

## شناسایی ریزحذف‌های 22q11.2 با روش PCR نیمه کمی چند گانه (SQMPCR)

سارا پورانوری<sup>۱</sup>، مهرداد نوروزی نیا\*<sup>۲</sup>، علی اکبر زینالو<sup>۳</sup>، سعیدرضا غفاری<sup>۴</sup>، مسعود هوشمند<sup>۵</sup>، سعید کاویانی<sup>۶</sup>

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، بخش قلب بیمارستان طی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۴- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۵- استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
- ۶- استادیار، گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۶

دریافت مقاله: ۸۶/۸/۲۲

### چکیده

**هدف:** ناحیه 22q11.2 یک منطقه مستعد برای وقوع انواع بازآرایی‌ها است؛ به ویژه حذف‌هایی که منجر به وقوع انواع مختلفی از اختلالات ژنومی از جمله دی‌جرج و ولوکاردیوفاسیال می‌شوند. شاخص‌ترین ویژگی بیماران دارای این ریزحذف، نقایص قلبی مادرزادی از نوع کونوترانکال است. روش استاندارد برای تشخیص ریزحذف، روش (FISH) است. با این حال این روش دارای اشکالاتی از جمله گران بودن قیمت تمام شده و حساسیت کمتر این روش در شناسایی ریزحذف‌های غیر شایع و کوچکتر از معمول است.

**مواد و روش‌ها:** گروه مورد مطالعه در این تحقیق شامل ۱۰ فرد با علائم مشخصه نشانگان دی‌جرج و دارای ناهنجاری مادرزادی قلبی از نوع کونوترانکال بودند که با استفاده از روش FISH و کاوشگر TUPLE1 بررسی شده بوده‌اند. علاوه بر این سه فرد نرمال به‌عنوان کنترل منفی ریزحذف فوق در این تحقیق داخل شده‌اند. در این مطالعه با استفاده از نشانگرهای STS داخل و خارج منطقه مورد مطالعه، واکنش PCR نیمه کمی (SQMPCR) طراحی شد. نتایج با استفاده از نرم افزار TotalLab تجزیه و تحلیل شد.

**نتایج:** ۴ بیمار دوز ژنی کمتر از ۶۰ درصد نشان دادند که تأیید کننده وجود ریزحذف است. روش FISH تنها نشان دهنده یک بیمار مبتلا به ریزحذف بوده است.

**نتیجه‌گیری:** روش SQMPCR راه‌اندازی شده در این تحقیق توانست در بیماران مبتلا به ناراحتی مادرزادی قلبی نوع کونوترانکال وجود ریزحذف را در ۴۰ درصد بیماران مشخص کند. به عبارت دیگر در ۳ بیمار مبتلا و بدون مشکل شناخته شده ژنتیکی با روش FISH، حذف تشخیص داده شده است. بررسی‌های قبلی هم نشان دهنده حساسیت بیشتر روش‌های مولکولی در تشخیص ریزحذف‌های ناحیه مورد نظر بوده است. این تحقیق نشان دهنده وجود ریزحذف‌های غیر شایع در جامعه مبتلایان ایرانی و توانایی روش فوق در شناسایی بعضی از موارد منفی با روش FISH است. اگرچه آزمایش‌ها و بررسی‌های بیشتری برای تعیین حساسیت این روش لازم است اما به‌نظر می‌رسد که این روش می‌تواند در تشخیص موارد ریزحذف بدون علت شناخته شده ژنتیکی در بررسی FISH ولی دارای فنوتیپ کامل نشانگان 22q11.2 استفاده شود.

کلیدواژگان: ریزحذف 22q11.2، SQMPCR، نشانگان دی‌جرج.

### ۱- مقدمه

بیماران VCFS یافت شده است. ریزحذف 22q11.2 علاوه بر DGS و VCFS، در بیمارانی با نشانگان Cayler (ConoTruncal Anomaly Face Syndrome) CTAFS و نشانگان Opitz GBBB و CHARGE association، cardiofacial

ریزحذف در 22q11.2 با دو نشانگان دی‌جرج (DiGeorge Syndrome :DGS) و ولوکاردیوفاسیال (VeloCardioFacial Syndrome :VCFS) در ارتباط است. این ریزحذف در بیش از ۹۰ درصد بیماران DGS و ۷۵ درصد

\* نشانی مکاتبه: تهران، تقاطع بزرگراه جلال آل احمد و شهید چمران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵

و ملایم در این افراد باشد. با این حال در مواردی بیماری با فنوتیپ مشابه نشانگان 22q11DS گزارش شده‌اند که دارای میکرودوپلیکاسیون بوده‌اند [۸].

