خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۵ شماره ۴ زمستان ۸۷ (۲۳۵-۲۲۵)

شناسایی دقیق حذف‌های ناشناخته خوشه ژنی بتاگلوبین در ناقلین بتا تالاسمی با استفاده از دو روش Real-time PCR و MLPA

صادق باباشاه[۱]، سمیه جمالی[۲]، دکتر رضا مهدیان[۳]، مینا حیات نوسعید[۴]، دکتر مرتضی کریمی‌پور[۵]، دکتر فرشته مریمی[۶]، مرضیه رئیسی[۷]، راحله علی‌محمدی[۸]، دکتر سیروس زینلی[۹]

چکیده

سابقه و هدف

بتا تالاسمی به طور عمده از جهش‌های نقطه‌ای یا حذف‌های کوچک ناشی می‌شود ولی مواردی از وجود حذف‌های بزرگ در خوشه ژنی بتاگلوبین مشاهده شده است. شناسایی حذف‌های شناخته شده مبتنی بر روش Gap PCR می‌باشد در حالی که حذف‌های ناشناخته با این روش شناسایی نمی‌شوند. برای فایق آمدن بر این محدودیت، دو روش کمی Real-time PCR و MLPA برای بررسی کمی خوشه ژنی بتاگلوبین به کار گرفته شد.

مواد وروش‌ها

در این مطالعه که به صورت مورد - شاهدی انجام شد، به روش سرشماری ۴۰ فرد ناقل مشکوک به حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین که دارای شاخص‌های خونی کاهش یافته(MCV < ۸۰ fl ، MCH < ۲۷ pg)، هموگلوبین A_2 نرمال و هموگلوبین F افزایش یافته یا نرمال بودند وارد مطالعه شدند. تعداد نسخه‌های ژنی با به کارگیری روش Real-time PCR و روش مقایسه‌ای چرخه آستانه، مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین تعداد نسخه‌های ژنی با روش MLPA نیز ارزیابی شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از Real-time PCR برای ژن‌های HBB ، HBD و HBG2 با استفاده از روش بررسی مقایسه‌ای چرخه آستانه، میزان $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ را برای افراد سالم، ۰/۱۸ ± ۰/۹۶ و برای ناقلین حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین، ۰/۰۴ ± ۰/۵۸ نشان داد. هم چنین نتایج حاصل از MLPA ، کاهش حدود ۵۰٪ در ارتفاع پیک شناساگرهای تکثیر یافته مرتبط با ژن حذف شده در افراد هتروزیگوت را نشان داد.

نتیجه گیری

نتایج MLPA و بررسی پیک‌های حاصل از تکثیر شناساگر، وجود حذف را در مناطقی که توسط Real-time PCR شناسایی شده بود، تایید کرد. با کمک این دو روش می‌توان حذف‌های شناخته شده و ناشناخته را در ناقلین بتا تالاسمی با دقت زیاد شناسایی نمود.

کلمات کلیدی: بتا تالاسمی، بتاگلوبین، حذف ژنی

تاریخ دریافت : ۸۷/ ۶/۲۴
تاریخ پذیرش : ۸۷/۱۱/۱۳

۱ـ کارشناس ارشد سلولی و مولکولی ـ واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
۲ـ کارشناس ارشد زیست‌شناسی ـ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
۳- PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
۴- کارشناس ارشد سلولی و مولکولی ـ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
۵ـ پزشک عمومی ـ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
۶ـ PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
۷ـ کارشناس ارشد ژنتیک ـ مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر
۸ـ کارشناس ارشد ژنتیک ـ واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی
۹ـ مؤلف مسؤول: PhD ژنتیک پزشکی ـ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر- صندوق پستی: ۱۶۶۷-۱۳۱۸۵

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

مقدمه

بتا تالاسمی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تک ژنی بوده که دارای الگوی توارث اتوزومال مغلوب می‌باشد، از این رو ناقلینی که یک نسخه از الل بتا تالاسمی را به ارث می‌برند، معمولاً از لحاظ بالینی فاقد علامت می‌باشند(۳-۱). بیش از ۲ میلیون ناقل بتا تالاسمی و بیش از ۱۵۰۰۰ فرد مبتلا به بتا تالاسمی ماژور در ایران گزارش شده است، لذا تشخیص پیش از تولد این بیماری از اولویت‌های بهداشتی در ایران می‌باشد(۴). امروزه از پیوند مغز استخوان و ژن درمانی برای درمان این بیماری ژنتیکی نام برده می‌شود، ولی طبیعتاً بهترین راه حل ممکن، شناخت جهش‌های موجود در سطح ایران و تعیین میزان پراکندگی آن‌ها در جهت پیشگیری از تولد این بیماران است(۵). برای رسیدن به این هدف، باید تمام ناقلین این بیماری شناسایی شوند. به عبارت دیگر برای کنترل این بیماری نیاز به شناسایی انواع جهش‌های ژنی مرتبط با بتا تالاسمی از جمله حذف‌های خوشه ژنی بتاگلوبین می‌باشد. تا امروز بیش از ۲۰۰ جهش گوناگون در ژن بتاگلوبین گزارش شده است که از این بین، حداقل ۶۰ مورد مرتبط با حذف‌های مختلف می‌باشند. تعداد قابل ملاحظه‌ای از این حذف‌ها از جمله حذف‌های Spanish ، Sicilian ، Chinese ، Hb Lepore و حذف/وارونه شدگی‌های Turkish ، Asian-Indian با اندازه و موقعیت متغیر، خوشه ژنی بتاگلوبین را درگیر می‌کنند(۶، ۱).

