خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۷ شماره ۱ بهار ۸۹ (۲۶-۱۷)

مقاله پژوهشی

آنالیز مولکولی ژن فاکتور IX انعقادی در بیماران هموفیلی B خراسان رضوی

نرگس خاتون کریمی[۱]، لیلا کوکبی[۲]، زهرا بدیعی[۳]، مجید شهابی[۴]، سید عبداله بنی‌هاشم[۵]، سیروس زینلی[۶]، کاظم پریور[۷]، مرتضی کریمی‌پور[۸]

چکیده

سابقه و هدف

هموفیلی B یا بیماری کریسمس، یک اختلال خونریزی‌دهنده وابسته به جنس مغلوب است که به علت کاهش مقدار یا نقص عملکرد فاکتور IX انعقادی ایجاد می‌شود. بیماری ناشی از جهش‌های مختلف در ژن فاکتور IX است. هدف از این تحقیق، آنالیز مولکولی ژن فاکتور IX جهت ارزیابی طیف جهش‌ها و یافتن ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ در بیماران هموفیلی B خراسان رضوی بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، به روش غیر تصادفی آسان ۱۴ بیمار هموفیل B از خراسان رضوی بررسی شدند. DNA ژنومیک بیماران به وسیله روش salting out از خون محیطی استخراج گردید. PCR برای کلیه اگزون‌ها و نواحی مهم ژن فاکتور IX بیماران انجام و بر روی محصولات PCR ، آزمایش SSCP انجام شد. نمونه‌هایی که در SSCP ، حرکت آن‌ها روی ژل اکریل‌آمید در مقایسه با کنترل نرمال متفاوت بود انتخاب و به روش ختم زنجیره، تعیین توالی شدند.

یافته‌ها

از لحاظ توزیع انواع مختلف جهش، ۶۹/۲ درصد جهش‌ها از نوع بد معنی(Missense)، ۲۳/۱ در صد جهش‌ها از نوع بی‌معنی(Nonsense) و ۷/۷ درصد جهش‌ها از نوع جایگذاری(Insertion) بودند که با نتایج موجود در بانک اطلاعاتی بیماران هموفیلی B مطابقت داشت. ۲ مورد از جهش‌های به دست آمده جدید بودند و تاکنون در بانک اطلاعاتی هموفیلی B گزارش نشده بودند.

نتیجه گیری

این مطالعه، ناهمگونی قابل توجه جهش‌های ژن فاکتور IX را در جمعیت شمال شرق کشور تایید می‌کند. از اطلاعات به دست آمده، در ردیابی ناقلین مؤنث در خانواده‌های این بیماران و تشخیص قبل از تولد می‌توان استفاده کرد.

کلمات کلیدی: هموفیلی B ، SSCP ، موتاسیون، فاکتور IX

تاریخ دریافت : ۸۸/ ۴/۲۰
تاریخ پذیرش : ۸۸/۱۱/۱۲

۱ـ دانشجوی کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی مولکولی ـ گروه پزشکی مولکولی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۲ـ کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی مولکولی ـ گروه پزشکی مولکولی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
۳- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی اطفال ـ دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۴- PhD زیست فن‌آوری پزشکی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون مشهد
۵ـ متخصص کودکان ـ دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۶ـ PhD ژنتیک پزشکی ـ گروه پزشکی مولکولی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر
۷ـ PhD زیست‌شناسی سلولی و تکوینی ـ استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۸ـ مؤلف مسؤول: PhD زیست فن‌آوری پزشکی ـ گروه پزشکی مولکولی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران ـ تهران ـ خیابان پاستور ـ پلاک ۶۹ ـ کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10]

مقدمه

بیمـاری هموفیلی B (OMIM : # ۳۰۶۹۰۰)، یـک بیماری خونریزی دهنده وابسته به جنس مغلوب با شیوع ۱ در هر ۳۰۰۰۰ تولد مذکر می‌باشد کـه بـا کـاهش خفیـف، متوسط و یا شدید فعالیت فاکتور IX انعقادی همراه اسـت. ژن فاکتور IX به طول ۳۴ کیلو باز، دارای ۸ اگزون بـوده و بر روی بـازوی بلنـد کرومـوزم X در ناحیـه Xq27.1 قـرار گرفته است(۲، ۱). محصول نهایی ژن فاکتور IX ، پلی‌پپتید تک زنجیره‌ای ۵۵ کیلـو دالتـونی بـا ۴۱۵ اسـید آمینـه و ۶ منطقه(domain) می‌باشد. این مناطق عبارتند از:
(Signal peptide, pre peptide, GLA domain, EGF1, 2-like domain, Active peptide, catalytic domain)

هـر کـدام از ۶ منطقـه، دارای اسـید آمینـه‌هـای مهـم و محافظـت‌شـده‌ای بـوده کـه در ترشـح، واکـنش‌هـای گاماکربوکسیلاسـیون، واکـنش بـا سـطوح بیولوژیـک، کوفاکتورهـا، اتصـال بـه فاکتورهـای VII, VIII, X و XI انعقادی، پلاکت‌ها و فعالیت کاتالیتیک، نقش مختص خـود را دارا می‌باشند(۴-۱). این پروتئین به همراه سایر فاکتورها در آبشار انعقادی، نقش مهمی در انعقاد خون دارد(۳-۱).

بر اساس فعالیت فاکتورIX (FIX:C)، انـواع همـوفیلی B شامل خفیـف(۳۰٪-۵٪ FIX:C)، متوسـط (۵٪-۱٪ FIX:C) و شدید (۱٪ > FIX:C) می‌باشند(۶، ۵، ۲).

