جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۸۴، صفحات ۷۹ تا ۸۴

Original Article

# طراحی استریپ تشخیصی با بکارگیری تکنیک هیبریدسازی کووالانت معکوس DNA برای تشخیص سریع دو موتاسیون رایج IVS-I-5 و IVS-I-110 بتاتالاسمی در ایران

مهرداد هاشمی*، علی ناظمی**، مهدی فروزنده***

* دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
**دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن
***گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

## چکیده

**سابقه و هدف**: *بتاتالاسمی یک اختلال اتوزومال مغلوب می‌باشد که در اکثر موارد بوسیله موتاسیون‌های نقطه‌ای در ژن بتا-گلوبین ایجاد می‌گردد. موتاسیون‌های IVS-I-5 و IVS-I-110 موتاسیون‌های شایع در میان جمعیت ایران بوده و حدود ۱۲٪ از اختلالات بتاتالاسمی را شامل می‌شوند. در این مطالعه با طراحی استریپ، تکنیک هیبریدسازی معکوس نقطه‌ای RDB، بعنوان یک روش غیررادیواکتیو و سریع برای تشخیص این دو موتاسیون شایع ژن بتاگلوبین گسترش داده شد.*

**روش بررسی**: *پس از استخراج DNA ژنومی از خون کامل، واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی Forward و Reverse روی ناحیه‌ای از ژن بتا-گلوبین حاوی دو موتاسیون مورد نظر انجام گرفت. برای تهیه استریپ، پروب اولیگونوکلئوتیدی بر روی غشاء نایلونی حاوی گروههای کربوکسی Biodyne C از طریق فعال‌سازی غشاء تثبیت گردید. عمل هیبریداسیون به همراه ۱۰ میکرولیتر از محصول دناتوره نشاندار شده با DIG-11-dUTP در دمای ۴۲° سانتیگراد بمدت یک ساعت انجام شد. بدنبال آن عمل بلاکینگ غشاء با BSA(Bovine serum albumin) ۰/۱ درصد انجام و سپس با ۵ یونیت آنتی‌بادی Anti DIG متصل به آلکالین فسفاتاز بمدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق مجاور گردید. ظهور رنگ با سوبسترای نمک نیتروبلوتترازولیوم (NBT/BCIP) بمدت ۲ ساعت انجام گردید.*

**یافته‌ها**: *حضور یک توالی خاص DNA بوسیله ظهور یک لکه روی غشا شناسایی شد. افراد نرمال لکه‌ها را تنها در مقرهای تثبیت پروبهای طبیعی، افراد هتروزیگوت، یک لکه در مقر تثبیت پروب طبیعی و یک لکه در مقر تثبیت پروب موتانت، و افراد هموزیگوت تنها یک لکه در مقر تثبیت پروب موتانت نشان دادند.*

**نتیجه‌گیری**: *در این تحقیق یک استراتژی سریع و ساده به منظور تشخیص موتاسیون‌های متداول بتاتالاسمی ایران بر اساس PCR و بدنبال آن هیبریدسازی معکوس راه‌اندازی گردید.*

**واژگان کلیدی**: *استریپ، موتاسیون، بتاتالاسمی، هیبریدسازی نقطه‌ای معکوس.*

## مقدمه

بتاتالاسمی یکی از اختلالات ژنتیکی شایع در جامعه بشری است و مشکلات سلامتی عمده‌ای را برای اکثر جمعیتها از جمله جمعیت ایران ایجاد می‌نماید. در این جمعیت فراوانی ژن بتاتالاسمی ۰/۰۱۵ می‌باشد. مدیریت مناسب این اختلال شامل غربالگری نوزادان تازه متولد شده، مشاوره ژنتیک و تشخیص والدینی است که در هر یک، تشخیص صحیح الزامی می‌باشد (۱،۲).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، مهدی فروزنده
foroz@modares.ac.ir
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۸/۲۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸٤/۲/۱٤

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



چندین روش مختلف برای شناسایی نقایص ژنتیکی بتاتالاسمی مورد استفاده قرار می‌گیرند که عبارتند از: واکنش زنجیره پلی‌مرازی (PCR) و هضم با آنزیم محدودکننده، PCR و هیبریداسیون پروبهای اولیگونوکلئوتیدی اختصاصی آلل، PCR Multiplex آللهای اختصاصی و DGGE (Denature Gradient Gel Electrophoresis). مزیتها و معایب این روشها براساس ساختار و هدف آزمایشگاهی متفاوت می‌باشد (۳-۱).

