خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۳ شماره ۴ زمستان ۸۵(۳۰۸-۲۹۹)

شناسایی جهش‌های ژن فاکتور IX انعقادی در بیماران هموفیلی B استان اصفهان با استفاده از روش SSCP و تعیین توالی

عصمت کمالی دولت‌آبادی[۱]، دکتر مرتضی کریمی‌پور[۲]، شهرام سمیعی[۳]، لیلا کوکبی[۴]، دکتر سیروس زینلی[۵]، نفیسه نفیسی[۶]، دکتر حمیدرضا هورفر[۷]

چکیده

سابقه و هدف

هموفیلی B یک بیماری وابسته به جنس مغلوب است که در اثر کاهش مقدار و یا نقص عملکرد فاکتور IX انعقادی رخ می‌دهد. ژن فاکتور IX انعقادی به طول ۳۴ کیلو باز، دارای ۸ اگزون است. جهش در نواحی مختلف ژن فاکتور IX انعقادی سبب نقص در پروتئین IX انعقادی و بیماری هموفیلی B می‌گردد.

هدف از این مطالعه تعیین جهش در ژن فاکتورIX انعقادی بیماران مبتلا به هموفیلی B در استان اصفهان و یافتن ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ این بیماران بود.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. نمونه‌ها به روش غیر تصادفی آسان انتخاب شدند. DNA ژنومیک ۲۴ بیمار مبتلا به هموفیلی B مراجعه کننده به بیمارستان سیدالشهدا(امید) اصفهان، طبق روش استاندارد استخراج شد. PCR و SSCP بر روی ژل پلی اکریل آمید در شرایط غیر تقلیب کننده برای کلیه اگزون‌ها و نواحی مهم ژن فاکتور IX بیماران انجام گرفت. نمونه‌هایی که در SSCP، حرکت آن روی ژل در مقایسه با کنترل نرمال متفاوت بود، انتخاب و به روش ختم زنجیره تعیین توالی شدند. توالی‌های به دست آمده با نرم‌افزارهای بایوادیت و کروماس تجزیه شدند.

یافته‌ها

۷۰/۸٪ جهش‌ها از نوع missense، ۸/۳٪ جهش‌ها از نوع nonsense، ۱۶/۷٪ جهش‌ها از نوع deletion و ۴/۲٪ جهش‌ها از نوع insertion بودند. پلی‌مرفیسم مالمو در یک بیمار مشاهده شد. جهش‌های به دست آمده ناهمگن بوده و حدود نیمی از آن‌ها در اگزون ۸ رخ داده بود که با نتایج موجود در بانک اطلاعاتی بیماران هموفیلی B مطابقت داشت. در طی این تحقیق ۴ جهش جدید(C31088G، C30857G، A17690C، C6460G) به دست آمد که تاکنون گزارش نشده بود.

نتیجه گیری

از این یافته‌ها می‌توان در تشکیل یک بانک اطلاعاتی کشوری و نیز مشاوره ژنتیک در خانواده‌های این بیماران استفاده کرد.

کلمات کلیدی: هموفیلی B، SSCP ، جهش

تاریخ دریافت : ۸۴/۱۱/۲۷
تاریخ پذیرش : ۸۵/ ۶/۲۸

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۲- مؤلف مسؤول: PhD فرآورده‌های بیولوژیک ـ استادیار انستیتو پاستور ایران ـ خیابان پاستور ـ پلاک ۶۹ ـ کدپستی: ۱۳۱۶۴
۳- کارشناس ارشد بیوشیمی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون
۴- کارشناس ارشد سلولی و مولکولی ـ انستیتو پاستور ایران
۵- PhD ژنتیک انسانی ـ استادیار انستیتو پاستور ایران
۶- کارشناس سلولی و مولکولی ـ انستیتو پاستور ایران
۷- پزشک عمومی ـ بیمارستان سیدالشهدا اصفهان

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

مقدمه

هموفیلی B، یک بیماری خونریزی دهنده وابسته به جنس مغلوب با شیوع ۱ در هر ۲۵۰۰۰ تولد مذکر می‌باشد که با کاهش خفیف، ملایم و یا شدید فعالیت فاکتور IX انعقادی همراه است. ژن فاکتور IX انعقادی به طول ۳۴ کیلو باز، دارای ۸ اگزون بوده و بر روی بازوی بلند کروموزوم X در ناحیه Xq۲۷ ۱. قرار گرفته است(۴-۱). محصول نهایی ژن فاکتور IX انعقادی، پلی‌پپتید تک زنجیره‌ای ۵۵ کیلو دالتونی با ۴۱۵ اسید آمینه و ۶ منطقه(domain) می‌باشد(Signal peptide ، pre peptid ، GLA ، $EGF_{1,2}$ – like domain ، Active peptide ، Catalytic domain). هر کدام از ۶ منطقه دارای اسید آمینه‌های مهم و محافظت شده‌ای است که در واکنش‌های گاماکربوکسیلاسیون، اتصال به فاکتور VII انعقادی، اتصال به فاکتور VIII انعقادی، پلاکت‌ها و فعالیت کاتالیتیک نقش مختص خود را دارا می‌باشند(۷-۱). این پروتئین به همراه سایر فاکتورها در آبشار انعقادی، نقش مهمی در انعقاد خون دارد(۳-۱).