بیماری از طریـق زنـان ناقـل بـه فرزنـدان پسـر منتقـل می‌شود(۲، ۱). ۳۰٪-۲۰٪ موارد گزارش شـده، بـه صـورت جهش جدید(تشکیل از نو= *de novo*) بـوده و هـیچ سـابقه قبلی در خانواده وجـود نـدارد. همـوفیلی B در زنـان نـادر است و حاصل مکانیسم‌های مختلفی است که عمومی‌تـرین آن‌ها غیـر فعـال شـدن نامتقـارن کرومـوزم X در دختـران هتروزیگـوت اسـت. بـه نـدرت ممکـن اسـت بیمـاری در دختران به دلیل سندرم ترنر(45XO) و موزائیسـم کرومـوزم X باشد (۷،۸).

جهش‌های عامل بیماری هموفیلی B بسیار پراکنده‌انـد و وابستگی به مسایل نژادی و منطقه ای ندارند. این مسـأله را می‌توان با مراجعه به جهش هـای گـزارش شـده در بانـک اطلاعـاتی جهـش‌هـای همـوفیلی B و نیـز بـا مراجعـه بـه مقاله‌های مختلفی که در ایـن زمینـه منتشـر شـده، متوجـه شد(۹).

بنـابـراین وجود جهش مشترک که محل داغ(Hot Spot) برای جهش نیسـت، در افـرادی کـه از یـک جـد مشـترک نمی‌باشند، مسأله شایعی نیست.

هر گونه جهش در نواحی رمزگـردان(Coding) ایـن ژن شـــامل جهـــش بـــد معنـــی(Missense) ، جهـــش بی‌معنی(Nonsense) و حذف و ورود نوکلئوتید(Insertion)، منجر به نقص در عملکرد و یا کاهش میزان پروتئین فاکتور IX انعقـادی و بـروز بیمـاری مـی‌گـردد(۲، ۱). جهـش در مناطق مختلف اگزون‌های ژن فاکتور IX ، منجـر بـه تغییـر اسید آمینه در پروتئین فاکتور IX گردیده و این خود سـبب تغییر عملکرد و یـا کـاهش میـزان پـروتئین IX انعقـادی و بیماری هموفیلی می‌شود(۲، ۱). جهش‌ها ممکـن اسـت در نواحی مختلف ژنی اتفاق بیفتند که بر حسب محـل و نـوع جهش، میزان تولید فـاکتور IX متفـاوت اسـت. ۹۳ درصـد جهش‌ها در توالی‌های کدکننده ژن و بیشتر در اگـزون‌هـای ۲ ، ۶ و ۸ رخ می‌دهند. جهش‌ها در ناحیـه تنظیمـی ژن(در ناحیه پروموتر) ممکن است سبب عدم اتصـال فاکتورهـای نسخه‌برداری به ژن شوند که نهایتاً منجر بـه کـاهش تولیـد محصول ژن می‌گردند. معمولاً دو نوع جهش، جهـش‌هـای نقطـه‌ای کـه سـبب ایجـاد کـدون خاتمـه مـی‌شـوند و یـا جهش‌هایی که باعث بـه هـم ریخـتن چـارچوب خوانـدن کدون‌ها می‌شوند و حذف‌ها یا بازآرایی‌های بزرگ ژنی بـه دلیل کاهش یا فقدان سطح آنتی‌ژن(گـروه CRM = Cross Reacting Material)، باعث افزایش خطر ایجاد آنتـی‌بـادی مهارکننده بعـد از درمـان‌هـای جـایگزینی در ایـن بیمـاری می‌گردند(۲، ۱).

علایم بیماری بـر اسـاس شـدت همـوفیلی متفـاوت و معمولاً شامل خونریزی‌های خود به خودی و یـا بـه دنبـال ضربه در نقاط مختلف بدن است(۶). عـلاوه بـر مشـکلات فوق باید به عوارض ناشی از درمان‌های نگه‌دارنده در ایـن بیماران(تشکیل آنتی‌بـادی‌هـای مهارکننـده و بیمـاری‌هـای منتقله از خون) اشاره کرد. از مهم‌ترین بیماری‌هـای منتقلـه به بیماران که ناشی از درمان‌های نگه‌دارنده است، می‌تـوان هپاتیت C و HIV را ذکر نمود(۴). از دیگر مواردی که باید در این گروه از بیماران مد نظر داشـت، هزینـه‌هـای بـالای درمانی و اشغال تخت‌های بیمارستانی به دلیل عدم داشـتن

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10]

برنامه‌های درمانی مدون در منزل است(۱۰). با توجه به این که این بیماری تک ژنی است و تاکنون درمان قطعی برای آن شناسایی نشده است، به نظر می‌رسد بهترین روش برای کنترل آن پیشگیری باشد و اولین گام برای رسیدن به این هدف، شناسایی نوع و جایگاه جهش در افراد مبتلا در خانواده و شناسایی ناقلین جهت تشخیص قبل از تولد در ناقلین حامل جنین پسر می‌باشد(۱۳-۱۱). هدف از این تحقیق، آنالیز مولکولی جهش های ژن فاکتور IX در بیماران هموفیلی B استان خراسان رضوی بود.

مواد و روش ها

در یک مطالعه تجربی، بعد از هماهنگی با کانون هموفیلی استان خراسان رضوی، ۱۴ بیمار هموفیل B غیرخویشاوند مورد ارزیابی قرار گرفتند. بیماران و خانواده‌های آن‌ها مورد مشاوره قرار گرفته و درخصوص تحقیق، توضیحات لازم به آن‌ها داده شد. پس از تکمیل فرم‌های اطلاعاتی، جهت شناسایی موارد فامیلی و اسپورادیک و بررسی سطح فعالیت فاکتور IX با کسب رضایت از بیمار، ۱۰-۵ میلی‌لیتر خون محیطی گرفته و در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ریخته شد.