در این تحقیق یک استراتژی سریع و ساده به منظور تشخیص موتاسیون‌های متداول بتاتالاسمی ایران بر اساس PCR و بدنبال آن هیبریدسازی معکوس راه‌اندازی گردید.

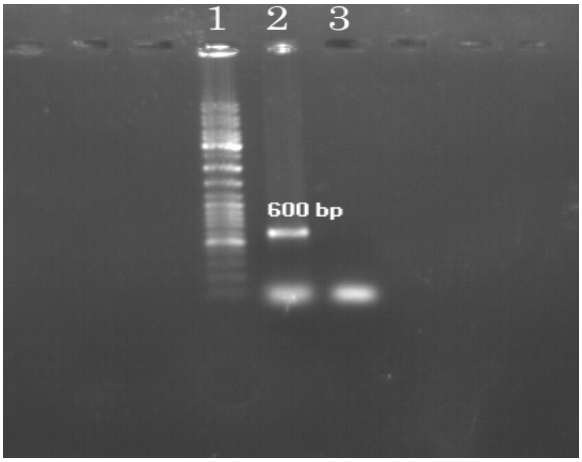
## مواد و روشها

DNA ژنومی از خون کامل افراد نرمال، و مبتلایان به تالاسمی مینور و ماژور استخراج گردید. همچنین نمونه‌هایی با موتاسیون مشخص از مرکز تحقیقات ژنتیک علوم بهزیستی تهیه گردید. پرایمرهای اختصاصی بر روی ناحیه‌ای از ژن بتاگلوبین طراحی و با سفارش به شرکت MWG Oligo Synthesis سنتز و به روش کروماتوگرافی HPLC تخلیص گردید:

پرایمر Forward : 5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3

پرایمر Reverse: 5'-TCATTCGTCTGTTTCCCATT-3'

این واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی، پرایمر Forward و Reverse روی ناحیه‌ای از ژن بتاگلوبین حاوی دو موتاسیون مورد نظر انجام گرفت. مخلوط واکنش PCR شامل ۲۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، پرایمرهای Forward و Reverse هر یک در غلظت ۰/۵ میکرومول، مخلوط dNTP ها هر یک در غلظت ۵۰ میکرومول و dNTP نشاندار DIG-11-dUTP در غلظت ۲ میکرومول، $MgCl_2$ ۲ میکرومول، Tris.Hcl ۱۰ میکرومول و ۵ واحد از آنزیم DNA Taq پلی‌مراز در یک حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر بود. واکنش PCR با یک ترمال سایکلر Eppendorf بصورت Hot Start اجرا گردید. برنامه واکنش PCR شامل یک دناتوراسیون اولیه ۹۴°C بمدت ۱۰ دقیقه و بدنبال آن ۳۵ سیکل متوالی دناتوراسیون ۹۴°C بمدت ۲۰ ثانیه، دمای آنیلینگ ۵۵° درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه و دمای پلی‌مریزاسیون ۷۲° درجه سانتیگراد بمدت ۴۰ ثانیه می‌باشد. سیکل نهایی با یک تکثیر ۷۲° درجه سانتیگراد بمدت ۱۰ دقیقه خاتمه یافت. جهت تایید انجام عمل PCR محصول بر روی ژل آگارز با الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).




**شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR. (1) Ladder، (2) کنترل مثبت و (3) کنترل منفی**

اولیگونوکلئوتیدهای تغییر یافته برای بتاتالاسمی IVS-I-5 و IVS-I-110با نوکلئوتید 5' متصل به گروه آمین بصورت توالی‌های زیر و با سفارش به شرکت MWG Oligo Synthesis سنتز گردید:

IVS-I-110؛

پروب طبیعی: 5'-NH2-GAAAATAGACCATAGGCAGA-3'

پروب موتانت:5'-NH2-CTGCCTATTAGTCTATTTTC-3'

IVS-I-5؛

پروب طبیعی: 5'- NH2 – CCTTGATACCAACCTGC- 3'

پروب موتانت: 5'- NH2 – GCAGGTTGCTATCAAG- 3'

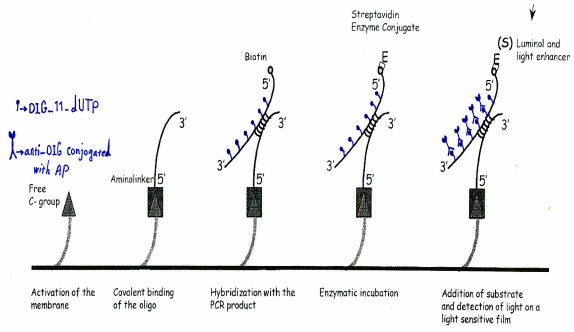
پروب اولیگونوکلئوتیدی بر روی غشاء نایلونی حاوی گروههای کربوکسی Biodyne C از طریق فعال‌سازی غشاء با ترکیب اتیل ۳-۳- دی‌متیل‌آمینوپروپیل‌کربودی‌آمین (EDC) ۱۶ درصد تثبیت گردید. برای انجام هیبریداسیون، نوار فوق ابتدا در یک میلی‌لیتر بافر هیبریداسیون 2XSSPE شامل ۱۸۰ میلی‌مول NaCl، ۱۰ میلی‌مولار $NaH_2PO_4$ و یک میلی‌مولار EDTA و سدیم دودسیل‌سولفات ۰/۱ درصد در دمای ۴۲° درجه بمدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور می‌گردد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR نشاندار با DIG بوسیله جوشاندن ۱۰ دقیقه‌ای دناتوره و به نوار فوق اضافه گردیده و عمل هیبریداسیون بمدت یک ساعت در دمای ۴۲° درجه انجام می‌گیرد.

پس از عمل هیبریداسیون غشاء دوباره با بافر 2XSSPE, SDS 0.1 درصد در دمای ۵۲° درجه سانتیگراد بمدت ۱۰ دقیقه شستشو می‌گردد. بدنبال آن عمل بلاکینگ غشاء با BSA 0.1 درصد انجام می‌گیرد و سپس ۵ یونیت

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



آنتی‌بادی anti DIG متصل به آلکالین فسفاتاز بمدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق مجاور می‌گردد. ظهور رنگ آبی تیره با سوبسترا نمک نیتروبلوتترازولیوم (NBT/BCIP) بمدت ۲ ساعت انجام می‌گردد که با روش تشخیص چشمی قابل ارزیابی می‌باشد. در شکل ۲ روند فعال سازی غشا، تثبیت پروب و عمل هیبریداسیون ارائه شده است.