روش‌های مولکولی رایج برای تشخیص ناقلین حذف‌ها علاوه بر داشتن محدودیت‌هایی نظیر زمان‌بر و پرهزینه بودن، فاقد حساسیت و دقت لازم و کافی برای شناسایی تمام ناقلین حذف‌ها می باشند. به طور مثال، روش لکه‌گذاری ساترن به عنوان یک روش زمان‌بر، به هیبرید شدن شناساگرها وابسته بوده و نیازمند مقادیر بالایی از نمونه DNA است و یا روش(Fluorescent In Situ Hybridization) FISH ، مستلزم طی کردن مراحل کشت سلولی برای دست‌یابی به کروموزوم‌های متافازی می‌باشد. ضمن این که این روش از حساسیت لازم و کافی برای شناسایی حذف‌های کوچک برخوردار نمی‌باشد(۹-۷). روش‌های معمولی شناسایی موتاسیون مبتنی بر تکثیر PCR یک توالی منفرد از DNA ژنومی، توانایی شناسایی حذف را ندارند زیرا همواره الل نرمالی در کروموزوم همتای دیگر وجود دارد که می‌تواند نتایج PCR فرد ناقل را تغییر داده و پاسخ کاذبی مشاهده گردد. لذا برای شناسایی متداول موتاسیون‌های حذفی، روش مبتنی بر تکثیر DNA با نام Gap PCR به عنوان روشی ساده، سریع و ارزان جایگزین مناسبی برای روش‌های ذکر شده(روش‌های لکه‌گذاری ساترن و FISH) محسوب می‌شود(۱۰). روش Gap PCR برای شناسایی حذف‌های شناخته شده δβ ـ تالاسمی، هموگلوبین لپور و انواع موتاسیون‌های حذفی تداوم ارثی هموگلوبین جنینی HPFH (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin) استفاده می‌شود. این روش تنها توانایی شناسایی حذف‌هایی با دامنه مشخص را دارد ولی قادر به شناسایی افراد دارای حذف‌های ناشناخته با دامنه بزرگ و نامشخص نیست(۶، ۲). در این تحقیق بر اساس مطالعه‌ها و بررسی‌های انجام شده، به راه‌اندازی روش Real-time PCR کمی در سطح ژنومی برای بررسی حذف‌های خوشه ژنی بتاگلوبین اقدام شد(۱۲، ۱۱، ۶). سیستم Real-time PCR مبتنی بر سنجش کمی نسخه‌های ژنی در طول فاز تصاعدی از واکنش PCR ، از طریق سنجش میزان نشر نور فلورسانس می‌باشد. در این سیستم از یک رنگ فلورسانس ویژه متصل شونده به DNA نظیر SYBR Green I که تنها پس از اتصال به DNA دو رشته‌ای سیگنال فلورسانس قوی منتشر می‌کند، استفاده می‌شود. این رنگ فلورسنت طی واکنش، متناسب با میزان محصولات تولید شده از هر سیکل، نور فلورسنت ساطع کرده و میزان نشر فلورسانس آن توسط نمایانگر دستگاه شناسایی و ثبت می‌شود(۱۵-۱۳). با توجه به حساسیت و قدرت تشخیص بالا، این سیستم به عنوان روشی مناسب برای تشخیص ناقلین حذف‌های بتا تالاسمی انتخاب شد. وجود تنها یک نسخه از ژن سالم مورد مطالعه در افراد ناقل در مقابل وجود دو نسخه از این ژن در افراد سالم منجر به تولید محصول کمتری در ابتدای فاز تصاعدی تکثیر DNA در افراد ناقل می‌شود و این می‌تواند در تمایز این افراد و شناسایی ناقلین حذف‌ها در این روش، مبنا قرار گیرد.

داده‌های اولیه حاصل از انجام Real-time PCR می‌توانند

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold cycle, Ct) مورد بررسی قرار گیرند. چرخه آستانه(Ct)، چرخه‌ای است که در آن هر نمونه تکثیر تصاعدی خود را شروع کرده، افزایش معنی‌داری در سنجش سیگنال فلورسانس مشاهده می‌شود و منحنی PCR در این چرخه، خط آستانه(Threshold Line) را قطع می‌کند. خط آستانه، خطی است که به صورت خودکار توسط دستگاه رسم شده و مرز بین سیگنال‌های فلورسانس پس زمینه و سیگنال‌های فلورسانس معنادار مرتبط با تکثیر را مشخص می‌نماید(۱۵).

دیدگاه جدیدی که در این زمینه مطرح است، استفاده از روش تکثیر وابسته به اتصال شناساگرهای چندگانه (MLPA=Multiplex Ligation-dependent probe Amplification) است. این روش مبتنی بر اتصال (Ligation) دو نیمه شناساگر روی توالی هدف و یک واکنش تکثیری PCR توسط الیگونوکلئوتیدهای هیبرید شونده مجاور با استفاده از تنها یک جفت آغازگر می‌باشد. از آن جا که میزان محصولات تکثیر شناساگر، متناسب با میزان نسخه‌های اولیه توالی هدف می‌باشد، این روش در بررسی تعداد نسخه‌های ژنی(Gene dosage) قابل استفاده است(۱۶، ۱۰).

مواد و روش ها

انتخاب بیماران و استخراج DNA

مطالعه انجام شده از نوع مورد ـ شاهدی بود. از میان افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک انستیتو پاستور ایران و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، ۴۰ فرد ناقل مشکوک به حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین پس از اخذ رضایت نامه وارد مطالعه شدند. مبنای انتخاب افراد برای ورود در این مطالعه، داشتن شاخص‌های خونی کاهش یافته(MCV < ۸۰ fl و MCH < ۲۷ pg)، هموگلوبین A_2 نرمال و هموگلوبین F افزایش یافته یا نرمال بود(جدول ۱). هم چنین در این مطالعه از اشخاصی که دارای حذف قطعی بودند، تحت عنوان کنترل مثبت و تعدادی از افراد سالم تحت عنوان کنترل منفی استفاده گردید. DNA مورد نیاز از گلبول‌های سفید خون محیطی با استفاده از روش نمک اشباع(Salting Out) استخراج و غلظت و کیفیت آن توسط اسپکتروفتومتر NanoDrop® ND-1000 سنجیده شد(۱۷).

Gap PCR

برای انجام این روش از مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۰/۱ واحد از آنزیم DNA پلیمراز Taq و بافر محتوی ۲/۵ میکرولیتر(۱۰ X) PCR buffer ، ۰/۷۵ میکرولیتر ($MgCl_2$ (۵۰ mM ، ۰/۲ میکرولیتر(۱۰۰ mM) dNTP Mix و ۰/۰۲۵ میکرولیتر(۱M) Spermidin که همگی از شرکت سیناژن خریداری شدند، با شرایط دمایی ذکر شده در مقاله کریگ و همکاران، در دستگاه ترموسایکلر(2720 ، Applied Biosystems) استفاده شد(۶)(جدول ۲). محصولات Gap PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید و با استفاده از اشعه ماوراء بنفش مشاهده شد. باندهای ظاهر شده با سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی سنجیده شدند.