هر گونه جهش در نواحی رمز گردان(coding) این ژن شامل حذف(deletion)، ورود یک نوکلئوتید(insertion)، جهش بی‌معنی(nonsense)، جهش دگرمعنی(missense)، منجر به نقص درعملکرد و یا کاهش میزان پروتئین فاکتور IX انعقادی و بروز بیماری می‌گردد(۴-۱). بیماری از طریق زنان ناقل به فرزندان پسر منتقل می‌شود(۳، ۱). ۲۰ تا ۳۰ درصد موارد گزارش شده، به صورت جهش جدید(de novo) بوده و هیچ سابقه قبلی در خانواده وجود ندارد. شیوع بیماری در تمام نقاط دنیا یکسان بوده و به نوع نژاد وابسته نمی‌باشد. خون‌ریزی‌های پیاپی در مفاصل مچ دست، زانو، شانه، آرنج، لگن، هماتوم‌های غیر قابل رویت که گاهی بدون هیچ ضربه‌ای ایجاد می‌شود، هماچوری، خونریزی از مخاط و خونریزی‌های داخل جمجمه‌ای از مهم‌ترین مشکلاتی است که بیماران با آن روبرو بوده و از آن رنج می‌برند. علاوه بر مشکلات فوق باید به عوارض ناشی از درمان‌های نگهدارنده در این بیماران(تشکیل آنتی‌بادی‌های مهار کننده و بیماری‌های عفونی منتقله از خون) اشاره کرد. از مهم‌ترین بیماری‌های منتقله به بیماران که ناشی از درمان‌های نگه‌دارنده است، می‌توان به هپاتیت B، هپاتیت C و HIV اشاره نمود(۸-۶، ۱). از دیگر مواردی که باید در این گروه از بیماران مد نظر داشت، هزینه‌های بالای درمانی و اشغال تخت‌های بیمارستانی به دلیل عدم داشتن برنامه‌های درمانی مدون در منزل است(۹). در مورد بیماری‌های ژنتیکی نظیر هموفیلی B، بهترین موضع‌گیری پیشگیری می‌باشد و اولین گام برای رسیدن به این موضوع، شناسایی جهش در افراد مبتلا در خانواده و شناسایی ناقلین در خانواده‌هاست. هم اکنون در کل کشور، ۶۴۹۱ بیمار هموفیلی A و B وجود دارند که سالانه ۵۵ میلیارد تومان فقط صرف وارد کردن داروها و فاکتورهای انعقادی آن‌ها می‌شود. از اطلاعات به دست آمده در این تحقیق می‌توان برای تعیین ناقلین و تشخیص پیش از تولد موارد هموفیلی B استفاده کرد(۱۱، ۱۰).

هدف از این تحقیق، شناسایی جهش‌های ژن فاکتور IX انعقادی در ۲۴ بیمار مبتلا به هموفیلی B استان اصفهان بوده است.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. در این مطالعه بعد از هماهنگ کردن با کانون هموفیلی استان اصفهان و فراخوان بیماران مبتلا به هموفیلی B، بیماران به بیمارستان سیدالشهدای اصفهان مراجعه کرده و از آنان مصاحبه به عمل آمد. فرم‌های اطلاعاتی مربوطه تکمیل شد و پس از گرفتن رضایت نامه، با توجه به این که افراد خویشاوند دارای جهش‌های مشابه می‌باشند، ۲۴ بیمار هموفیلی B غیر خویشاوند به روش نمونه‌گیری غیر تصادفی آسان وارد این مطالعه شدند. ۱۰ میلی لیتر خون سیاهرگی از بیماران به طور جداگانه گرفته و در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ریخته شد. در تمامی بیمارانی که وارد این مطالعه شدند، سطح فاکتور IX انعقادی پایین‌تر از حد طبیعی و فعالیت فاکتور VIII آن‌ها طبیعی بوده و تحت درمان با فاکتور IX انعقادی نیز بوده‌اند.

استخراج DNA:

DNA خون وریدی بیماران پس از لیز و شستشوی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای به کار رفته برای SSCP بر روی ژن فاکتور IX انعقادی بیماران هموفیلی

ناحیه	آغازگر	نوکلئوتید*	سکانس	سایز bp	آنیلینگ
Promoter & Exon I	FIX11	-79 to -57	gaagtaaatacagctcagcttg	۲۶۸	۵۳/۵°C
	FIX12	196-176	attctatgctctgcatctga		
Exon II	FIX21	6285-6304	ctttttgctaaaactaaag	۲۴۸	۵۵°C
	FIX22	6533-6514	attctatgctctgcatctga		
Exon III	FIX31	6510-6532	taaaagataggaaatcaatacc	۲۵۱	۵۸°C
	FIX32	6753-6733	ttagagggttggactgatct		
Exon IV	FIX41	10311-10332	atcccaatgagtatctacaggg	۲۵۴	۶۲°C
	FIX42	10565-10545	gtttcaacttgtttcagaggg		
Exon V	FIX51	17607-17627	ccatgtacttttttagaaatgc	۲۴۲	۵۷°C
	FIX52	17849-17830	gctgaagtttcagatacaga		
Exon VI	FIX61	20317-20335	gccaatgagaaatatcagg	۲۷۹	۵۶°C
	FIX62	20596-20578	ccagttttgacacaccatc		
Exon VII	FIX71	29954-29976	gcctattcctgtaaccagcacac	۲۴۲	۶۰°C
	FIX72	30196-30177	gagctagtggtgctgcagat		
Exon VIII	FIX81	30735-30756	ttaggtcagtggtcccaagtag	۲۲۳	۶۰°C
	FIX82	30958-30937	taagggttcgtccagttccaga		
	FIX83	30885-30905	ctcaccacaactacaatgcag	۲۳۵	۶۱°C
	FIX84	31120-31096	tcggtcaacaagtggaactctaagg		
	FIX85	31015-31036	cttcctcaaatttggatctggc	۲۰۷	۶۱°C
	FIX86	31222-31205	tcccccactatctccttg		
	FIX87	31172-31191	gctggcttccatgaaggagg	۲۶۷	۶۳°C
	FIX88	31439-31417	agtgattagttagtgagaggccctg		

* شماره‌گذاری بازها بر اساس شماره‌گذاری یوشیتاکا و همکاران(Yoshitake *et al.*) می‌باشد(۱۵).

