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

Original Article

Development and Application of Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Technique Using SYBR Green I in the Diagnosis of Down Syndrome

Ahmad Reza Kamyab, M.Sc.[1], Shirin Shahbazi, Ph.D.[2], Parvin Dibajnia, M.D.[3], Mina Hayt Nosaeid, M.Sc.[4], Mohammad Taghi Akbari, Ph.D.[2], Amir Reza Rafiee, B.Sc.[5], Katayun Akhlagh Tamiz, B.Sc.[4], Reza Mahdian, Ph.D.[4*]

1. Biology Department, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Medical Genetics Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Psychiatrics Department, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran
4. Molecular Medicine Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
5. Tehran Medical School, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**** Corresponding Address: P.O.Box: 1316943551, Molecular Medicine Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran***
Email: rezamahdian@yahoo.com,

Received: 20/May/2009, Accepted: 2/Jan/2010

Abstract

Objective: Rapid diagnosis of Trisomy 21 Syndrome (Down Syndrome) patients using Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction (Real-Time qPCR) in order to establish a novel method for prenatal diagnosis in the future.

Materials and Methods: A total of 5 ml of peripheral blood was obtained from each patient and normal controls (NR). Then, genomic DNA from lymphocytes was extracted using the salting out procedure. Gene dosage levels of *DSCAM* and (*PMP22*, *DSCAM*) in Down Syndrome and NR were analyzed using real-time quantitative PCR. The *DSCAM/PMP22* ratio was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula for all samples.

Results: Real-time PCR showed a *DSCAM/PMP22* ratio of 1.48 ± 0.18 and 1.01 ± 0.10 ($p<0.001$) in Down Syndrome and normal samples, respectively, demonstrating three copies of the target (*DSCAM*) gene in Trisomy 21 Syndrome.

Conclusion: *DSCAM/PMP22* ratio is increased significantly in Down Syndrome patients than NR (1.5 times). Therefore, the real-time quantitative PCR technique can be used as a sensitive, accurate and reliable technique for rapid and prenatal diagnosis of Trisomy 21 Syndrome.

Keywords: Down Syndrome, Trisomy 21, Gene Copy Number, Real-Time, PCR

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 249-256

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

مقاله اصیل

بهینه‌سازی و کاربرد تکنیک Real-Time PCR کمی با استفاده از SYBR-Green I در تشخیص سندرم داون

احمدرضا کامیاب .M.Sc[۱]، شیرین شهبازی .Ph.D[۲]، پروین دیباج‌نیا .M.D[۳]، مینا حیات‌نوسعید .M.Sc[۴]، محمدتقی اکبری .Ph.D[۲]، امیررضا رفیعی .B.Sc[۵]، کتایون اخلاق‌تمیز .B.Sc[۴]، رضا مهدیان .Ph.D[۴*]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی ،گروه ژنتیک پزشکی، تهران، ایران
۳. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه روان‌پزشکی، تهران، ایران
۴. انستیتو پاستور ایران، بخش پزشکی مولکولی، تهران، ایران
۵. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، انستیتو پاستور ایران، بخش پزشکی مولکولی
پست الکترونیک: Email: rezamahdian@yahoo.com

دریافت مقاله: ۸۸/۲/۳۰، پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۱۲

چکیده

* **هدف:** تشخیص سریع بیماران مبتلا به سندرم داون (تریزومی ۲۱) با استفاده از تکنیک Real-time PCR کمی به منظور پایه‌گذاری روش نوین در تشخیص پیش از تولد در آینده

* **مواد و روش‌ها:** از افراد مورد مطالعه، پنج میلی‌لیتر خون محیطی گرفته شد. سپس با روش رسوب‌گذاری با نمک اشباع، DNA ژنومی از لنفوسیت‌ها استخراج شد. میزان ژن‌های *DSCAM* و *PMP22* در افراد مبتلا به سندرم داون و نرمال با تکنیک Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real Time-PCR) به صورت کمی سنجش و نسبت ژنی در این افراد با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید.

* **یافته‌ها:** نتایج حاصل از Real-Time PCR نسبت ژنی *DSCAM/PMP22* را در بیماران مبتلا به سندرم داون و افراد نرمال به ترتیب ۰/۱۸ ± ۱/۴۸ و ۰/۱۰ ± ۱/۰۱ ($p<0/001$) نشان داد که بیانگر حضور سه کپی از ژن هدف (*DSCAM*) در افراد مبتلا به سندرم تریزومی ۲۱ است.

* **نتیجه‌گیری:** نسبت ژنی *DSCAM/PMP22* در افراد مبتلا به سندرم داون به طور معنی‌داری ۱/۵ برابر بیشتر از افراد نرمال است. بنابراین تکنیک Real-Time PCR کمی، می‌تواند به عنوان روشی بسیار دقیق و قابل اعتماد با حساسیت بالا در تشخیص سریع و پیش از تولد سندرم تریزومی ۲۱ مورد استفاده قرار گیرد.