Real-time PCR و مخلوط واکنش

آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی برای سه ژن از خوشه ژنی بتاگلوبین(HBB ، HBD ، HBG2) و هم چنین ژن CLCN7 به عنوان ژن مرجع با استفاده از نرم‌افزار(CA ، Primer Ver. 3.0 (Applied Biosystems ، Foster City Express طراحی شد(جدول ۳).

درون هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای(سنگاپور، Microamp ، Applied Biosystems) مخلوطی به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر(انگلستان، SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems ، ۵ پیکومول از هر آغازگر، ۶/۵ میکرولیتر آب و ۵ نانوگرم DNA ژنومی تهیه شد. واکنش‌های هر نمونه DNA برای هر سه ژن، دو سری و به صورت هم زمان انجام شد و میانگین Ct (چرخه آستانه)های به دست آمده برای هر ژن محاسبه شد. Real-time PCR در دستگاه ABI 7300 Sequence Detection Systems و با برنامه زیر انجام پذیرفت: در ابتدا ۹۵ درجه سانتی‌گراد واسرشت سازی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

جدول ۱: شاخص‌های خون‌شناسی در ۴۰ فرد بررسی شده

حذف	تعداد	RBC(x10^6/µl)	Hb(g/dl)	MCV(fl)	MCH(pg)	HbA_2(%)	HbF(%)
Sicilian (δβ)°	۳	۶/۱ ± ۰/۲	۱۰/۴ ± ۱/۸	۶۴ ± ۲/۹	۲۰ ± ۰/۹	۲/۵ ± ۰/۳	۹/۱ ± ۳/۱
Turkish Inversion/Deletion(δβ)°	۱	۶/۴	۱۱/۶	۶۲/۸	۱۹/۵	۲/۷	۹/۱
Asian-Indian Inversion/Deletion^{G}γ(^{A}γδβ)°	۶	۵/۹ ± ۰/۱	۱۲/۶ ± ۱/۷	۷۲ ± ۵/۲	۲۲ ± ۳/۳	۳/۷ ± ۱/۷	۱۲/۷ ± ۰/۸
Hb Lepore	۲۲	۵/۶ ± ۰/۴	۱۱/۷ ± ۱/۷	۷۱ ± ۲/۷	۲۰ ± ۱	۳ ± ۱/۱	۲/۴ ± ۱/۳
حذف ناشناخته همراه با HbF افزایش یافته	۵	۵/۵ ± ۰/۷	۱۴/۱ ± ۱/۳	۶۶ ± ۱/۱	۲۱ ± ۰/۸	۲/۴ ± ۰/۲	۱۰/۲ ± ۱/۳
حذف ناشناخته همراه با HbF نرمال	۳	۶/۱ ± ۰/۲	۱۱/۲ ± ۱/۲	۶۱ ± ۱/۲	۱۸ ± ۰/۸	۳ ± ۰/۳	۰/۷ ± ۰/۱

MCV : میانگین حجم گویچه‌ای، MCH: میانگین هموگلوبین گویچه‌ای، HbF: هموگلوبین جنینی(α2γ2)، HbA_2:(α2δ2). مقادیرذکر شده در جدول نمایانگر میانگین ± انحراف از معیار(mean ± SD) است.

جدول ۲: توالی آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی به کار گرفته شده در Gap PCR

موقعیت آغازگر بر روی ژن	توالی	آغازگر	حذف
۵۴۵۸۶–۵۴۶۱۰	5′-GACACACATGACAGAACAGCCAAT-3′	F	Hb Lepore
۶۱۸۴۸–۶۱۸۷۰	5′-CGATCTTCAATATGCTTACCAAG-3′	F	
۶۲۷۶۳–۶۲۷۴۲	5′-CATTCGTCTGTTTCCCATTCTA-3′	R	
۵۴۹۷۲–۵۴۹۹۲	5′-TTGGGTTTCTGATAGGCACTG-3′	F	Sicilian
۵۶۵۵۶–۵۶۵۳۳	5′-GTGTCACCCATTAATGCCTTGTAC-3′	R	
۶۹۵۰۰–۶۹۴۸۱	5′-TAGATCCCTTTGCCATTATG-3′	R	
۳۹۸۲۷–۳۹۸۴۷	5′-ATGCCATAAAGCACCTGGATG-3′	F	Asian-Indian
۴۱۰۲۲–۴۱۰۰۰	5′-GAGCTGAAGAAAATCATGTGTGA-3′	R	
۵۶۱۱۰–۵۶۱۳۲	5′-TAACCATATGCATGTATTGCC-3′	F	
۶۶۴۴۰–۶۶۴۱۹	5′-TTCCACTATCTTACTTACACAT-3′	R	
۷۴۹۱۶–۷۴۹۳۶	5′-TGCTGAGGATTGTTTTAGGTC-3′	F	Turkish
۷۵۶۱۶–۷۵۵۹۷	5′-GAATAGCAGTGGTGAGAGAG-3′	R	

جدول ۳: توالی آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی به کار گرفته شده در Real-time PCR

طول محصول تکثیر (جفت باز)	موقعیت آغازگر بر روی ژن	توالی	آغازگر	ژن
۱۲۴	۷۰۷۳۴–۷۰۷۵۶	5′-GGGCATGTGGAGACAGAGAAGAC-3′	F	HBB
	۷۰۸۳۴–۷۰۸۵۷	5′-ACTCAAAGAACCTCTGGGTCCAAG-3′	R	HBB
۱۳۶	۶۳۱۹۴–۶۳۲۱۸	5′-GACTCCTGAGGAGAAGACTGCTGTC-3′	F	HBD
	۶۳۳۰۹–۶۳۳۲۹	5′-ACATGCCCAGTTTCCATTTGC-3′	R	HBD
۱۰۳	۴۴۳۳۵–۴۴۳۵۶	5′-ACTGAGCTCACTGCCCATGATG-3′	F	HBG2
	۴۴۴۱۱–۴۴۴۳۷	5′-AGACAACCATGTGTGATCTCTTAGCAG-3′	R	HBG2
۱۲۹	۸۳۰۴–۸۳۲۴	5′-CTCTTAGGCCAGGCGTTTGTG-3′	F	CLCN7
	۸۴۱۴–۸۴۳۲	5′-ACCGTGCTCAGCGCTATGC-3′	R	CLCN7

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

DNA الگو در مدت زمان ۱۰ دقیقه در چرخه اول و سپس دو برنامه دمایی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه. هر مرحله تکثیری کامل، توسط یک مرحله تفکیک(dissociation) که شامل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ ثانیه، ۹۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ ثانیه بود، به منظور تجزیه و تحلیل منحنی ذوب ادامه یافت.

