوت

یافته‌ها

نتایج جهش *JAK2 V617F* بر روی ۴۸ نمونه مورد بررسی به روش اصلاح شده PCR RFLP دقیقاً مشابه با نتایج روش استاندارد PCR REAL TIME بود. در این بررسی میزان p value حاصل بیش از ۰/۰۵ بوده که نشان از عدم اختلاف معنادار بین دو آزمایش می‌باشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی صورت گرفته و بخشی از نمونه قبل از انجام هضم آنزیمی مورد الکتروفورز قرار گرفت (شکل ۲). الکتروفورز نمونه‌ها به روش اصلاح شده PCR RFLP انجام شد (شکل‌های ۳ و ۴). به علاوه روش اصلاح شده PCR-RFLP این توانایی را دارد که بین نمونه‌های هموزیگوت و هتروزیگوت برای جهش نیز افتراق ایجاد کند.

بحث

هدف از مطالعه حاضر بررسی روش اصلاح شده PCR-RFLP جهت تشخیص جهش *JAK2 V617F* در

پیشنهاد شود.

پزشکی کرمان که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند.

تشکر و قدردانی

با تشکر از مرکز سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم

References:

1. Neoplasm M. International Journal of Biological & Medical Research. Int J Biol Med Res 2012; 3(2): 1801-5.
2. Trifa AP, Popp RA, Cucuianu A, Dima D, Militaru MS, Pațiu M, *et al.* JAK2 p.V617F mutation-tetra-primer PCR and PCR-RFLP comparative semiquantitative approaches for estimation of the mutant allele in myeloproliferative neoplasms. Revista Română de Medicină de Laborator 2009; 14(1): 25-30.
3. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 2005; 434(7037): 1144-8
4. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 2005; 365(9464): 1054-61.
5. Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, *et al.* Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. J Biol Chem 2005; 280(24): 22788-92.
6. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, *et al.* Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell 2005; 7(4): 387-97.
7. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, *et al.* A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N Engl J Med 2005; 352(17): 1779-90.
8. Er TK, Lin SF, Chang JG, Hsieh LL, Lin SK, Wang LH, *et al.* Detection of the JAK2 V617F missense mutation by high resolution melting analysis and its validation. Clin Chim Acta 2009; 408(1-2): 39-44.
9. Cao HC, Lin J, Qian J, Yao DM, Li Y, Yang J, *et al.* Detection of the JAK2 mutation in myeloproliferative neoplasms by asymmetric PCR with unlabeled probe and high-resolution melt analysis. J Clin Lab Anal 2011; 25(4): 300-4.
10. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, *et al.* Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. Blood 2005; 106(6): 2162-8.

Original Article

Modified PCR-RFLP for detection of *JAK2V617F* mutation in patients with myeloproliferative neoplasm

Moradabadi A.R.¹, Farsinejad A.R.², Fatemi A.²

¹Student Research Committee, Faculty of Allied Medical Sciences, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

²Department of Hematology, Faculty of Allied Medical Sciences, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Abstract

Background and Objectives

Chronic myeloproliferative neoplasms (MPNs) are clonal hematopoietic stem cell disorders. They are heterogeneous in symptoms and mainly consist of Philadelphia chromosome positive (Ph+) and negative (Ph-). The Ph- group includes polycythemia Vera (PV), essential thrombocythemia (ET), primary myelofibrosis (PMF) and other rare disorders. In the latter group, substitution of phenylalanine for valine at codon 617 (*JAK2V617F*), could be relevant to the disease. In this study we used modified PCR-RFLP to detect *JAK2 V617 F* mutation in chronic myeloproliferative neoplasms.

Materials and Methods

In this cross sectional study, for detection of *JAK2 V617 F* mutation, 47 subjects were enrolled and peripheral blood samples were collected between 2015 and 2016. The samples were collected from the clinic center of Arak city and diagnosed to be *JAK2 V617F* positive by TaqMan probe and sequencing methods. All samples were investigated for the mutation by modified PCR-RFLP using specific primers and BsaXI restriction enzyme. The data were analyzed by t-test.

Results

Our modified PCR-RFLP for detection of *JAK2 V617F* mutation showed the same results as TaqMan probe and sequencing standard methods. In this study we have positive and negative samples and a standard method whose sensitivity and specificity was calculated to be 100% .

Conclusions

Our modified PCR-RFLP is a comparable method with gold standard methods, TaqMan probe and sequencing, for detection of *JAK2 V617F* mutation. The advantages of this modified method include its ability to detect *JAK2 V617F* in homozygote and heterozygote conditions, and the presence of the internal digestion control.

Key words: Myeloproliferative Disorders, PCR, Neoplasm, Philadelphia Chromosome

Received: 7 Dec 2016

Accepted: 8 Oct 2017

Correspondence: Fatemi A., PhD of Hematology & Blood Banking. Assistant Professor of Department of Hematology, Faculty of Allied Medical Sciences, Kerman University of Medical Sciences. Postal Code: 7619794435, Kerman, Iran. Tel: (+9834) 32112007; Fax: (+9834) 31325375 E-mail: ahmad.fatemi2@gmail.com