از نظر آزمایشگاهی، معیار ورود بیماران به مطالعه این بود که آزمایش‌های زمان خونریزی(BT)، شمارش پلاکتی، میزانPT و فعالیت فاکتور VIII نرمال باشند. هم‌چنین میزان PTT طولانی و درصد فعالیت فاکتور IX زیر ۳۰٪ و بیماران تحت درمان‌های معمول هموفیلی B نیز باشند(۱۵، ۱۴). DNA گلبول‌های سفید خون محیطی بیماران، طبق روش استاندارد اشباع نمکی استخراج گردید و بعد از تعیین غلظت و ارزیابی خلوص به روش اسپکتروفتومتری، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۱۶).

مناطق مهم ژن فاکتور IX هر بیمار شامل پروموتر، اگزون‌های شماره یک تا هشت و نواحی سرحد اگزون‌ها و اینترون‌ها، به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR) برای هر ناحیه پس از بهینه‌سازی به طور جداگانه تکثیر شد. توالی آغازگرهای به کار رفته در واکنش‌های PCR مطالعه‌های منتشر شده قبلی استخراج گردید(۱۸، ۱۷).

مواد وارد شده در واکنش PCR شامل ۵۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۱۰ پیکومول از آغازگرهای بالادست و پایین دست(شرکت Primme ، کره جنوبی)، مخلوط dNTP (شرکت رُوش، آلمان) با غلظت ۲۰۰ میکرو مولار، $MgCl_2$ با غلظت ۲ میلی‌مولار، بافر X ۱۰ و آنزیم Taq DNA پلی‌مراز(سیناژن، ایران) با غلظت ۰/۵ واحد در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. PCR در برنامه بهینه شده به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۲-۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه(دمای اتصال آغازگر بهینه شده برای نواحی مختلف)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه با ۳۲ سیکل و در نهایت دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از تکثیر هر ناحیه، الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ با ولتاژ ۸۰ به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، تحت تابش نور ماوراء بنفش (UV) مشاهده شد.

بعد از به دست آوردن یک محصول PCR مناسب بدون هیچ باند غیر اختصاصی، روش غربالگری SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) روی کلیه قطعات تکثیر یافته به طور جداگانه همراه با کنترل نرمال انجام گرفت. در این مطالعه از بین روش‌های غربالگری از SSCP به علت سادگی روش، عدم احتیاج به ابزار پیچیده، حساسیت بالای آن در تعیین جهش‌ها و سهولت راه‌اندازی در مراکز تحقیقاتی استفاده شد. اساس این روش وابسته به شکل فضایی زنجیره‌های تک رشته‌ای DNA است(۲۰، ۱۹). این ساختار ثانویه بسته به تغییرات اسید نوکلئیک، تغییر یافته و این مسأله سبب تفاوت حرکت در الکتروفورز قطعات در شرایط غیر تقلیب کننده ژل می‌گردد. بهترین اندازه گزارش شده محصولات PCR که می‌توان با این روش بررسی کرد، ۳۰۰-۲۰۰ نوکلئوتید می‌باشد. اندازه اگزون‌های ژن فاکتور IX برای SSCP مناسب بود و در مورد اگزون ۸ نیز به علت بزرگ بودن اندازه آن، به ۴ قطعه کوچک‌تر تقسیم شده و از ۴ جفت آغازگر برای تکثیر این اگزون استفاده شد.

بسته به میزان غلظت محصول PCR ، ۶-۳ µl از محصول PCR با ۷ µl بافر مخصوص SSCP که شامل فورمامید ۹۵٪، برموفنل بلو، زایلن سیانل ۰/۰۵ درصد و ۱۰ میلی‌مولار EDTA بود مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10]

جدول ۱: فهرست آغازگرهای استفاده شده در تعیین هاپلوتایپ بیماران

آغازگر	سکانس	محصول PCR	سایز قطعه هضم شده	آنیلینگ
HhaI forward HhaI reverse	ACAGGCACCTGCCATCACTT AGATTTCAAGCTACCAACAT	۲۳۰ bp	۱۵۰ & ۸۰ bp	۶۲ ºC
MnlI forward MnlI reverse	AAGTGACAAGGATGGGCCTCAATC GAAACTTGCCTAAATACTTCTC	۴۲۲ bp	−۳۳۳ & ۶۲ & ۲۷ bp +۲۱۴ & ۱۱۹ & ۶۲ & ۲۷ bp	۶۳ ºC
DdeI forward DdeI reverse	GGGACCACTGTCGTATAATGTGG CTGGAGGATAGATGTCTCTATCTG	۳۶۹ bp یا ۳۱۹ bp	–	۶۲ ºC
TaqI forward TaqI reverse	GCTATCAACATAGGTGAAAGTCAAT TAAG GTGCGTTTCTCAATCACAGTACCAGT AAT	۳۳۲ Bp	۱۷۴ & ۱۵۸ bp	۴۷/۳ ºC

دقیقه در حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سریعاً روی یخ منتقل گردیدند. سپس نمونه‌ها، در درون چاهک‌های تعبیه شده بر روی ژل پلی اکریلامید منتقل شد. الکتروفورز به مدت ۱۴-۱۰ ساعت با ولتاژ ۴۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

از رنگ‌آمیزی نیترات نقره جهت ظهور باندها در ژل پلی‌اکریلامید استفاده شد. به طور خلاصه ابتدا ژل با محلول فیکساتیو(اسید استیک ۵٪ و اتانل ۴۰٪) فیکس شده و پس از شستشو با آب مقطر دیونیزه با نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید. بعد از شستشوی مجدد با آب مقطر به منظور دیدن باندها از محلول NaOH ۱/۵٪ و فرمالدئید ۳۷٪ استفاده شد و در پایان با استفاده از اسید استیک، واکنش متوقف گردید. در اتمام کار به منظور حذف اسید استیک اضافی، شستشوی ژل با آب مقطر انجام شد.