**شکل ۲- روند فعال سازی غشا، تثبیت پروب، هیبریداسیون محصول PCR و اضافه نمودن سوبسترا برای ظهور رنگ**

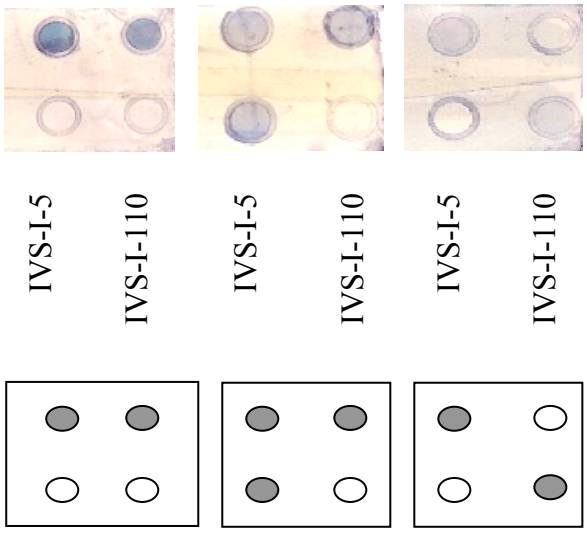
## یافته‌ها

شکل ۳ نوارهایی را نشان می‌دهد که عمل هیبریداسیون محصول PCR نشاندار شده افراد حاوی دو موتاسیون مورد نظر ژن بتاگلوبین روی آنها انجام گرفته است.

توالی DNA در هر یک از جایگاهها بوسیله یک پروب نرمال و یک پروب موتانت ارائه گردیده است. حضور یک توالی خاص را می‌توان بوسیله ظهور یک لکه روی غشاء شناسایی نمود. بعنوان مثال، یک فرد نرمال (N/N) لکه‌های را تنها در محلهای تثبیت پروبهای نرمال نشان می‌دهد. افراد هتروزیگوت برای هر یک از موتاسیون‌ها، یک لکه در محل تثبیت پروب نرمال و یک لکه در مقرر تثبیت پروب موتانت را نشان می‌دهند و DNA تکثیر شده از یک فرد هموزیگوس موتانت، تنها با پروب موتانت مربوطه و سایر پروبهای نرمال هیبرید می‌گردد (۶-۳).

## بحث

امروزه تنوعی از روشها برای تشخیص موتاسیون‌های نقطه‌ای گسترش یافته است و برای انتخاب مناسب هر یک از این روشها چندین پارامتر مهم باید ملاحظه شود (۷). از این جمله می‌توان به این موارد اشاره کرد: چه نوع اسیدنوکلئیک مورد آنالیز قرار می‌گیرد (DNA یاRNA)؟، چه نوع نمونه‌ای مورد آنالیز قرار می‌گیرد (خون محیطی، مغز استخوان، بافت




**شکل ۳- تشخیص دوموتاسیون بتا-تالاسمی بوسیله PCR و هیبریداسیون RDB و تشخیص رنگی با سوبسترا NBT/BCIP . در هر نوار ردیف بالا مربوط به پروب نرمال و ردیف پایین مربوط به پروب موتانت می باشد. همچنین در هر نوار ردیف سمت راست مربوط به IVS-I-110 و ردیف سمت چپ مربوط به IVS-I-5 است.**

ترشحات، مدفوع)؟ آیا موتاسیون‌های مورد بررسی جزء موتاسیون‌های شناخته شده می‌باشند؟ حداکثر تعداد موتاسیون که باید شناسایی شود چقدر است؟ آیا شناسایی هریک از موتاسیون‌ها نیاز می‌باشد؟ روش مورد استفاده چقدر صحت داشته و چطور می‌توان آنرا استاندارد نمود؟ آیا آزمایش برای تشخیص روتین مناسب می‌باشد؟ و در نهایت چه نوع ارزیابی کیفی می‌تواند بدست آید؟

در حال حاضر بیش از یکصدهزار آلل موتانت در ۲۰۰۰ ژن انسانی گزارش شده که محدوده آنها از تغییرات ژنی بزرگ تا حذفها یا دخولهای کوچک و جانشینی تک ژنی را شامل می‌گردند. از این میان اختلال ژنتیکی بتا تالاسمی بیش از ۱۹۰ نوع آلل موتانت را در خود جای داده است (۱۰-۸). فراوانی هر آلل موتانت در هر جمعیتی اختصاصی است و بیش از ۹۰٪ از موتاسیون‌ها در هر جمعیت را یک دسته محدودی از آللها شامل می‌شوند (۱۱).

