

بررسی دو حذف ژنی موسوم به لپور و هندی - آسیایی در کلاستر ژن بتا گلوبین به صورت PCR دو گانه

فائزه رحیمی نژاد^۱، راحله علی محمدی^۲، پانتی فولادی^۳، سمیرا فروغی^۴، مرضیه فیض پور^۱، رقیه وحیدی^۱، مریم هاشمی^۱،
فائزه ملازاده^۱، معصومه حیدری^۱، مهدی دیلم صالحی^۳، سیروس زینلی^۴

چکیده

سابقه و هدف

بتا تالاسمی یکی از شایع ترین بیماری های تک ژنی در دنیا است. اکثر موتاسیون های عامل بتا تالاسمی، از نوع نقطه ای هستند ولی در بعضی از موارد، موتاسیون ها سبب حذف بزرگ در کلاستر ژن بتا گلوبین می شوند. هدف از این مطالعه، تشخیص و بررسی دو حذف ژنی معروف به هندی - آسیایی و لپور به شیوه دوپلکس می باشد که سبب پاسخگویی سریع تر به مراجعین و بیماران می شود.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. تحقیق بر روی ۳ نمونه حذف هندی - آسیایی و ۱۰ نمونه لپور انجام شد. در این تحقیق، بعد از اطمینان از وجود حذف لپور و هندی - آسیایی در نمونه های مورد مطالعه، سعی در تنظیم کردن Gap-PCR مربوط به شناسایی این دو حذف به صورت دوگانه (duplex) شد. PCR با استفاده از ۸ عدد آغازگر در دمای آنیلینگ ۶۸ درجه سانتی گراد با غلظت مورد نظر تنظیم شد و با شرایط ایجاد شده، به خوبی این دو حذف در یک واکنش قابل تشخیص بود.

یافته ها

با توجه به بررسی های انجام شده با روش Gap PCR، نتایج ژل ها به صورت مولتی پلکس نشان داد که این دو حذف و باندهای اختصاصی مربوط به هر حذف، در یک PCR مولتی پلکس قابل ردیابی است.

نتیجه گیری

با توجه به اهمیت بررسی به روش مولتی پلکس، بررسی حذف های ژنی زنجیره بتا برای دو حذف لپور و هندی - آسیایی به صورت هم زمان، سریع، مطمئن و به راحتی قابل انجام است. این روش با توجه به صرفه جویی در وقت و مواد مصرفی به صرفه تر می باشد.

کلمات کلیدی: بتا تالاسمی، بتا گلوبین ها، حذف ژنی

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۲۵

تاریخ پذیرش: ۸۹/ ۷/ ۶

۱- کارشناس زیست شناسی - مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر

۲- دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی - دانشگاه علوم تحقیقات دانشگاه آزاد تهران

۳- کارشناس زیست شناسی سلولی و مولکولی - مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر

۴- مؤلف مسئول: PhD ژنتیک انسانی - مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر - صندوق پستی: ۱۳۱۸۵-۱۶۶۷

مقدمه

بتا تالاسمی، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تک ژنی در منطقه مدیترانه، شبه قاره هند، خاورمیانه و آسیای شرقی می‌باشد. بیماران مبتلا به بتا تالاسمی ماژور، می‌بایست هر ماه خون دریافت کنند. بتا تالاسمی مینور نیاز به درمان خاصی ندارد ولی تشخیص و غربالگری آن به ویژه مشاوره ژنتیک قبل از ازدواج، جهت پیشگیری از تولد کودک مبتلا بر اثر ازدواج دو ناقل بتا تالاسمی مینور، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در ایران نزدیک به ۲ میلیون ناقل بتا تالاسمی و حدود ۱۵۰۰۰ فرد مبتلا به بتا تالاسمی ماژور گزارش شده است (۱). غربالگری داوطلبین ازدواج از سال ۱۳۷۶ در کشور اجباری شده است. در برنامه کشوری مهار تالاسمی، زوج ناقل به یکی از چندین آزمایشگاه ژنتیک پزشکی در کشور جهت بررسی موتاسیون‌ها و امکان تشخیص قبل از تولد معرفی می‌شوند.

