خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۹ شماره ۲ تابستان ۹۱ (۱۱۳-۱۰۴)
مقاله پژوهشی

مقایسه حساسیت دو روش Real-time PCR و ARMS PCR در تشخیص جهش شایع Q793X ژن *vWF* در مبتلایان به بیماری فون ویلبراند نوع ۳

سارا علوی[۱]، شیرین شهبازی[۲]، رضا مهدیان[۳]، احمدرضا کامیاب[۴]، محمد علی شکرگزار[۵]

چکیده

سابقه و هدف

بیماری فون ویلبراند نوع ۳ ، یک بیماری ارثی همراه با علایم خونریزی‌دهنده می‌باشد. این بیماری با توارث اتوزومال مغلوب در مناطقی که نرخ ازدواج‌های خویشاوندی بالا است، شیوع بیشتری نشان می‌دهد. نشان داده شده است که جهش Q793X ایجادکننده بیماری فون‌ویلبراند نوع ۳، در اگزون ۱۸ فراوانی بیشتری در جمعیت ایرانی دارد. لذا به منظور بررسی جهش مذکور در بیماران ایرانی، دو روش مولکولی جدید به کار گرفته شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه از نوع توصیفی بود. وجود جهش ژنتیکی Q793X در ۱۵ بیمار و ۳۰ فرد نرمال بررسی شد. از دو روش ARMS-PCR و Real-time PCR برای بررسی جهش استفاده شد. پس از انجام واکنش Real-time PCR ، الگوی منحنی‌های ذوب نیز بررسی و به منظور تایید نتایج آزمایش‌ها، نمونه محصول PCR بیماران تعیین توالی گردید. نتایج با نرم‌افزار Chormaspro ۱/۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

از مجموع نمونه‌های بیماران، ۳ نمونه از قبل برای جهش Q793X شناسایی شده بودند که در این بیماران وجود موتاسیون در حالت هموزیگوت تایید شد. بر اساس آزمایش‌های انجام شده، دو نمونه از میان بیماران تعیین جهش نشده به کمک دو روش Real-time PCR و ARMS-PCR ، واجد جهش Q793X شناخته شدند. در میان ۳۰ نمونه نرمال نیز، هیچ حالت هتروزیگوتی برای این موتاسیون مشاهده نشد.

نتیجه گیری

جهش Q793X در میان جمعیت ایرانی از فراوانی بالایی برخوردار است. هر دو روش ARMS PCR و Real-time PCR در بررسی این جهش تک نوکلئوتیدی مناسب به نظر می‌رسند اگرچه نسبت به هم دارای معایب و مزایایی هستند.

کلمات کلیدی: **بیماری فون ویلبراند، Real-Time PCR ، جهش**

تاریخ دریافت : ۹۰/۸/۱۰
تاریخ پذیرش : ۹۰/۱۲/۲

۱ـ کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی ـ مؤسسه آموزش عالی خاتم ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسؤول: PhD ژنتیک ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵
۳ـ PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران ـ تهران ـ ایران
۴- کارشناس ارشد ژنتیک ـ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران ـ تهران ـ ایران
۵- PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ دانشیار بانک سلولی ـ انستیتو پاستور ایران ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-14]

مقدمه

بیماری فون ویلبراند(*vWD*) شایع‌ترین اختلال خونریزی‌دهنده ارثی می‌باشد. شیوع این بیماری حدود یک درصد جمعیت است. *vWD* به واسطه کمبود و یا نقص عملکردی فاکتور فون ویلبراند(*vWF*) ایجاد می‌شود. این فاکتور، یک پروتئین مولتی‌مر پلاسمایی است که عملکردی چندگانه دارد(۱). *vWF* به اجزای ماتریکس خارج سلولی، رسپتورهای پلاکتی و فاکتور VIII انعقادی(فاکتور آنتی‌هموفیلیک) که یک کوفاکتور ضروری در سیستم انعقادی است متصل می‌شود. بنابراین نقش مهمی در هموستاز اولیه و ثانویه ایفا کرده و در نهایت منجر به جلوگیری از خونریزی می‌شود(۲). ژن *vWF* (۱۲P۱۳/۲) حدوداً ۱۷۸ کیلو باز طول دارد و شامل ۵۲ اگزون می‌باشد(۳). یک ژن *vWF* کاذب با ۹۷ درصد همولوژی با ژن مزبور، روی کروموزوم شماره ۲۲ شناسایی شده است. رونویسی از ژن *vWF* در سلول‌های اندوتلیال و مگاکاریوسیت‌ها صورت می‌گیرد و حاصل این رونویسی یک mRNA با بلندی ۸/۷ کیلوباز می‌باشد(۴).

