

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

سارا علوی^۱، شیرین شهبازی^۲، رضا مهدیان^۳، احمد رضا کامیاب^۴، محمد علی شکرگزار^۵

چکیده

سابقه و هدف

بیماری فون ویلبراند نوع ۳، یک بیماری ارثی همراه با علائم خونریزی دهنده می باشد. این بیماری با توارث اتوزومال مغلوب در مناطقی که نرخ ازدواج های خویشاوندی بالا است، شیوع بیشتری نشان می دهد. نشان داده شده است که جهش Q793X ایجادکننده بیماری فون ویلبراند نوع ۳، در آگزون ۱۸ فراوانی بیشتری در جمعیت ایرانی دارد. لذا به منظور بررسی جهش مذکور در بیماران ایرانی، دو روش مولکولی جدید به کار گرفته شد.

مواد و روش ها

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

یافته ها

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

نتیجه گیری

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

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

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۰

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۲

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی - مؤسسه آموزش عالی خاتم - تهران - ایران

۲- مؤلف مسؤول: PhD ژنتیک - استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱

۳- PhD بیوتکنولوژی پزشکی - استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران

۴- کارشناس ارشد ژنتیک - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران

۵- PhD بیوتکنولوژی پزشکی - دانشیار بانک سلولی - انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران

مقدمه

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

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

است (۶).

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

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

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

پذیرفت، مقایسه گردید.

مواد و روشها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. در این مطالعه جمعا ۱۵ بیمار مورد بررسی قرار گرفتند. بیماران مبتلا به بیماری فون ویلبراند نوع ۳ و دارای سطح غیر قابل ردیابی از آنتی ژن vWF ($< 5 \text{ IU/dL}$) بودند. پس از اخذ رضایت کتبی از بیماران، نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی سیترات یا EDTA (Ethylendiamine tetra acetic acid) تهیه شده و برای ارزیابی‌های انعقادی و بررسی ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج DNA:

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

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

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

طراحی جفت آغازگرها با استفاده از نرم‌افزارهای Gene Runner® و Primer Express® و بر اساس توالی ژن vWF بر روی کروموزوم شماره ۱۲ انجام شد. پس از انتخاب

جفت آغازگرها به منظور اطمینان از ویژگی آن‌ها در اتصال به ناحیه مکملی خود در ژن مربوطه، توالی آغازگرها با تمامی توالی ژنوم انسان در پایگاه اطلاعاتی Gene Bank، مقایسه گردید. به منظور افزایش ویژگی جفت آغازگرهای اصلی، علاوه بر عدم تطابق انتهای ۳، در سومین باز انتهای ۳ هر دو آغازگر، یک باز تغییر داده شد تا از اتصال احتمالی آن آغازگر به آلل مخالف ممانعت به عمل آید (جدول ۱).

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

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

TETRA PRIMER ARMS PCR:

در اولین مرحله، به منظور اطمینان از عملکرد صحیح آغازگرها، واکنش PCR با استفاده از غلظت‌های مختلف بر روی نمونه‌های شناخته شده نرمال و بیمار انجام شد. جهت تعیین غلظت بهینه DNA الگو، شیب غلظتی DNA نیز مورد بررسی قرار گرفت. طیف بررسی شده از غلظت DNA، محدوده $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ تا $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ را در بر می‌گرفت.

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

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

تعیین توالی DNA:

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

یافته ها

نتایج بررسی های ARMS-PCR:

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

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

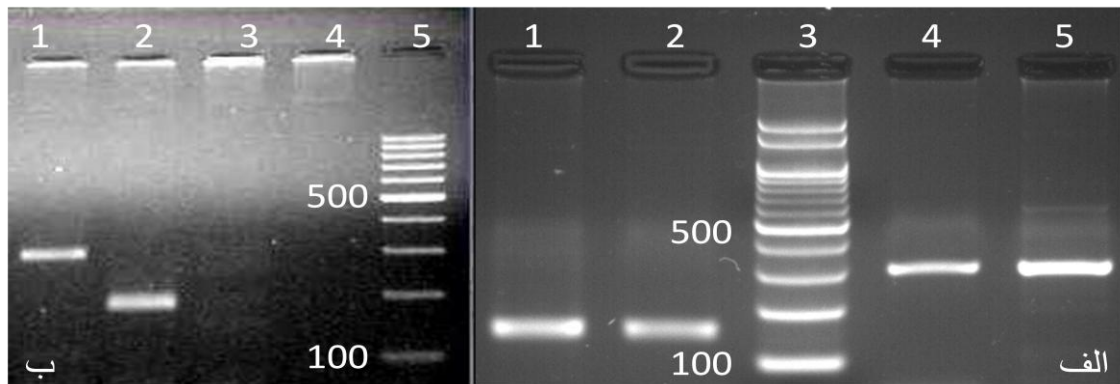
علاوه بر بررسی های فوق، واکنش ها به صورت مولتی پلکس هم بررسی شدند. به این منظور که در PCR هم زمان از هر چهار آغازگر با غلظت های بهینه شده