روش متسداول و استاندارد طلاپی برای شناسایی ریزحذف 22q11 در نشانگان 22q11DS روش FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) است [۹]. با این حال روش FISH معایب و مشکلاتی دارد: اولاً این روش بیشترین کارایی را زمانی دارد که نقاط شکست کاملاً مشخص باشند [۱۰]. به عبارت دیگر در مواردی که نقاط شکست به علت وجود LCRهای مختلف متفاوت است استفاده از روش FISH می‌تواند دارای جواب منفی کاذب باشد. ثانیاً روش FISH نمی‌تواند موارد میکرودوپلیکاسیون را تشخیص دهد [۱۰]. ثالثاً این روش حساسیت کمتری از روش‌های مولکولی در ریزحذف‌های کوچک دارد.

با توجه به تمام این موارد و این که اصولاً استفاده از روش FISH در این نشانگان در ایران فراگیر نشده است و تشخیص مولکولی در بیماران مبتلا به نشانگان ریزحذف 22q11 برای مدیریت بیماری در بیماران و خانواده آن‌ها لازم است، روش PCR نیمه کمی (Semi-Quantitative Multiplex PCR :SQMPCR) جدیدی برای شناسایی ریزحذف‌ها و میکرودوپلیکاسیون‌های ناحیه 22q11.2 طراحی و راه‌اندازی شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

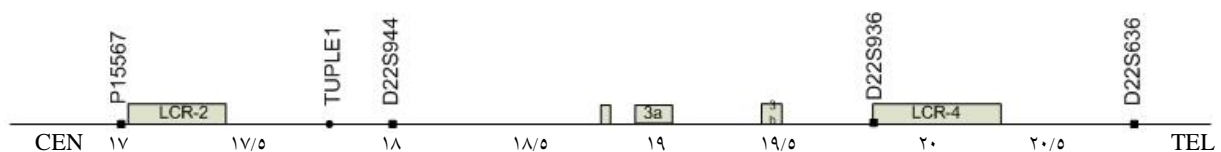
### ۲-۱- انتخاب بیماران مناسب برای مطالعه

تعداد ۱۰ بیمار دارای علائم مشخص DGS از جمله دیسمورفی (Dysmorphism) صورت و نواقص قلبی کونوترانکال انتخاب شد و پس از گرفتن رضایت‌نامه از والدین آن‌ها مراحل بعدی تحقیق انجام گرفت. علاوه بر این، ۳ نمونه نرمال به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. قبلاً روی این بیماران آزمون FISH با استفاده از کاوشگر (Probe) TUPLE1 [۱۱] برای تشخیص نشانگان 22q11DS انجام گرفته بود.

مشاهده شده است [۱]. به مجموعه نشانگان‌های ناشی از این ریزحذف نام کلی نشانگان del22q11 (22q11DS) داده شده است [۲]. شاخص‌ترین ویژگی 22q11DS بیماری قلبی مادرزادی (Congenital Heart Disease :CHD) از نوع کونوترانکال (Conotruncal) (tetralogy of Fallot, interrupted aortic arch, ventricular septal defect, and truncus arteriosus) است که تقریباً در ۷۵ درصد بیماران مشاهده می‌شود [۲].