نمونه‌هایی که در SSCP آن‌ها تفاوت حرکتی نسبت به کنترل نرمال دیده شد، پس از PCR مجدد در حجم ۵۰ میکرولیتر و تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل(شرکت کیاژن- آلمان)، به روش ختم زنجیره تعیین توالی شدند. توالی‌های به دست آمده با نرم‌افزار(Chromas) آنالیز شده و با ژن فاکتور IX به وسیله نرم‌افزار بلاست مقایسه و تغییرات احتمالی مشخص شد. سپس جهش‌های به دست آمده بیماران با بانک اطلاعاتی موتاسیون هموفیلی B مقایسه و موارد گزارش نشده مشخص شدند(۹). جهت تعیین هاپلوتایپ بیماران، مارکرهای پلی‌مرفیک داخل و خارج ژنی TaqI ، Mn1I و HhaI با استفاده از روش PCR-RFLP در بیماران مورد بررسی قرار گرفت (۲۲، ۲۱). ابتدا هر محل پلی‌مرفیک با استفاده از آغازگرهای خاص تکثیر شدند و سپس محصول PCR به دست آمده برای هر محل با استفاده از آنزیم محدودالاثر مربوطه، تحت شرایط بافری و دمایی خاص با توجه به نوع آنزیم برشی به مدت ۱۲ الی ۱۶ ساعت در انکوباتور گذاشته شد(جدول ۱). پس از هضم، نمونه‌ها روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند. مارکر DdeI که در اینترون شماره یک ژن فاکتور IX قرار دارد، یک مارکر VNTR می‌باشد که با PCR و بردن محصولات آن روی ژن، آنالیز شد.

یافته ها

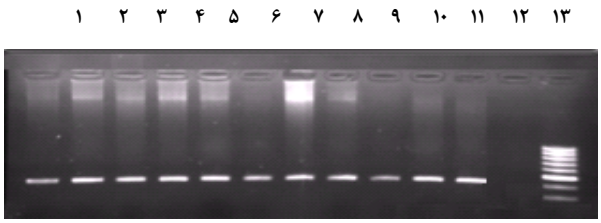
این تحقیق بر روی ۱۴ بیمار شناخته شده هموفیلی B غیر خویشاوند شهر مشهد انجام شد(در خانواده‌هایی که بیش از یک بیمار وجود داشت، نمونه فقط از یک بیمار گرفته شد). با توجه به شجره نامه‌های بیماران، ۴ مورد فرم اسپورادیک و ۸ مورد فرم فامیلیال بیماری را دارا بودند. در ۲ مورد هیچ مدرکی دال بر نوع تک‌گیر و فامیلیال در دسترس نبود. به علاوه در ۷ بیمار هموفیلی شدید، در ۶ بیمار هموفیلی متوسط و در یک مورد شدت هموفیلی نامشخص بود.

نتایج PCR:

کلیه نواحی ژن فاکتور IX انعقادی با آغازگرهای طراحی شده در تمام ۱۴ بیمار مورد مطالعه، تکثیر شدند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10]

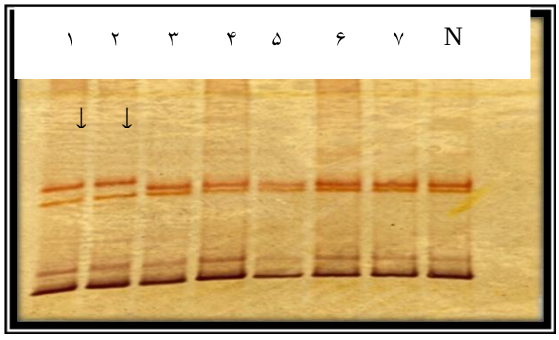
نمونه‌ای از تکثیر یکی از نواحی اگزون شماره ۸ ژن در شکل آورده شده است(شکل ۱). در همه بیماران، کلیه نواحی تکثیر شدند و در هیچ بیماری ناحیه‌ای یافت نشد که قابل تکثیر نباشد. بنابراین در هیچ کدام از بیماران، حذف بزرگ ژنی مشاهده نشد.



شکل ۱: PCR قطعه‌ای از اگزون ۸ ژن فاکتور IX در ۱۱ بیمار مبتلا به هموفیلی B . شماره ۱۲ کنترل منفی بدون DNA و شماره ۱۳ سایز مارکر bp ۱۰۰ می‌باشد.

نتایج SSCP:

سیزده مورد باند شیفت در نتایج SSCP مشاهده شد که یازده مورد در اگزون ۸ ، یک مورد در اگزون ۶ و یک مورد در 3'UTR بود(شکل ۲). در یک بیمار در SSCP ، تغییر حرکتی در هیچ کدام از نواحی مورد بررسی ژن فاکتور IX به دست نیامد، برای به دست آوردن جهش بایستی کل ژن تعیین توالی شود.



شکل ۲: SSCP یکی از نواحی اگزون ۸ ژن فاکتور IX در ۷ بیمار مبتلا به هموفیلی B و باند شیفت‌های قابل رویت در ردیف ۱ و ۲ که در شکل با فلش مشخص شده است و N کنترل نرمال می‌باشد.