گلبول‌های قرمز طبق روش استاندارد اشباع نمکی (Salting out) استخراج گردید(۱۳، ۱۲). بعد از تعیین غلظت و ارزیابی خلوص به روش اسپکتروفتومتری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تکثیر ژن فاکتور IX:

مناطق مختلف ژن فاکتور IX انعقادی هر بیمار شامل پروموتر، اگزون‌های شماره یک تا هشت و نواحی سر حد اگزون‌ها و اینترون‌ها به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR) با آغازگرهای طراحی شده برای هر ناحیه پس از بهینه سازی، به طور جداگانه تکثیر شد(۱۴-۱۲)(جدول ۱). مواد وارد شده در این واکنش شامل ۵۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی هر بیمار، ۱۰ پیکو مول از آغازگرهای بالا دست و پایین دست(پرایم ـ کره جنوبی)، مخلوط dNTP (رُوش ـ آلمان) با غلظت ۲۰۰ میکرو مولار $MgCl_2$ با غلظت ۲ میلی مولار، بافر ۱۰x و آنزیم SmarTaq DNA polymerase(سیناژن) با غلظت ۰/۵ واحد در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. برنامه بهینه شده برای PCR به شکل زیر بود:

۹۴ درجه ۵ دقیقه، ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه، ۶۳-۵۵ درجه ۴۰ ثانیه(دمای آنیلینگ بهینه شده برای نواحی مختلف)، ۷۲ درجه ۳۵ ثانیه که ۳۰ سیکل انجام شد. پس از تکثیر هر ناحیه، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ با ولتاژ ۸۰ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید تحت تابش نور ماوراء بنفش(UV) مشاهده شدند.

Single Strand Conformation Polymorphism(SSCP):

پس از حصول اطمینان از مناسب بودن محصولات PCR ، آزمایش غربالگری SSCP بر روی کلیه قطعات تکثیر یافته بیماران به طور جداگانه همراه با کنترل نرمال انجام گرفت(۱۶). برای انجام SSCP به روش غیر رادیواکتیو، ۵ میکرولیتر از محصولات PCR با ۱۲ میکرولیتر بافر مخصوص SSCP که شامل فورمامید ۹۵٪، برموفنل بلو و زایلن سیانل ۰/۰۵ درصد و EDTA ۱۰ میلی مولار بود مخلوط شد. به منظور واسرشته کردن نمونه‌ها، مخلوط فوق در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شده و سریعاً بر روی یخ منتقل گردید.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

نمونه‌های واسرشته شده توسط سرنگ هامیلتون به چاهک‌های تعبیه شده بر روی ژل غیر واسرشته پلی اکریل آمید ۱/۳۷/۵ یا ۲۹/۱، ۱۰٪ منتقل شده و به مدت ۱۰ ساعت با ولتاژ ۵۰۰ ولت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد الکتروفورز شد. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل به روش نیترات نقره ۰/۱ درصد به ترتیب زیر رنگ‌آمیزی شد.

ابتدا ژل با اسید استیک ۵٪ و اتانل ۴۰٪ فیکس شده و پس از شستشو با نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید. بعد از شستشو با آب مقطر به منظور دیدن باندها از محلول NaOH ۱/۵٪ و فرمالین ۳۷٪ استفاده شد و در پایان با استفاده از اسید استیک واکنش متوقف گردید.

تعیین توالی و آنالیز:

نمونه‌هایی که در SSCP آن‌ها تفاوت حرکتی(band shift) نسبت به کنترل نرمال دیده شده بود، پس از PCR مجدد در حجم ۲۰۰ میکرولیتر و تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل کیاژن(کیاژن – آلمان) به روش ختم زنجیره تعیین توالی شدند. در توالی یابی از آغازگرهای بالادست(فوروارد)SSCP استفاده شد.

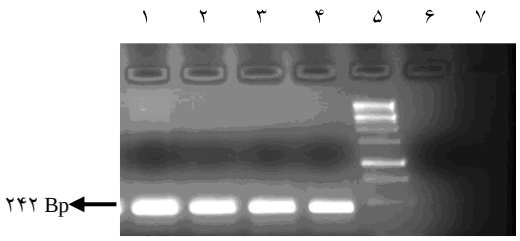
توالی‌های به دست آمده با نرم‌افزارهای بایوادیت و کروماس تجزیه شده و سپس با ژن فاکتور IX انعقادی به وسیله نرم‌افزارهای Blast و Fasta3 تطبیق داده شده و تغییر باز مربوطه، حذف و یا ورود نوکلئوتید به سکانس اصلی ژن به دست آمد(۱۸، ۱۷). جهش‌های به دست آمده بیماران با بانک اطلاعاتی جهش هموفیلی B مقایسه و موارد گزارش نشده مشخص شدند.

یافته ها

تحقیق فوق بر روی ۲۴ بیمار مبتلا به هموفیلی B انجام شد. در این مطالعه با توجه به شجره نامه‌های بیماران، ۱۱ مورد فرم اسپورادیک بیماری و ۱۳ مورد فرم فامیلیال بیماری را دارا بودند. در ۲ مورد هیچ مدرکی دال بر نوع اسپورادیک و فامیلیال در دسترس نبود.