شناسایی توالی‌های تکراری کم تعداد ویژه کروموزوم ۲۲ که LCR (Low Copy Repeat) نامیده می‌شوند درون ناحیه 22q11.2 در داخل یا در مجاورت نقاط انتهایی حذف ۳ Mb مخصوص DGS/VCFS منجر به شناخت مکانیسم تغییرات ژنومی در ناحیه 22q11.2 شده است. بر اساس این فرضیه نوترکیبی همولوگ بین کپی‌های LCR ویژه کروموزوم ۲۲ در ایجاد حذف‌های کروموزوم ۲۲ دخالت دارد [۳]. ناحیه 22q11.2 حداقل دارای ۸ عدد LCR22 است که ۴ تا از این‌ها درون یا مجاور حذف‌های معمول 22q11DS قرار دارد (شکل ۱). این LCRها از سانترومر (Centromere) به تلومر (Telomere) به این صورت نشانه‌گذاری شده‌اند: LCR22-2، LCR22-3a، LCR22-3b و LCR22-4 [۴]. نوترکیبی همولوگ بین نواحی LCR مختلف توضیح دهنده انواع ریزحذف‌ها در این ناحیه است. اکثر افراد مبتلا به 22q11DS (۹۸ درصد-۹۹ درصد) یک نقطه شکست ابتدایی (Proximal) درون LCR22-2 دارند در حالی که نقطه شکست انتهایی (Distal) آن‌ها می‌تواند متغیر باشد. در ۹۰ درصد بیماران این نقطه درون LCR22-4 قرار می‌گیرد که تولید یک حذف ۳ Mb می‌کند که به Typical Deleted Region (TDR) معروف است و در ۷ درصد بیماران درون LCR22-3a قرار می‌گیرد که تولید یک حذف ۱/۵ Mb می‌کند [۱،۵،۳]. البته گروه کوچکی هم دارای حذف‌ها یا جابه‌جایی‌های غیر معمول هستند [۴،۳].

می‌توان انتظار داشت که در این ناحیه نوترکیبی‌هایی به صورت میکرودوپلیکاسیون (Microduplication) هم روی دهد [۷]. البته موارد گزارش شده میکرودوپلیکاسیون‌ها در این ناحیه بسیار کمتر از ریزحذف‌ها بوده که علت می‌تواند فنوتیپ (Phenotype) متفاوت



شکل ۱ نقشه ناحیه 22q11.2 در شکل نشانگرهای ژنتیکی استفاده شده در روش SQMPCR به صورت مربع‌های توپر، کاوشگر TUPLE1 استفاده شده در روش FISH به صورت دایره توپر و LCRها به شکل جعبه‌های خاکستری نشان داده شده‌اند.

## ۲-۲- استخراج DNA

بعد از گرفتن خون محیطی از بیماران، استخراج DNA با استفاده از روش رسوبدهی با نمک (Salting out) انجام گرفت [۱۲].

## ۲-۳- انتخاب نشانگرها و آغازگرها

در مجموع ۵ جفت آغازگر انتخاب شد (جدول ۱) که ۳ جفت آن برای نشانگرهای STS (Sequence Tagged Site) شناخته شده در ناحیه حذف طراحی شده‌اند [۱۳]: از این ۳ جفت، ۲ جفت درون منطقه ۳ Mb قرار دارند: D22S944 درون منطقه حذف ۱/۵ Mb و D22S936 درون منطقه ۳ Mb و خارج از منطقه حذف ۱/۵ Mb قرار دارد. یک جفت دیگر در خارج از این منطقه (D22S636) به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. از نشانگر P15567 که در انتهای ابتدایی حذف ۳ Mb قرار دارد نیز استفاده شد [۱۳]. این نشانگر تنها در تعداد کمی از بیماران دارای حذف است. ژن HPRT (Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase) به‌عنوان کنترل داخلی در بررسی نیمه کمی نشانگر P15567 استفاده شد [۱۴].

جدول ۱ توالی آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه

نام آغازگر	توالی آغازگر	PCR اندازه محصول	Tm
D22S944-F	CAT GTG AAA GAT GCT ACT TCC	۱۶۶ bp	۵۵/۰
D22S944-R	ATC CCA TGC TCC TCC CCA T		۶۳/۹
D22S936-F	CAA TCT TGG CAG CCA GTT TAG	۱۸۰ bp	۵۹/۹
D22S936-R	CAG CAT CTT CCT GGT GGC C		۶۴/۱
D22S636-F	AAC CTT CTG ATG GCT CCT CT	۱۲۳ bp	۵۷/۹
D22S636-R	CAT GGA GCT GAC ACT GAG TG		۵۷/۹
HPRT-F	ACG TCT TGC TCG AGA TGT GA	۸۹ bp	۵۷/۳
HPRT-R	CCA GCA GGT CAG CAA AGA AT		۵۷/۳
P15567-F	GCC AGA GGA TAG GGA GTG C	۱۱۹ bp	۵۹/۸
P-15567-R	GTG GAA GCA GTC AAA CAG AAC		۵۷/۴