خونریزی‌های جلدی ــ مخاطی در همه موارد *vWD* شایع هستند، اما همارتروزیس و هماتوما در مواردی رخ می‌دهد که سطح فاکتور VIII نیز به طور هم زمان پایین باشد. مواردی که نقص نسبی کمی در *vWF* دارند، نوع ۱ بیماری فون ویلبراند را ایجاد می‌کنند که با تظاهرات خونریزی‌دهنده متنوعی روبرو هستند. در حالی که کمبودهای کیفی در ساختار *vWF* ، نوع ۲ *vWD* را باعث می‌شوند. نوع ۳ بیماری فون ویلبراند، نادرتر است و بیماران مبتلا، خونریزی‌های متوسط تا شدیدی دارند(۵). این حالت به دلیل عدم وجود پروتئین *vWF* به واسطه جهش‌هایی در ژن *vWF* می‌باشد که با الگوی وراثتی اتوزومال مغلوب به ارث رسیده و منجر به پایان پیش‌رس(Immature) ترجمه پروتئین در هر دو آلل بیمار شده‌اند. *vWD* نوع ۳ ، شدیدترین نوع بیماری است و شیوعی برابر با ۰/۵ تا ۱ در یک میلیون نفر در کشورهای اروپای غربی و ۶ در یک میلیون نفر در مناطقی با شیوع بالای ازدواج‌های فامیلی دارد. در این بیماران، مقدار *vWF* در پلاسما و پلاکت‌ها بسیار پایین و یا غیر قابل ردیابی است(۶).

همان گونه که ذکر شد، فنوتیپ‌های آزمایشگاهی بسیار ناهمگون هستند و هم چنین عواملی غیر از نقایص ژنتیکی ژن *vWF* ، در بروز آن دخیل می‌باشند. به عبارت دیگر، عواملی مانند گروه‌های خونی، سطح پروتئین *vWF* را تحت تاثیر قرار می‌دهند(۷). از سوی دیگر با وجود شیوع نسبتاً کم بیماری، بیش از ۱۰۰ جهش متفاوت در بیماران مبتلا به *vWD* نوع ۳ شناسایی شده است. در این بیماری بیشتر نقایص ژنتیکی منجر به ایجاد آلل‌های خنثی(null) می‌شوند که به واسطه حذف‌های کوچک و بزرگ، جایگزینی‌های(insertion) کوچک، جهش‌های نقطه‌ای بی‌معنی(non sense) و جهش‌های جایگاه برش(splice site) ایجاد می‌شوند. البته جهش‌های بد معنی(missense) هم در ۱۷ مورد گزارش شده است(۶). با وجود تنوع در جهش‌ها، بعضی از آن‌ها با شیوع بیشتری در بیماران ایرانی مشاهده شده‌اند. جهش Q793X در اگزون ۱۸ ، یکی از جهش‌های شایع در بین بیماران ایرانی بوده است(۸).

طبق نتایج منتشر شده، بیماران تعیین جهش شده ایرانی تاکنون ۲۲ بیمار می‌باشند که مجموعاً ۱۸ جهش گوناگون در آن‌ها مشاهده شده است(۱۰-۸). نکته حایز اهمیت این است که اکنون بیش از ۱۰۰۰ بیمار فون ویلبراند نوع ۳ در ایران شناسایی شده‌اند که از اکثر قریب به اتفاق آن‌ها هیچ اطلاعات ژنتیکی در دست نیست. با توجه به استمرار تمایل برای ازدواج‌های خویشاوندی خصوصاً در مناطق روستایی و بافت‌های سنتی شهری، دسترسی به اطلاعات ژنتیکی بیماران برای مشاوره ژنتیک بیمار یا فامیل درجه یک ایشان، امکان پیشگیری از تولد موارد جدید مبتلا به این بیماری را فراهم می‌نماید. لذا ابداع روش‌هایی که با هزینه‌های کم بتوانند به صورت هدفمند به جهش‌یابی بیماران ایرانی منجر شوند، از ارزش خاصی برخوردار خواهد بود.

مطالعه حاضر، به منظور بررسی جهش شایع Q793 در بیماران مبتلا به *vWD* نوع ۳ انجام شد. به این منظور آزمایش Tetra primer ARMS-PCR برای جهش Q793 ژن *vWF* طراحی شد. علاوه‌بر این، نتایج این روش با نتایج آزمایش Real-time PCR که به موازات آن صورت

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-14]

پذیرفت، مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. در این مطالعه جمعاً ۱۵ بیمار مورد بررسی قرار گرفتند. بیماران مبتلا به بیماری فون ویلبراند نوع ۳ و دارای سطح غیر قابل ردیابی از آنتی‌ژن *vWF* (۵IU/dL >) بودند. پس از اخذ رضایت کتبی از بیماران، نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی سیترات یا EDTA (Ethylendiamine tetra acetic acid) تهیه شده و برای ارزیابی‌های انعقادی و بررسی ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج DNA :

DNA ژنومی از نمونه‌های خونی گردآوری شده از افراد طبیعی که در ماده ضد انعقاد EDTA نگهداری شده بودند، با روش رسوب‌گذاری به وسیله نمک(salting out) استخراج شدند و DNA ژنومیک از نمونه‌های خونی سیتراته افراد بیمار با استفاده از کیت استخراج DNA (کیاژن، QIAamp Mini spin) مطابق با دستورالعمل موجود در کیت جداسازی شدند.

طراحی آزمایش Tetra primer ARMS-PCR برای جهش Q793X ژن vWF.

این روش بر اساس طراحی جفت آغازگرهای اختصاصی آلل‌ها و تکثیر آلل مورد نظر در یک واکنش PCR انجام می‌شود. تعداد جفت آغازگرها بسته به نوع طراحی می‌تواند ۳ یا ۴ عدد باشد. در روش ۴ آغازگری (Tetra primer ARMS- PCR)، برای تشخیص یک جهش ویژه، دو جفت آغازگر کنترل در طرفین محل موتاسیون برای اطمینان از عملکرد صحیح PCR طراحی می‌شود. برای تکثیر منطقه حاوی جهش نیز از دو جفت آغازگر که به ترتیب برای آلل جهش یافته و آلل طبیعی طراحی شده، استفاده می‌گردد.