ویژگیهایی که در انتخاب روش شناسایی جهشهای ژنی در برنامه‌های غربالگری جمعیت مورد توجه قرار می‌گیرد عبارتند

از: حساسیت، اختصاصیت، سرعت عمل و نیازمندی به تجهیزات و قیمت تمام شده آن. یکی از روشهای شناسایی جهشهای ژنی با قابلیت غربالگری بزرگتر جمعیت که بر پایه هیبریداسیون در فاز جامد قرار دارد تکنیک Reverse Dot Blot می‌باشد که موضوع مورد مطالعه در این تحقیق بوده است.

این تکنیک با قابلیت غربالگری همزمان چندین آلل می‌تواند جهت شناسایی افراد ناقل یا مبتلا به اختلالات ژنتیکی از جمله بتا تالاسمی بکار رفته بطوری‌که راه‌اندازی آن می‌تواند بعنوان یک روش اولیه در مسیر شناسایی موتاسیون مورد استفاده قرار گیرد (۵،۱۰).

تکنیک RDB در مقایسه با سایر روشهای متداول که برای تشخیص موتاسیون‌های شناخته شده بتا تالاسمی درکشور بکار گرفته می‌شوند، دارای مزایایی می‌باشد؛ بعنوان مثال روش PCR–RFLP نیازمند تهیه آنزیمهای محدودکننده خاص با هزینه بالا و همینطور فراهم‌سازی شرایط مناسب برای عملکرد صحیح چنین آنزیمهایی است و همینطور روش ARMS نیازمند انجام مکرر واکنش PCR (تنها برای یک نوع جهش خاص) تحت شرایط مناسب می‌باشد بطوری‌که کوچکترین تغییری در غلظتهای dNTPs و $MgCl_2$، پرایمر و تغییرات دمایی می‌تواند سبب نتایج مثبت و منفی کاذب گردد. سرعت اجراء بالا و آنالیز همزمان حدوداً ۴۳ آلل مختلف و ثبت نتایج هیبریداسیون و خواندن آسان آن، از مزیتهای دیگر این روش می‌باشد. همینطور این تکنیک نیازمند لوازم و مواد گران نبوده و به آسانی در هر آزمایشگاهی که بتواند PCR و هیبرایدسیون را اجراء نماید، قابل استفاده است (۱۲-۱۵).

نکته قابل بحث دیگر در رابطه با تکنیک RDB انتخاب غشاء و نحوه تثبیت پروب‌ها روی غشاء می‌باشد. بطورکلی در هیبریداسیون فاز جامد، غشاء بعنوان یک بستر مناسب مطرح بوده و باید به آسانی و بدون تخریب جابجا و مناسب برای هر روش هیبریداسیون و تشخیص باشد. در این میان غشاهای نایلونی بدلیل داشتن ویژگیهای فوق جایگزین غشاهای نیتروسلولزی شده‌اند. در رابطه با تثبیت پروب روی غشاء، پروبهای اولیگونوکلئوتیدی در حین سنتز بوسیله ارائه گروههای نوکلئوفیل همانند گروههای آمین یا تیول و یا اضافه شدن دم پلی T بوسیله آنزیم ترمینال دزوکسی ریبوترانسفراز به انتهای '5 فعال می‌گردند. غشاء انتخاب شده باید دارای میزان بالایی گروههای کربوکسیل آنیونیک به منظور واکنش با پروب‌های تغییر یافته با آمین یا تیول باشند. از میان غشاهای با بار منفی، تنها غشاء IAM (Millipore, MA) و Biodyne C قادر به اتصال به پروب‌های تغییر یافته با آمین یا تیول می‌باشند. نحوه‌اتصال پروب به غشاء IAM برخلاف Biodyne C تنها تحت شرایط پیشنهادی کمپانی سازنده آن قابل اجراء می‌باشد و به همین منظور، از غشاء Biodyne C به دلیل داشتن گروههای کربوکسیل قابل واکنش با گروه آمین پس از فعال سازی با EDC استفاده نمودیم. همینطور خصوصیت آنیونیک نسبتاً ضعیف آن منجر به کاهش اتصالات غیر اختصاصی دراثر فعل و انفعالات الکترواستاتیک مابین اسیدهای نوکلئیک و غشاء می‌گردد. ترکیب EDC گروههای کربوکسیل غشاء را به شکل O – acylurea تبدیل می‌نماید که این فرم حدواسط می‌تواند به گروههای آمین حمله نموده و پیوند آمیدی را تشکیل دهد. گروه آمین انتهایی و آمین‌های موجود در بازهای نوکلئوتید می‌توانند بوسیله O – acylurea مورد حمله قرار گیرند، بهرحال آمین انتهای '5 یک نوکلئوفیل قویتری نسبت به آمین‌های آروماتیک روی بازها می‌باشد.