تکثیر همزمان D22S936-D22S636 و ۱۰ میکرومولار از هر آغازگر انجام گرفت. تکثیر همزمان D22S944-D22S636 با استفاده از کیت PCR چندگانه (Multiplex PCR) (Qiagen) و به صورت شروع داغ (Hot start) انجام گرفت. برنامه‌های PCR بهینه‌سازی شده در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است.

جدول ۲ شرایط بهینه برای دو واکنش PCR چندگانه D22S936-D22S636 و P15567-HPRT

PCR چندگانه	واکنش اولیه	واکنش ثانویه	اتصال	طولیل شدن	زمان
D22S936, D22S636	۵ دقیقه ۹۴°C	۱ دقیقه ۹۴°C	۱ دقیقه ۶۳°C	۳۰ ثانیه ۷۲°C	۱۰ دقیقه ۷۲°C
P15567, HPRT	۵ دقیقه ۹۴°C	۱ دقیقه ۹۴°C	۱ دقیقه ۵۵°C	۱ دقیقه ۷۲°C	۱۰ دقیقه ۷۲°C

در این تحقیق محصولات PCR در مرحله لگاریتمی در سه چرخه ۲۲، ۲۵ و ۲۸ روی ژل پلی‌آکرلامید ۷/۵ درصد برده شد. ژل‌ها سپس توسط اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) رنگ‌آمیزی شده و باندها زیر نور ماوراء بنفش (UV: Ultraviolet) (UV-Transilluminator UVP US) مشاهده شدند. (در مورد تکثیر همزمان D22S944 و D22S636 رنگ‌آمیزی نیترات نقره انجام شد [۱۵]).

جدول ۳ برنامه PCR شروع داغ در واکنش PCR چندگانه D22S636-D22S944

PCR چندگانه	فعالسازی پلیمرز	واکنش ثانویه	اتصال	طولیل شدن	زمان
D22S944, D22S636	۱۵ دقیقه ۹۴°C	۱ دقیقه ۹۴°C	۹۰ ثانیه ۶۱°C	۹۰ ثانیه ۷۲°C	۱۰ دقیقه ۷۲°C

## ۳- نتایج

### ۳-۱- نتایج SQMPCR

برای محاسبه مقدار محصولات PCR و مقایسه آن‌ها از نرم‌افزار TotalLab TL100 استفاده شد و محاسبات بعدی در Excel انجام گرفت. در واقع توسط نرم‌افزار TotalLab TL100 شدت نسبی باند قطعه مورد نظر و قطعه کنترل با استفاده از نشانگر

### ۲-۴- روش SQMPCR

واکنش‌های SQMPCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۲۵ واحد آنزیم Taq پلیمرز (Cinnagen)، مخلوط dNTP ۲ میلی مولار (Cinnagen)، بافر ۱X PCR (Cinnagen) (برای تکثیر همزمان P15567-HPRT)، یا بافر ۲X PCR (Cinnagen) (برای

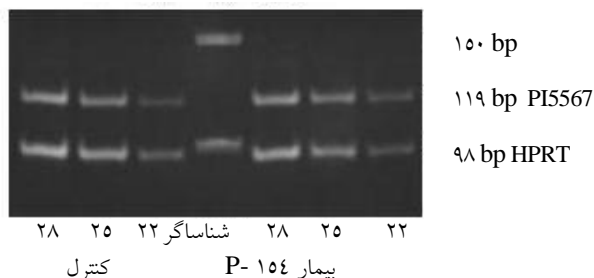
جدول ۴ نسبت نهایی نرمال شده برای هر نشانگر به تفکیک بیمار نشان داده شده است. همان‌طور که مشخص است، بیماران P-۱۹، P-۳۴، P-۴۰ و P-۱۲۵ دارای نسبت زیر ۰/۶ برای نشانگر D22S944 هستند. بیمار P-۱۲۵ علاوه بر نشانگر D22S944 دارای نسبت زیر ۰/۶ برای نشانگر P15567 نیز است. ولی سایر بیماران در کلیه نشانگرها دارای نسبت بین ۰/۶ و ۱/۳ هستند.