بیش از ۲۰۰ موتاسیون مختلف در مورد بتا تالاسمی گزارش شده است که در هر جمعیت، موتاسیون‌های خاصی وجود دارد. از این ۲۰۰ نوع موتاسیون، تعداد قابل ملاحظه‌ای مربوط به جهش‌های حذفی هستند. این حذف‌ها از حدود چند جفت باز تا چند کیلو باز از خوشه ژنی بتا گلوبین را پوشش می‌دهند (۲).

بیشتر این حذف‌ها منجر به حذف قسمت یا تمامی خوشه ژنی بتا و تمامی این حذف‌ها منجر به فوتیپ تالاسمی می‌شود. اهمیت این حذف‌های ژنی کمتر از سایر جهش‌های مولکولی ژن بتا نمی‌باشد اما مطالعه‌ها و دانستنی‌ها در مورد این جهش‌ها اندک و مطالعه‌هایی که به بررسی این حذف‌ها مرتبط شود، بیش از پیش لازم است. این حذف‌ها ممکن است ژن‌های β ، δ و حتی گاما را تحت تاثیر قرار دهند و سبب کاهش ($\delta\beta^+$) و یا فقدان ($\delta\beta^0$) زنجیره‌های β و δ شوند.

در میان حذف‌های ژنی در بتا گلوبین، چندین حذف به علت نوترکیبی‌های جدید ایجاد می‌شود. در نوترکیبی به علت کراسینگ اور، در یک سری از ژن‌های به هم پیوسته، یک شکستی ایجاد شده و پس از به هم پیوستگی دوباره ژن‌ها، یک ترکیب جدید از ژن‌های به هم پیوسته قبلی به وجود می‌آید. در این شرایط، ژن قبلی در اکثر موارد

شکسته شده و یا آن خوشه ژنی غیر فعال می‌شود.

حذف هندی - آسیایی (Asian - Indian) یکی از این نوع حذف‌ها است که در سال ۱۹۸۱ جونز و همکارانش در یک بیمار هندی ناقل تالاسمی از نوع $(\gamma\delta\beta)^0$ پیدا کردند.

در این نمونه، نقص ژنی سبب دو حذف کوچک در دو طرف یک منطقه معکوس شده بین ژن‌های بتا و گاما گلوبین می‌شد. این اولین گزارش حذف و وارونه‌شدگی در انسان بود. نام این حذف - معکوس‌شدگی، به هندی - آسیایی معروف شد. در این نقص ژنی، حذف اول در ۸۳۴ جفت باز از IVS2 ژن γ تا اگزون 3 این ژن رخ می‌دهد.

حذف دوم در حدود ۷/۴۶ کیلو باز می‌باشد که از اگزون ۳ ژن δ تا منطقه UTR ۳' ژن بتا ادامه می‌یابد. این حذف فقط در افراد ناقل از منطقه خاورمیانه و شبه قاره هند گزارش شده است. در این افراد علاوه بر ژن‌های بتا و دلتا، ژن γ نیز حذف می‌شود. در نتیجه هموگلوبین جنینی این افراد، فقط زنجیره γ را تولید می‌کند. مقدار HbF این افراد نیز بالا می‌باشد (۳).

نوترکیبی دیگری نیز وجود دارد که هموگلوبین لپور (Lepore) را تولید می‌کند. هموگلوبین لپور اولین بار در سال ۱۹۵۸ به عنوان یک ساختمان هموگلوبینی که سبب فنوتیپ تالاسمی می‌شود معرفی شد (۴).

در سال ۱۹۶۱، باگلیونی و همکارانش توانستند ساختمان این زنجیره را که از ادغام بین ژن‌های دلتا و بتا ایجاد می‌شود، تشخیص دهند. علت ایجاد این حذف، نوترکیبی نامساوی همولوگوس و طول مقدار حذف شده، در حدود ۷/۴ کیلو باز بود (۵).

حداقل تا به حال سه نوع هموگلوبین پور شناسایی شده است (Baltimore, Hollandia, Washington Boston). تفاوت این سه هموگلوبین به علت تفاوت در محل شکستگی، جهت ایجاد کراسینگ اور می باشد که سبب ایجاد ژن ادغام می شود (۲).