اتصال کووالانت پروبها از طریق دم پلی T روش دیگر برای تثبیت پروب می‌باشد. دم پلیT هم از طریق واکنش آنزیمی و هم شیمیایی قابل سنتز می‌باشد. تثبیت پروب‌های با دم پلی A تحت تابش UV روی غشاء Biodyne C صورت می‌گیرد که سبب تغییر باز تیمین و اتصال آن به غشاء می‌گردد (۱۶).

با توجه به اینکه این روش در مقایسه با روش قبلی یک اتصال کووالانت تصادفی را فراهم می‌سازد، ممکن است توالی پروپ برای هیبریداسیون با توالی هدف دردسترس نباشد. با توجه به اینکه اتصال دم پلی T به غشاء به کمک تابش UV صورت می‌گیرد، تابش طولانی می‌تواند سبب آسیب به DNA پروب گردد.

اتصالات غیراختصاصی بواسطه فعل انفعالات الکترواستاتیک، هیدروفوبیک یا شیمیایی می‌توانند حساسیت این سنجش را کاهش دهند. گروههای کربوکسیل فعال شده می‌توانند با هر نوکلئوفیل موجود در محلول واکنش دهند. پس از تثبیت اولیگونوکلئوتید، غیرفعال سازی جایگاههای فعال پیش از استفاده بعدی ضروری است.

در مطالعات انجام گرفته توسط Zhang و همکارانش از میان ترکیبات مختلف که قادر به هیدرولیز استرهای فعال باقیمانده روی غشاء بدون تاثیر بر پیوند کووالانت می‌گردند (از جمله کازئین، اتانول آمین، هیدروکسیل آمین، آمینواسیدها (کلاسین) و NaoH 0.1 نرمال)، هیدروکسیل آمین و NaoH ۰/۱ نرمال حداکثر کارآیی در غیرفعال سازی گروههای استر

در کوتاهترین زمان را داشتند که NaOH بدلیل سادگی و تاثیر بهتر انتخاب گردید (۱۷،۸).

در تکنیک RDB تمامی پروبهای متصل شده به غشاء باید Tm تقریباً یکسانی حداکثر با ۲ درجه اختلاف داشته باشند که در تحقیق این نکته رعایت شد (۱۸).

در تکنیک RDB از دو مسیر می‌توان برای نشاندارسازی غیررادیواکتیو محصول PCR استفاده نمود (۱۹):

۱) از طریق استفاده از دزوکسی‌ریبونوکلئوتید تری‌فسفات متصل به DIG یا بیوتین و ورود آنزیماتیکی آن در آمپلیکون.

۲) از طریق استفاده از پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی متصل شده از سمت '5 به DIG یا بیوتین و استفاده از این پرایمر در تکثیر آمپلیکونها .