نام بیمار	D22S944	D22S936	P15567
P-۱۹	۰/۲۶	۱/۰۶	۰/۷۸
P-۳۴	۰/۵۳	۱/۰۵	۰/۷
P-۴۰	۰/۲۳۸	۱/۰۱	۱/۱۷
P-۱۰۸	۱/۲	۰/۹۵	۱/۲۰
P-۱۱۴	۰/۷۳	۰/۹۹	۱/۰۶
P-۱۲۵	۰/۵۳	۰/۹۰	۱/۵۴
P-۱۲۷	۱	۰/۹۴	۰/۸۸
P-۱۵۱	۱/۱	۰/۹۹	۱/۲۷
P-۱۵۳	۰/۷۴	۰/۹۲	۱/۱۷
P-۱۵۴	۱/۰۶	۰/۹۸	۱/۰۶

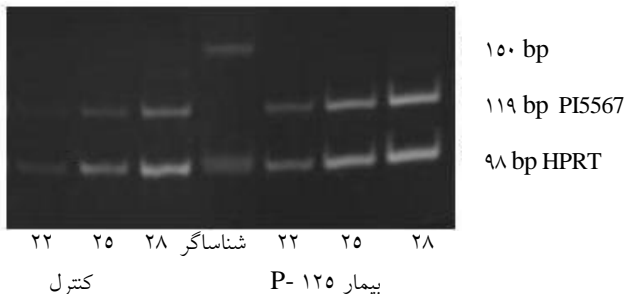
وزن استاندارد کمی شد و سپس بر این اساس نسبت DNA باند مورد نظر به باند کنترل برای هر فرد بیمار محاسبه شد.

این محاسبات هر بار در سه چرخه ۲۲، ۲۵ و ۲۸ انجام شده است. در انتها این نسبت در مقایسه با فرد طبیعی نرمال شد. برای اطمینان از تکرارپذیری نتایج به دست آمده هر واکنش در سه نوبت جداگانه تکرار شد و نتایج نهایی به صورت میانگین بیان شده است. در صورت وقوع حذف همی‌زیگوس (Hemizygous) در نشانگر D22S944، D22S936 یا P15567، نسبت شدت باند مربوط به باند کنترل داخلی به کار رفته در آن واکنش PCR چندگانه (یعنی کنترل داخلی D22S636 برای D22S936 و D22S944 و کنترل داخلی HPRT برای P15567) در فرد بیمار حدود نصف همان نسبت در فرد نرمال خواهد بود، یعنی نسبت نهایی برابر با ۰/۵ خواهد شد و در صورت عدم وجود حذف، این نسبت در فرد بیمار و کنترل نرمال با هم برابر خواهد بود؛ یعنی نسبت نهایی برابر با ۱ خواهد شد. اما با توجه به شرایط حاکم بر فرآیند آنالیز و اجرای PCR نیمه کمی از جمله خطای نرم افزار، نسبت  $\geq 0.6$  (بیمار به کنترل) در هر واکنش نشان دهنده وجود حذف در قطعه مربوط و نسبت بین ۰/۶ تا ۱/۳ نشان دهنده عدم وجود حذف در قطعه مربوط در نظر گرفته شد.

الف نسبت بیمار به کنترل ۱/۰۶



ب نسبت بیمار به کنترل ۰/۵۴



شکل ۲ نمونه‌ای از آنالیز نیمه کمی انجام شده در بیمار P-۴۰ الف) که نسبت نهایی ۰/۲۳ (نشان دهنده حذف) و بیمار P-۱۵۴ ب) که نسبت نهایی ۰/۹۸ (نشان دهنده عدم حذف) به دست آمده است.

بررسی نتایج در سه چرخه ۲۲، ۲۵ و ۲۸ نشان دهنده مطابقت نسبت‌ها و در مرحله لگاریتمی بودن واکنش PCR بوده است.