طراحی جفت آغازگرها با استفاده از نرم‌افزارهای Gene Runner® و Primer Express® و بر اساس توالی ژن *vWF* بر روی کروموزوم شماره ۱۲ انجام شد. پس از انتخاب جفت آغازگرها به منظور اطمینان از ویژگی آن‌ها در اتصال به ناحیه مکملی خود در ژن مربوطه، توالی آغازگرها با تمامی توالی ژنوم انسان در پایگاه اطلاعاتی Gene Bank ، مقایسه گردید. به منظور افزایش ویژگی جفت آغازگرهای اصلی، علاوه بر عدم تطابق انتهای ۳' ، در سومین باز انتهای ۳' هر دو آغازگر، یک باز تغییر داده شد تا از اتصال احتمالی آن آغازگر به آلل مخالف ممانعت به عمل آید(جدول ۱).

جدول ۱: جفت آغازگرهای طراحی شده برای شناسایی جهش Q793X. زیر بازهای تغییر یافته به منظور عدم تطابق(Mismatch) خط کشیده شده است.

آغازگرها	سکانس
F-Mut	AAAGGACAGTGTGGAAGGTAG
R-Mut	CGACTCCAGGTCATAGTTATA
F-Norm	GAGTGTACCAAAACGTTCC
R-Norm	ACTCATCCCTGCCTACAAGA

TETRA PRIMER ARMS PCR :

در اولین مرحله، به منظور اطمینان از عملکرد صحیح آغازگرها، واکنش PCR با استفاده از غلظت‌های مختلف بر روی نمونه‌های شناخته شده نرمال و بیمار انجام شد. جهت تعیین غلظت بهینه DNA الگو، شیب غلظتی DNA نیز مورد بررسی قرار گرفت. طیف بررسی شده از غلظت DNA ، محدوده ۱۰ng/µL تا ۱۰۰ng/µL را در بر می‌گرفت.

به منظور تشخیص نوع موتاسیون در نمونه‌های بیماران، ۲۰ میکرولیتر PCR Mix و ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو در چاهک‌های جداگانه ریخته شد. سپس به واکنش اول، آغازگرهای مستقیم(FW) و معکوس(RW) آلل نرمال و به واکنش دوم، آغازگرهای مستقیم و معکوس آلل جهش یافته اضافه گردید. هم چنین، یک واکنش کنترل با استفاده از آغازگرهای کنترل برای هر نمونه تهیه شد. سپس واکنش تکثیری PCR در دستگاه ترموسایکلر(ABI ۲۷۲۰) و طبق برنامه زمانی ـ دمایی زیر انجام شد:

مرحله اول شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. مرحله دوم شامل فاز دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-14]

ثانیه، فاز اتصال آغازگر(Annealing) در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و فاز سوم، طویل‌سازی (Extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه بود. مرحله دوم مجموعاً ۳۵ تکرار را در بر می‌گرفت. مرحله سوم شامل طویل‌سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. انتخاب بهترین دمای آنیلینگ از طریق انجام آزمایش‌هایی با شیب دمایی(Gradient) صورت گرفت.

آزمایش Real-time PCR:

در این مطالعه، علاوه بر بررسی نمونه‌ها با روش PCR معمولی، از روش پیشرفته‌تر Real-time PCR نیز استفاده شد. طراحی آغازگرها به صورتی انجام شد که قابلیت استفاده در هر دو روش را دارا باشند. لذا مراحل بهینه‌سازی واکنش‌ها به صورت مشترک انجام شد و نمونه‌ها با هر دو روش بررسی شدند. مواد زیر اجزای تشکیل‌دهنده واکنش Real-time PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بودند:

SYBR GREEN Master mix (شامل رنگ فلورسنت SYBR Green I ، رنگ زمینه ROX ، آنزیم AmpliTaq Gold® DNA Polymerase، بافر PCR ، dNTPs و $MgCl_2$)، آب مقطر دیونیزه، آغازگرها با غلظت نهایی ۲۰۰ نانو مول و ۲۰ نانوگرم DNA الگو. برنامه دمایی برای تکثیر قطعات و رسم منحنی ذوب به صورت زیر انجام شد: مرحله اول در طی یک سیکل و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم به صورت تکرار متناوب ۳۰ سیکل با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، یک فاز آنیلینگ به دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و فاز اکستنشن در۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. سپس در مرحله سوم که شامل تشکیل منحنی تفکیک می‌باشد، در طول یک سیکل، دمای واکنش از ۹۵ درجه سانتی‌گراد به ۶۰ درجه سانتی‌گراد و مجدداً، به دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد رسید. در این مرحله، تغییر دما از ۹۵ درجه سانتی‌گراد به ۶۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۰/۰۳ درجه سانتی‌گراد بر ثانیه انجام شد و ۲۰ دقیقه طول کشید.

تعیین توالی DNA:

به منظور تایید نتایج آزمایش‌های Tetra primer ARMS-PCR و Real-time PCR ، نمونه محصول PCR قطعه کنترل (۲۹۲ bp) توسط شرکت بایونیر(کره جنوبی) تعیین توالی(DNA Sequencing) شد. نتایج حاصل با نرم‌افزار ChromasPro Ver. ۱/۵ آنالیز گردید.