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 ۹۲/۸٪ محاسبه شد.

نتایج تعیین توالی DNA:

نتایج حاصل از تعیین توالی به همراه شدت بیماری، نوع جهش، جایگاه جهش، تغییر اسید آمینه و منطقه پروتئینی درگیر در جدول ۲ خلاصه شده است. همان گونه که مشاهده می‌شود، بیشتر جهش‌های به دست آمده از نوع Missense می‌باشد و حدود ۷۸ درصد از آن‌ها در اگزون ۸ رخ داده که با نتایج موجود در بانک اطلاعاتی بیماران هموفیلی B مطابقت داشت. در مجموع ۱۰ نوع جهش به دست آمد که ۴۲٪ در منطقه CpG رخ داده بود. ۳ نوع از جهش‌ها، هر یک در دو خانواده غیر خویشاوند مشاهده شدند. ۲ مورد از جهش‌های به دست آمده جدید بوده و تاکنون در بانک اطلاعاتی هموفیلی B گزارش نشده بودند. این جهش‌ها شامل T 31440 A و Ins T 31197-99 بودند. در یک بیمار، جهشی در نواحی مورد بررسی ژن فاکتور IX به دست نیامد.

نتایج تعیین هاپلوتایپ:

نتایج تعیین هاپلوتایپ با مارکرهای چند شکلی در محل‌های MnlI, HhaI, TaqI و DdeI در جدول ۲ نشان داده شده است. فراوانی این جایگاه‌ها در ۴ محل بدین صورت بوده است که در کل بیماران مشهد ۴۲ درصد برای HhaI، ۲۱ درصد برای محل MnlI و ۲۱ درصد برای محل TaqI مثبت بودند(دارای جایگاه برش برای آنزیم بودند). هم چنین ۵۰ درصد بیماران باند ۳۱۹ bp (+) برای محل DdeI داشتند. هشت نوع هاپلوتایپ مختلف در ۱۴ بیمار مورد مطالعه به دست آمد. بر اساس نتایج به دست آمده از تعیین هاپلوتایپ، ۱۱ بیمار دارای پلی‌مرفیسم مالمو بودند(مطابق با اکثریت نژاد آسیایی)(۲۳). در بررسی هاپلوتایپ جمعیت بیمار با توجه به نتایج به دست آمده، فراوانی جایگاه‌های برش آنزیم‌های HhaI از دو جایگاه MnlI و TaqI بیشتر بود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10]

جدول ۲: جهش‌های به دست آمده در ژن فاکتور IX و نتایج تعیین هاپلوتایپ بیماران هموفیلی B استان خراسان رضوی

ردیف	شدت بیماری	اگزون	موتاسیون +	تغییر اسید آمینه	منطقه درگیر	CpG◊	نوع جهش	آنالیز هاپلوتیپ
۱	Severe	۶	G 20519 A	R 180 Q	Activation peptide	Y	Missense	++−+
۲	Severe	۸	C 30857 A	Q 246 K	Catalytic domain	N	Missense	+−−−
۳	Moderate	۸	G 30864 A	R 248 Q	Catalytic domain	Y	Missense	−−−−
۴	Moderate	۸	G 30864 A	R 248 Q	Catalytic domain	Y	Missense	−−−−
۵	Severe	۸	C 30863 A	R 248 X	Catalytic domain	Y	Non sense	−−−−
۶	Severe	۸	C 30863 T	R 248 X	Catalytic domain	Y	Non sense	−−−−
۷	Severe	۸	C 31118 T	R 333 X	Catalytic domain	Y	Non sense	++++
۸	-	۸	A 31197 G	D 359 G	Catalytic domain	N	Missense	+−−−
۹	Severe	۸	InsT 31197-99*	S 365 X	Catalytic domain	N	Frame shift	+−−−
۱۰	Severe	۸	G 31217T	G 366 W	Catalytic domain	N	Missense	−−++
۱۱	Moderate	۸	T 31340 A	W 407 R	Catalytic domain	N	Missense	−−−+
۱۲	Moderate	۸	T 31340 A	W 407 R	Catalytic domain	N	Missense	−−−+
۱۳	Moderate	3' UTR	T 31440 A*	-	3' UTR	N	Missense	+++−
۱۴	Moderate	−	-	-	-	-	-	+−−+

◊CpG: مناطق پرخطر برای جهش

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

+ : شماره‌گذاری بازها بر اساس Yoshitake *et al*. 1985 می‌باشد.

R : آرژنین، Q :گلوتامین، K :لیزین، Stop codon : X ، D: اسپارتیک اسید، S :سرین، G :گلیسین، W :تریپتوفان.

نتایج تعیین هاپلوتایپ بیماران به ترتیب از چپ به راست در محل های HhaI, MnlI, TaqI, DdeI می‌باشد. علامت + نشان‌دهنده وجود محل برش برای آنزیم و علامت − نشان‌دهنده نبودن محل برش برای آنزیم است. برای محل DdeI باند 369bp با − و باند 319bp با + مشخص شده است.

بحث

بیماری هموفیلی هزینه‌های بهداشتی درمانی گزافی را علاوه بر خود بیماری، به فرد، جامعه و سیستم درمانی تحمیل می‌کند.