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

آزمایش Real-time PCR:

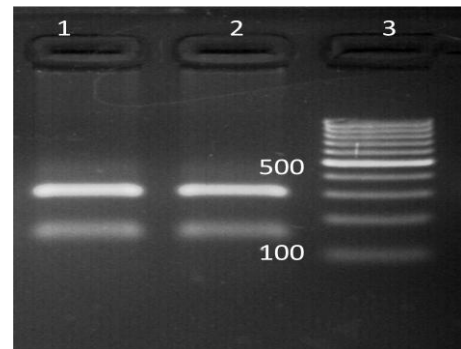
در این مطالعه، علاوه بر بررسی نمونه ها با روش PCR معمولی، از روش پیشرفته تر Real-time PCR نیز استفاده شد. طراحی آغازگرها به صورتی انجام شد که قابلیت استفاده در هر دو روش را دارا باشند. لذا مراحل بهینه سازی واکنش ها به صورت مشترک انجام شد و نمونه ها با هر دو روش بررسی شدند. مواد زیر اجزای تشکیل دهنده واکنش Real-time PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بودند:

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



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

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



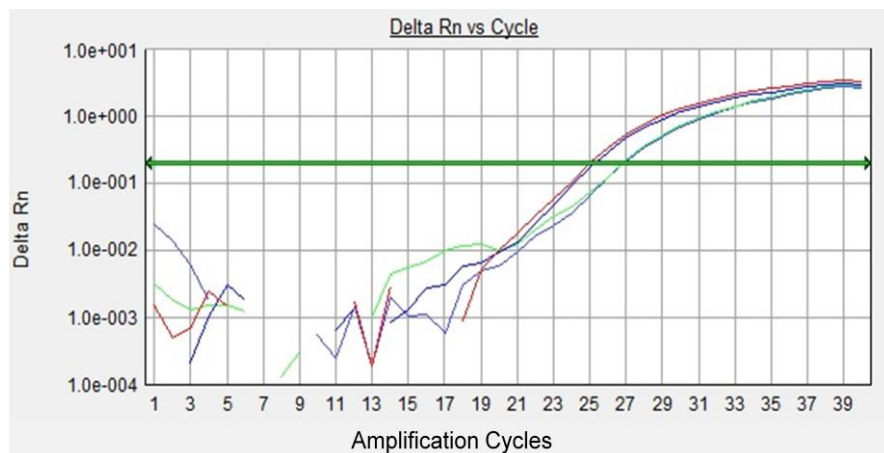
شکل ۲: آنالیز ژل الکتروفورز برای واکنش مولتی‌پلکس در نمونه دارای جهش Q793X به صورت هموزیگوت. ۱ و ۲: در هر واکنش، دو باند در محدوده کنترل (۲۹۲ bp) و جهش‌یافته (۱۸۶ bp) قابل مشاهده است. ۳: سایز مارکر با اندازه ۱۰۰ جفت باز.

نتایج بررسی‌های Real-time PCR:

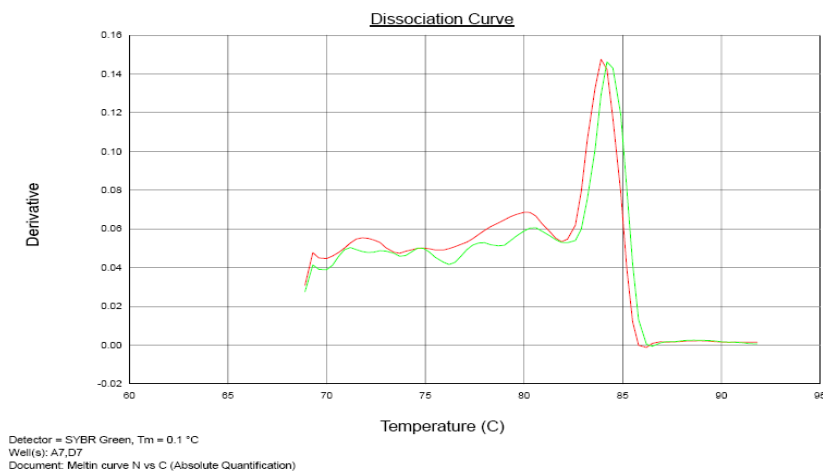
بهینه‌سازی واکنش‌ها: رقت‌هایی از DNA الگو با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۶۰، ۷۵ و ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر به صورت دوتایی برای هر واکنش در چاهک‌های متفاوت آزمایش شد. با توجه به منحنی تکثیر