* **کلیدواژگان:** : سندرم داون، تریزومی ۲۱، تعداد کپی ژن، Real-Time PCR

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۲۵۶-۲۴۹

مقدمه

سندرم داون (تریزومی ۲۱) یکی از ناهنجاری‌های کروموزومی شایع (۱ در هر ۱۰۰۰-۸۰۰ تولد) است که تشخیص و پیش‌گیری از تولد بیماران مبتلا به این سندرم از اولویت‌های وزارت بهداشت می‌باشد. بیشتر مبتلایان در دوره جنینی یا اوایل نوزادی از بین می‌روند. علت زمینه‌ای و اصلی بروز این بیماری در همه جمعیت‌ها و نژادها سن بالای مادر گزارش شده است. در این ناهنجاری، سه کپی از تمام یا بخشی از کروموزوم ۲۱ وجود دارد. با توجه به اهمیت تشخیص پیش از تولد در پیش‌گیری از تولد کودکان مبتلا به این بیماری، روش‌های مختلف تشخیصی به کار گرفته شده است. روش آنالیز سیتوژنتیک سنتی (شمارش کروموزومی) اولین روشی است که در تشخیص تریزومی ۲۱ استفاده شد. در اواخر دهه ۸۰ میلادی برای شناسایی سندرم تریزومی ۲۱ تکنیک Fluorescent in Situ Hybridization (FISH) معرفی شد (۳-۱). تکنیک Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (QF-PCR) یکی از روش‌های مولکولی رایج است که بر مبنای تکثیر نشانگرهای مولکولی Short Tandem Repeats (STRs) واقع بر کروموزوم ۲۱ عمل می‌کند (۴، ۵).

علاوه بر این، از تکنیک‌های مولکولی دیگر نظیر Homologous Gene Quantitative PCR (HGQ-PCR) (۶) و Multiplex Fluorescent PCR (۷) نیز در تشخیص بیماران مبتلا به این سندرم استفاده می‌شود (۷، ۸). روش‌های ذکر شده در کنار مزایا و قابلیت‌های تشخیصی، محدودیت‌های خاص خود را دارند. بنابراین معرفی تکنیک مولکولی دقیق و قابل اعتماد که قادر به تشخیص سندرم تریزومی ۲۱ به ویژه در بارداری‌های پر خطر در مدت زمان کوتاه باشد، ضروری به نظر می‌رسد.

امروزه از تکنیک Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real Time-PCR) در زمینه‌های متفاوتی مانند آنالیز تغییرات نوکلئوتیدی در توالی ژن‌ها (جهش‌های نقطه‌ای)، تعیین تغییرات در میزان ژنی (Gene Dosage) (۱۱-۹) و بیان ژن‌ها (۱۲، ۱۳) به فراوانی استفاده می‌شود. دستگاه Real-Time PCR قادر است قطعات تکثیری را هم‌زمان با پیشرفت واکنش زنجیره پلیمراز مانیتور کند.

تحقیق حاضر، به منظور بررسی توانایی تکنیک Real-Time PCR کمی با استفاده از DNA ژنومیک در افتراق نمونه‌های بیماران مبتلا به

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

سندرم تریزومی ۲۱ از نمونه‌های افراد سالم، طراحی و اجرا گردید تا در ادامه با استفاده از نتایج حاصل (تایید حساسیت و اختصاصی بودن روش) بتوان از آن، جهت پایه‌گذاری و ارائه تکنیکی دقیق و قابل اعتماد با حساسیت بالا در تشخیص پیش از تولد سندرم تریزومی ۲۱ استفاده کرد. این مطالعه برای اولین بار در ایران، کاربرد تکنیک Real-Time PCR کمی را در شناسایی و تشخیص سندرم تریزومی ۲۱ معرفی می‌کند.

مواد و روش‌ها

گردآوری نمونه

با همکاری آزمایشگاه‌های خصوصی و مراکز مشاوره ژنتیک شهر تهران، ۲۵ بیمار ۲۱-۲ ساله مبتلا به سندرم داون به طور تصادفی انتخاب و پس از اخذ رضایت‌نامه از خانواده آنها، از هر فرد پنج میلی‌لیتر خون محیطی تازه گرفته شد. هم‌چنین ۱۰ فرد نرمال ۲۸-۲۱ ساله به عنوان گروه کنترل نیز به طور مشابه وارد مطالعه شدند (جدول ۱).

جدول ۱: تعداد، دامنه سنی و جنسیت افراد مورد مطالعه

نوع نمونه	دامنه سنی	تعداد زن	تعداد مرد	تعداد کل
نرمال	۲۸-۲۱	۶	۴	۱۰
سندرم داون	۲۱-۲	۱۱	۱۴	۲۵

این مطالعه در سال ۱۳۸۷ با تصویب کمیته اخلاقی انستیتو پاستور ایران در بخش پزشکی مولکولی انجام گردید.

آنالیز کروموزومی سیتوژنتیک

ابتدا لنفوسیت‌های خون محیطی تازه با روش فیکول (۱۴) جدا شده و در محیط کشت، کامل کشت داده شد. پس از افزودن ۱۵۰ میکرولیتر کالسمید و انکوبه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه، سانتریفیوژ با دور ۴۰۰ به مدت پنج دقیقه انجام شد. مایع رویی را دور ریخته و به رسوب، محلول پنج میلی‌لیتر کلرید پتاسیم افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون انجام گردید. سپس مایع رویی را دور ریخته و به رسوب محلول تثبیت کننده افزوده شد. پس از سانتریفوژ کردن، نمونه به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه قرار گرفت. در ادامه پس از سانتریفیوژ کردن، مایع رویی را خارج کرده و به آن محلول تثبیت کننده افزوده شد تا لام‌گیری انجام شود. لام در معرض هوای اتاق خشک شده و در محلول تریپسین (به مدت ۳۰ ثانیه) قرار گرفت. سپس تریپسین را با بافر شست‌وشو داده و لام به مدت پنج دقیقه در رنگ گیمسا قرار گرفت. در نهایت کروموزوم‌ها با آب مقطر شست‌وشو و با میکروسکوپ نوری مشاهده گردیدند.