گرچه طرق درمانی متعددی ارائه شده است ولی هر کدام محدودیت و عوارض خاصی را به دنبال دارد. مثلاً در تزریق فاکتور IX با خلوص پایین، خطر بروز اختلالات ترومبوتیک وجود دارد. استفاده از فرآورده‌های مشتق از پلاسما، امکان سرایت عفونت‌های ناشناخته از جمله پریون‌ها را فراهم می‌کند و تجویز پروتئین‌های نوترکیب نظیر BENE FIX ، خطر تولید و گسترش آنتی‌بادی‌های مهار کننده بر علیه پروتئین IX انعقادی خصوصاً در افراد با هموفیلی شدید را باعث می‌شود(۶).

با توجه به عوارض زیاد بیماری و محدودیت درمان آن با درمان‌های نگهدارنده(جهت پیشگیری از خونریزی و خرابی مفاصل یا کاهش خونریزی) و با توجه به این که ژن درمانی برای هموفیلی B در فاز I و II کار آزمایی بالینی می‌باشد، لذا پیشگیری از بیماری مهم‌ترین گزینه است. بهترین موضع‌گیری در مقابل این بیماری و دیگر بیماری‌های ژنتیکی، تعیین ناقلین، تشخیص قبل از تولد و جلوگیری از به دنیا آمدن فرد مبتلا(پسر) می‌باشد.

برای شناسایی زنان ناقل دو راه وجود دارد:

۱- استفاده از روش‌های غیر مستقیم نظیر استفاده از مارکرهای پلی‌مرفیک(۲۵، ۲۴).

۲- روش مستقیم مثل تعیین توالی بعد از یک روش غربالگری یا بدون آن(۲۶).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10]

در بسیاری از مواقع، بیماری مارکرهای پلی‌مرفیک گویایی نداشته و یا به صورت تک موردی می‌باشد که در این صورت تعیین جهش در خانواده الزامی است. در روش مستقیم، یا کل ژن تعیین توالی شده و یا با استفاده از روش‌های غربالگری، حدود جهش در ژن شناسایی شده و سپس تنها همان ناحیه تعیین توالی می‌شود(۲). با توجه به تجربیات قبلی گروه بر روی تعیین موتاسیون ژن فاکتورIX، در ابتدا از روش غربالگری SSCP استفاده شد.

روش SSCP یک روش غربالگری مناسب، ارزان، در دسترس و با قدرت مانور بالا می‌باشد لذا در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.پس از انجام روش SSCP ویا هر روش غربالگری دیگر، معمولاً تعیین توالی بر روی همان قطعه‌ای که تغییر حرکت نسبت به نمونه نرمال نشان می‌دهد انجام می‌شود. با توجه به این که قبل از انجام توالی‌یابی DNA یک روش غربالگری انجام شده است، معمولاً یک بار توالی‌یابی کافی است.

بیمارانی که در SSCP تغییر الگوی حرکتی مشابهی را نسبت به نمونه نرمال نشان دادند، بعد از بررسی تعیین توالی آن‌ها، مشخص شد که هر دو یک نوع جهش را دارند که با توجه به داشتن هاپلوتایپ یکسان، احتمالاً جد مشترک داشته‌اند. حتی در غیر این صورت، ممکن است در دو فرد غیر خویشاوند، جهش مشابه ولی هاپلوتایپ متفاوت ناشی از جهش در محل‌های CpG باشد. به عبارتی اگر موتاسیون در محل‌های CpG واقع شود، لزومی ندارد هاپلوتایپ یکسان باشد. بنابراین بررسی هاپلوتایپ علاوه بر تشخیص ناقلین در خانواده‌ها، می‌تواند به یافتن منشاء جهش هم کمک کند.

با یافتن جهش‌های فاکتور IX انعقادی بیماران مبتلا به هموفیلی B ، شناسایی ناقلین در خانواده‌های بیماران با سرعت و دقت بیشتری امکان‌پذیر است. به علاوه همان طوری که در مقدمه اشاره شد، تولید مهارکننده فاکتور IX انعقادی، یکی از عوارض ناشی از درمان می‌باشد. با دانستن نوع جهش در فاکتور IX انعقادی می‌توان خطر بروز مهارکننده‌ها را تخمین زد. در موارد جهش‌های کدون ختم و یا تغییر چارچوب خواندن، به علت این که پروتئین فاکتور IX انعقادی به طور ناقص ساخته می‌شود، در سیستم ایمنی بدن نسبت به بعضی اپی‌توپ‌های آن تحمل ایجاد نمی‌شود و با درمان این بیماران با فاکتورهای انعقادی، احتمال تشکیل آنتی‌بادی مهار کننده بر علیه آن‌ها بیشتر از سایر جهش‌ها می‌باشد.

علاوه بر آن، این بیماری مدل مولکولی بسیار مناسبی برای بررسی ارتباط بین جهش‌ها با شدت بیماری و ساختار پروتئینی و نیز مدل بسیار مناسبی برای بررسی اسیدهای آمینه مهم در جایگاه‌های حساس در پروتئین مربوطه می‌باشد(۲۶). نوع جهش به دست آمده در هر بیمار، با شدت بیماری او مقایسه شد که در بیماران مورد مطالعه (آن دسته که جهش آن‌ها قبلاً در بانک اطلاعاتی هموفیلیB گزارش شده بود)، شدت بیماری مطابق با موارد گزارش شده در بانک اطلاعاتی بیماران هموفیلی B بود(۹).

نظر به این که یکی از جهش‌های جدید به دست آمده در این مطالعه Missense می‌باشد، با توجه به نوع تغییرات و محل تغییر در ساختار پروتئین فاکتور IX ، به توجیه وضعیت پرداخته و سعی شد شدت بیماری ارزیابی گردد. بنابراین با دیدگاه فوق، عواقب احتمالی جهش‌ها در سطح پروتئین فاکتور IX انعقادی و رابطه شدت بیماری و نوع جهش پیش‌بینی گردید.

