

# خون

مجله علمی پژوهشی

دوره ۷ شماره ۴ زمستان ۸۹ (۲۲۰-۲۱۴)

مقاله پژوهشی

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

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

### چکیده

#### سابقه و هدف

بتا تالاسمی یکی از شایع ترین بیماری های تک ژنی در دنیاست. 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 مسؤول: PhD ژنتیک انسانی - مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر - صندوق پستی: ۱۳۱۸۵-۱۶۶۷



### مواد و روشها

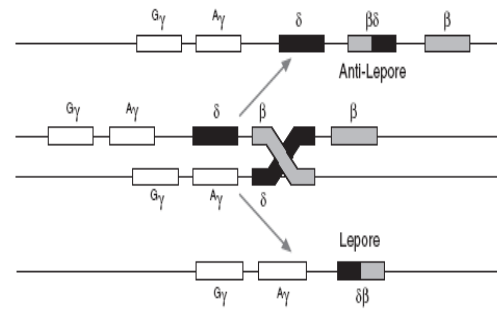
مطالعه انجام گرفته از نوع تجربی - کاربردی بود. در این تحقیق، نمونه‌ها با توجه به اندکس‌های خونی و نتایج آزمایش‌های هماتولوژی از میان افراد مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی کوثر، برای بررسی‌های مولکولی مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌ها از میان افرادی که نتیجه اندکس‌های خونی غیر طبیعی داشتند، (مقدار  $MCV < 80\text{fl}$ ،  $MCH < 27\text{pg}$ ، هموگلوبین A2 نرمال و افزایش یافته  $HbF$  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 گلوبول‌های 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	CAATGTATCATGCCTCTTTGCAC
H5	GCAGCCTCACCTTCTTTCATGG
E1	GACACACATGACAGAACAGCCAAT
E2	CGATCTTCAATATGCTTACCAAG
E3	CATTCGTCTGTTTCCCATTCTA

در بررسی حذف لپور، از آغازگرهای E1 و E3 به عنوان آغازگرهایی که باند موتان را با طول ۷۷ جفت باز نشان می‌داد و از آغازگرهای E2 و E3 به عنوان



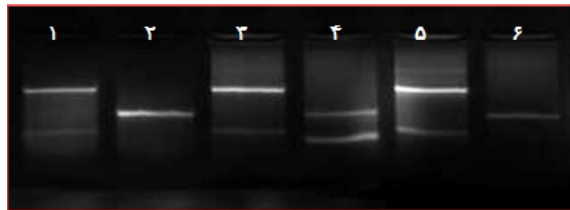
شکل ۱: نحوه ایجاد هموگلوبین لپور و آنتی‌لپور (۶)

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  $\beta\psi$  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).

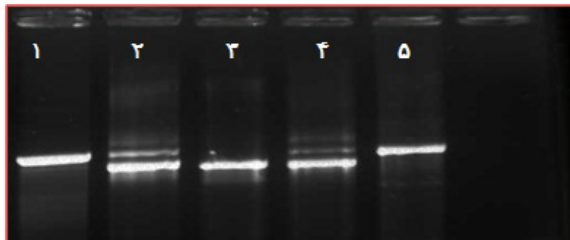
برای تشخیص حذف‌های ناشناخته، باید از روش‌های MLPA و Real-Time استفاده کرد. با استفاده از روش MLPA، با نزدیک ۴۰ پروب به ردیابی منطقه حذف پرداخته می‌شود، ولی حدود دقیق حذف با این روش قابل شناسایی نمی‌باشد (۸، ۹). Real-time دارای محدودیت مشابه و حتی بیشتر است یعنی با این روش، محدوده حذف باید مشخص شده باشد. 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 روش Real-Time و MLPA ندارد و با بررسی دوپلکس این دو حذف، بررسی با سرعت عمل بیشتر و هزینه کمتر قابل انجام است.



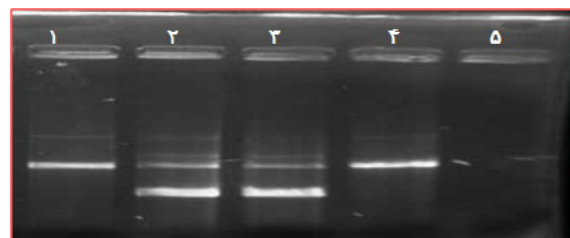
شکل ۲: در چاهک ۱ و ۲ کنترل نرمال، چاهک ۳ و ۴ فرد هتروزیگوت لپور و ۵ و ۶ و ۷ و ۸ نمونه فرد هتروزیگوت می باشد.



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 حذف‌ها به صورت دوپلکس پرداخته شد. به این معنا که آغازگرهای موتان و نرمال

آغازگرهایی که باند نرمال را به طول ۹۱۵ جفت باز تکثیر می‌کرد، 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 رادر فرد طبیعی ایجاد می‌کنند. آغازگرهای H1 و H3، قطعه موتان با طول ۳۲۷ و آغازگرهای H2 و H5، قطعه موتان به طول ۳۷۱ جفت باز ایجاد می‌نمایند. در بررسی حذف‌های 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.