روش مقایسه‌ای چرخه آستانه

با پایان انجام واکنش PCR ، نرم‌افزار دستگاه به طور اتوماتیک خط آستانه را رسم می‌کند. تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار ABI 7300 sequence Detection system و نرم‌افزار SDS Ver. 1.2.3 (Applied Biosystems ، انگلستان) و با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه انجام پذیرفت. داده‌های خام اولیه با استفاده از نرم‌افزار Excel (Microsoft corp.) 2007 تحت تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. به این ترتیب که با تفاضل میانگین Ct ژن هدف برای هر دو نمونه نرمال و آزمایش از میانگین Ct ژن مرجع، شاخص ΔCt در نمونه نرمال و نمونه آزمایش محاسبه شد و از تفاضل دو ΔCt مربوط به نمونه نرمال و نمونه آزمایش، فاکتوری تحت عنوان ΔΔCt به دست آمد. در نهایت تعداد نسخه ژن هدف(Beta ، Delta و G-gamma) با استفاده از فرمول $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ مشخص شد(۱۴).

هم چنین به منظور تعیین کارآیی تکثیر ژن‌های هدف و ژن مرجع CLCN7 ، لازم بود در ابتدا به صورت هم زمان رقت‌های متوالی از DNA نرمال تهیه و پس از انجام Real-time PCR ، نمودار استاندارد برای هر قطعه ژنی ترسیم شود. با توجه به شیب(Slope) نمودار استاندارد مرتبط با تکثیر ژن‌های β ، δ ، $^{G}\gamma$ و همین طور ژن مرجع CLCN7 ، کارآیی PCR برای تمامی این ژن‌ها مطابق فرمول زیر محاسبه شد(۱۱): Efficiency = $[10^{(-1/Slope)}]$-1 (کارآیی)

تکثیر وابسته به اتصال شناساگرهای چندگانه(MLPA)

همه افراد مشکوک به داشتن حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین و هم چنین افراد کنترل مثبت و کنترل منفی با استفاده از کیت SALSA MLPA P102 HBB (هلند)مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده مورد بررسی قرار گرفتند. فرآیند MLPA شامل مراحل واسرشت‌سازی DNA ، هیبریداسیون دو نیمه شناساگر به مناطق مجاور روی ژنوم، اتصال دو نیمه شناساگر به یکدیگر و تکثیر توسط PCR است که در نهایت با جداسازی محصولات تکثیر شده توسط الکتروفورز موئین در دستگاه توالی‌یابی ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer در مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر خاتمه یافت(۱۶، ۱۰). آنالیز MLPA با استفاده از نرم‌افزار Gene Marker® Ver. 1.6 انجام شد.

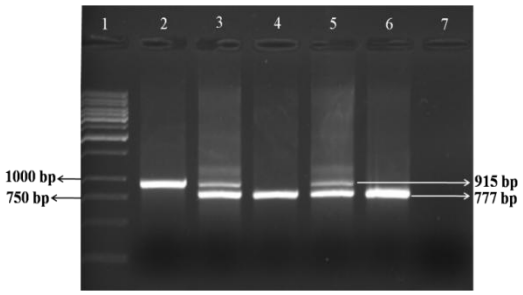
یافته ها

از تعداد بیش از ۶۰۰۰ نفر فرد ناقل بتا تالاسمی مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک انستیتو پاستور ایران و مرکز تحقیقات ژنتیک کوثر، تعداد ۴۰ نفر واجد حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین و یا مشکوک به وجود حذف، شناسایی شدند. ملاک وجود حذف، داشتن هموگلوبین A_2 نرمال و هموگلوبین F افزایش یافته یا نرمال، عدم شناسایی موتاسیون‌های نقطه‌ای، کوتاه بودن محصول PCR در منطقه ژنی بتاگلوبین و نیز عدم مشخص شدن موتاسیون نقطه‌ای در فرد ناقل بتا تالاسمی با استفاده از روش توالی‌یابی بود.

برای انجام روش Gap PCR از دو آغازگر طراحی شده برای دو ناحیه بالا دست و پایین دست محدوده هر حذف شناخته شده استفاده شد. به عنوان کنترل برای الل سالم، از یک آغازگر که توانایی اتصال به توالی در داخل ناحیه حذفی در الل سالم را دارد استفاده شد که تولید یک محصول اضافی با یکی از آغازگرهای کناره ناحیه حذف می‌کند. از ۴۰ نمونه انتخاب شده برای بررسی وجود حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین با شاخص‌های خونی ارایه شده در جدول ۱، حذف‌های شناخته شده Lepore ، Asian/Indian ، Turkish و Sicilian در ۳۲ فرد توسط Gap PCR مشخص گردید. هم چنین وجود حذف شناخته شده در همگی افراد کنترل مثبت تایید شد. نتایج الکتروفورز محصولات Gap PCR روی ژل آگارز یک باند مشخص را برای فرد نرمال، دو باند مشخص را برای فرد هتروزیگوت

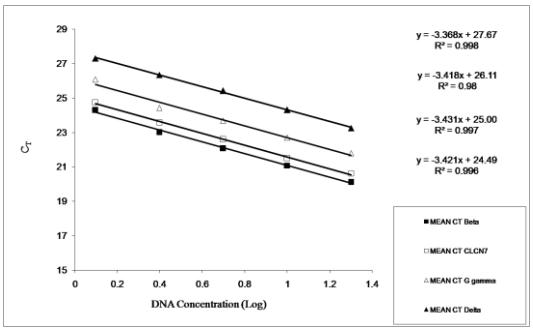
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

و یک باند مشخص با دامنه حرکتی بیشتر از تک باند مرتبط با فرد نرمال را برای فرد هموزیگوت حذف نشان می‌دهد(شکل ۱). انجام Gap PCR برای حذف‌های شناخته شده در ۸ نمونه دیگر، حذفی را مشخص نکرد. روش مقایسه‌ای چرخه آستانه در Real-time PCR مبتنی بر تغییرات چرخه آستانه نمونه آزمایش در مقایسه با نمونه کنترل است که با کمک آن نسبت تعداد نسخه نمونه اولیه قابل اندازه‌گیری می‌باشد. در این آزمایش، ژن کانال کلری ۷(CLCN7) به عنوان ژن مرجع(reference gene) انتخاب شد. این ژن به عنوان یک ژن سالم روی کروموزوم ۱۶ قرار دارد. یکی از سه ژن(β ، δ ، $^{G}\gamma$) نیز به عنوان ژن هدف در نظر گرفته شد.