یافته‌ها

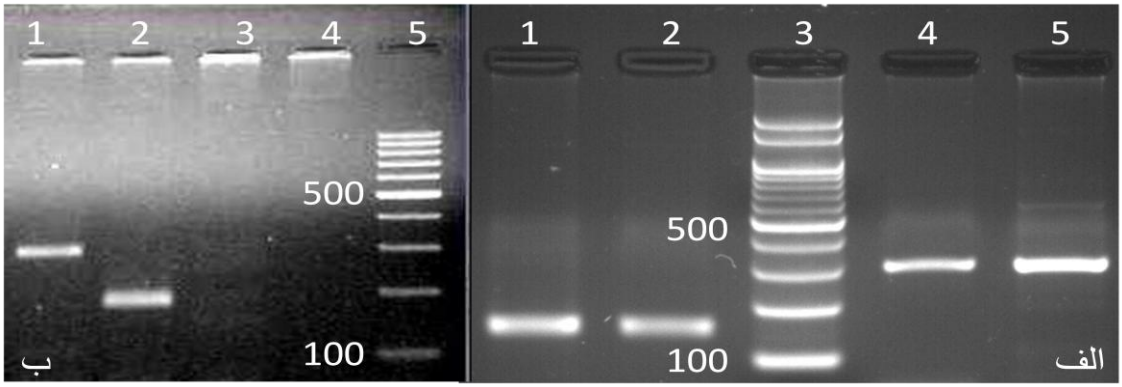
نتایج بررسی‌های ARMS-PCR:

در این بررسی در مجموع ۴۵ نمونه بررسی شدند که ۳۰ نمونه مربوط به افراد نرمال و ۱۲ نمونه مربوط به افراد بیمار که نوع جهش ایجاد کننده بیماری در آن‌ها مجهول می‌باشد بود. به علاوه جهت مستندسازی آزمایش‌ها، ۳ نمونه کنترل مثبت که واجد جهش Q793X بودند، از میان بیماران مطالعه قبلی انتخاب گردیدند و با دو روش جدید مجدداً بررسی شدند(۸).

طراحی آغازگرها به گونه‌ای انجام شده بود که مجموعا" سه قطعه متفاوت در محصول PCR قابل رؤیت بود : قطعه بزرگ با طول ۲۹۲ جفت باز که به عنوان قطعه کنترل در نظر گرفته می‌شد، قطعه متوسط با طول ۱۸۶ جفت که به عنوان قطعه جهش یافته و قطعه کوچک با ۱۴۵جفت باز که به عنوان قطعه نرمال در نظر گرفته شد. در افراد کنترل فاقد جهش Q793X ، تنها شاهد تکثیر قطعه کنترل به اندازه ۲۹۲ جفت باز و قطعه نرمال به اندازه ۱۴۵ جفت باز بودیم. در صورتی که فرد برای جهش Q793X هتروزیگوت باشد، تکثیر هر سه باند ذکر شده را شاهد خواهیم بود. با توجه به آغازگرهای طراحی شده، نمونه‌های افراد بیمار شامل دو باند مشخص بودند، با این تفاوت که علاوه بر قطعه کنترل ۲۹۲ جفت بازی، می‌بایستی شاهد قطعه متوسط در محدوده ۱۸۶جفت بازی به عنوان قطعه جهش یافته نیز باشیم. عکس‌های به دست آمده از ژل الکتروفورز این موضوع را در افراد بیمار تایید کرد(شکل ۱).

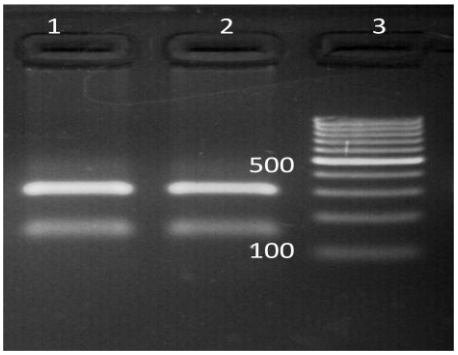
علاوه بر بررسی‌های فوق، واکنش‌ها به صورت مولتی‌پلکس هم بررسی شدند. به این منظور که در PCR هم زمان از هر چهار آغازگر با غلظت‌های بهینه شده

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-14]



شکل ۱: آنالیز ژل الکتروفورز در مرحله اول بهینه‌سازی واکنش PCR ؛ الف: باند چاهک ۴ و ۵ بیانگر محصول تکثیری قطعه کنترل به اندازه ۲۹۲ جفت باز است و باند چاهک ۱ و ۲ بیانگر محصول تکثیری قطعه نرمال به اندازه ۱۴۵ جفت باز در یک فرد سالم می‌باشد. چاهک ۳ مارکر نشانگر(size marker) با اندازه ۱۰۰ جفت باز را نشان می‌دهد. ب: باند چاهک ۱ بیانگر محصول تکثیری قطعه کنترل به اندازه ۲۹۲ جفت باز و باند چاهک ۲ بیانگر محصول تکثیری قطعه جهش‌یافته به اندازه ۱۸۶ جفت باز در یک فرد بیمار می‌باشد. چاهک ۳ و ۴ بیانگر کنترل منفی واکنش‌ها است. چاهک ۵ سایز مارکر با اندازه ۱۰۰ جفت باز را نشان می‌دهد.