الکتروفورز با ژل آگاروز (Agarose Gel Electrophoresis)

ابتدا ژل آگارز یک درصد (یک گرم پودر آگارز در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر Tris-Borate-EDTA 0.5X) مخلوط با رنگ اتیدیم بروماید تهیه گردید، سپس محصولات تکثیری هر ژن در واکنش Real-Time PCR، در ژل آگارز بارگذاری و الکتروفورز انجام شد. این مرحله جهت تایید تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیراختصاصی و جفت شدن پرایمرها (پرایمر دایمر) انجام گردید.

استخراج DNA

استخراج DNA از خون محیطی با استفاده از روش رسوب‌گذاری با نمک اشباع انجام شد (۱۵). در این روش لنفوسیت‌ها را جدا کرده و به آن بافر لیزکننده هسته
(NaCl 150 mM, Tris 15 mM, EDTA 10 mM PH=7.5), SDS
ده درصد، آنزیم پروتئیناز K افزوده و به صورت شبانه انکوباسیون انجام شد. پس از افزودن کلرید سدیم ۶ مولار و سانتریفیوژ کردن (Eppendorfe 4804R)، مایع رویی جدا و با اتانول سرد شست‌وشو گردید تا کلاف DNA تشکیل شود. سپس با حذف اتانول، ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE (Tris 10 mM , EDTA 1 mM , PH=7-8) به آن افزوده شد. غلظت و چگالی نوری DNA تخلیص شده در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ ND-1000 (BioRad, USA) تعیین گردید. سپس از نمونه‌های DNA با نسبت طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر بین ۱/۶ تا ۱/۸ جهت آزمایش Real-Time PCR استفاده گردید.

طراحی پرایمر

در این مطالعه ژن
Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (*DSCAM*)
واقع بر ناحیه اساسی کروموزوم ۲۱ در سندرم داون (Down Syndrome Critical Region, 21q22.1) و ژن Peripheral Myelin Protein 22 (*PMP22*) واقع بر کروموزوم ۱۷ (17p11.2) به ترتیب به عنوان ژن هدف و ژن مرجع انتخاب شدند. سپس با اخذ توالی ژن‌ها از سایت http://www.ncbi.nlm.nih.gov، با نرم‌افزار
Primer Express Ver.3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
برای ژن‌های مورد مطالعه پرایمرهای اختصاصی طراحی گردید. توالی پرایمرهای مستقیم و معکوس ژن هدف *DSCSM* به صورت
Fw-5'CCGGGCAGTCTAATTCCAGAAC3'
Rv- 5'AGTATGTGCACTCAGAAACCAGCTG3
و برای ژن مرجع *PMP22* به صورت
Fw-5'GGAGGAGAGAAGGCTTGAATGC3'
و
Rv- 5'GTTCCACATGCACACAGAAACG3'
می‌باشد. جهت اطمینان از عدم همولوژی و مکمل بودن توالی پرایمرها با توالی‌های نوکلئوتیدی در بخش‌های دیگر ژنوم، در BLAST سایت http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast بررسی گردید.

Real-Time PCR

در این مطالعه از دستگاه Real-Time PCR مدل
ABI 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.)
استفاده شد. برنامه زمانی-گرمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد. مرحله اول که منجر به دناتوره شدن مولکول‌های DNA و فعال شدن آنزیم پلیمراز می‌گردد، به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه

سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ سیکل متوالی و مرحله نهایی جهت ترسیم منحنی تفکیک (Dissociation Curve) یا منحنی ذوب به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. واکنش‌های Real-Time PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت سه‌تایی (Triplicate) در پلیت‌های ۹۶ چاهکی انجام شدند. مخلوط هر واکنش شامل : ۱۲/۵ میکرولیتر SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK)

یک میکرولیتر (۱۰ پیکومول) از پرایمرهای مستقیم (Forward) و معکوس (Reverse) اختصاصی هر ژن، ۵ میکرولیتر DNA ژنومیک (۲۰ نانوگرم) و به بقیه آب مقطر افزوده شد تا به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید.

در مطالعه حاضر از ماده‌ای با رنگ فلورسنت سبز به نام SYBR Green I استفاده شد که قادر است در میان شیار کوچک مولکول DNA دو رشته‌ای قرار گرفته و نور فلورسنت منتشر کند. میزان تولید نور فلورسنت، نسبت مستقیم با میزان تولید محصول PCR دارد. مولکول SYBR Green I اثر مهارکنندگی بر PCR نداشته و از آن می‌توان به جای پروب‌های اختصاصی فلورسنت استفاده کرد.