## یافته‌ها

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 حذف‌ها 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 می‌باشد (چاهک ۱ و ۲ از شکل ۲). در تیوب‌های ۳ و ۴ به علت هتروزیگوت بودن در چاهک ۳، قطعه موتان تکثیر شد (با طول ۷۷۷ جفت باز) که با اختلاف کمی پایین‌تر 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 حذف‌های لپور و هندی - آسیایی (هر کدام جداگانه) یک جا به نمونه اضافه شد (شکل‌های ۴ و ۵).

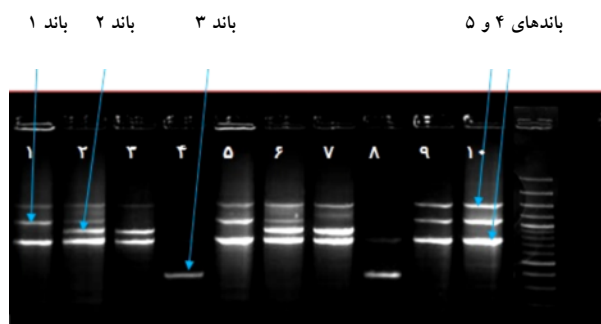
سهولت انجام می‌شود، این کار گشایشی در شروع راه‌اندازی بررسی حذف‌های بتا به صورت مولتی است. لازم به ذکر است با توجه به روش‌های مختلف برای تشخیص حذف‌ها از جمله MLPA، Real Time و Gap-PCR، مسلماً تشخیص با روش Gap-PCR ارزان‌تر و سریع‌تر می‌باشد. پس بهینه‌سازی این روش در تشخیص حذف‌ها مهم به نظر می‌رسد. باید در نظر گرفت که با روش MLPA، تعداد کثیری از حذف‌ها قابل ردیابی است ولی با روش Real-Time، فقط حذفی که در محدوده آغازگر است قابل شناسایی می‌باشد. روش MLPA که دارای حداقل ۴۰ پروب برای بررسی کلاستر ژن بتا است، به بررسی حذف‌ها در یک محدوده می‌پردازد و ارزش و کارایی بالایی دارد. ولی باید این مساله را در نظر گرفت که روش MLPA، صرفاً به بررسی حذف‌ها بدون دادن اطلاعات از نوع حذف می‌پردازد. حسن استفاده از روش GAP-PCR در بررسی حذف‌ها چه به صورت جداگانه و چه به صورت مولتی پلکس این است که با توجه به شناخت حذف‌های شایع در منطقه ایران، می‌توان با هزینه خیلی کمتر از هزینه روش MLPA، به بررسی این حذف‌ها پرداخت. البته لازم به ذکر است که حذف هندی - آسیایی، شیوع زیادی در ایران ندارد ولی دو حذف لپور و Sicilian، از حذف‌های نسبتاً شایع‌تر 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.

### نتیجه‌گیری

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 وقت‌گیر و به نسبت پیچیده‌ای است.

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

مربوط به هر دو حذف یک جا و در یک تیوب ریخته شد (شکل ۶). در واقع آن چه در این شکل دیده می‌شود، هدف تحقیق می‌باشد 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، شماره ۷ همولپور، شماره ۸ هندی - آسیایی و شماره‌های 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 می‌باشد.

### بحث

حذف‌های ژن آلفا - گلوبین روی کروموزوم ۱۳/۳ p ۱۶، در ۸۰ تا ۹۰ درصد موارد، علت اصلی مولکولی آلفا تالاسمی می‌باشد. اما نوترکیبی‌ها در خوشه ژنی بتا گلوبین روی کروموزوم ۱۵/۴ p ۱۱، علت فقط ۱۰ درصد از بتا تالاسمی‌ها است. در دنیا بیش از ۵۰ حذف مربوط به آلفا تالاسمی و ۶۰ حذف مربوط به بتا تالاسمی شناخته شده است. در واقع شیوع حذف‌ها در آلفا تالاسمی خیلی بیشتر از بتا تالاسمی است (۱۱). با توجه به این شیوع کم حذف‌ها در بتا تالاسمی، هیچ گزارشی از بررسی به صورت مولتی و یا دوپلکس از این حذف‌ها داده نشده است. اما باید به این نکته توجه کرد که بعد از بررسی موتاسیون‌های نقطه‌ای که علت اصلی بتا تالاسمی می‌باشد، به بررسی حذف‌ها در این ژن می‌پردازند و اگر بتوان تمام حذف‌های شایع در ایران را با هم بررسی کرد، مسلماً دستاورد علمی مهمی است که تمام آزمایشگاه‌های تشخیص طبی می‌توانند برای صرفه‌جویی در وقت و هزینه از آن استفاده کنند. با توجه به این که بررسی چندین حذف آلفا در حال حاضر 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.* Thalassaemia 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 thalassaemia 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 thalassaemia 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 thalassaemia 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.<sup>1</sup>, Ali Mohammadi R.<sup>2</sup>, Fuladi P.<sup>1</sup>, Foroughi S.<sup>1</sup>, Feiz Pour M.<sup>1</sup>, Vahidi R.<sup>1</sup>, Hashemi M.<sup>1</sup>, Mola Zadeh F.<sup>1</sup>, Heidari M.<sup>1</sup>, Deilam Salehi M.<sup>1</sup>, Zeinali S.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Kowsar Human Genetics Research Center, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Science 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*