نتایج PCR:

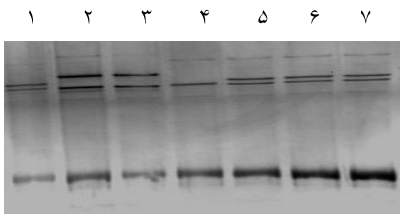
در ۲۳ بیمار از ۲۴ بیمار وارد مطالعه شده، کلیه نواحی ژن فاکتورIX انعقادی تکثیر گردید. برای یک بیمار علیرغم کنترل‌های مختلف فقط اگزون‌های ۱ تا ۶ تکثیر شد و اگزون‌های ۷ و ۸ تکثیر نشدند(شکل ۱).



شکل ۱: PCR اگزون ۷ به طول bp ۲۴۲. ردیف ۵ سایز مارکر kb ۱، ردیف ٦ نمونه‌ای که حذف در این اگزون دارد. ردیف ۷ کنترل منفی

نتایج SSCP:

نتایج SSCP مربوط به پروموتر و اگزون ۱ در ۲ بیمار، اگزون ۲ در ۳ بیمار، اگزون ۴ در ۱ بیمار، اگزون ۵ در ۲ بیمار، اگزون ۶ در ۲ بیمار و اگزون ۸ در ۱۲ بیمار الگوی حرکتی متفاوتی را نسبت به کنترل نرمال نشان دادند(شکل ۲- الف). در SSCP ۲ بیمار، تغییر حرکتی در هیچ کدام از نواحی مورد بررسی ژن فاکتورIX به دست نیامد که برای به دست آوردن جهش بایستی کل ژن تعیین توالی شود. حساسیت روش SSCP در به دست آوردن جهش‌ها با استفاده از فرمول نسبت موارد مثبت(مواردی که در الگوی حرکتی آن‌ها نسبت به کنترل نرمال تغییری مشاهده گردید) به کل جمعیت هموفیل مورد بررسی ضرب در ۱۰۰، حدود ۹۱٪ محاسبه شد.



شکل ۲- الف: SSCP اگزون ۲ و باند شیفت‌های قابل رؤیت در ردیف‌های ۲ و ۳ و ٤. ردیف ۷ کنترل نرمال می‌باشد

نتایج تعیین توالی DNA:

نتایج حاصل از تعیین توالی به همراه شدت بیماری،

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

جدول شماره ۲: جهش‌های به دست آمده در ژن فاکتور IX انعقادی بیماران هموفیلی B استان اصفهان

	شدت بیماری	CpG◊	جهش +	تغییر اسید آمینه	منطقه درگیر	نوع جهش
۱	Mild	N	A 13G	-	Promoter	–
۲	Mild	N	A 13G	-	Promoter	–
۳	Severe	Y	C 6364 T	R-4 W	Propeptide	Missense
۴	Severe	Y	A 192 G C 6425 T	R 29 X	Signal peptide Propeptide	Nonsense
*۵	Mild	Y	C 6460 G	R 29 G	Propeptide	Missense
۶	Severe	N	Del A 10371		EGF1	Deletion
*۷	Severe	N	A 17690 C	N 92 T	EGF2	Missense
۸	Severe	Y	G 20422 A C 17761 T	A 148 T R 116 X	EGF2	Malmo polymorphism Nonsense
۹	Mild	N	Del A 20293	-	Active peptide	Deletion
۱۰	Mild	N	Del A 20365	Frame shift	Active peptide	Deletion
*۱۱	Mild	N	C 30857 G	Q 246 E	Catalytic domain	Missense
۱۲	Severe	Y	C 30863 T	R 248 X	Catalytic domain	Missense
۱۳	Severe	Y	G 30864 A	R 248 Q	Catalytic domain	Missense
۱۴	Mild	N	G 30864 A	R 248 Q	Catalytic domain	Missense
۱۵	Mod	N	A 30897 G	Y 259 C	Catalytic domain	Missense
۱۶	Severe	Y	C 31118 T	R 333 X	Catalytic domain	Nonsense
۱۷	Severe	Y	G 31119 A	R 333 Q	Catalytic domain	Missense
۱۸	Severe	Y	G 31119 A	R 333 Q	Catalytic domain	Missense
۱۹	Severe	Y	G 31119 A	R 333 Q	Catalytic domain	Missense
*۲۰	Mild	N	C 31088 G	L 323 V	Catalytic domain	Missense
۲۱	Mod	N	Ins T 31140	Frame shift	Catalytic domain	Insertion
۲۲	Severe	Y	Del g & h?	-	Catalytic domain	Deletion

◊ CpG : مناطق پرخطر برای جهش

* شماره‌هایی که با ستاره مشخص شده است جهش جدید می‌باشد که در بانک اطلاعاتی هموفیلی تاکنون گزارش نشده است.

+ شماره‌گذاری بازها بر اساس Yoshitade *et al*. 1985[15] می‌باشد.

Mild : شدت بیماری خفیف، Severe : بیماری شدید، Mod : شدت بیماری متوسط A. Y: Yes, N: No : باز آدنین، G : باز گوانین، C : سیتوزین، T : تیمین. Del: deletion، Ins: insertion.