بهینه‌سازی واکنش Real-Time PCR

ابتدا جهت تعیین غلظت مناسب و عملکرد پرایمرها، از آن‌ها رقت‌های متوالی (Serial Dilution) به صورت ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۳ پیکومول در میکرولیتر تهیه و واکنش Real-Time PCR انجام گردید. هم‌چنین جهت ترسیم منحنی استاندارد (Standard Curve) برای هر ژن از رقت‌های متوالی DNA استاندارد (نرمال کنترل) به صورت ۳/۱۳، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر استفاده گردید. از منحنی استاندارد، دامنه‌ی غلظت بهینه DNA الگو و میزان راندمان PCR (PCR Efficiency) برای هر ژن، تعیین می‌گردد. واکنش رقت‌های متوالی برای پرایمرها و DNA استاندارد به صورت سه‌تایی به همراه یک واکنش بدون حضور DNA الگو (Non Template Control) برای هر ژن در پلیت ۹۶ چاهکی انجام شد.

Real-Time Quantitative PCR

در مطالعات سنجش نسبی داده‌های کمی، تغییرات ژن هدف نسبت به ژن مرجع مورد بررسی و مقایسه قرار می‌گیرد. از این‌رو محاسبه میزان کارایی و راندمان واکنش تکثیری (Amplification Efficiency) برای هر دو نوع ژن، لازم و ضروری می‌باشد. بنابراین پس از اتمام واکنش رقت‌های متوالی از DNA استاندارد به عنوان الگو، منحنی استاندارد بر اساس لگاریتم غلظت DNA (محور افقی) و سیکل آستانه یا Ct (محور عمودی) برای هر ژن ترسیم شد (نمودار ۱ و ۲). از شیب منحنی استاندارد در محاسبه راندمان واکنش تکثیری استفاده می‌شود که باید بین ۳/۶- تا ۳/۱- باشد:

$$\text{PCR Efficiency Percent} = [10^{(-1/SLPOE)} - 1] \times 100$$

آنالیز نسبی داده‌های کمی (Relative Quantification Data Analysis)

در مطالعه حاضر، جهت سنجش تعداد کپی‌های ژن‌های هدف و مرجع از روش مقایسه‌ای سیکل آستانه استفاده شد. در این روش از سیکل‌های آستانه هر ژن (که به صورت سه‌تایی یا Trip-licate انجام شده است) میانگین گرفته شد (mCt). سپس mCt ژن هدف را از mCt ژن مرجع کم کرده تا ΔCt به دست آید ($\Delta Ct = Ct_{target\ gene} - Ct_{reference\ gene}$). در ادامه ΔCt نمونه فرد نرمال را از ΔCt فرد مجهول کم کرده تا ΔΔCt حاصل گردد:

$$[\Delta\Delta Ct = (Ct_{target\ gene} - Ct_{reference\ gene})_{Unknown\ sample} - (Ct_{target\ gene} - Ct_{reference\ gene})_{Normal\ control}].$$

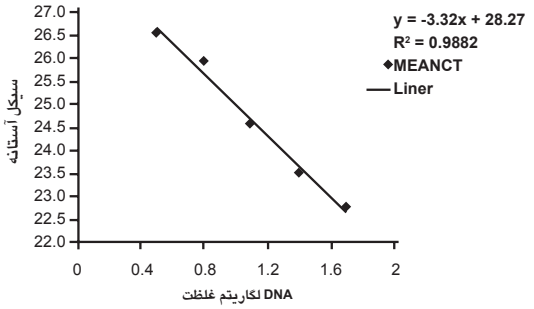
در نهایت میزان $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با نسبت ژن هدف به ژن مرجع برابر است ($\text{Target gene/Reference gene ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) (۱۲، ۱۶). ارزیابی و آنالیز داده‌های حاصل از Real-Time PCR در سیستم ABI PRISM 7300 Sequence Detection System و بسته نرم‌افزاری Sequence Detection System (SDS) V.1.2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.) انجام گردید.

آنالیز آماری

ارزیابی و سنجش آماری داده‌های حاصل از Real-Time PCR شامل میانگین، انحراف از استاندارد (SD)، ضریب تعیین داده‌ها (R^2) و نمودارها با نرم افزار SPSS (Statistical Package for Social Science, V.16, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) انجام شد. میزان p نیز با استفاده از Student's t test (۱۷) جهت تعیین اختلاف آماری معنی‌دار بین دو گروه مورد مطالعه محاسبه گردید.

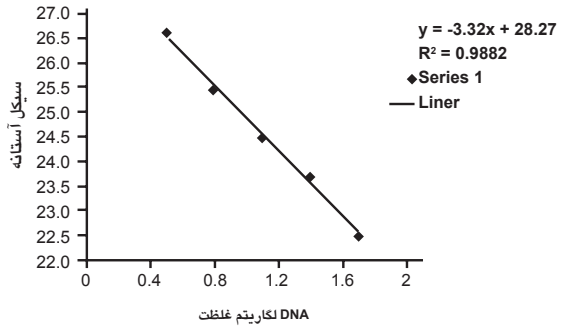
یافته ها

پس از اتمام واکنش رقت‌های متوالی در مرحله بهینه‌سازی و Set up، غلظت مناسب برای پرایمرها ۱۰ پیکومول در میکرولیتر و برای DNA الگو دامنه ۵۰-۱۲/۵ نانوگرم در میکرولیتر به دست آمد. در این مطالعه، از DNA الگو با غلظت ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر استفاده شد. با ترسیم منحنی استاندارد بر اساس لگاریتم غلظت DNA و تعداد سیکل‌های واکنش PCR و تعیین شیب آن برای هر ژن (نمودار ۱ و ۲)، درصد کارایی و راندمان تکثیری ژن *DSCAM* و *PMP22* به ترتیب ۹۹/۷ درصد و ۱۰۰ درصد به دست آمد که بیانگر صحت و اعتبار روش مقایسه‌ای سیکل آستانه در سنجش نسبی داده‌های کمی Real-Time PCR است.