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

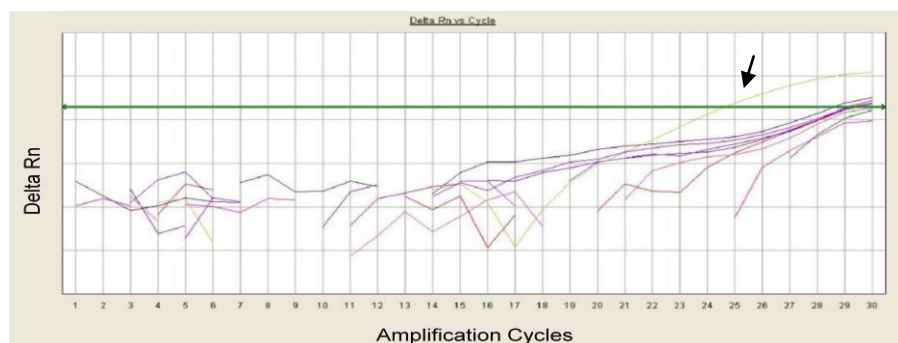
الف



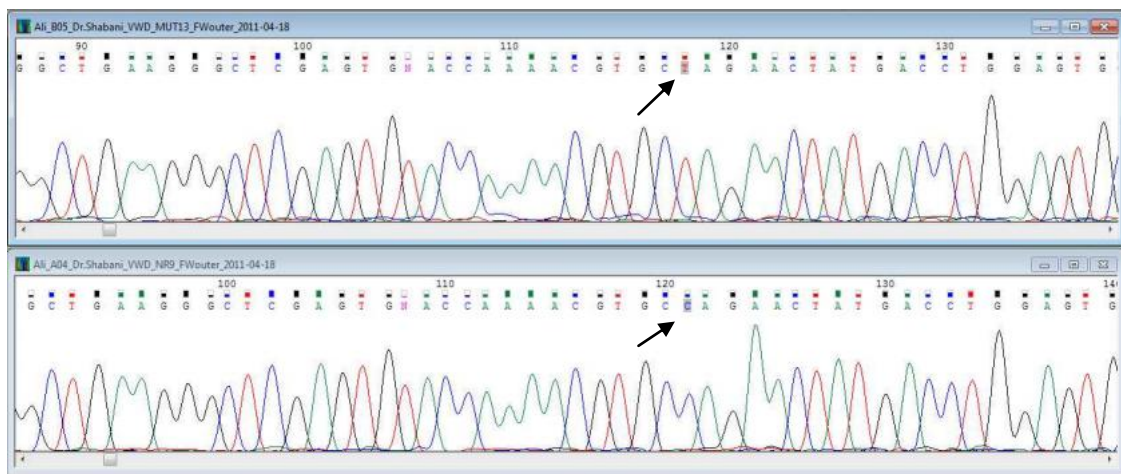
ب



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



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



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

تعیین توالی DNA:

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

بحث

در پروژه حاضر به منظور بررسی جهش Q793X در بیماری فون ویلبراند نوع ۳، از دو روش ARMS-PCR و Real-time PCR استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی به گونه ای طراحی شد که برای کار با هر دو روش مناسب باشد. شرایط مختلف واکنش اعم از زمان، دما، غلظت آغازگر و DNA بهینه سازی گردید و با توجه به بهینه سازی های انجام شده، واکنش های طراحی شده انجام شد. به این ترتیب که واکنش های ARMS-PCR و Real-time PCR برای افراد نرمال و بیمار به صورت جداگانه و در مواردی به صورت مولتی پلکس صورت پذیرفت و نتایج نهایی با هم مقایسه گردید. طراحی آغازگر برای بررسی یک جهش خاص، با محدود کردن آغازگر به یک

نقطه خاص از توالی ژن، امکان انتخاب بهترین حالت ممکن برای ساختار آغازگر را کاهش می دهد. برای اطمینان از صحت نتایج، تعیین توالی DNA انجام شد و نتایج قبلی تایید گردید.