لازم به ذکر است در الکتروفورز هموگلوبین، هموگلوبین D ، G و پور هر سه با هم نشان داده می‌شود و به صورت افتراقی نشان داده نمی‌شود. در نتیجه برای اطمینان از وجود هموگلوبین پور، حتماً باید از روش‌های مولکولی استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

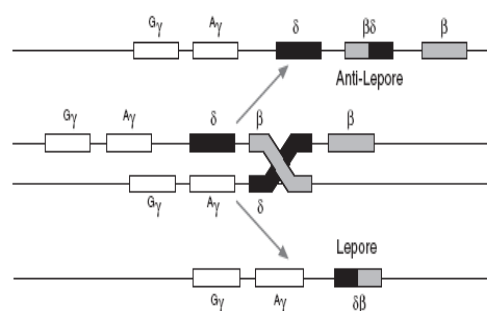
مطالعه انجام گرفته از نوع تجربی - کاربردی بود. در این تحقیق، نمونه‌ها با توجه به اندکس‌های خونی و نتایج آزمایش‌های هماتولوژی از میان افراد مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی کوثر، برای بررسی‌های مولکولی مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌ها از میان افرادی که نتیجه اندکس‌های خونی غیر طبیعی داشتند، (مقدار $MCV < 80\text{fl}$ ، $MCH < 27\text{pg}$ ، هموگلوبین A2 نرمال و HbF افزایش یافته و یا نرمال) انتخاب شدند. در این مطالعه، از اشخاصی که دارای حذف قطعی بودند به عنوان کنترل مثبت و تعدادی از افراد سالم تحت عنوان کنترل منفی استفاده گردید. DNA مورد نیاز از گلبول‌های سفید خون محیطی استخراج شد. سپس با استفاده از روش ARMS، به بررسی حذف‌های نقطه‌ای شایع در ایران پرداخته شد. نمونه‌هایی که حذف نقطه‌ای نداشتند، با روش GAP-PCR برای وجود یا عدم وجود حذف، مورد بررسی قرار گرفتند.

تعداد نمونه‌های دارای حذف ۷۵ نفر بود که ۳ نفر دارای حذف هندی - آسیایی و ۱۰ نفر دارای حذف لپور بودند. ادامه کار در نمونه‌های دارای حذف‌های لپور و هندی - آسیایی پیگیری شد. سپس برای تنظیم PCR دوپلکس، نمونه‌ها با آغازگرهای مخصوص تشخیص این دو حذف با توجه به مقاله کریچ مورد بررسی قرار گرفتند (۱۰) (جدول ۱).

جدول ۱: توالی آغازگرهای استفاده شده در PCR، آغازگرهای H مربوط به بررسی حذف هندی - آسیایی و آغازگرهای E مربوط به بررسی حذف لپور می‌باشد.

	توالی آغازگرهای بررسی حذف
H1	ATGCCATAAAGCACCTGGATG
H2	GAGCTGAAGAAAATCATGTGTGA
H3	TAACCATATGCATGTATTGCC
H4	CAATGTATCATGCGCTCTTTGCAC
H5	GCAGCCTCACCTTCTTTTCATGG
E1	GACACACATGACAGAACAGCCAAT
E2	CGATCTTCAATATGCTTACCAAG
E3	CATTCTGCTGTTTCCCATTTCTA

در بررسی حذف لپور، از آغازگرهای E1 و E3 به عنوان آغازگرهایی که باند موتان را با طول ۷۷۷ جفت باز نشان می‌داد و از آغازگرهای E2 و E3 به عنوان



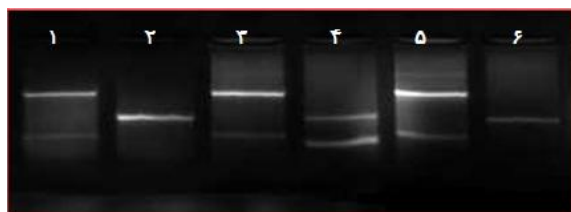
شکل ۱: نحوه ایجاد هموگلوبین لپور و آنتی‌لپور (۶)