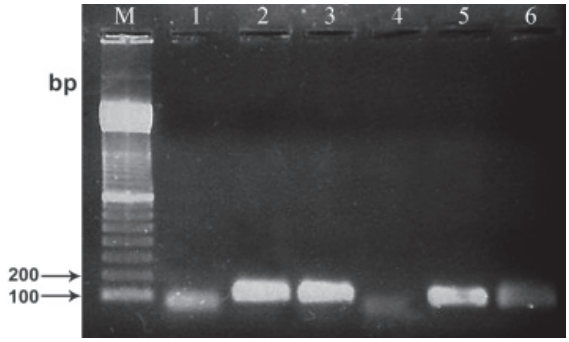
نمودار ۱: منحنی استاندارد ژن *PMP22* براساس لگاریتم غلظت DNA (محور افقی) و تعداد سیکل‌های واکنش PCR (محور عمودی). پس از آنالیز واکنش رقت‌های متوالی، شیب خط (SLOPE) منحنی استاندارد برای ژن *PMP22* ۳/۳۲- با ضریب تعیین (R^2) ۰/۹۹ به دست آمد.

در مطالعه حاضر، از رنگ فلورسنت SYBR Green I به عنوان آشکارساز استفاده شد که به طور غیراختصاصی به مولکول DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود. بنابراین جهت تعیین تکثیر اختصاصی قطعات ژنی موردنظر، عدم وجود جفت شدن پرایمرها (پرایمر دایمر) و عدم تکثیر قطعات غیراختصاصی، برای هر واکنش تکثیری منحنی ذوب یا منحنی تفکیک (Dissociation Curve) ترسیم شد (نمودار ۳).



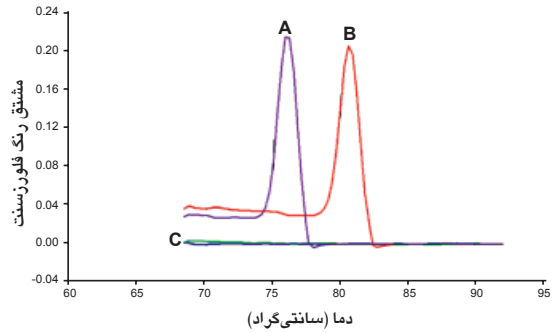
نمودار ۲: منحنی استاندارد ژن *DSCAM* براساس لگاریتم غلظت DNA (محور افقی) و تعداد سیکل‌های واکنش PCR (محور عمودی). پس از آنالیز واکنش رقت‌های متوالی، شیب خط (SLOPE) منحنی استاندارد برای ژن *DSCAM* ۳/۳۳- با ضریب تعیین (R^2) ۰/۹۹ به دست آمد.

علاوه بر این، محصولات PCR هر ژن در ژل الکتروفورز بارگذاری شد که تصویر ژل الکتروفورز، باندهای مربوط به تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر را تایید نمود (شکل ۱).

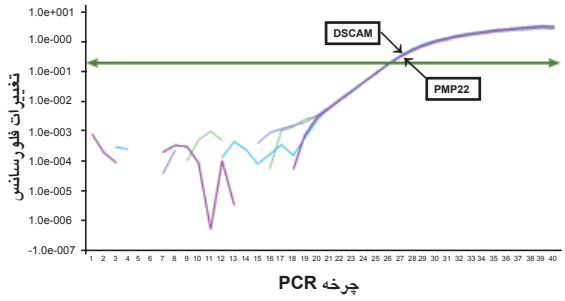


شکل ۱: الکتروفورز محصولات تکثیری ژن های *PMP22* و *DSCAM* طی برنامه Real-Time PCR ذکر شده در بخش روش‌ها روی ژل آگارز یک درصد. چاهک ۱ واکنش NTC (واکنش فاقد DNA الگو) و باند چاهک‌های ۲ و ۳ محصولات تکثیری ژن مرجع *PMP22* را نشان می‌دهد. طول قطعه تکثیری ۱۰۳جفت باز است. چاهک ۴ واکنش NTC و باند چاهک‌های ۵ و ۶ بیانگر محصولات تکثیری ژن هدف *DSCAM* را نشان می‌دهد. طول قطعه تکثیری ۹۹ جفت باز است. چاهک M مارکرهای نشانگر (Size Markers) با اندازه ۱۰۰جفت بازی را نشان می‌دهد.