استفاده شد. در صورت هموزیگوت بودن بیمار برای جهش Q793X ، دو باند در یک ستون قابل رؤیت بود(شکل ۲).



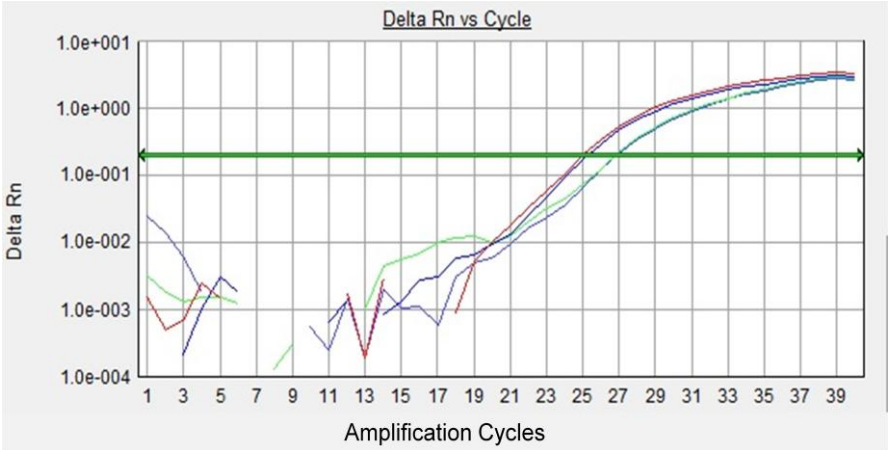
شکل۲ : آنالیز ژل الکتروفورز برای واکنش مولتی‌پلکس در نمونه دارای جهش Q793X به صورت هموزیگوت. ۱ و ۲ : در هر واکنش، دو باند در محدوده کنترل(bp ۲۹۲) و جهش یافته(۱۸۶ bp) قابل مشاهده است. ۳: سایز مارکر با اندازه ۱۰۰ جفت باز.

نتایج بررسی‌های Real- time PCR :

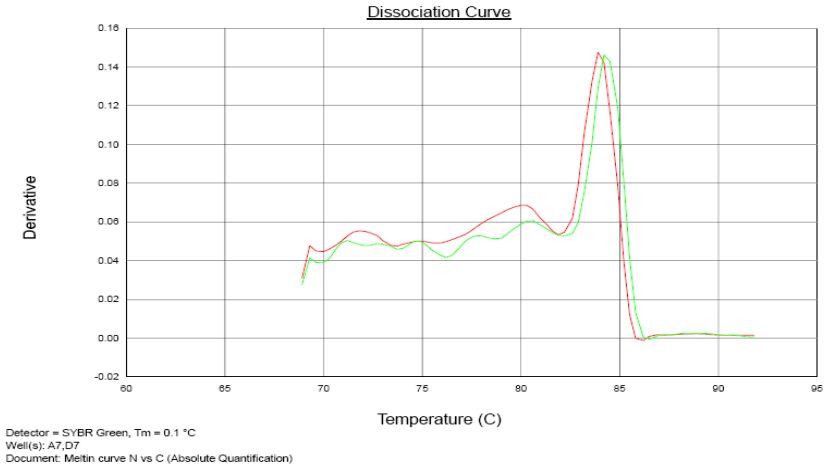
بهینه‌سازی واکنش‌ها: رقت‌هایی از DNA الگو با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۶۰، ۷۵ و ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر به صورت دوتایی برای هر واکنش در چاهک‌های متفاوت آزمایش شد. با توجه به منحنی تکثیر مناسب که معادل با کمترین Ct (Cycle threshold) و بهترین شیب نمودار بود، غلظت بهینه DNA ، ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر تعیین شد. به منظور تایید قطعه تکثیر شده و اطمینان از عدم وجود محصول غیر اختصاصی آغازگر دایمر و آلودگی، از آنالیز منحنی تفکیک استفاده شد. همان‌گونه که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، با توجه به وجود تنها یک پیک برای هر قطعه ژن در دمای ذوب منحصر به خودش، اختصاصی بودن محصول PCR مشخص گردید. جهت تایید نتایج منحنی ذوب قطعات تکثیری، محصول Real-time PCR با ژل الکتروفورز آنالیز شده و نتایج تایید گردید. بر اساس آزمایش‌های انجام شده از مجموع ۱۲ نمونه بیمار، ۲ نمونه واجد جهش Q793X شناخته شدند و در ۳۰ نمونه نرمال نیز هیچ حالت هتروزیگوتی مشاهده نشد. نمونه‌های دارای جهش، با آغازگر اختصاصی آلل جهش‌یافته دارای منحنی تکثیر بودند در حالی که نمونه‌های فاقد جهش، تنها با آغازگرهای نرمال جواب دادند. به عنوان مثال همان‌گونه که در شکل ۴ ملاحظه می‌شود، ۸ نمونه بیمار با آغازگر اختصاصی آلل جهش یافته مورد بررسی قرار گرفتند. از آن‌جایی که تنها یک بیمار واجد جهش Q793X بود، لذا تنها همان نمونه منحنی تکثیر کامل را نشان می‌داد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-14]