در یکی از بیماران دارای جهش جدید، با ورود یک نوکلئوتید تیمین بعد از باز ۳۱۱۹۷ در موقعیت آمینواسید ۳۵۹، تغییری در این آمینواسید روی نمی‌دهد ولی با ایجاد تغییر چارچوب، منجر به ایجاد کدون خاتمه در اسید آمینه ۳۶۵ این پروتئین می‌شود(با توجه به این که توالی کدون‌های ۳۵۹ و ۳۶۰ به صورت GATTCA می‌باشد با ورود یک تیمین این توالی به GATTTCA تغییر می‌یابد). در این بیمار ایجاد کدون پایان زودرس در دومین کاتالیتیکی، سبب تشکیل ناقص پروتئین می‌شود و بیان پروتئین ناقص منجر به بیماری هموفیلی B شدید می‌گردد.

تنها موردی که جهش در ناحیه 3' UTR ژن روی داد، تغییر باز T 31440 A بود که این جهش تاکنون گزارش نشده است. چنین یافته‌ای احتمال بروز تغییر در نواحی شناساگر فاکتورهایی که در واکنش پلی‌مریزاسیون، دنباله Poly A دخالت می‌کنند را در انتهای 3' مطرح می‌نماید. این

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10]

دنباله خواص مختلفی را به mRNA می‌دهد که از جمله، تسهیل انتقال mRNA به سیتوپلاسم، تثبیت بعضی از mRNA ها در فضای سیتوپلاسم و تسهیل ترجمه با تقویت شناخته شدن mRNA توسط ماشین ریبوزومی است. دیده شده که حذف این قسمت، باعث کاهش بیان ژن مورد نظر می‌شود(۲۷).

دریک بیمار، جهشی در نواحی مورد بررسی ژن فاکتور IX به دست نیامد. این احتمال وجود داشت که تغییر در این بیمار می‌توانست در نواحی پروموتر، انتهای '۵ ژن یا جایگاه اضافه شدن پلی A در انتهای '۳ باشد، هر چند که با PCR ومتعاقب آن تعیین توالی این نواحی، نتیجه‌ای حاصل نشد. شاید جهش عامل ایجاد بیماری در این بیمار در اینترون‌های ژن فاکتور IX باشد که نیاز به طراحی آغازگرهای جدید و بررسی بیشتر است. این احتمالات را نیز باید در نظر گرفت که شاید دوپلیکاسیون و یا واژگونی در ژن فاکتور IX در این بیمار، علت بیماری باشد که جهت تشخیص نهایی بررسی‌های بیشتری مورد نیاز است.

به طور کلی جهش‌های عامل ایجاد بیماری هموفیلی B در ژن فاکتور IX بسیار پراکنده بوده که این مسأله نتایج تحقیقات قبلی در ایران و سایر کشورها را کاملاً تائید می‌کند(۲۸، ۱۱). از طرف دیگر با توجه به پیچیدگی‌های ساختاری پروتئین فاکتور IX انعقادی و داشتن نواحی فضایی مختلف، جهش‌هایی که در ژن فاکتور IX رخ می‌دهند، سبب تغییرات اسیدهای آمینه خاصی شده و سبب تنوع فنوتیپی مختلف می‌شوند که هر کدام باید جداگانه مورد ارزیابی قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

جهش‌های ژن فاکتور IX عامل بیماری هموفیلی B در بیماران مورد بررسی استان خراسان رضوی، متنوع و پراکنده می‌باشد. از اطلاعات به دست آمده در این تحقیق می‌توان برای تعیین ناقلین و تشخیص پیش از تولد موارد هموفیلی B استفاده کرد و با دانستن نوع جهش در فاکتور IX انعقادی، می‌توان خطر بروز مهارکننده‌ها را تخمین زد و بر این اساس درمان مناسب تجویز نمود(۲۹، ۱۱).

تشکر و قدردانی

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10]

References :