برای بررسی این حذف‌ها از دو روش مستقیم و غیر مستقیم استفاده می‌شود. در روش غیر مستقیم، از نتایج گویایی و یا عدم گویایی RFLP در سه منطقه $Hinf1\beta$ ، $Ava2\beta$ و β^3 استفاده بیشتر می‌شود. در روش مستقیم، از روش‌های MLPA، Real-time PCR و Gap PCR برای تشخیص حذف‌ها استفاده می‌شود. روش Gap-PCR، روشی ساده، سریع و ارزان می‌باشد. این روش برای شناسایی حذف‌های شناخته شده $\delta\beta$ - تالاسمی، هموگلوبین لپور و انواع موتاسیون‌های حذفی تداوم ارثی هموگلوبین جنینی (HPFH) 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 (۷).

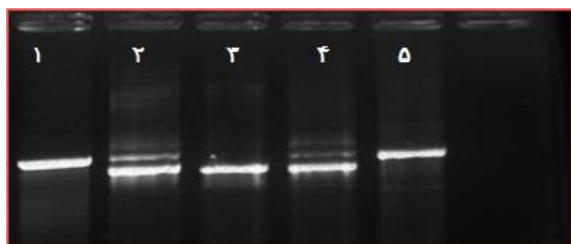
برای تشخیص حذف‌های ناشناخته، باید از روش‌های MLPA و Real-Time استفاده کرد. با استفاده از روش MLPA، با نزدیک ۴۰ پروب به ردیابی منطقه حذف پرداخته می‌شود، ولی حدود دقیق حذف با این روش قابل شناسایی نمی‌باشد (۸، ۹). Real-time دارای محدودیت مشابه و حتی بیشتر است یعنی با این روش، محدوده حذف باید مشخص شده باشد. بعد از مشخص شدن محل حذف، می‌توان برای آن آغازگرهای اختصاصی طراحی کرد. هدف این مطالعه، تشخیص و بررسی دو حذف ژنی معروف به هندی - آسیایی و لپور به شیوه دوپلکس بود. این دو حذف از حذف‌های شناخته شده می‌باشد و نیازی به بررسی با دو روش Real-Time و MLPA ندارد و با بررسی دوپلکس این دو حذف، بررسی با سرعت عمل بیشتر و هزینه کمتر قابل انجام است.



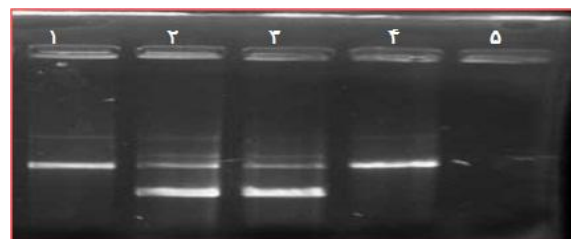
شکل ۲: در چاهک ۱ و ۲ کنترل نرمال، چاهک ۳ و ۴ فرد هتروزیگوت لپور و ۵ و ۶ و ۷ و ۸ نمونه فرد هتروزیگوت می باشد.



شکل ۳: چاهک شماره ۱ و ۲ نمونه فرد نرمال، ۳ و ۴ نمونه فرد هتروزیگوت هندی - آسیایی و نمونه ۵ و ۶ نمونه نرمال می باشد.



شکل ۴: فرد ناقل لپور، از سمت چپ نمونه ۱ فرد نرمال، فرد شماره ۲ هتروزیگوت، فرد شماره ۳ هموزیگوت، فرد شماره ۴ هتروزیگوت لپور و شماره ۵ نیز فرد نرمال می باشد.



شکل ۵: بررسی حذف هندی - آسیایی، چاهک شماره ۱ نرمال، شماره ۲ هتروزیگوت، شماره ۳ نیز هتروزیگوت و چاهک شماره ۴ نمونه فرد نرمال است.