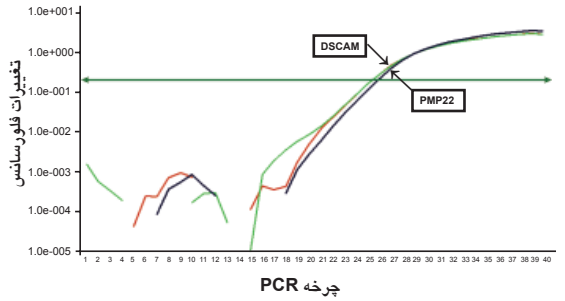
در واکنش Real-Time PCR، منحنی‌های تکثیری مربوط به واکنش‌های سه‌تایی هر ژن (هدف و مرجع) به طور کامل با یکدیگر هم‌پوشانی داشتند. منحنی‌های تکثیری ژن هدف و مرجع در فرد نرمال (نمودار ۴) و تریزومی ۲۱ (نمودار ۵) نشان داده شده است که اختلاف موجود به اندازه نیم سیکل آستانه (Ct) و یا به عبارتی بیانگر حضور یک کپی اضافی از ژن *DSCAM* در افراد مبتلا به سندرم تریزومی ۲۱ است. در آنالیز نسبی داده‌های کمی حاصل از Real-Time PCR با روش مقایسه‌ای سیکل آستانه (ΔΔCt) و فرمول نسبت تعداد کپی ژن هدف به ژن مرجع ($DSCAM/PMP22$ ratio=$2^{-\Delta\Delta Ct}$)، در افراد کنترل نرمال و بیماران مبتلا به سندرم تریزومی ۲۱ به ترتیب ۰/۱۰ ± ۱/۰۱ و ۰/۱۸ ± ۱/۴۸ (نمودار ۶) با p value<۰/۰۰۱ به دست آمد که اختلاف معنی‌دار آماری بین دو گروه مورد مطالعه را نشان می‌دهد (جدول ۲).



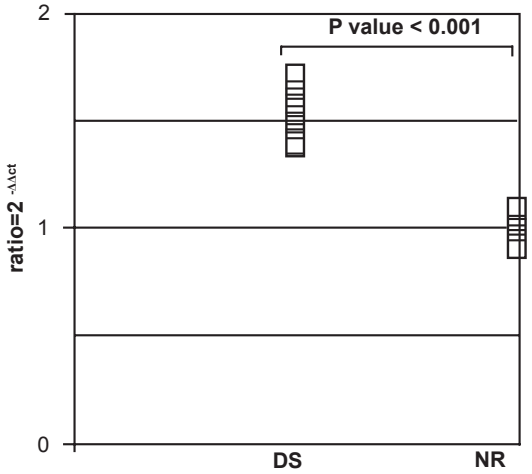
نمودار ۳: منحنی تفکیک (ذوب) که بر اساس دما (محور افقی) و مشتق سیگنال فلورسنت دریافتی دستگاه Real-Time PCR (محور عمودی) ترسیم می‌شود. A منحنی تفکیک ژن مرجع *PMP22* را نشان می‌دهد که قطعه تکثیری مورد نظر در دمای ۷۶ درجه سانتی‌گراد دناتوره می‌شود. B منحنی تفکیک ژن هدف *DSCAM* است که قطعه تکثیری مورد نظر در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد دناتوره می‌شود. C بیانگر عدم جفت شدن پرایمر (پرایمر دایمر) است. سطح زیر منحنی بیانگر میزان محصولات تکثیری حاصل از PCR است.



نمودار ۴: منحنی تکثیری ژن *DSCAM* (Ct=26.24) و *PMP22* (Ct=26.24) در فرد کنترل نرمال. هر دو منحنی همپوشانی داشته و اختلافی را نشان نمی‌دهند. محور افقی بیانگر تعداد چرخه‌های PCR و محور عمودی بیانگر ΔRn یا اختلاف رنگ فلورسنت دریافتی توسط دستگاه Real-Time PCR از رنگ زمینه است (رنگ فلورسنت زمینه= Rn-، کل رنگ فلورسنتی دریافتی =Rn^+، $\Delta Rn=Rn^+ - Rn^-$).



نمودار ۵: منحنی تکثیری ژن *DSCAM* (Ct=25.31) و *PMP22* (Ct=25.85) در بیمار مبتلا به سندرم تریزومی۲۱. اختلاف منحنی تکثیری ژن *DSCAM* و *PMP22* به اندازه نیم سیکل آستانه است. (محور افقی تعداد سیکل‌های PCR و محور عمودی ΔRn را نشان می‌دهد. رنگ فلورسنت زمینه = Rn-، کل رنگ فلورسنتی دریافتی =+Rn، $\Delta Rn= Rn^+ - Rn^-$).



نمودار ۶: نسبت تعداد کپی‌های ژن *DSCAM* به ژن *PMP22* در افراد بیمار مبتلا به سندرم تریزومی 21 (DS) و افراد نرمال (NR) به ترتیب ۰/۱۸ ± ۱/۴۸ و ۰/۱۰ ± ۱/۰۱ با ۰/۰۰۱ > p value به دست آمد که اختلاف معنی‌دار آماری بین دو گروه مورد مطالعه را تایید نمود.

.جدول ۲: نسبت ژنی *DSCAM/PMP22* در لنفوسیت‌های افراد بیمار و نرمال

نوع نمونه	تعداد	Mean ± SD	Student's t test
سندرم داون	۵۲	۱/۸۴ ± ۰/۸۱	p value>۰/۰۰۱
نرمال	۰۱	۱/۱۰ ± ۰/۰۱	

هم‌چنین نتایج حاصل با تکنیک آنالیز کروموزومی سیتوژنتیک (کاریوتیپ، G باندینگ) و تکنیک مولکولی QF-PCR مقایسه و مورد تایید قرار گرفت.