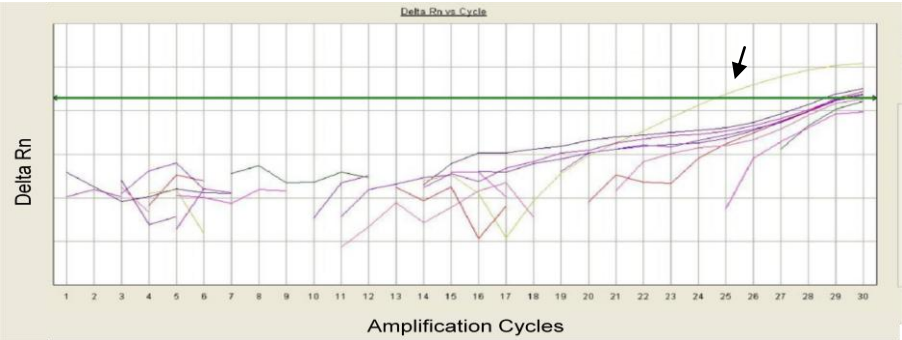
الف



ب

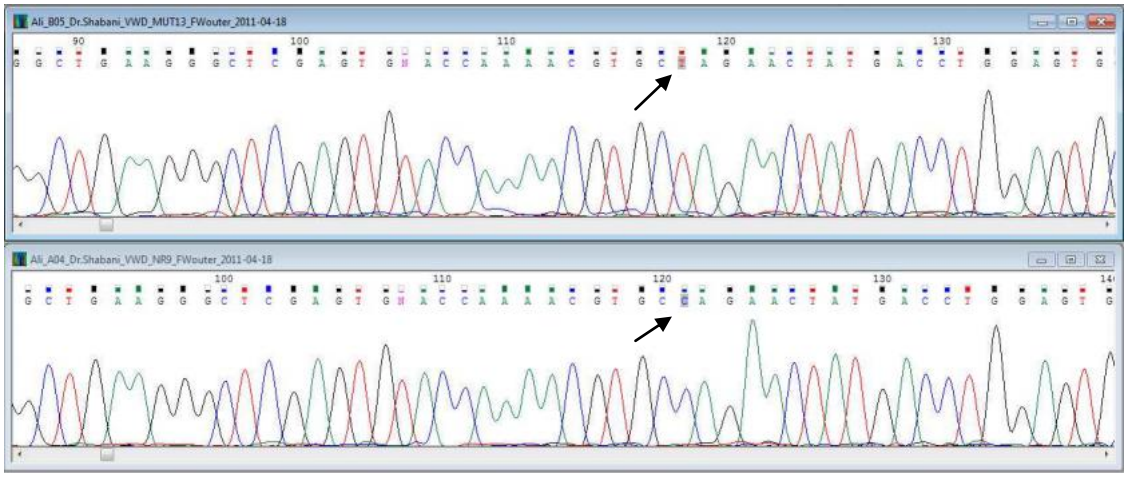


شکل ۳: آنالیز منحنی تکثیر و منحنی تفکیک برای قطعات نرمال و جهش‌یافته. در آنالیز منحنی تفکیک به واسطه تغییرات دمایی که پس از اتمام فرآیند PCR صورت می‌پذیرد، هر قطعه DNA دو رشته‌ای موجود در محصول بر اساس طول و محتوای بازهای GC در دمای ذوب اختصاصی خود، تک رشته‌ای شده و همان طور که در شکل ملاحظه می‌گردد، این تغییر حالت توسط سیستم به صورت یک پیک نمایش داده می‌شود. الف: منحنی تکثیر مربوط به قطعات نرمال و جهش‌یافته. ب: منحنی‌های مربوط به تفکیک دو قطعه نرمال و جهش‌یافته که Tm آن‌ها به ترتیب ۸۴ و ۸۳ درجه می‌باشد. هر یک از پیک‌ها نمایانگر Tm یک محصول PCR است.



شکل ۴: منحنی تکثیر برای ۸ نمونه بیمار: آغازگرهای مورد استفاده، اختصاصی آلل جهش‌یافته هستند. همان‌گونه که در شکل با فلش نشان داده شده است تنها یک بیمار منحنی تکثیر کامل را داشته و واجد جهش Q793X می‌باشد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-14]



شکل ۵: نتایج تعیین توالی(DNA sequencing) برای یک نمونه بیمار واجد جهش Q793X (بالا) و یک فرد سالم(پایین). همان‌گونه که در شکل با فلش نمایش داده شده است، باز C در نمونه نرمال با باز T در نمونه بیمار جایگزین شده است.

تعیین توالی DNA:

جهت تایید بیشتر صحت روش‌های ARMS-PCR و Real-time PCR در تعیین موتاسیون و مشخص نمودن قطعی نوع موتاسیون بیماران، تعیین توالی انجام شد. به این ترتیب که محصول PCR قطعه کنترل(۲۹۲ bp) افراد کنترل و افراد بیمار جهت تعیین توالی فرستاده شد و جهش Q793X در بیمارانی که در آزمایش‌های قبلی واجد این جهش شناخته شده بودند، تایید گردید(شکل ۵).