در مرحله آخر به بررسی حذف ها به صورت دوپلکس پرداخته شد. به این معنا که آغازگرهای موتان و نرمال

آغازگرهایی که باند نرمال را به طول ۹۱۵ جفت باز تکثیر می کرد، استفاده شد. در بررسی حذف هندی - آسیایی نیز H5 و H4 باندی به طول ۶۶۵ جفت باز و H2 و H1 باندی به طول ۱۱۹۵ جفت باز را در فرد طبیعی ایجاد می کنند. آغازگرهای H3 و H1، قطعه موتان با طول ۳۲۷ و آغازگرهای H5 و H2، قطعه موتان به طول ۳۷۱ جفت باز ایجاد می نمایند. در بررسی حذف های لپور و هندی - آسیایی چه به صورت جداگانه و چه به صورت دوپلکس، PCR با شرایط زیر انجام شد: ۳ دقیقه دناتراسیون در دمای ۹۳°C، ۱ دقیقه دناتراسیون در دمای ۹۳°C، ۱ دقیقه آنیلینگ در دمای ۶۸°C، ۱ دقیقه اکستنشن در دمای ۷۲°C و ۲ دقیقه اکستنشن اضافی در دمای ۷۲°C.

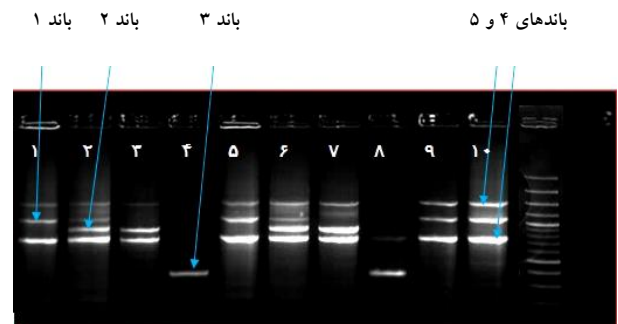
یافته ها

از کل مراجعین به آزمایشگاه که ناقل تالاسمی بودند، ۳ نفر ناقل حذف از نوع هندی - آسیایی و ۱۰ نفر ناقل حذف لپور بودند. این حذف ها بعداً توسط همکاران با روش MLPA تایید شد.

نمونه DNA این افراد ابتدا به صورت جداگانه برای هر حذف مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا به این صورت که برای هر نمونه دو تیوب در نظر گرفته شد، آغازگرهای مربوط به تکثیر قطعه موتان در تیوب اول و آغازگرهای مربوط به تکثیر قطعه نرمال در تیوب دوم ریخته شد. در صورتی که فرد نرمال باشد فقط قطعه مربوط به تکثیر قطعه نرمال، در ژل قابل رؤیت می باشد (چاهک ۱ و ۲ از شکل ۲). در تیوب های ۳ و ۴ به علت هتروزیگوت بودن در چاهک ۳، قطعه موتان تکثیر شد (با طول ۷۷۷ جفت باز) که با اختلاف کمی پایین تر از قطعه نرمال (چاهک ۴ با طول ۹۱۵ جفت باز) قرار گرفت. این بررسی دو تیوبی، برای حذف هندی - آسیایی نیز صورت گرفت که در فرد هتروزیگوت باند موتان قابل تشخیص است (شکل ۳).

پس از بررسی دو تیوبی، به بررسی تک تیوبی نیز پرداخته شد. به این نحو که آغازگرهای نرمال و موتان مربوط به حذف های لپور و هندی - آسیایی (هر کدام جداگانه) یک جا به نمونه اضافه شد (شکل های ۴ و ۵).

مربوط به هر دو حذف یک جا و در یک تیوب ریخته شد (شکل ۶). در واقع آن چه در این شکل دیده می شود، هدف تحقیق می باشد که به طور واضح، باندهای مربوط به هر حذف قابل ردیابی است.



شکل ۶: چاهک شماره ۱ نرمال، شماره ۲ هترو لپور، شماره ۳ همولپور، شماره ۴ هندی - آسیایی، شماره ۵ نمونه نرمال، شماره ۶ هترو لپور، ۷ همولپور، شماره ۸ هندی - آسیایی و شماره های ۹ و ۱۰ نرمال هستند. باند ۱ باند نرمال، باند ۲ باند مربوط به لپور، باند ۳ باند مربوط به حذف هندی - آسیایی و باندهای ۴ و ۵ باندهای غیر اختصاصی هستند. چاهک آخر نیز سایز مارکر ۱۰۰ می باشد.