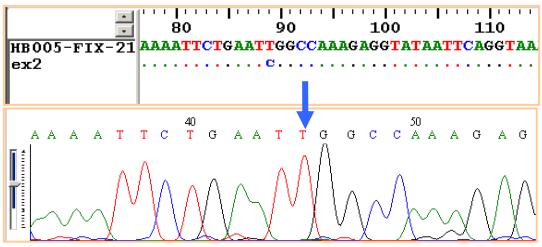
R : آرژنین، W : تریپتوفان، G, Stop Codon: X : گلایسین، N : آسپارژین، T : تریپتوفان، A : آلانین، Q : گلوتامین، E : گلوتامیک، Y : ترئونین، C : سیستئین، V : والین

Missense : موتاسیونی که سبب تغییر اسید آمینه شده است. Nonsense: موتاسیونی که سبب ایجاد کدون خاتمه گردیده است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

نوع جهش، جایگاه جهش، تغییر اسید آمینه و منطقه پروتئینی درگیر در جدول ۲ خلاصه شده است.

جهت حصول اطمینان از جهش‌های به دست آمده نمونه‌هایی که جهش آن‌ها جدید بودند مجدداً تعیین توالی شدند(شکل ۲- ب).



شکل ۲- ب: نمونه بی‌مار که تغی‌ی‌ر باز سی‌توزی‌ن به تی‌می‌ن سبب تغییر اسید آمینه آرژنین به تری‌پتوفان در موقعیت ٤- شد.

همان گونه که مشاهده می‌شود، بیشتر جهش‌های به دست آمده از نوع missense می‌باشد. در یکی از بیماران علاوه بر جهش ایجاد کننده بیماری، تغییر باز گوانین در جایگاه ۲۰۴۲۲ به آدنین(G 20422 A) سبب تغییر اسید آمینه آلانین در جایگاه ۱۴۸ به ترئونین شده بود. این تغییر جهش نبوده و به پلی‌مورفیسم مالمو مشهور می‌باشد. این پلی‌مورفیسم اولین بار در کشور سوئد شناسایی شده و تنها پلی‌مرفیسمی است که در نواحی رمز گردان ژن فاکتورIX انعقادی اتفاق می‌افتد(۳). ۴ مورد از جهش‌های به دست آمده جدید بودند تاکنون گزارش نشده بودند. این جهش‌ها عبارتند از: C6460G، A17690C، C30857G، C31088G

بحث

از میان بیماری‌های ژنتیکی، هموفیلی جزو بیماری‌های شایع و با هزینه بهداشتی ـ درمانی بالا می‌باشد. با توجه به این که عوارض بیماری زیاد بوده و فعلاً درمان قطعی برای آن وجود ندارد(درمان‌های موجود نگهدارنده بوده و ژن درمانی برای آن در فاز یک و دو کارآزمایی بالینی قرار دارد) اهمیت پیشگیری از بیماری خود را به وضوح نشان می‌دهد(۱۹). جهت پیشگیری، بهترین موضع‌گیری در مقابل بیماری‌های ژنتیکی، تعیین ناقلین، تشخیص قبل از تولد و جلوگیری از به دنیا آمدن فرد مبتلا می‌باشد. با توجه به این که هموفیلی یک بیماری وابسته به جنس مغلوب است و بیماری از طریق زنان ناقل به پسران به ارث می‌رسد بنابراین برای پیشگیری از بیماری بایستی زنان ناقل شناسایی شوند. برای شناسایی زنان ناقل دو راه وجود دارد:

۱- استفاده از روش‌های غیر مستقیم نظیر استفاده از مارکرهای پلی‌مورفیک RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)، SNP(Single Nucleotide Polymorphism) و VNTR(Variable Number of Tandem Repeats)(۲۰-۲۳).

۲- روش مستقیم مثل تعیین توالی بعد از یک روش غربالگری یا بدون آن(۲۴).

در بسیاری از مواقع مارکرهای پلی‌مورفیک گویایی نداشته و یا بیماری به صورت تک موردی می‌باشد که در این صورت تعیین جهش خانواده الزامی است. در روش مستقیم، یا کل ژن تعیین توالی شده و یا با استفاده از روش‌های غربالگری حدود جهش در ژن را شناسایی کرده و سپس تنها همان ناحیه تعیین توالی می‌شود(۳). با توجه به این که جهش‌های موجود در ژن فاکتورIX در کل ژن پراکنده بوده و جهش شایعی که تعداد زیادی از بیماران را پوشش دهد وجود ندارد، لذا کل ژن فاکتورIX انعقادی بیماران باید مورد بررسی قرار گیرد. SSCP یک روش غربالگری مناسب،ارزان، در دسترس و با قدرت مانور بالا بوده و نیاز به امکانات پیشرفته‌ای ندارد. لذا از این روش جهت غربالگری جهش‌های ژن فاکتورIX انعقادی بیماران وارد شده در این تحقیق استفاده گردید. اساس این روش بر شکل فضایی(Conformation) زنجیره‌های تک رشته‌ای DNA استوار است. این ساختار ثانویه، بسته به توالی نوکلئوتیدها، تغییر یافته و این مساله سبب تفاوت حرکت در الکتروفورز قطعات در شرایط غیر تقلیب کننده ژل می‌گردد(۱۴-۱۲). پس از انجام SSCP و یا هر روش غربالگری دیگر، معمولاً تعیین توالی روی همان قطعه‌ای که تغییر حرکت نسبت به نمونه‌های کنترل نرمال نشان می‌دهد انجام می‌شود.

در این مطالعه برای بررسی تکرار پذیری آزمایش‌های SSCP، چنانچه تفاوت حرکتی در نمونه یک بیمار مشاهده

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

می‌شد از آن نمونه در دفعات بعدی آزمایش به عنوان کنترل مثبت استفاده می‌گردید و در تمامی موارد تغییرات حرکتی تکرار پذیر بود. پس از انجام SSCP، معمولاً تعیین توالی قطعات مورد نظر با یکی از آغازگرها انجام شد، مگر در موتاسیون‌های جدید که تعیین توالی به جهت تایید دو بار انجام گرفت. با توجه به این که قبل از انجام توالی یابی DNA، یک روش غربالگری انجام شده است، معمولاً یک بار توالی یابی کافی است.