انتظار می‌رود در روش اول فعالیت اختصاصی بالاتری از ماده نشاندار در آمپکیلونها (به این معنا که ملکولهای بیشتری از ماده نشاندار در هر آمپلیکون وارد می شود) نسبت به روش دوم وجود داشته باشد، اما کارآیی ورود آنزیماتیکی نوکلئوتیدهای نشاندار شده ممکن است بدلیل ممانعت فضایی و بزرگی ماده نشاندار تحت تاثیر قرار گیرد. این حالت در ورود DIG-UTP بوسیله DNA پلی‌مراز اتفاق می‌افتد (۱۹،۱۸). در آزمایش انجام گرفته توسط Blais وGauthier، دزوکسی ریبونوکلئوتیدی نشاندار Biotin-16-dUTP, DIG- 11- dUTP یا Biotin- 11- dUTP در حین PCR بداخل آمپلیکونها وارد و برای هیبریداسیون با پروبهای تثبیت شده ژن invA سالمونلا تیفی موریوم روی غشاء با یکدیگر مقایسه گردید. نتایج هیبریداسیون مثبتی با هر سه ماده نشاندار با استفاده از حداقل ۰/۱ پیکوگرم DNA الگو بدست آمد (۱۹). بهرحال هنگام استفاده از DIG-11-dUTP سیگنال کیفی قویتری بدست آمد. حال زمانیکه از حداقل DNA ژنومی معادل ۰/۰۱ پیکوگرم استفاده گردید، سیگنال مثبت تنها برای آمپلیکونهای نشاندار شده با DIG-11-dUTP حاصل گردید. این نتایج نشان می‌دهد، DIG نسبت به بیوتین برای نشاندار سازی از حساسیت بالاتری برخوردار می‌باشد و یک انتخاب بهتری برای ورود بداخل محصول PCR می‌باشد. همچنین Blais و Gauthier، تکنیک RDB را با دو فرم مختلف نشاندارسازی یکی با ورود DIG-11-dUTP بداخل محصول PCR و دیگری با استفاده از پرایمرهای Reverse وForward متصل به 5'DIG، با یکدیگر مقایسه نمودند. نتایج کارآیی یکسانی را در نشاندار سازی محصول PCR نشان داد (۷). بهرحال مقایسه قیمت این دو روش نشان می‌دهد که وارد سازی دیگ اکسی ژنین در هر واکنش بداخل آمپلیکون تقریباً ۱۰ برابر گرانتر از روش استفاده از پرایمرهای 5'DIG می‌باشد (۲۰،۱۹).

در این تحقیق از ورود DIG-11-dUTP به داخل محصول PCR به منظور نشاندارسازی استفاده شد که با توجه به نتایج فوق می‌توانیم از پرایمرهای 5'DIG استفاده کرده و هزینه این تکنیک را کاهش دهیم. درضمن در این تحقیق برای اولین با طراحی استریپ و راه اندازی تکنیک RDB، شناسایی دو موتاسیون شایع بتاتالاسمی در ایران صورت گرفت. بطوریکه با گسترش پروبهای موتاسیون‌های بتاتالاسمی شایع کشور به بیش از ۱۵ موتاسیون می‌توان بیش از ۷۰ درصد از موتاسیون‌های کشور را تنها با یک آزمایش شناسایی کرده و با ساخت انبوه Strip های مربوطه آنرا بعنوان تست اولیه غربالگری موتاسیون بتاتالاسمی به جامعه آزمایشگاهی ارائه نمود. در ارزیابی صورت گرفته در تحقیق حاضر، هزینه ساخت Stripهای برپایه RDB مورد ارزیابی قرار گرفت و با توجه به اینکه اکثر آللهای موجود در افراد بیمار و ناقل محدود به ۱۰ آلل می شود، هزینه اجرایی برای شناسایی حداقل ۱۰ الل موتانت در مقایسه با سایر روشهای معمول حداقل یک دهم کمتر بوده و از نظر حساسیت نسبت به روشهای RFLP و ARMSدر مرتبه بالاتری قرار داشته و حتی قابل مقایسه با DNA sequencing می‌باشد. همچنین با توجه به انعطاف‌پذیری فوق‌العاده این تکنیک می‌توان از آن به منظور شناسایی موتاسیون در سایر ژنها همچون موتاسیونهای درگیر در انواع سرطانها و اختلالات ژنتیکی همچون Cystic fibrosis و در HLA typing و شناسایی ذرات عفونی بهره جست.