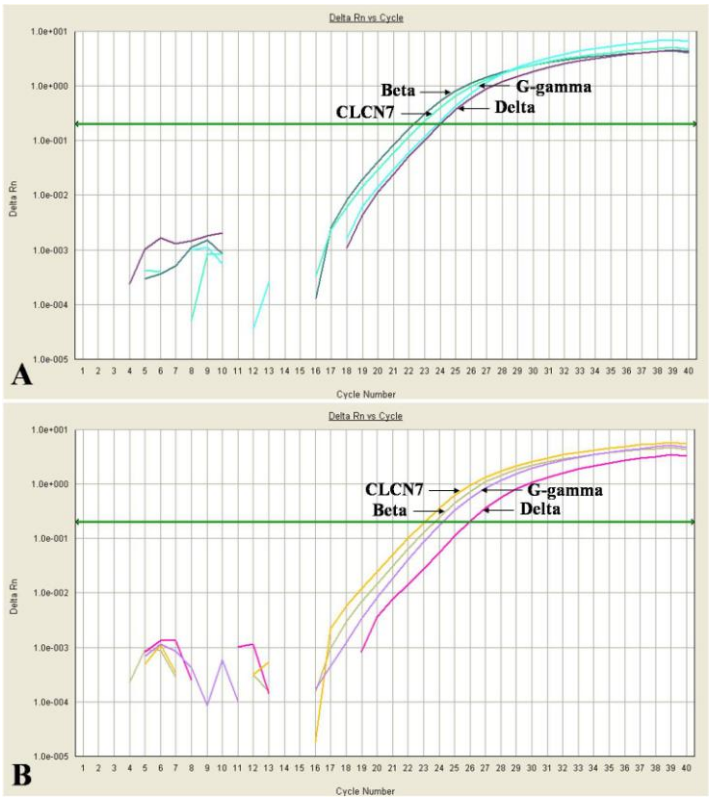
شکل ۱: غربالگری برای حذف Lepore توسط Gap PCR. چاهک ۱ سایز مارکر، چاهک ۲ نمونه فرد سالم(کنترل منفی) با یک باند مشخص، چاهک ۳ نمونه فرد هتروزیگوت قطعی(کنترل مثبت حذف هتروزیگوت) با دو باند مشخص، چاهک ۴ نمونه فرد هموزیگوت قطعی(کنترل مثبت حذف هموزیگوت) با یک باند مشخص، چاهک ۵ نمونه فرد هتروزیگوت با دو باند مشخص، چاهک ۶ نمونه فرد هموزیگوت با یک باند مشخص را نشان می‌دهد. چاهک ۷ فاقد DNA الگو می‌باشد.

انجام مراحل بهینه‌سازی Real-time PCR و انجام آزمایش بر روی رقت‌های متوالی از نمونه DNA نرمال و رسم نمودار استاندارد، خطوطی با شیب‌های منفی و مشابه برای هر چهار ژن β ، δ ، $^{G}\gamma$ و CLCN7 را ایجاد نمود. از آن جایی که بین غلظت‌های مختلف DNA و رسیدن به چرخه آستانه(Ct) در نمودار استاندارد، رابطه معکوس وجود دارد، نمودار استاندارد مرتبط با هر ژن دارای شیبی منفی می‌باشد. شیب‌های مشابه در نمودار استاندارد مربوط به ژن‌های β ، δ و $^{G}\gamma$ و ژن مرجع CLCN7 تایید نمود که کارایی PCR برای این ژن‌ها تقریباً برابر بوده و بنابراین استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه، از اعتبار لازم برخوردار می‌باشد(شکل ۲). پس از آن، انجام Real-time PCR وجود حذف در ژن β را در تمامی ناقلین دارای حذف شناخته شده و هم چنین افراد کنترل مثبت اثبات نمود. هم چنین انجام Real-time PCR برای ژن‌های β ، δ و $^{G}\gamma$ در ۸ نمونه باقیمانده، وجود حذف بزرگ را در ۵ نمونه بدون هیچ اطلاعی از سرحدات دقیق حذف مشخص نمود. منحنی‌های مرتبط با تکثیر ژن‌های β و δ در فرد ناقل حذف در مقایسه با فرد نرمال، دیرتر وارد فاز تصاعدی شدند(شکل ۳). بدیهی است که در فرد دارای حذف، به علت فقدان یک نسخه از ژن هدف، منحنی تکثیر یک چرخه دیرتر از منحنی متناظر در فرد سالم به آستانه می‌رسد. با تجزیه و تحلیل این داده‌های اولیه با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه(Ct) و محاسبه نسبت $^{-\Delta\Delta Ct}$۲، نسبت ۰/۱۸ ± ۰/۹۶ برای افراد سالم و نسبت ۰/۰۴ ± ۰/۵۸ برای افراد ناقل حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین به دست آمد.



شکل ۲: رسم منحنی استاندارد بر پایه سری رقت‌ها از نمونه DNA نرمال برای ژن‌های β، δ، $^{G}\gamma$ و ژن مرجع CLCN7 به منظور محاسبه کارایی. شیب به دست آمده برای منحنی‌های تکثیر ژن‌های β، δ، $^{G}\gamma$ و CLCN7 به ترتیب ۳/۴۲-، ۳/۳۶-، ۳/۴۱- و۳/۴۳- می‌باشد، لذا می‌توان کارایی PCR را برای هر سه ژن تقریباً برابر دانست و از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه استفاده کرد. منفی بودن شیب‌ها به علت وجود رابطه معکوس بین غلظت DNA و رسیدن به چرخه آستانه(Ct) می‌باشد. همچنین ضریب همبستگی (Correlation coefficient) برای ژن‌های β، δ و CLCN7 معادل ۰/۹۹ و برای ژن $^{G}\gamma$ معادل ۰/۹۸ می‌باشد که نشانه وجود هماهنگی بین تغییرات غلظت DNA و اختلاف Ct ها است.