نتایج حاصل از آنالیز نیمه کمی نشان داد که چهار بیمار P-۱۹، P-۳۴، P-۴۰ و P-۱۲۵ دارای نسبت‌های زیر ۰/۶ در نشانگر D22S944 بودند که این به معنی وجود حذف همی‌زیگوس نشانگر D22S944 در ناحیه 22q11.2 در این بیماران است. بیمار P-۱۲۵ علاوه بر نشانگر D22S944 دارای نسبت زیر ۰/۶ برای P15567 نیز بود که نشان دهنده وجود حذف همی‌زیگوس در این ناحیه است. این در حالی است که آنالیز FISH انجام شده روی این بیماران فقط منجر به شناسایی ریزحذف در بیمار P-۴۰ شده بود. نتایج نهایی آنالیز SQMPCR به تفکیک بیمار در جدول ۴ نشان داده شده است.

شکل ۲ مثالی از آنالیز نیمه کمی انجام شده را نشان می‌دهد که نشان دهنده وجود حذف در نشانگر D22S944 الف) و عدم وجود حذف در نشانگر D22S936 ب) است.

## ۴- بحث

ریزحذف‌های شناسایی شده داشت ولی می‌توان این چنین استنباط کرد که این ۴ بیمار هیچ کدام حذف معمول ۳ Mb را ندارند زیرا همه این بیماران دارای نسبت بالای ۰/۶ برای نشانگر D22S936 هستند. این نشانگر در انتهای ناحیه حذف ۳ Mb قرار دارد. همچنین بیمار P-۱۲۵ دارای یک ریزحذف ابتدایی نسبت به TDR است. بدیهی است این روش با انتخاب نشانگرهای بیشتر در سراسر طول حذف ۳ Mb و مناطق مجاور آن قادر به تعیین دقیق بزرگی و حدود ریزحذف خواهد بود، در صورتی که روش FISH فقط قادر به شناسایی وجود یا عدم وجود ریزحذف است و بزرگی و ناحیه دقیق حذف را مشخص نمی‌کند.

همان‌طور که در مقدمه ذکر شد در برخی موارد وجود میکروداپلیکاسیون در بیماران دارای علائم DGS گزارش شده است [۸] که روش FISH قادر به شناسایی این میکروداپلیکاسیون‌ها نخواهد بود [۹]. در صورت استفاده از روش SQMPCR به خوبی می‌توان این میکروداپلیکاسیون‌ها را شناسایی کرد که در این حالت نسبت نهایی تقریباً برابر با ۲ خواهد شد. البته در این تحقیق نمونه‌ای از میکروداپلیکاسیون‌ها مشاهده نشد که می‌تواند به دلیل نادرتر بودن این ناهنجاری و تعداد نمونه مورد بررسی باشد. روش SQMPCR به‌طور بالقوه به وسیله طراحی آغازگرهایی در سایر کروموزوم‌ها که حذف در آن‌ها منجر به علائمی شبیه به 22q11DS می‌شود قادر به شناسایی این گروه از مبتلایان به 22q11DS خواهد بود.

از طرف دیگر گزارش‌هایی از ریزحذف در نواحی 4q، 10p13، 18q21 و 17p13 [۱۶-۱۸] نیز در بیماران 22q11DS شده است. روش FISH با استفاده از کاوشگرهای متداول نمی‌تواند این بیماران را تشخیص دهد. استفاده از روش SQMPCR در صورت استفاده از آغازگرهای منطقه مورد نظر روی هر کروموزوم درگیر می‌تواند در تشخیص این بیماران کمک کننده باشد.

از طرف دیگر، تکنولوژی FISH در ایران وابسته به خرید کاوشگرهای مربوطه از شرکت‌های خارجی است. هیچ شرکت ایرانی یا گروه تحقیقاتی ایرانی موفق به ساخت مستقل کاوشگرهای مربوط به FISH در این بیماری نشده است، در حالی که روش SQMPCR یک روش در دسترس است که امکان راه‌اندازی آن در بسیاری از آزمایشگاه‌های ژنتیک میسر است. با این حال باید توجه داشت که به‌کارگیری یک آزمون ژنتیکی در بالین احتیاج به انجام مطالعات گسترده در شناسایی محدودیت‌های آن دارد. در این تحقیق مشخص شده است که در جامعه ایرانی انواعی از