## تشکر و قدردانی

با تشکر فراوان از ریاست محترم و حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی که در تمامی مراحل تحقیق حامی و پشتیبان ما بودند.

## REFERENCES


1. Gupta AS, Gupta UR, Sarwai S. Prenatal diagnosis in beta thalassemia: An Indian experience. Fetal Diagn Ther 2003;328–32.
2. Bhardwaj U, Zhang YH, McCabe ERB. Neonatal hemoglonbinopathy screening: molecular genetic technologies. Mol Genet Metab 2003;80:129–37.
3. Bunschoten A, Tiemersma E, Schouls L, et al. Simultaneous determination of polymorphism in N–Acethyltransfetase 1 and 2 genes by reverse Line Blot Hybridization. Anal Biochem 2000;285:156–62.
4. Cao A. Carrier screening and genetic counseling in beta thalassemia. Hematology 2002;76:105–13.
5. Denmat CL, Duchassaing D. Rapid diagnosis of beta thalassemia mutation in Meditettaneans by PCR and restriction analysis of natural or Created sites. Clin Biochem 1997;30(5):433–37.
6. Fiss EH, Chehab F, Brookd GF. DNA amplification and reverse dot–blot hybridization for detection and identification of mycobacteria to the species level in the clinical laboratory. Clin Microbiol 1992;30(5):1220–24.
7. Gauthier M, Blais BW. Comparison of different approaches for the incorporation of non – radioactive labels into polymerase chain reaction products. Biotechnology Letters 2005;25:1369–74 .
8. Ghosh SS, Musso GF. Covalent attachment of oligonucleotides to solid supports. Nucleic Acids Res 1987;15(13): 5353–72.
9. Hillard LM, Berkow RL. The thalassemia syndromes. Cardiovasc Update 1996;3(5):157–62.
10. Lappin S, Cahlik J, Gold B. Robot printing of reverse dot blot arrays for human mutation detection. Mol Diagn 2001;3(4):178–88.
11. Maggio A, Giambona A, Cai SP, et al. Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C and seven Mediterranean beta thalassemia mutationed by covalent reverse dot – blot analysis: Application to prenatal diagnosis in Sicily. Blood 1993;81(1):239–42.
12. Najmabadi H, KarimiNejad R, Sahebjam S, et al. The beta thalassemia mutation spectrum in the Iranian population. Hemoglobin 2001;25(3):285-96.
13. Nollau P, Wagener C. Methods for detection of point mutations performance and quality assessment. Clin Chem 1997;43(7):1114-28.
14. Paul F, Ying J, Kickler B. Rapid genotyping of the five major platelet alloantigens by reverse dot- blot hybridization. Blood 1994;84(12):4361-67.
15. Saiki RK, Sean Walsh P, Levenson CH, et al. Genetic analysis of amplified DNA With immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. Proc Natl Acad Sci 1989;86:6230-34.
16. Schollen E, Vandenberk P, Cassiman JJ, et al. Development of reverse dot- blot system for screening of mitochondrial DNA mutations associated with Leber hereditary optic atrophy. Clin Chem 1997;43(1):18-23.
17. Sutcharitchan P, Saiki R, Huisman TH, et al. Reverse dot-blot detection of the African-American beta thalassemia mutations. Blood 1995;86(4):1580-85.
18. Taylor GR, Day INM, editors. Guide to mutation detection. Wiley–Liss, 2005.
19. Vanden Brule AJC, Pol R, Daalmijer NF, et al. GP5 +/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. Clin Microbiol 2002;40(3):779-87.
20. Zhang Y, Coyne MY, Will SG, et al. Single base mutational analysis of cancer and genetic. Diseases using membrane bound modified oligonucleotides. Nucleic Acids Res 1991;19(14):3929-33.