با یافتن جهش‌های فاکتور IX انعقادی بیماران مبتلا به هموفیلی B، شناسایی ناقلین در خانواده‌های بیماران با سرعت و دقت بیشتری امکان‌پذیر است. علاوه بر آن بیماری هموفیلی B مدل مولکولی بسیار مناسبی برای بررسی ارتباط بین جهش‌ها با شدت بیماری و ساختار پروتئینی و نیز مدل مناسبی برای بررسی اسیدهای آمینه مهم در جایگاه‌های حساس برای پروتئین مربوطه می‌باشد(۲۴).

نوع جهش به دست آمده در هر بیمار با شدت بیماری او مقایسه شد(Genotype-Phynotype Correlation) که مطابق با موارد گزارش شده در بانک اطلاعاتی بیماران هموفیلی بود(۲۵).

مطالعات مدل سازی قبلی که روی اسید آمینه‌های مختلف پروتئین فاکتورIX انعقادی انجام شده، اهمیت این اسیدآمینه‌ها را مشخص کرده است. نظر به این که بعضی از جهش‌های جدید به دست آمده در این مطالعه، missense می‌باشند، با توجه به نوع تغییرات و محل تغییر در ساختار پروتئین فاکتورIX ، به توجیه وضعیت پرداخته و سعی می‌گردد شدت بیماری ارزیابی گردد. بنابراین با دیدگاه فوق سعی گردیده که عواقب احتمالی جهش‌های جدید در سطح پروتئین فاکتورIX انعقادی و رابطه شدت بیماری و نوع جهش پیش‌بینی گردد.

در یک بیمار، تغییر باز C 6460 G رخ داده که منجر به تغییر اسید آمینه آرژنین به گلایسین در موقعیت ۲۹ گردیده است(R29G)(جهش جدید). آرژنین در این ناحیه جزو آرژنین‌های شدیداً محافظت شده نواحی ۹ گانه بحران است(۲۶). اسیدهای آمینه واقع در این منطقه پس از گاما کربوکسیلاسیون، نقش حیاتی در اتصال فاکتور IXa به کلسیم دارند، لذا جهش در این ناحیه منجر به ایجاد فرم شدید بیماری هموفیلی B می‌گردد. در بانک اطلاعاتی بیماران هموفیلی B، تغییر C به T که به ایجاد کدون ختم می‌گردد، گزارش شده است اما تغییر اسید آمینه به دست آمده در این مطالعه قبلاً گزارش نشده است.

در یک بیمار تغییر A17690C سبب تغییر اسید آمینه آسپارژین(Asn) به ترئونین(Thr) در جایگاه ۹۲ اگزون ۵ شده بود(جهش جدید). تغییر در جایگاه ۹۲ سبب نقص در اتصال فاکتور IX انعقادی به فاکتور X می‌گردد. Glu^{78} و Arg^{94} در فاکتور IX انعقادی سبب برقراری ارتباط بین دو منطقه EGF شده که این ارتباط در واکنش فاکتور IX انعقادی با زنجیره سبک فاکتور VIIIa بسیار ضروری است(۲۹-۲۷). تغییر در اسید آمینه بسیار نزدیک به Arg در جایگاه ۹۴ بر روی این تداخل بی‌تاثیر نیست. این جهش سبب ایجاد فرم شدید بیماری شده بود.

در یک بیمار به دلیل جهش در باز C 31088 G، تغییر محافظه کارانه(تبدیل اسید آمینه به اسید آمینه‌ای از همان خانواده) اسید آمینه لوسین در محل ۳۲۳ به والین(L 323 V) رخ داد که سبب ایجاد فرم خفیف بیماری در این بیمار شده بود(جهش جدید).

در ۳ بیمار تغییر باز G 31119 A موجب تغییر اسید آمینه آرژنین به گلوتامین در موقعیت ۳۳۳ شد(R 333 Q). جهش این بیماران سبب تغییر اساسی در اسید آمینه گردید. در طی این تغییر با کاهش بار اسید آمینه، تداخل مستقیم این اسید آمینه با فاکتور VIIIa از بین رفته و تمایل فاکتور IXa به فاکتور VIIIa کاهش یافت و سبب هموفیلی شدید در این بیماران شد(۲۷). در بانک اطلاعاتی بیماران مبتلا به هموفیلی B، تمام جهش‌های گزارش شده در این ناحیه با بیماری شدید همراه بود و با یافته‌های به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد.

در یک بیمار علیرغم آزمایش‌های متعدد همراه با کنترل‌های مختلف، اگزون‌های ۷ و ۸ تکثیر نشد. بنابراین فرض بر این گذاشته شد که این بیمار دارای حذف در این دو اگزون می‌باشد که نیازمند بررسی‌های بیشتر، نظیر لکه‌گذاری ساترن(Southrn blot)است(۲۱). در این بیمار مصرف فاکتور IX بسیار بیشتر از حد عادی بود که نشان

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

دهنده احتمال وجود مهارکننده در خون بیمار می‌باشد. در موارد حذف ژنی در فاکتور IX، احتمال وجود مهارکننده بالاتر در حدود ۱۰٪ است.