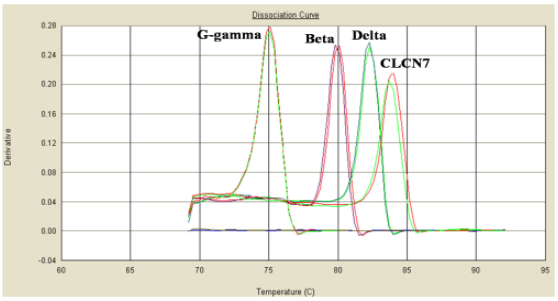
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]



شکل ۳: منحنی تکثیرDNA برای ژن‌های β، δ، $^{G}\gamma$ و ژن مرجعCLCN7 در دو فرد سالم و ناقل. شکل A : منحنی تکثیر DNA مربوط به فرد سالم. ژن β در چرخه ۲۲/۱۹، ژن δ در چرخه ۲۳/۹۸، ژن $^{G}\gamma$ در چرخه ۲۳/۷۷ و ژن مرجع CLCN7 در چرخه ۲۲/۶۷ وارد فاز تصاعدی تکثیر شده و به آستانه رسیده‌اند. شکل B : منحنی تکثیر DNA مربوط به فرد ناقل حذف در ژن‌های β و δ. ژن β در چرخه ۲۳/۵۴، ژن δ در چرخه ۲۵/۸۶، ژن $^{G}\gamma$ در چرخه ۲۴/۱۶ و ژن مرجع CLCN7 در چرخه ۲۳/۰۱ وارد فاز تصاعدی تکثیر شده‌اند.

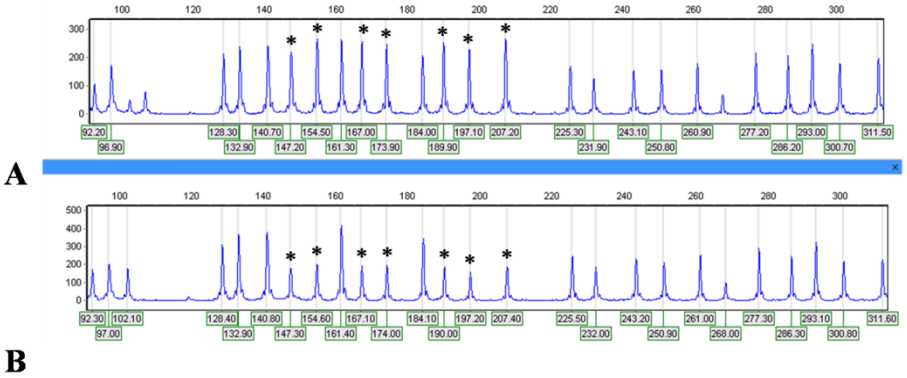
از آن جایی که رنگ SYBR Green I که برای شناسایی محصول PCR استفاده می‌شود، به هر نوع DNA دو رشته‌ای متصل شده و توانایی تشخیص محصول اختصاصی از غیر اختصاصی را ندارد، لذا وجود مواردی چون آغازگر دایمر یا محصول غیر اختصاصی نیز سبب افزایش سیگنال نور فلورسانس می‌شوند(۱۹، ۱۸). از این رو به منظور تایید صحت قطعه تکثیر شده و اطمینان از عدم وجود محصول غیر اختصاصی آغازگر دایمر و آلودگی، از نمودار ذوب (Melting curve) استفاده شد. در این نمودار با توجه به وجود تنها پیک مشاهده شده برای هر جفت آغازگر در دمای ذوب منحصر به خودش، اختصاصی بودن محصول PCR مشخص گردید(شکل ۴).

با استفاده از روش MLPA و به کارگیری شناساگرهای اختصاصی، چندین محل در خوشه ژنی بتاگلوبین به منظور شناسایی حذف‌های کوچک و بزرگ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج MLPA وجود حذف را در تمامی ۳۲ ناقل حذف شناخته شده و هم چنین ۵ ناقل با حذف ناشناخته مشخص نمود. پیک‌های مرتبط با ناحیه حذف در فرد ناقل دارای طول کوتاه‌تری از پیک‌های متناظر در فرد سالم(کنترل منفی) بودند(شکل ۵).



شکل ۴: آنالیز منحنی ذوب برای ژن‌های β، δ، $^{G}\gamma$ و ژن مرجع CLCN7

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]



شکل ۵ : پیک‌های به دست آمده از الکتروفورز موئین محصولات تکثیر شده مربوط به ژن بتاگلوبین. پیک‌های مرتبط با ناحیه حذف با ستاره مشخص شده‌اند. شکل A الگوی تیپیک یک فرد سالم را نشان می‌دهد. شکل B مربوط به یک فرد ناقل دارای حذف در ژن بتاگلوبین می‌باشد. کاهش تقریباً ۵۰٪ در ارتفاع پیک‌های مرتبط با ژن بتاگلوبین در فرد ناقل، نشانه وجود حذف در این ژن است.

بحث

بتا تالاسمی شایع‌ترین بیماری تک ژنی در ایران می‌باشد. از آن جایی که موتاسیون‌های نقطه‌ای عوامل اصلی ایجاد این بیماری را تشکیل می‌دهند، بیشترین مطالعه‌ها در مورد بتا تالاسمی در زمینه شناسایی موتاسیون‌های نقطه‌ای انجام پذیرفته است و روش‌های مبتنی بر PCR از جمله ARMS PCR و RFLP برای شناسایی موتاسیون‌های شایع در ژن بتاگلوبین استفاده می‌شوند. با این وجود، مواردی از حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین دیده می‌شود که علت دسته‌ای دیگر از بتا تالاسمی‌ها است(۱۲، ۴). تحقیقات گذشته در زمینه شناسایی حذف‌ها در خوشه ژنی بتاگلوبین در ایران و جهان بسیار اندک بوده است به طوری که تاکنون هیچ یک از روش‌های آزمایشگاهی از جمله Gap PCR ، توانایی تشخیص تمامی ناقلین دارای حذف را نداشته‌اند. هم چنین روش‌های لکه‌گذاری ساترن و FISH نیز به علت نیاز به صرف زمان طولانی و هم چنین فقدان دقت و حساسیت کافی، چندان مطلوب نمی‌باشند(۹-۷). در این جا دو روش سریع و کارآمد نسبت به روش‌های رایج گذشته، مبتنی بر استفاده از سیستم Real-time PCR و تکثیر وابسته به اتصال شناساگرهای چندگانه(MLPA) برای شناسایی سریع و دقیق انواع حذف‌های شناخته شده و ناشناخته در خوشه ژنی بتاگلوبین شرح داده شده است.