بحث

در پروژه حاضر به منظور بررسی جهش Q793X در بیماری فون ویلبراند نوع ۳ ، از دو روش ARMS-PCR و Real-time PCR استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی به گونه‌ای طراحی شد که برای کار با هر دو روش مناسب باشد. شرایط مختلف واکنش اعم از زمان، دما، غلظت آغازگر و DNA بهینه‌سازی گردید و با توجه به بهینه‌سازی‌های انجام شده، واکنش‌های طراحی شده انجام شد. به این ترتیب که واکنش‌های ARMS-PCR و Real-time PCR برای افراد نرمال و بیمار به صورت جداگانه و در مواردی به صورت مولتی‌پلکس صورت پذیرفت و نتایج نهایی با هم مقایسه گردید. طراحی آغازگر برای بررسی یک جهش خاص، با محدود کردن آغازگر به یک نقطه خاص از توالی ژن، امکان انتخاب بهترین حالت ممکن برای ساختار آغازگر را کاهش می‌دهد. برای اطمینان از صحت نتایج، تعیین توالی DNA انجام شد و نتایج قبلی تایید گردید.

همان طور که قبلاً اشاره شد، درصد بالایی از آلل‌های خنثی در ژن *vWF* را جهش‌های بی‌معنا تشکیل می‌دهند که در تئوری، ایجاد پروتئین ناقص(Truncated protein) می‌نمایند و بسته به محل جهش می‌توانند اندازه‌های متفاوت داشته باشند. جهش بی‌معنا تبدیل کدون اسید آمینه به کدون خاتمه می‌باشد که در سطح ترجمه پروتئین اختلال ایجاد کرده و باعث خاتمه زودرس ترجمه و ایجاد پروتئین ناقص می‌گردد. یکی از جهش‌هایی که باعث ایجاد جهش بی‌معنا در کل ژنوم می‌شود، تبدیل توالی CAG به TAG است که باعث تغییر اسید آمینه گلوتامین به کدون خاتمه در سطح ترجمه پروتئین می‌گردد(۱۲، ۱۱). در *vWD* این نوع جهش در اگزون‌های مختلف مشاهده شده است(۱۳).

عامل اصلی محدود کننده مطالعه های ژنتیکی بیماران فون ویلبراند، ژن بزرگ و ۵۲ اگزونی آن می‌باشد. باید توجه داشت که جهش در سرتاسر ژن ۵۲ اگزونی *vWF* قابل وقوع است و این امر تعیین توالی در همه اگزون‌ها را اجباری می‌کند(۱۴، ۵). از آن جا که تعیین توالی ۵۲ اگزون

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-14]

بسیار پر هزینه و وقت‌گیر می‌باشد، مطالعه های ژنتیکی این بیماران بسیار کند پیشرفته است. البته در کنار تعیین توالی، از روش‌های دیگری نیز استفاده شده است که به PCR-SSCP (Single-strand conformation polymorphism) و DHPLC (Denaturing high performance liquid chromatography) می‌توان اشاره کرد(۱۵، ۹). هر کدام از این روش‌ها، محدودیت‌های خاص خود را دارند و به صورت روتین مورد استفاده قرار نمی‌گیرند. از دیگر روش‌ها که تنها نواحی خاصی را بررسی می‌کنند، مطالعه نقاط داغ هستند که به صورت سرشتی در ژنوم کل موجودات تمایل به جهش دارند و مشخص‌ترین آن‌ها در ژنوم انسانی، تبدیل توالی CGA به TGA می‌باشد. در طی مطالعه‌های متعدد در اروپا، ۱۱ نقطه داغ ژن *vWF* بررسی و چندین جهش گزارش شده است(۱۷، ۱۶). مطالعه حاضر بر روی جهش‌یابی Q793X متمرکز است و دو روش Real-time PCR و ARMS-PCR برای تشخیص این جهش به کار گرفته شده است. هر دو روش، قدرت شناسایی و تشخیص تغییر ژنتیکی مورد نظر را دارا هستند. علی‌رغم این که روش Real-time PCR روش بسیار دقیقی است، اما روش ARMS-PCR از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر تشخیص داده شد و جواب‌های قابل استنادی با استفاده از این روش به دست آمد. با توجه به انجام ARMS-PCR به صورت مولتی‌پلکس، امکان هزینه‌های مواد مصرفی و هم چنین کاهش امکان خطای آزمایشگر وجود دارد. اگر چه انجام واکنش Real-time PCR نیز به صورت مولتی‌پلکس وجود دارد اما در تجربه این مطالعه، به هنگام تکثیر هم‌زمان سه قطعه مورد نظر، نتایج گویایی به دست نیامد. یکی از دلایل اصلی این موضوع، عدم توانایی رنگ فلورسنت SYBR Green در تفکیک قطعه‌ها به هنگام تکثیر هم زمان می‌باشد. از سوی دیگر منحنی ذوب قطعه‌های بزرگ‌تر از bp ۱۵۰ در این سیستم در ۲ یا چند فاز رخ می‌دهد. این موضوع باعث تداخل در رسم منحنی سایر محصولات و وجود چند پیک در منحنی ذوب آن محصول می‌شود. رخ دادن این مشکل در مورد قطعه بزرگ کنترل bp ۲۹۲ مشاهده شد. لذا پیشنهاد می‌شود تا در صورت فراهم بودن بودجه لازم و امکانات سخت‌افزاری، در واکنش Real-time PCR ، به جای رنگ فلورسنت SYBR Green از پروب‌های اختصاصی نشاندار(TaqMan Probes) به منظور مطالعه جهش‌های نقطه‌ای استفاده شود.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که راه‌کار جهش‌یابی با تاکید بر جهش Q793X در جمعیت ایران می‌تواند گروهی از این بیماران را به تشخیص مولکولی برساند و در مشاوره ژنتیک این بیماران مؤثر واقع شود.