همان گونه که یافته‌های فوق نشان می‌دهد و رجوع به بانک اطلاعاتی بیماران نیز آن را تایید می‌کند، چنانچه جهش در یکی از مناطق نه گانه بحران رخ دهد و منجر به تغییرات اساسی(تغییر اسید آمینه به اسید آمینه‌ای از خانواده دیگر با خصوصیات متفاوت) یا محافظه کارانه(تغییر اسید آمینه به اسید آمینه‌ای از همان خانواده با خصوصیات مشابه) اسید آمینه شود و یا این که جهش در سایر مناطق ژن منجر به تغییرات اساسی اسید آمینه آن ناحیه گردد، بیماری حاصله از نوع شدید می‌شود(۳). مناطق بحران مناطقی از ژن می‌باشد که غنی از GC بوده و جهش در این مناطق به سن مادری بستگی دارد(۳۲-۳۰).

رجوع به جدول شماره ۲ نشان می‌دهد که جهش‌های عامل ایجاد بیماری هموفیلی B در ژن فاکتور IX انعقادی در بیماران ایرانی پراکنده است و این مساله نتایج تحقیقات قبلی در ایران و سایر کشورها را کاملاً تایید می‌کند(۳۴، ۳۳). از طرف دیگر همان گونه که در موارد فوق توضیح داده شد، با توجه به پیچیدگی‌های ساختاری پروتئین فاکتور IX انعقادی و داشتن نواحی فضایی مختلف، جهش‌هایی که در ژن فاکتور IX انعقادی رخ می‌دهند، سبب تغییرات اسیدهای آمینه خاصی شده و سبب تنوع فنوتیپی مختلف می‌شوند، که فنوتیپ حاصله رابطه نزدیکی با نوع و جایگاه جهش دارد. با رجوع به اطلاعات ثبت شده در بانک اطلاعاتی بیماران، رابطه فنوتیپ و ژنوتیپ به دست آمده در این تحقیق تایید می‌گردد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی می‌توان گفت که جهش‌های عامل ایجاد بیماری هموفیلی B در ژن فاکتور IX انعقادی در بیماران ایرانی پراکنده است و سبب ایجاد بیماری با شدت‌های مختلف می‌شوند. تفاوت شدت بیماری بستگی به نوع جهش و جایگاه آن در ساختار پروتئینی فاکتورIX انعقادی دارد.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت شبکه پزشکی مولکولی کشور در بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران انجام شده است. نویسندگان این مقاله از همکاران گروه ژنتیک بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران و کانون هموفیلی استان اصفهان نهایت سپاس و امتنان را دارند.

References:

1- Beutter E, Cller B. Haemophilia A & B. In: Roberts HR, Hoffman M, editors. Williams Haematology – North America. 2005: 1643-55.
2- Provan D, Gribben J, Paulf LF, Giangran D.. The molecular basis of hemophilia. Haemophilia 2003; 16: 168-74.
3- Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. Mol Pathol 2002; 55: 127-44.
4- Lillicrap D. The molecular basis of haemophilia B. Haemophilia 1998; 4: 350-7.
5- Mahajan A, Chavali S, Kabra M, Chowdhury MR, Bharadwaj D. Molecular characterization of haemophilia B in North India families: identification of novel and recurrent molecular events in the factor IX gene. Haematologica 2004; 89: 1498-503.
6- Stamato Y, Majerus, Perlmutter, Evans J, Sadler W, Earl W. The molecular basis of blood disease. 3rd ed. Philadelphia, London: WB Saunders Company, Ahar Court health Scienses Company. 2003: 691-7.
7- Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. The Lancet 2003; 24: 1801-9.
8- Peyvandi F, Jayandharan G, Chandy M, Srivastava A, Nakaya SM, Johnson MJ, *et al*. Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. Haemophilia 2006; 12 (Suppl 3): 82-9.
9- Sasanakul W, Chuansumrit A, Ajji Makorn S, Krasaesub S, Sirachainan N, Chotsupakam S, *et al*. Cost-effectiveness in establishing haemophilia carrier detection a prenatal diagnosis services in a developing country with limited healt resources. Soutesthest Asian J Trop Med Public Health 2003; 34(4): 891-8.
10- Karimipoor M, Zeinali S, Safaee R, Lak M, Nafissi N. Carrier determination in a Haemophilia B family using single strand conformation polymorhism (SSCP) and sequencing. Iranian Journal of Biotechnology 2004; 2(2): 132-5.
11- Karimipoor M, Zeinali S, Lak M, Safaee R. Carrier testing and prenatal diagnosis of haemophilia B by SSCP in an Iranian family. Haemophilia 2003; 9(1): 116-8.
12- Mc Pherson MJ, Moller SG. PCR, the basics: from background to bench. United States of America and Canada: Springer - Verlage New York INC. 2000: 23-119.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