DGS با فراوانی ۱ در ۴۰۰۰ تولد زنده شایع‌ترین نشانگان از نوع ریزحذف در انسان است [۴]. روش استاندارد برای تشخیص ریزحذف در این بیماران، FISH با استفاده از کاوشگرهای اختصاصی مانند کاوشگر TUPLE1 است [۹] ولی این روش اگرچه قادر به شناسایی اکثریت بیماران (۸۵-۹۰ درصد) است ولی بعضی از بیماران با ویژگی‌های فنوتیپی حذف 22q11DS، قابل تشخیص توسط روش FISH نیستند. در واقع بعضی از این بیماران به خاطر داشتن حذف غیر معمولی که خارج از ناحیه تحت پوشش کاوشگر TUPLE1 قرار دارد تشخیص داده نمی‌شوند [۱۰] که در این صورت بررسی FISH می‌تواند نتیجه منفی کاذب داشته باشد.

روش جدیدی که در این تحقیق برای تشخیص ریزحذف استفاده شده است، روش SQMPCR است که بر پایه تکثیر همزمان دو جفت آغازگر که یکی به‌عنوان کنترل داخلی تکثیر کننده قطعه‌ای در منطقه‌ای خارج از حذف است و دیگری قطعه‌ای درون ناحیه ۳ Mb TDR را تکثیر می‌کند، بنا شده است. سپس شدت باندهای مورد نظر کمی شده نرمالیزه می‌شوند. در صورت وجود حذف در ناحیه تکثیر شده توسط یک جفت آغازگر نسبت به دست آمده می‌باید به نصف حالت نرمال کاهش یابد. در این تحقیق علاوه بر بیمار P-۴۰ که نتیجه FISH مثبتی برای ریزحذف 22q11.2 داشت، ۳ بیمار P-۱۹، P-۳۴ و P-۱۲۵ که نتایج FISH نرمالی داشتند نیز با روش SQMPCR شناسایی شدند.

حداقل دو شرط مهم برای بررسی نیمه کمی ژن‌ها به وسیله PCR باید در نظر گرفته شود؛ اولاً بررسی کمی محصولات PCR و استفاده از آن در محاسبه مقدار DNA اولیه تنها در مرحله لگاریتمی امکان پذیر است. PCR در واقع یک فرآیند نمایی است که مقدار محصولات به صورت تصاعدی افزایش پیدا می‌کند. اما در یک ناحیه مشخص که مرحله کفه (Plateau) نامیده می‌شود، آهنگ تولید محصولات کند می‌شود و میزان محصولات PCR با نسبت نامعینی افزایش پیدا می‌کند. تنها در مرحله لگاریتمی محصول PCR با مقدار اولیه DNA نسبت مستقیم دارد. ثانیاً نرمالیزه کردن محصول PCR در مرحله لگاریتمی با استفاده از کنترل داخلی می‌تواند تأثیر عوامل مداخله‌گر وابسته به شرایط داخلی مانند مقدار اولیه DNA و بازده PCR را از بین ببرد. در واقع هر واکنش SQMPCR شامل تکثیر همزمان یک جفت آغازگر به‌عنوان کنترل داخلی و یک جفت آغازگر درون ناحیه ریزحذف است.

واضح است که با توجه به تعداد کم نشانگرهای استفاده شده نمی‌توان بر اساس نتایج به‌دست آمده تخمین صحیحی از اندازه

مانند موارد کلاسیک نشانگان ریزحذف 22Q11DS بدون علت شناخته شده ژنتیکی در مطالعه با روش FISH ضروری است. استفاده از روش ارایه شده در مطالعه حاضر در تحقیقات آتی می‌تواند برآورد دقیقی از حساسیت این روش را حاصل نماید.