1- Beutter E, Cller B. Haemophilia A and B. In: Lichtman MA, Williams WJ. Williams Haematology. 7th ed. New York: McGraw Hill. 2005. p.1643-55.
2- Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. Mol Pathol 2002; 55(2): 127-44.
3- 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(12): 1498-503.
4- Bolton- Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. Lancet 2003; 361(9371): 1801-9.
5- Attali O, Vinciguerra C, Trzeciak MC, Durin A, Pernod G, *et al.* Factor IX Gene Analysis In 70 Unrelated Patients with Haemophilia B: Description of 13 New Mutations. Thromb Haemost 1999; 82(5): 1437-42.
6- Stamatoyannopoulos G. The Molecular Basis of Blood Diseases. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2001. p. 691-7.
7- Zabel BU, Baumann WA, Pirntke W, Gerhard-Ratschow K. Am J Hum Genet 1978; 1(3): 309-17.
8- Orstavik KH, Orstavik RE, Eiklid K, Tranebjaerg L. Inheritance of skewed X chromosome inactivation. Am J Med Genet 1996; 64(1): 31-4.
9- Haemophilia B data base of point mutations and short additions and deletion. Haemophilia B Mutation Database. Edition 13. Available from: URL: http: // www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html.
10- Sasanakul W, Chuansumrit A, Ajjimakorn S, Krasaesub S, Sirachainan N, Chotsupakarn S, *et al.* Cost-effectiveness in establishing haemophilia carrier detection a prenatal diagnosis services in a developing country with limited health resources. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2003; 34(4): 891-8.
11- 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. Thromb Res 2007; 120(1): 135-9.
12- Karimipoor M, Zeinali S, Safaee R, Lak M, Nafissi N. Carrier determination in a heamophilia B family using single strand conformation polymorphism (SSCP) and sequencing. Iranian Journal of Biotechnology 2004; 2(2): 132-5.
13- 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.
14- Giannelli F, Green PM, Sommer SS, Poon MC, Ludwig M, Schwaab R. Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions 7th ed. Nucleic Acids Res 1997; 25(1): 133-5.
15- Lillicrap D. The molecular basis of haemophilia B. Haemophilia 1998; 4(4): 350-7.
16- 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.
17- Montejo JM , Magallón M , Tizzano E , Solera J. Identification of twenty-one new mutation in the factor IX gene by SSCP analysis. Hum Mutat 1999; 13(2): 160-5.
18- Kamali Dolatabadi E, Karimipoor M, Samiee Sh, Kokabee L, Zinali S, Nafissi N, *et al*. Mutation analysis of coagulation factor IX gene in Esfahanian hemophilia B patients by SSCP and sequencing. Sci J Iran Blood Transfus Org 2007; 3(4): 299-308.
19- Bimal DM, Wallace AJ, Theophilus, Rapley R. SSCP. Hetroduplex analysis, PCR mutation detection protocols. Human Press Inc. Totowa, NewJersey. 2002; 16: 137-51.
20- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Sekyia T. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86(8): 2766-70.
21- Graham JB, Kunkel GR, Egilmez NK, Wallmark A, Fowlkes DM, Lord ST. The varying frequencies of five DNA polymorphism of X-linked coagulant factor IX in eight ethnic groups. Am J Hum Genet 1991; 49(3): 537-44.
22- de la Salle C, Wu Q, Baas MJ, Hanauer A, Ruan C, Cazenave JP. Common intragenic and extragenic polymorphisms of blood coagulation factors VIII and IX are different in Chinese and Caucasian populations. Clin Genet 1990; 38(6): 434-40..
23- Smith KJ, Thompson AR, McMullen BA, Frazier D, Lin SW, Stafford D, *et al*. Carrier testing in hemophilia B with an immunoassay which distinguishes a prevalent factor IX dimorphism. Blood 1987; 70(4): 1006-13.
24- Belvini D, Salviato R, Radossi P, Pierobon F, Mori P, Castaldo G, *et al*. Molecular genotyping of the Italian cohort of patients with haemophilia B. Haematologica 2005; 90(5): 635-42.
25- 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.
26- 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): 416-8.
27- De la sale, Wu Q, Baas MJ. A deletion locatedin the 3' nontranslated part of the factor IX gene responsible for mild haemophilia B. Thromb haemost 1993; 70: 370. [letter].
28- Enayat MS, Karimi M, Chana G, Farjadian S, Theophilus BD, Hill FG. Mutation analysis in FIX gene of 17 families with haemophilia B from Iran. Haemophilia 2004; 10(6): 751-5.
29- Montandon AJ, Green PM, Bentley DR, Ljung R, Nilsson IM, Giannelli F. Prenatal and molecular diagnosis of haemophilia B. Am J Hematol 1996; 52(4): 243-7.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10]

Original Article

Molecular analysis of coagulation factor IX gene in hemophilia B patients of Khorasan Razavi province

Karimi N.Kh.[1,2], Kokabee L.[1], Badiee Z.[3], Shahabi M.[4,5], Banihashem S.A.[3], Zeinali S.[1,6], Parivar K.[2], Karimipoor M.[1]

[1]*Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*
[2]*Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[3]*Dr.Sheikh Hospital, Mashad University of Medical Sciences, Mashad, Iran*
[4]*Research Center of Iranian Blood Transfusion Organization, Tehran, Iran*
[5]*Mashad Regional Educational Blood Transfusion Center, Mashad, Iran*
[6]*Kosar Human Genetic Research Center, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Hemophilia B, Christmas disease, is an X-linked recessive bleeding disorder caused by the functional deficiency of blood coagulation factor IX (FIX). The disease is caused by heterogeneous mutations in the factor IX gene (factor IX). FIX is a vitamin K-dependent glycoprotein that plays a key role in the coagulation cascade. The aim of this study was to make molecular analysis of factor IX gene and evaluate genotype-phenotype correlation in 14 hemophilia B patients from Khorasan Razavi province.

Materials and Methods

Fourteen unrelated hemophilia B patients were included in the study. The patients had high PTT, normal PT, low factor IX activity (less than 30%), and normal FVIII activity. After obtaining informed consent, genomic DNA was extracted from the peripheral blood leukocytes by standard methods. Polymerase chain reaction (PCR) and single strand conformation polymorphism (SSCP) were performed to obtain a full scan of all functionally important regions of the FIX gene. DNA sequencing was done on samples with a definite band shift in SSCP. In addition, Haplotypes were constructed using four markers (DdeI, TaqI, MnlI and HhaI).

Results

The sequencing results showed 9 missenes mutations, 3 stop codons, and 1 insertion. Two of the mutations not having been reported in the database so far were novel. Malmo polymorphism (Ala148Thr) was found in two patients.

Conclusions

This study confirms the heterogeneity of factor IX gene mutations in northeast hemophilia B patients. The obtained data could be used both in tracking female carriers in families and in making decisions about prenatal diagnosis.

Key words: Hemophilia B, SSCP, Mutation, Factor IX
Sci J Iran Blood Transfus Org 2010; 7(1): 17-26

Received: 11 Jul 2009
Accepted: 1 Feb 2010

Correspondence: Karimipoor M., PhD of Medical Biotechnology. Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran. Pasteur St, No. 69.
Postal code: 1316943551, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 66480780; Fax : (+9821) 66480780
E-mail: *mortezakarimi@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10]