بحث

در این مطالعه از تکنیک بسیار حساس و دقیق Real-Time PCR کمی برای سنجش تعداد کپی‌های ناحیه اساسی کروموزوم ۲۱ استفاده شد. به طور کلی در ۹۹ درصد افراد مبتلا به سندرم داون (سندرم تریزومی ۲۱) از ژن‌های واقع بر ناحیه اساسی (Down Syndrome Critical Region) سه نسخه و در افراد نرمال تنها دو نسخه وجود دارد. از این رو ژن *DSCAM* به عنوان ژن هدف واقع در ناحیه اساسی کروموزوم ۲۱ (21q22.2) و ژن *PMP22* به عنوان ژن مرجع واقع بر روی کروموزوم ۱۷ (17p11.2) انتخاب شد. در مطالعه حاضر، نسبت ژنی *DSCAM/PMP22* در نمونه‌های بیمار مبتلا به سندرم تریزومی ۲۱ (DS) و گروه کنترل نرمال (NR) به ترتیب ۰/۱۸ ± ۱/۴۸ و ۰/۱۰ ± ۱/۰۱ (p value<۰/۰۰۱) محاسبه گردید که بیانگر حضور سه کپی (نسخه) از کروموزوم ۲۱ در گروه بیماران و دوکپی از این کروموزوم در افراد نرمال است. نتایج حاصل از تکنیک Real-Time PCR با روش‌های استاندارد متداول شامل آنالیز کروموزومی سیتوژنتیک (کاریوتیپ، G باندینگ) و تکنیک مولکولی QF-PCR تایید گردید.

از روش Real-Time PCR در سنجش میزان بیان ژنی (۱۸) و سنجش تعداد کپی (۵، ۹) در تشخیص پیش از تولد سندرم تریزومی ۲۱ استفاده شده است. در مطالعه هو و همکاران (۹) از پروب‌های فلورسنت Taq-Man در تکنیک Real-Time PCR بر نمونه‌های خون و مایع آمنیون استفاده شده است، هم‌چنین ژن (*GAPDH*) Glyceraldehyde 3-Phosphat Dehyrogenase به عنوان مرجع و ژن *DSCR3* (Down Real-Time PCR3) به عنوان ژن هدف واقع بر کروموزوم ۲۱ انتخاب شده است. ژن *GAPDH*، یک ژن خانه‌دار (Housekeeping Gene) است که در مطالعات سنجش بیان ژنی استفاده می‌شود و تغییرات بیان ژن هدف را نسبت به آن می‌سنجند. این ژن دارای تعداد زیادی ژن‌های کاذب (Pseudo Genes) در نواحی دیگر ژنوم می‌باشد. بنابراین استفاده از این ژن در مطالعات ژنومیک و سنجش تعداد کپی مناسب نمی‌باشد. انتخاب ژن مرجع در مطالعات سنجش تعداد کپی اهمیت بسیاری دارد زیرا تعداد کپی‌های ژن هدف نسبت به این ژن مقایسه و محاسبه می‌گردد. از این رو در مطالعه حاضر، ژن *PMP22* به عنوان مرجع انتخاب گردید؛ زیرا هر گونه تغییر در تعداد کپی به صورت حذف یا مضاعف شدن به ترتیب منجر به بیماری Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies (HNPP) و شارکوت-ماری توث نوع A1 می‌شود (Charcot-Marie Tooth Type 1A) (۱۹). در مطالعه یانگ و همکاران (۵)، ژن *S100B* و نشانگر مولکولی D21S167 به عنوان ژن‌های هدف و ژن فاکتور رشد شبه انسولینی نوع 1 (Insulin-like Growth Factor 1) که یک ژن خانه‌دار است، به عنوان ژن مرجع انتخاب شده است. در این مطالعه نیز از پروب‌های فلورسنت Taq-Man استفاده شده است و نسبت تعداد کپی ژن *S100B* به ژن مرجع *(S100B/IGF-1 ratio)* در نمونه‌های خون NR و DS به ترتیب ۰/۱ ± ۶/۴ و ۲/۱ ± ۱۵/۶ و در نمونه‌های مایع آمنیون به ترتیب ۲/۵ ± ۶/۳ و ۷/۰ ± ۱۹/۱، هم‌چنین نسبت تعداد کپی نشان‌گر مولکولی D21S167 به ژن مرجع (*D21S167/IGF-1* ratio) در نمونه‌های NR و DS به ترتیب ۰/۴ ± ۲/۳ و ۰/۸ ± ۶/۱ و در نمونه‌های نرمال مایع آمنیون و جنین‌های مبتلا به سندرم تریزومی ۲۱ به ترتیب ۱/۱ ± ۳/۰ و ۲/۵ ± ۷/۰ بیان شده است. در کاریوتیپ افراد مبتلا به سندرم تریزومی

۲۱ و افراد نرمال به ترتیب سه و دو کپی از کروموزوم ۲۱ حضور دارد. از نظر تئوری، نسبت ژن‌های مستقر بر کروموزوم ۲۱ در افراد داون نسبت به افراد نرمال ۱/۵ برابر است. بر این اساس، نتایج مطالعه یالی هو و همکاران مشابه با مطالعه حاضر بوده و یکدیگر را تایید نمودند، اما نتایج مطالعه یانگ و همکاران به طور کامل متفاوت است، به گونه‌ای که نسبت‌های به دست آمده با نسبتهای مورد انتظار (۱/۵ برابر) هماهنگی ندارد.