ریزحذف‌های غیر شایع دیده می‌شود که با روش FISH و استفاده از کاوشگرهای رایج قابل شناسایی نیستند. چنین ریزحذف‌هایی در مطالعات دیگر هم گزارش شده‌اند. به نظر می‌رسد در چنین شرایطی راه‌اندازی و مطالعه روش‌های جایگزین حداقل در شرایط خاصی

## ۵- منابع

- [1] Borgmann S, Luhmer I, Arslan-Kirchner M, Kallfelz HC, Schmidtke J. A search for chromosome 22q11.2 deletions in a series of 176 consecutively catheterized patients with congenital heart disease: no evidence for deletions in non-syndromic patients. *Eur J Pediatr* 1999; 158(12): 958-63.
- [2] Yamagishi H, Srivastava D. Unraveling the genetic and developmental mysteries of 22q11 deletion syndrome. *Trends Mol Med* 2003; 9(9): 383-9.
- [3] Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, Roe BA, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Budarf ML, Emanuel BS. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet* 2000; 9(4): 489-501.
- [4] Shaikh TH, Kurahashi H, Emanuel BS. Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review. *Genet Med* 2001; 3(1): 6-13.
- [5] Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RS, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet* 1999; 8(7): 1157-67.
- [6] Saitta SC, Harris SE, Gaeth AP, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Maisenbacher MK, Yersak JM, Chakraborty PK, Hacker AM, Zackai EH, Ashley T, Emanuel BS. Aberrant interchromosomal exchanges are the predominant cause of the 22q11.2 deletion. *Hum Mol Genet* 2004; 13(4): 417-28.
- [7] Yamagishi H. The 22q11.2 deletion syndrome. *Keio J Med* 2002; 51(2): 77-88.
- [8] Yobb TM, Somerville MJ, Willatt L, Firth HV, Harrison K, MacKenzie J, Gallo N, Morrow BE, Shaffer LG, Babcock M, Chernos J, Bernier F, Sprysak K, Christiansen J, Haase S, Elyas B, Lilley M, Bamforth S, McDermid HE. Microduplication and triplication of 22q11.2: a highly variable syndrome. *Am J Hum Genet* 2005; 76(5): 865-76.
- [9] Katzman PJ, Wang B, Sawhney M, Wang N. Differential detection of deletion 22q11.2 syndrome by specialty and indication. *Pediatr Dev Pathol* 2005; 8(5): 557-67.
- [10] Weksberg R, Hughes S, Moldovan L, Bassett AS, Chow EW, Squire JA. A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics* 2005; 6: 180.
- [11] Crifasi PA, Michels VV, Driscoll DJ, Jalal SM, Dewald GW. DNA fluorescent probes for diagnosis of velocardiofacial and related syndromes. *Mayo Clin Proc* 1995; 70(12): 1148-53.
- [12] Lahiri DK, Bye S, Nummerger JI Jr, Hodes ME, Crisp M. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *J Biochem Biophys Methods* 1992; 25(4): 193-205.
- [13] Uddin RK, Zhang Y, Siu VM, Fan YS, O'Reilly RL, Rao J, Singh SM. Breakpoint Associated

- with a novel 2.3 Mb deletion in the VCFS region of 22q11 and the role of Alu (SINE) in recurring microdeletions. *BMC Med Genet* 2006; 7: 18
- [14] Muscarella P, Melvin WS, Fisher WE, Foor J, Ellison EC, Herman JG, Schirmer WJ, Hitchcock CL, DeYoung BR, Weghorst CM. Genetic alterations in gastrinomas and nonfunctioning pancreatic neuroendocrine tumors: an analysis of p16/MTS1 tumor suppressor gene inactivation. *Cancer Res* 1998; 58(2): 237-40.
- [15] Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991; 196(1): 80-3.
- [16] Matsuoka R, Takao A, Kimura M, Imamura S, Kondo C, Joh-o K, Ikeda K, Nishibatake M, Ando M, Momma K. Confirmation that the conotruncal anomaly face syndrome is associated with a deletion within 22q11.2. *Am J Med Genet* 1994; 53(3): 285-9.
- [17] Giannotti A, Digilio MC, Marino B, Mingarelli R, Dallapiccola B. Cayler cardiofacial syndrome and del 22q11: part of the CATCH22 phenotype. *Am J Med Genet* 1994 ; 53(3): 303-4.
- [18] Crifasi PA, Michels VV, Driscoll DJ, Jalal SM, Dewald GW. DNA fluorescent probes for diagnosis of velocardiofacial and related syndromes. *Mayo Clin Proc* 1995; 70(12): 1148-53.