بحث

حذف های ژن آلفا - گلوبین روی کروموزوم ۱۳/۳ p ۱۶، در ۸۰ تا ۹۰ درصد موارد، علت اصلی مولکولی آلفا تالاسمی می باشد. اما نوترکیبی ها در خوشه ژنی بتا گلوبین روی کروموزوم ۱۵/۴ p ۱۱، علت فقط ۱۰ درصد از بتا تالاسمی ها است. در دنیا بیش از ۵۰ حذف مربوط به آلفا تالاسمی و ۶۰ حذف مربوط به بتا تالاسمی شناخته شده است. در واقع شیوع حذف ها در آلفا تالاسمی خیلی بیشتر از بتا تالاسمی است (۱۱). با توجه به این شیوع کم حذف ها در بتا تالاسمی، هیچ گزارشی از بررسی به صورت مولتی و یا دوپلکس از این حذف ها داده نشده است. اما باید به این نکته توجه کرد که بعد از بررسی موتاسیون های نقطه ای که علت اصلی بتا تالاسمی می باشد، به بررسی حذف ها در این ژن می پردازند و اگر بتوان تمام حذف های شایع در ایران را با هم بررسی کرد، مسلماً دستاورد علمی مهمی است که تمام آزمایشگاه های تشخیص طبی می توانند برای صرفه جویی در وقت و هزینه از آن استفاده کنند. با توجه به این که بررسی چندین حذف آلفا در حال حاضر به

سهولت انجام می شود، این کار گشایشی در شروع راه اندازی بررسی حذف های بتا به صورت مولتی است. لازم به ذکر است با توجه به روش های مختلف برای تشخیص حذف ها از جمله MLPA، Real Time و Gap-PCR، مسلماً تشخیص با روش Gap-PCR ارزان تر و سریع تر می باشد. پس بهینه سازی این روش در تشخیص حذف ها مهم به نظر می رسد. باید در نظر گرفت که با روش MLPA، تعداد کثیری از حذف ها قابل ردیابی است ولی با روش Real-Time، فقط حذفی که در محدوده آغازگر است قابل شناسایی می باشد. روش MLPA که دارای حداقل ۴۰ پروب برای بررسی کلاستر ژن بتا است، به بررسی حذف ها در یک محدوده می پردازد و ارزش و کارایی بالایی دارد. ولی باید این مساله را در نظر گرفت که روش MLPA، صرفاً به بررسی حذف ها بدون دادن اطلاعات از نوع حذف می پردازد. حسن استفاده از روش GAP-PCR در بررسی حذف ها چه به صورت جداگانه و چه به صورت مولتی پلکس این است که با توجه به شناخت حذف های شایع در منطقه ایران، می توان با هزینه خیلی کمتر از هزینه روش MLPA، به بررسی این حذف ها پرداخت. البته لازم به ذکر است که حذف هندی - آسیایی، شیوع زیادی در ایران ندارد ولی دو حذف لپور و Sicilian، از حذف های نسبتاً شایع تر در ایران هستند. در ضمن در بررسی انجام شده، هیچ گزارشی از روش بررسی دو حذف هندی - آسیایی و لپور به طور هم زمان تا به حال داده نشده است.

نتیجه گیری

در بررسی به صورت مولتی پلکس به علت این که باید از چندین جفت آغازگر استفاده شود، مشکلات خاصی وجود دارد. هماهنگ کردن دمای آنیلینگ و سایر دماهای PCR، کار دشواری است چون طراحی آغازگرهای زیادی که بتواند در تمام این دماها هماهنگی داشته باشد و یا این که آغازگرها خود با هم دایمر ندهند، کار وقت گیر و به نسبت پیچیده ای است.

در این بررسی از ۸ عدد آغازگر استفاده شده و آغازگرها از ابتدا طبق مقاله کریج، برای بررسی حذف به

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مساعدت و همکاری کلیه بیماران و خانواده‌های آن‌ها و نیز هم یاری تمام همکاران در آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

صورت جداگانه طراحی شدند، ولی برای بررسی به روش مولتی، از همان آغازگراها استفاده شد و بعد از بررسی‌های زیاد PCR به صورت مولتی پلکس، توانستیم دمای مناسب و مقدار آغازگرهای لازم را برای بررسی این دو حذف، پیدا کنیم.