روش Real-time PCR مبتنی بر استفاده از رنگ SYBR Green I به عنوان روشی ساده و نسبتاً ارزان برای شناسایی کمی حذف یا مضاعف‌شدگی در ژنوم و به طور ویژه و برای اولین بار در خوشه ژنی بتاگلوبین پیشنهاد شده است. البته گزارش‌های فراوانی مبنی بر بهره‌گیری از این روش در شناسایی انواع بازآرایی‌های ژنی در سایر بیماری‌های ژنتیکی از جمله آلفا تالاسمی، هایپر کلسترولمیای خانوادگی، سندرم آنجلمن و بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی دیگر ارایه شده است(۲۱، ۲۰، ۷). در تمام این مطالعه‌ها، سنجش کمی نسخه‌های ژنی در طول فاز تصاعدی از واکنش PCR بر اساس سنجش میزان نشر نور فلورسانس اساس سیستم Real-time PCR را تشکیل می‌دهد. این سیگنال متناسب با میزان محصول PCR در واکنش افزایش می‌یابد. با ثبت میزان تابش در هر چرخه می‌توان واکنش را در طول فاز تصاعدی ثبت کرد و آن را با مقدار نمونه الگوی اولیه مطابقت داد. هر چه مقدار نسخه‌های اولیه DNA بیشتر باشد، افزایش میزان نور فلورسانس و ورود به فاز تصاعدی زودتر اتفاق می‌افتد(۱۳). البته باید گفت با وجود این که این روش امکان شناسایی هم زمان با تکثیر توالی‌های ژنی را مهیا می‌کند، استفاده از آن در یک سنجش چندگانه (Multiplex) به شدت به علت تداخل طیف رنگ‌های فلورسانس محدود می‌شود. لذا حضور زوج آغازگرهای متعدد در یک واکنش چندگانه، سبب کاهش در توانایی PCR و اعتبار نتایج آن خواهد شد(۲۰، ۱۹).

تاکنون در زمینه تشخیص تعداد نسخ ژنی در خوشه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

ژنی بتاگلوبین با استفاده از سیستم Real-time PCR و رنگ فلورسانس SYBR Green I گزارشی ارایه نگردیده است. با این حال لیو و همکارانش در سال ۲۰۰۶ روشی مولکولی بر مبنای ارتفاع پیک‌های منحنی‌های ذوب مرتبط با ژن‌های تکثیر یافته از طریق Real-time PCR برای تشخیص حذف‌های موجود در آلفا تالاسمی ارایه دادند(۲۰). این در حالی است که در مطالعه حاضر بررسی پیک‌های منحنی ذوب تنها به منظور تایید اختصاصیت محصولات تکثیر یافته صورت پذیرفت. در مطالعه حاضر وجود حذف در تمامی ۳۲ فرد دارای حذف شناخته شده که وجود حذف در آن‌ها از طریق Gap PCR شناسایی شده بود، توسط روش Real-time PCR تشخیص داده شد که این دلیلی بر صحت و دقت در نتایج Real-time PCR در شناسایی تغییرات نسخه‌های ژنی می‌باشد.

روش MLPA که اخیراً از کاربرد گسترده‌ای در زمینه تشخیص بازآرایی‌های ژنی برخوردار می‌باشد، مبتنی بر ترکیب یک واکنش اتصال(Ligation)و یک PCR استاندارد است که در نهایت به جداسازی محصولات تکثیر شده توسط الکتروفورز موئین خاتمه می‌یابد. بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از این روش برای بررسی تعداد نسخه‌های ژنی آلفا و بتاگلوبین و دیگر ژن‌ها عملی است(۱۶). با این وجود هنوز یک ارتباط مستقیم میان تعداد نسخه‌های ژنی و مقدار محصول واکنش اثبات نشده است. بنابراین استفاده از کیت تجاری MLPA تنها می‌تواند به عنوان یک روش نیمه کمی مطرح باشد و نمی‌توان از آن به عنوان یک جایگزین برای روش‌های مبتنی بر Real-time PCR نام برد(۲۲). هم چنین جداسازی محصولات تکثیر شده توسط الکتروفورز موئین به کمک دستگاه توالی‌یابی و صرف زمان و هزینه زیاد و دقت کمتر نسبت به آن چه که در آنالیز Real-time PCR وجود دارد، از نقاط ضعف روش MLPA محسوب می‌شود.

در مطالعه حاضر وجود حذف‌های شناخته شده که توسط روش Gap PCR تشخیص داده شده بودند، به کمک روش Real-time PCR با موفقیت شناسایی گردیدند. هم چنین با استفاده از این روش امکان تشخیص حذف‌های ناشناخته که توسط روش‌های رایج مولکولی شناسایی نمی‌شدند، فراهم آمد و در ادامه تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از MLPA ، وجود حذف را در مناطقی که توسط روش Real-time PCR شناسایی شده بود، تایید نمود. به عقیده ما، استفاده از ترکیب دو روش Real-time PCR و MLPA برای شناسایی حذف‌های خوشه ژنی بتاگلوبین ایده‌آل محسوب می‌شود.

نتیجه‌گیری

روش MLPA با به کارگیری چندین شناساگر، به عنوان یک روش نیمه کمی برای شناسایی دامنه حذف‌ها بدون تعیین دقیق محدوده حذف مطرح می‌باشد.