در تشخیص پیش و بعد از تولد بیماری سندرم داون از روش‌های متفاوتی استفاده می‌شود؛ در حال حاضر از روش‌های آنالیز کروموزومی سیتوژنتیک (کاریوتیپ) و FISH به عنوان روشی استاندارد در تشخیص پیش از تولد سندرم تریزومی ۲۱ استفاده می‌شود. این روش‌ها دقت زیادی به کار رفته اما با این وجود، از نظر کلینیکی بسیار کاربر، پرهزینه و زمان‌بر هستند، هم‌چنین به سلول زنده جهت کشت سلولی نیاز دارند. پس از اتمام پروژه ژنوم انسان و ابداع تکنیک واکنش زنجیره پلیمراز، روش‌های مولکولی جهت تشخیص و شناسایی ناهنجاری‌های کروموزومی ابداع شدند. در تکنیک HGQ-PCR با تکثیر دو ژن همولوگوس مانند فسفوفروکتوکیناز I نوع کبدی واقع برکروموزوم ۱ و نوع عضلانی واقع بر کروموزوم ۲۱،تعداد کپی‌های کروموزوم ۲۱ را محاسبه می‌کنند. اما به دلایل محدود کننده، این تکنیک به صورت استاندارد و قابل اعتماد پذیرفته نشده است. در حال حاضر از تکنیک مولکولی QF-PCR بر اساس تکثیر نشانگرهای مولکولی STRs در تشخیص پیش از تولد تریزومی ۲۱ استفاده می‌شود. این تکنیک نیازمند یک مرحله پسا تکثیری (Post Amplification) است که نیاز به دستگاه تعیین توالی (Sequencer) دارد، همچنین نشانگرهای مولکولی STRs در جمعیت‌ها و نژادهایی مختلف پلی‌مورفیک (چند شکلی) می‌باشد.

نتیجه‌گیری

تکنیک Real-Time PCR، یکی از جدیدترین روش‌های مولکولی است که قادر است با دقت زیاد، حساسیت بالا و در مدت زمان بسیار کم، نمونه‌های زیادی را به طور هم‌زمان و بدون نیاز به سلول‌های زنده آنالیز نماید. بنابراین می‌توان از این تکنیک به عنوان روشی دقیق، قابل اعتماد و با حساسیت بالا در تشخیص سندرم تریزومی ۲۱ استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

از بیماران، خانواده محترم آنها و از همکاران گرامی در بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، کمال تشکر را داریم. این مطالعه در قالب طرح پژوهشی در انستیتو پاستور ایران با شماره ثبت طرح ۴۱۷ و همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است.

References

1. Acar H, Yildirim MS, Kaynak M. Reliability and efficiency of interphase-fish with alpha-satellite probe for detection of aneuploidy. Genet Couns. 2002, 13(1): 11-17.
2. Li F, Fang W, Wu B, Wang J, Zhong H, Heng W.Molecular cytogenetic detection of trisomy 21 in interphase nuclei and metaphase chromosomes. Chin Med J (Engl). 1999; 112(9): 840-844.
3. Witters I, Devriendt K, Legius E, Matthijs G, Van Schoubroeck D, Van Assche FA, et al.Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 in 5049 consecutive uncultured amniotic fluid samples by fluorescence in situ hybridisation (FISH). Prenat Diagn. 2002; 22(1): 29-33.
4. Mansfield ES. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. Hum Mol Genet. 1993; 2(1): 43-50.
5. Yang YH, Nam MS, Yang ES.Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 by real-time quantitative polymerase chain reaction with amplification of small tandem repeats and S100B in chromosome 21. Yonsei Med J. 2005; 46(2): 193-197.
6. Lee HH, Chang JG, Lin SP, Chao HT, Yang ML, Ng HT.Rapid detection of trisomy 21 by homologous gene quantitative PCR (HGQ-PCR). Hum Genet. 1997; 99(3): 364-367.
7. Findlay I, Matthews P, Tóth T, Quirke P, Papp Z.Same day diagnosis of Down's syndrome and sex in single cells using multiplex fluorescent PCR. Mol Pathol. 1998; 51(3): 164-167.
8. Blake D, Tan SL, Ao A. Assessment of multiplex fluorescent PCR for screening single cells for trisomy 21 and single gene defects. Mol Hum Reprod. 1999; 5(12): 1166-1175.
9. Hu Y, Zheng M, Xu Z, Wang X, Cui H. Quantitative real-time PCR technique for rapid prenatal diagnosis of Down syndrome. Prenat Diagn. 2004; 24(9): 704-707.
10. Zimmermann BG, Dudarewicz L. Real-time quantitative PCR for the detection of fetal aneuploidies. Methods Mol Biol. 2008; 444: 95-109.
11. Hayat No Saeed M KM, Maryami F, Edalat R, Najmabadi H, Zeinali S. Carrier detection of duchenne muscular dystrophy (DMD) in females using real time PCR. Yakhteh. 2007; 9(1): 6.
12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001; 25(4): 402-408.
13. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. Biotechniques. 2008; 44(5): 619-626.
14. Wysocki LJ , Sato VL. Panning of lymphocytes. A method for cell selection. Proc Natl Acad Sci USA. 1978; 75(6): 2844-2848.
15. 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.
16. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001; 29(9):e45.
17. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics. 2006; 22(7): 85.
18. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using

real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol. 2000; 25(2): 169-193.
19. Kim SW, Lee KS, Jin HS, Lee TM, Koo SK, Lee YJ, Jung SC. Rapid detection of duplication/deletion of the PMP22 gene in patients with Charcot-Marie-Tooth disease Type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsy by real-time quantitative PCR using SYBR Green I dye. J Korean Med Sci. 2003; 18(5): 727-732.