References :

- 1- Abolghasemi H, Amid A, Zeinali S, Radfar MH, Eshghi P, Rahiminejad MS, *et al.* Thalassemia in Iran: Epidomology, Prevention, and management. J Pediatr Hematol Oncol 2007; 29(4): 233-8.
- 2- Weatherall DJ, Clegg JB. Weatherall DJ. The thalassaemia syndromes. 4th ed. Oxford: Wiley-blackwell; 2001. p. 151.
- 3- Jones RW, Old JM, Trent RJ, Clegg JB, Weatherall DJ. Major rearrangement in the human-globin gene cluster. Nature 1981; 291: 39-44.
- 4- Gerald PS, Diamond LK. The diagnosis of thalassemia trait by starch block electrophoresis of the hemoglobin. Blood 1958; 13(1): 61-9.
- 5- Baglioni C. The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. Proc Natl Acad Sci U S A 1962; 48: 1880-6.
- 6- Trent RJ. Diagnosis of the haemoglobinopathies. Clin Biochem Rev 2006; 27(1): 27-38.
- 7- Babashah S, Jamali S, Mahdian R, Hayat Nosaeid M, Karimipoor M, Maryami F, *et al.* Accurate detection of unknown deletions in Beta-Globin gene cluster in beta thalassemia carriers using Real-time PCR and MLPA. Sci J Iran Blood Transfus Org 2009; 5(4): 247- 55. [Article in Farsi]
- 8- Alimohammadi R, Raeisi M, Ebrahimi A, Fallah S, Kianfar S, Massudifar M, *et al.* Comparison of MLPA method for detection of known and unknown deletions in Beta globin gene cluster with old methods (Real-Time, RFLP, Gap-PCR). Qom Medical University Journal 2009; 4(8): 5-10. [Article in Farsi]
- 9- 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.
- 10- Hartevelde 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.

Original Article

Detection of the Lepore and Asian-Indian beta-globin gene deletions with duplex-PCR

**Rahimi Nezhad F.¹, Ali Mohammadi R.², Fuladi P.¹, Foroughi S.¹, Feiz Pour M.¹,
Vahidi R.¹, Hashemi M.¹, Mola Zadeh F.¹, Heidari M.¹, Deilam Salehi M.¹, Zeinali S.¹**

¹Kowsar Human Genetics Research Center, Tehran, Iran

²Science and Research Center of Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Beta-thalassemia is one of the most common single-mutation diseases. These mutations cause decreased beta-globin protein synthesis or even deletion. Most of the mutations in beta-globin gene are point mutations but there are some small and big deletions in beta-globin gene cluster. The goal of this research is to detect and study two deletions (Lepore, Asian-Indian) with duplex-PCR.

Materials and Methods

This study was done on 3 Asian-Indian deletion samples and 10 Lepore samples. After detecting two deletions (Lepore and Asian-Indian), we started setting Gap-PCR in these two known deletions. Duplex-PCR with 8 different primers for detecting Lepore and Asian-Indian deletions simultaneously was set at 68°C annealing temperature; these two deletions can be detected easily in one reaction with this new method.

Results

The results show that detecting Lepore and Asian-Indian deletions with multiplex PCR is practical, and the specific bands for each deletion are detectable.

Conclusions

Detecting these two deletions in one reaction (Duplex-PCR) is practical. This method is easy, reliable, and fast; it is also economical and saves both time and money.

Key words: Beta-thalassemia, Beta-globins, Gene deletion

Sci J Iran Blood Transfus Org 2011; 7(4): 214-220

Received: 16 Dec 2009

Accepted: 28 Sep 2010

Correspondence: Zeinali S., PhD of Human Genetics, Kowsar Human Genetics Research Center.

P.O.Box: 13185-1667, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 66506801; Fax : (+9821) 88939141

E-mail: zeinali@kawsar.ir