همان طور که قبلاً اشاره شد، درصد بالایی از آلل های خنثی در ژن vWF را جهش های بی معنا تشکیل می دهند که در تئوری، ایجاد پروتئین ناقص (Truncated protein) می نمایند و بسته به محل جهش می توانند اندازه های متفاوت داشته باشند. جهش بی معنا تبدیل کدون اسید آمینه به کدون خاتمه می باشد که در سطح ترجمه پروتئین اختلال ایجاد کرده و باعث خاتمه زودرس ترجمه و ایجاد پروتئین ناقص می گردد. یکی از جهش هایی که باعث ایجاد جهش بی معنا در کل ژنوم می شود، تبدیل توالی CAG به TAG است که باعث تغییر اسید آمینه گلوتامین به کدون خاتمه در سطح ترجمه پروتئین می گردد (۱۲، ۱۱). در vWD این نوع جهش در اگزون های مختلف مشاهده شده است (۱۳).

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

تکثیر هم‌زمان سه قطعه مورد نظر، نتایج گویایی به دست نیامد. یکی از دلایل اصلی این موضوع، عدم توانایی رنگ فلورسنت SYBR Green در تفکیک قطعه‌ها به هنگام تکثیر هم‌زمان می‌باشد. از سوی دیگر منحنی ذوب قطعه‌های بزرگ‌تر از ۱۵۰ bp در این سیستم در ۲ یا چند فاز رخ می‌دهد. این موضوع باعث تداخل در رسم منحنی سایر محصولات و وجود چند پیک در منحنی ذوب آن محصول می‌شود. رخ دادن این مشکل در مورد قطعه بزرگ کنترل ۲۹۲ bp مشاهده شد. لذا پیشنهاد می‌شود تا در صورت فراهم بودن بودجه لازم و امکانات سخت‌افزاری، در واکنش Real-time PCR، به جای رنگ فلورسنت SYBR Green از پروب‌های اختصاصی نشاندار (TaqMan Probes) به منظور مطالعه جهش‌های نقطه‌ای استفاده شود.

نتیجه‌گیری

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

تشکر و قدردانی

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

بسیار پر هزینه و وقت‌گیر می‌باشد، مطالعه‌های ژنتیکی این بیماران بسیار کند پیشرفته است. البته در کنار تعیین توالی، از روش‌های دیگری نیز استفاده شده است که به PCR-Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) می‌توان اشاره کرد (۱۵، ۹). هر کدام از این روش‌ها، محدودیت‌های خاص خود را دارند و به صورت روتین مورد استفاده قرار نمی‌گیرند. از دیگر روش‌ها که تنها نواحی خاصی را بررسی می‌کنند، مطالعه نقاط داغ هستند که به صورت سرشتی در ژنوم کل موجودات تمایل به جهش دارند و مشخص‌ترین آن‌ها در ژنوم انسانی، تبدیل توالی CGA به TGA می‌باشد. در طی مطالعه‌های متعدد در اروپا، ۱۱ نقطه داغ ژن *vWF* بررسی و چندین جهش گزارش شده است (۱۶، ۱۷). مطالعه حاضر بر روی جهش‌یابی Q793X متمرکز است و دو روش Real-time PCR و ARMS-PCR برای تشخیص این جهش به کار گرفته شده است. هر دو روش، قدرت شناسایی و تشخیص تغییر ژنتیکی مورد نظر را دارا هستند. علی‌رغم این که روش Real-time PCR روش بسیار دقیقی است، اما روش ARMS-PCR از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر تشخیص داده شد و جواب‌های قابل استنادی با استفاده از این روش به دست آمد. با توجه به انجام ARMS-PCR به صورت مولتی‌پلکس، امکان هزینه‌های مواد مصرفی و هم چنین کاهش امکان خطای آزمایشگر وجود دارد. اگر چه انجام واکنش Real-time PCR نیز به صورت مولتی‌پلکس وجود دارد اما در تجربه این مطالعه، به هنگام

References :

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

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

Original Article

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

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

¹Khatam University, Tehran, Iran

²Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

⁴National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

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

Materials and Methods

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

Results

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

Conclusions

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

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

Received: 1 Nov 2011

Accepted: 21 Feb 2012

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