Real-time PCR دارای توانایی در شناسایی کمی حذف‌ها در مناطق مورد نظر از ژنوم با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه بین ژن هدف و ژن مرجع می‌باشد لذا روش Real-time PCR مبتنی بر استفاده از رنگ SYBR Green I می‌تواند به عنوان یک روش غربالگری دقیق و سریع برای شناسایی حذف‌های خوشه ژنی بتاگلوبین در ناقلین بتا تالاسمی به کار رود. اهمیت این روش به ویژه در مورد شناسایی حذف‌های ناشناخته با دامنه نامشخص که امکان شناسایی با روش‌های رایج مبتنی بر PCR معمولی را ندارند، خاطر نشان می‌شود. نتایج حاصل از روش MLPA ، حضور حذف‌های مشابه که توسط روش Real-time PCR شناسایی شده بودند را تایید کرد. آن چه در مورد استفاده از روش‌های کمی در شناسایی حذف‌ها و مضاعف شدگی‌های ژنی مطرح است، انجام آزمایش‌های بهینه‌سازی نظیر تعیین کارایی آغازگرها، استفاده از غلظت بهینه از DNA و آغازگر و افزایش دقت و توانایی دستگاه‌ها برای دست‌یابی به نتایج معتبرتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

در این طرح از مساعدت و همکاری کلیه بیماران و خانواده‌های محترم آن‌ها و هم چنین از پشتیبانی و همیاری تمامی همکاران بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران و آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی تشکر و قدردانی می‌گردد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

References :

1- Thein SL. Genetic modifiers of the beta-haemoglobinopathies. Br J Haematol 2008; 141(3): 357-66.
2- Trent RJ. Diagnosis of the haemoglobinopathies. Clin Biochem Rev 2006; 27(1): 27-38.
3- Thein SL. Genetic modifiers of beta-thalassemia. Haematologica. 2005; 90(5): 649-60.
4- 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.
5- Dover GJ, Valle D. Therapy for beta-thalassemia--a paradigm for the treatment of genetic disorders. N Engl J Med 1994; 1: 331(9): 609-10.
6- Craig JE, Barnetson RA, Prior J, Raven JL, Thein SL. Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. Blood 1994; 83(6): 1673-82.
7- Damgaard D, Nissen PH, Jensen LG, Nielsen GG, Stenderup A, Larsen ML, *et al*. Detection of large deletions in the LDL receptor gene with quantitative PCR methods. BMC Med Genet 2005; 6: 15.
8- White SJ, Sterrenburg E, van Ommen GJ, den Dunnen JT, Breuning MH. An alternative to FISH: detecting deletion and duplication carriers within 24 hours. J Med Genet 2003; 40(10): 113.
9- White SJ, Vink GR, Kriek M, Wuyts W, Schouten J, Bakker B, *et al*. Two-color multiplex ligation-dependent probe amplification: detecting genomic rearrangements in hereditary multiple exostoses. Hum Mutat 2004; 24(1): 86-92.
10- Harteveld CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, den Dunnen JT, White SJ, *et al*. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha- and beta-thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. J Med Genet 2005; 42(12): 922-31.
11- Barragan E, Bolufer P, Perez ML, Prieto F, Sanz MA. Molecular detection of Spanish deltabeta-thalassemia associated with beta-thalassemia identified during prenatal diagnosis. Clin Chim Acta 2006; 368 (1-2): 195-8.
12- Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. Clin Lab Haematol 2004 ; 26 (3) : 159-76.
13- Ruiz-Ponte C, Carracedo A, Barros F. Duplication and deletion analysis by fluorescent real-time PCR-based genotyping. Clin Chim Acta 2006; 363(1-2): 138-46.
14- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001; 25(4): 402-8.
15- Vaerman JL, Saussoy P, Ingargiola I. Evaluation of real-time PCR data. J Biol Regul Homeost Agents 2004; 18(2): 212-4.
16- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res 2002; 30(12): 57.
17- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16(3): 1215.
18- Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques 2005; 39(1): 75-85.
19- Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, *et al*. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. BMC Biotechnol 2003; 3: 18.
20- Liu J, Yan M, Wang Z, Wang L, Zhou Y, Xiao B. Molecular diagnosis of alpha-thalassemia by combining real-time PCR with SYBR Green1 and dissociation curve analysis. Transl Res 2006; 148(1): 6-12.
21- Raca G, Buiting K, Das S. Deletion analysis of the imprinting center region in patients with Angelman syndrome and Prader-Willi syndrome by real-time quantitative PCR. Genet Test 2004; 8(4): 387-94.
22- Shadrina MI, Semenova EV, Slominsky PA, Bagyeva GH, Illarioshkin SN, Ivanova S. Effective quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the parkin gene (PARK2) exon 1-12 dosage. BMC Med Genet 2007; 8: 6.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

Accurate detection of unknown deletions in beta-Globin gene cluster in beta thalassemia carriers using Real-time PCR and MLPA

Babashah S.[1,2](MS), Jamali S.[2](MS), Mahdian R.[2](PhD), Hayat Nosaeid M.[2](MS), Karimipoor M.[2](MD), Maryami F.[2](PhD), Raeisi M.[3](MS), Alimohammadi R.[1,3](MS), Zeinali S.[2,3](PhD)

[1]Department of Biology, Faculty of Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute, Tehran, Iran
[3]Kawsar Human Genetic Research Center, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Although beta thalassemia is mainly caused by mutations involving single base substitutions and small deletions, there have been reports showing deletions of large regions of beta- globin genes play a similar causing role. The strategy to identify beta thalassemia carriers with known deletions is based on PCR techniques such as Gap PCR. There are however some unknown deletions that can not be detected by the above methods. To overcome this limitation, Real-time PCR and MLPA were developed as two quantitative assays for analysis of beta-globin gene cluster.

Materials and Methods

The subjects were evaluated in a case-control study. Among individuals referred to genetic laboratories of Pasteur Institute of Iran and Kawsar Genetic Research Center, 40 were suspected of having a large deletion in β-globin gene cluster. The including criteria were hematological findings such as low blood indices (MCV <80 fl and MCH <27 pg), normal HbA2 and raised or normal HbF. Genomic DNA was extracted from peripheral blood. A Real-time PCR assay was developed using comparative threshold cycle (Ct) method for analysis of gene copy number. In addition, gene dosage was analyzed using MLPA method.

Results

Real-time PCR results for quantitative analysis of Beta, Delta, G-gamma genes showed the ratio ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) of 0.96 ± 0.18 for normal individuals and 0.58 ± 0.04 for carriers of deletions in beta globin gene cluster. MLPA results showed nearly 50% reduction in the height of the peaks corresponding to regions of deletions.

Conclusions

MLPA results confirmed the presence of the same deletions detected by Real-time PCR in all of the carrier individuals. It would be ideal to combine these quantitative assays to confirm corresponding results for accurate diagnosis of known and unknown deletions in beta thalassemia carriers.

Key words: beta-Thalassemia, beta-Globins, Gene Deletion
SJIBTO 2009; 5(4): 225-235

Received:14 Sep 2008
Accepted: 1 Feb 2009

Correspondence: Zeinali S., Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute. P.O.Box: 13185-1667, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 66480780; Fax : (+9821) 66480780
E-mail: *siruszeinali@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]