13- Maniatis T , Fritsch EF , Sambrook J . Molecular cloning: a laboratory manual glod spring. Harbor Laboratory 1999; 1: 55-8.
14- Bimal DM, Wallace AJ, Theophilus, Rapley R. SSCP Hetroduplex analysis, PCR mutation detection protocols. Human Press Inc. Totowa, NewJersey. 2002; 16: 137-151.
15- Yoshitake S, Shach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemphilic factor B). Biochemistry 1985; 24: 3736-50.
16- Montejo JM, Magallon M, Tizzano G, Solera J. Identification of twenty-one new mutation in the factor IX gene by SSCP analysis. Hum Mutat 1999; 13: 160-5.
17- www. ebi.ac.Lid/fasta 3.
18- www. ncbi.nlm.nih.gov/blast.
19- Manno CS, Chew AJ, Hutchinson S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, *et al*. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe haemophilia B. Blood 2003; 101: 2963-72.
20- Belvini D, Salvinto R, Radoss P, Pierobon F, Mori P, Castaldo G, *et al*. Molecular genotyping of the Italian cohort of patients with haemophilia B. Haematologica/The Haematology Journal 2005; 90(5): 635-42.
21- Klein I, Andrikorics H, Bors A, Nemes A, Tordai A, Varadi A. A haemophilia A and B molecular genetic diagnostic programme in hungary: a highly informative and cost-effective strategy. Haemophilia 2001; 7(3): 306-12.
22- Shetty S, Ghosh K, Mohanty D. Haemophilia B in a female. Acta Haematol 2001; 106 (3): 115-7.
23- Bicocchi MP, Pasino M, Bottini F. Mutation analysis is an essential strategy in the genetic counselling of sporadic haemophilia B families. Haemophilia 2002; 8: 729-32.
24- Acquila M, Bottini F, Valetto A, Caprino D, Mori PG, Bicocehi MP. A new strategy for prenatal diagnosis in a sporadic haemophilia B family. Haemophilia 2001; 7(4): 416-418.
25- www. kcl . ac . uk / ip / petergreen / haemBdatabase. html http://archive. uwcm. ac. uk/ uwcm/ mg / hmgdo. html(Human Gene Mutalion Databases).
26- Green PM, Montandon AJ, Bentley DR, Ljung R, Nilsson IM, Gianelli F. The incidence and distribution of CPG> TPG transitions in the coagulation factor IX gene. A fresh look at CPG mutation hotspots. Nucleic A cids Res 1990; 18 (11): 3227-31.
27- Mathur A, Bajaj P. Protease and EGF1 domains of factor Ixa play distinct roles in binding to factor VIIIa. The JBC 1999; 247(26): 18477-86.
28- Christophe OD, Lenting PJ, Kolkman JA, Brawnlee GG, Mertens K. Blood coagulation factor IX residues Glu^{78} and Arg^{94} provide a link between both epidermal growth factor-like domains that is crucial in the interaction with factor VIII light chain. J Biol Chem 1998; 2; 273(1): 222-7.
29- Hertzberg M, Facey SL, Hojg PJ. An Arg/Ser substitution in the second epidermal growt factor like module of factor IX introduces an O- linked carbohydrate and markedly impairs activation by factor Ixa and factor VIIa/tissue factor and catalytic efficiency of factor Ixa. Blood 1999; 94(1): 156-63.
30- Somer SS, Scaring WA, Hill KA. Human germline mutation in the factor IX gene. Mutat Res 2001; 487 (1-2): 1-17.
31- Liu JZ, Li X, Drost J, Thorland EC, Liu O, Lind T , *et al*. The human factor IX gene as germline mutagen test: samples from Mainlan China have the putatively endogenous pattern of mutation. Hum Mutat 2000; 16 (1): 31-6.
32- Ketterling RP, Vielhaber E, Li X, Drost J, Schaid DJ, Kasper CK, *et al*. Germline origins in the human F9 gene: frequent G:C> A: T mosaicim and increased mutation with advanced maternal age. Hum Genet 1999; 105 (6): 629-40.
33- Enayat MS, Karimi M, Chana G, Farjadian S, Theophilus BD, Hill FG. Mutation analysis in F9 gene of 17 families with haemophilia B from Iran. Haemophilia 2004; 10 (6): 751-5.
34- Karimipoor M, Zeinali S, Nafissi N, Tuddenham EGD, Lak M, Safaee R. Identification of factor IX mutation in Iranian haemophilia B patients by SSCP and sequencing. Thrombosis Research 2006.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

Mutation analysis of coagulation factor IX gene in Esfahanian hemophilia B patients by SSCP and sequencing

Kamali Dolatabadi E.[1,2](MS), Karimipoor M.[1](PhD), Samiee Sh.[2](MS), Kokabee L.[1](MS), Zinali S.[1](PhD), Nafissi N.[1](BS), Hoorfar M.[3](MD)

[1]Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[2]Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center
[3]Seyed Shohada Hospital, Esfahan

Abstract

Background and Objectives

Hemophilia B is an inherited recessive X-linked bleeding disorder caused by deficiency or defect of procoagulant factor IX (FIX). The factor IX gene spans 35kb of DNA and comprises of 8 exons. Mutations in the factor IX gene may result in deficient or defective coagulation factor IX causing the bleeding tendency known as hemophilia B. The aim of this study was to identify the causative mutations and genotype-phenotype correlation for mutations in some known patients with hemophilia B in Isfahan province.

Materials and Methods

After informed consent was obtained, genomic DNAs of 24 hemophilia B patients referred to Omid hospital were extracted according to standard protocols. PCR amplification and single strand conformation polymorphism (SSCP) on nondenaturing polyacrylamid gel were performed separately on each sample for eight exons and exon-intron boundaries and promoter. The results of SSCP were compared to normal control and sequencing was performed for those with different migration patterns.

Results

The sequencing results showed 70.8% missense mutation, 16.7% deletion, 8.3% nonsense mutation, and 4.2% insertion. Many of the mutations had occurred in exon 8; it came out to be similar to haemophilia B mutation database. Malmo polymorphism (Ala 148 Thr) was found in one family. Four novel mutations not previously reported in the database were also found.

Conclusions

This study confirms the marked heterogeneity of factor IX mutations in the population. The results could be used to develop a national database and offer genetic counselling to families.

Key words: Hemophilia B, SSCP, Mutation
SJIBTO 2007; 3(4): 299-308

Received: 16 Feb 2006
Accepted: 19 Sep 2006

*Correspondence:*Karimipoor M.PhD of Biologic Components. Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, No.69, Pasteur Avenue, Tehran, Iran.
Postal code: 13164.Tel: (+9821) 66480780; Fax: (+9821) 22806133. E-mail: *Mortezakarimi@pasteur.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]