تشکر و قدردانی

از بیمارانی که صبورانه در این مطالعه شرکت نمودند تشکر می‌نماییم و امیدواریم توانسته باشیم در جهت ارتقای سلامتشان گامی برداریم. تحقیق حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسیده که بدین‌وسیله از دکتر یعقوب فتح‌اللهی قدردانی به عمل می‌آید.

References :

1- Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. Blood 1987; 69(2): 454-9.
2- Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. Annu Rev Biochem 1998; 67: 395-424.
3- Sadler JE, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Harlan JM, Titani K, Davie EW. Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. Proc Natl Acad Sci U S A 1985; 82(19): 6394-8.
4- Wagner DD, Marder VJ. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization. J Cell Biol 1984; 99(6): 2123-30.
5- Ruggeri ZM Zimmerman TS. von Willebrand factor and von Willebrand disease. Blood 1987; 70(4): 895-904.
6- Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, *et al*. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. J Thromb Haemost 2006; 4(10): 2103-14.
7- Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ Jr, Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. Blood 1987; 69(6): 1691-5.
8- Shahbazi S, Mahdian R, Ala FA, Lavergne JM, Denis CV, Christophe OD. Molecular characterization of Iranian patients with type 3 von Willebrand disease. Haemophilia 2009; 15(5): 1058-64.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-14]

9- Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, Peyvandi F, Srivastava A, Federici AB, *et al*. Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients. Blood Cells Mol Dis 2003; 30(3): 264-70.
10- Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, Peyvandi F, Srivastava A, Federici AB, *et al*. Molecular characterization of a multiethnic group of 21 patients with type 3 von Willebrand disease. Thromb Haemost 2000; 84(4): 536-40.
11- Tosetto A, Castaman G, Rodeghiero F. Assessing bleeding in von Willebrand disease with bleeding score. Blood Rev 2007; 21(2): 89-97.
12- Cooper DN, Krawczak M. The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. Hum Genet 1990; 85(1): 55-74.
13- Eikenboom JC. Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology. Best Pract Res Clin Haematol 2001; 14(2): 365-79.
14- Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, *et al*. Structure of the gene for human von Willebrand factor. J Biol Chem 1989; 264(33): 19514-27.
15- Kakela JK, Friedman KD, Haberichter SL, Buchholz NP, Christopherson PA, Kroner PA, *et al*. Genetic mutations in von Willebrand disease identified by DHPLC and DNA sequence analysis. Mol Genet Metab 2006; 87(3): 262-71.
16- Zhang ZP, Lindstedt M, Falk G, Blombäck M, Egberg N, Anvret M. Nonsense mutations of the von Willebrand factor gene in patients with von Willebrand disease type III and type I. Am J Hum Genet 1992; 51(4): 850-8.
17- Eikenboom JC, Ploos van Amstel HK, Reitsma PH, Briët E. Mutations in severe, type III von Willebrand's disease in the Dutch population: candidate missense and nonsense mutations associated with reduced levels of von Willebrand factor messenger RNA. Thromb Haemost 1992; 68(4): 448-54.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-14]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2012; 9(2): 104-113

Original Article

Comparison of the sensitivity between real-time PCR and ARMS PCR on detection of *vWF* gene Q793X mutation in von Willeberand Disease type 3 patients

Alavi S.[1], Shahbazi Sh.[2], Mahdian R.[3], Kamyab AR.[3], Shokrgozar MA.[4]

[1]*Khatam University, Tehran, Iran*
[2]*Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
[3]*Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*
[4]*National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

von Willebrand Disease (*vWD*) type 3 is an inherited disease characterized by severe clinical manifestations due to haemostatic abnormalities. Because of the autosomal recessive pattern of its inheritance, the disease is more frequent in regions with the high rate of consanguine marriages. We have previously demonstrated that despite various mutations of the gene, the Q793X mutation in exon 18 is more frequent in Iranian *vWD* patients. We have developed two assays to further investigate this mutation among Iranian patients.

Materials and Methods

The Q793X mutation status was studied in 15 *vWD* type 3 patients and 30 normal individuals by ARMS-PCR and real-time PCR assays. Melting curve analysis was performed after each real-time PCR experiment. To confirm the results of assays, all amplified gene fragments were sequenced.

Results

Three out of 15 patients were previously diagnosed as having Q793X mutation in homozygote status. This was further confirmed by the ARMS-PCR and real-time PCR assays. Interestingly, the mutation was also found in 2 other unrelated patients with unknown mutations. Heterozygote status for the mutation was not detected in normal controls.

Conclusions

Q793X mutation in *vWF* gene is common in Iranian population. However, a particular demographic distribution of the mutation was not observed in this study. Both assays successfully detected the mutation, although each assay has its own advantages and drawbacks. It is up to each laboratory to choose either assay based on their facilities and expertise.

Key words: von Willebrand Diseases, Real-Time PCR, Mutation

Received: 1 Nov 2011
Accepted: 21 Feb 2012

Correspondence: Shahbazi Sh., PhD of Genetics. Assistant Professor of Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University.
P.O.Box: 14115-331,Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82884556; Fax: (+9821) 82884555
E-mail: *sh.shahbazi@modares.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-14]