

## تشخیص زنان ناقل دیستروفی عضلانی دوشن با استفاده از روش Real-Time PCR

مینا حیات نوسعید<sup>۱</sup>، M.Sc.<sup>۲</sup>، مرتضی کریمی پور<sup>۱</sup>، Ph.D.<sup>۱</sup>، فرشته مریمی<sup>۱</sup>، M.D.<sup>۱</sup>  
رزینا عدالت<sup>۱</sup>، M.Sc.<sup>۱</sup>، حسین نجم آبادی<sup>۲</sup>، Ph.D.<sup>۲</sup>، سیروس زینلی<sup>۳</sup>، Ph.D.<sup>۳</sup>

۱. انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد پزشکی مولکولی

۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

۳. دانشگاه علوم پزشکی و توان بخشی، مرکز تحقیقات ژنتیک

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۲۶۷-۱۳۱۸۵، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

پست الکترونیک: [slrouzelnal@yahoo.com](mailto:slrouzelnal@yahoo.com) Email:

### چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۱۰/۳۱، پذیرش مقاله: ۸۶/۴/۳۰

**هدف:** شناسایی ناقلین بیماری دیستروفی عضلانی دوشن با استفاده از تکنیک Real-Time PCR **مواد و روش‌ها:** بیماری دیستروفی عضلانی دوشن یک بیماری وابسته به جنس کشته و غیر قابل درمان است که حدود ۷۰ درصد موارد، به علت حذف در آگزون‌های ژن دیستروفین ظاهر می‌شود. تنها راه حل ممکن برای پیش‌گیری از تولد این بیماران، شناسایی ناقلین است ولی تاکنون هیچ یک از روش‌های آزمایشگاهی توانایی تشخیص همه ناقلین را نداشته است. لذا روش Real-Time PCR به عنوان روشی مناسب و مطمئن برای شناسایی تمام ناقلین دارای حذف انتخاب شده است. وجود حذف در آگزون‌های ۴۷ و ۶ ژن دیستروفین در بیماران ۲۵ خانوادگی توسط PCR Multiplex تایید شد. سپس با تکنیک Real-Time PCR و با استفاده از رنگ SYBR Green، ناقلین اجباری و زنان مشکوک به ناقل بودن، مورد بررسی قرار گرفتند. در این کار آگزون ۸ فاکتور X انعقادی هم به عنوان تعدیل کننده استفاده شد. آنالیز اطلاعات بر اساس متد مقایسه  $\Delta\Delta C_T$  صورت گرفت.

**یافته‌ها:** با این روش میزان  $\Delta\Delta C_T$  در زنان ناقل حدود  $1/0.9 \pm 0.21$  و در زنان سالم حدود  $0/51 \pm 0.1$  محاسبه شد و تقریباً تمام زنان ناقل مورد مطالعه با این روش غربال‌گری شدند.

**نتیجه‌گیری:** روش Real-Time PCR روشی حساس، دقیق و نسبتاً ارزان برای شناسایی حذف‌ها و مضاعف‌شدگی‌ها و قابل استفاده برای تشخیص ناقلین DMD/BMD در آزمایشگاه‌های ژنتیک است.

**کلیدواژگان:** دیستروفی عضلانی دوشن/بکر، تشخیص ناقلین، Real-Time PCR

فصلنامه پزشکی پانکه، سال نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۱۵-۲۵

### مقدمه

بیماری تحلیل عضلانی دوشن/بکر (DMD: OMIM # 310200, BMD: OMIM # 300376) یکی از شایع‌ترین اختلالات عصبی-عضلانی در پسر بچه‌ها است، که به صورت صفت وابسته به کروموزوم X مغلوب انتقال می‌یابد (۱). این بیماری علایم خود را تا قبل از ۵ سالگی با تاخیر در کسب مهارت‌های حرکتی اولیه نشان می‌دهد. با افزایش سن (حدود ۸ تا ۱۰ سالگی) و پیشرفت تحلیل عضلات و همچنین هایپرتروفی کاذب اندام‌های حرکتی، فرآیند راه رفتن به طور کامل مختل می‌شود. این بیماران در اوایل دهه دوم زندگی به علت نارسایی تنفسی و قلبی با شرایط بسیار اسفباری می‌میرند (۱). شیوع این بیماری یک در ۳۵۰۰ نوزاد پسر است. DMD/BMD در اثر جهش در ژن دیستروفین که در جایگاه ژنی Xp21 واقع است، ایجاد می‌شود. این ژن با داشتن ۲/۴۰۰/۰۰۰ جفت باز، ۱۷۹ آگزون و تولید mRNA ای به طول ۱۴ کیلوباز بزرگترین ژن شناخته شده در انسان است.

۶۰ درصد از موارد این بیماری ناشی از حذف ژنی و ۵ درصد ناشی از مضاعف‌شدگی‌ها در یک یا تعداد بیشتری از آگزون‌های موجود در یکی از دو ناحیه داغ در ژن دیستروفین است. بقیه موارد نیز ناشی از جهش نقطه‌ای است. ۷۰ درصد جهش‌ها به صورت ارثی از یک مادر ناقل مستقل می‌شود و ۳۰ درصد موارد به صورت تک موردی (Sporadic) روی می‌دهد (۲).

باتوجه به این که هیچ درمان قطعی برای این بیماران تا به امروز ارائه نشده است تنها راه حل ممکن پیشگیری از تولد این بیماران است. لذا برای رسیدن به این هدف باید تمام ناقلین این بیماری شناسایی شوند. بر خلاف توانایی بالای تکنیک Multiplex PCR در شناسایی بیماران مبتلا به DMD/BMD این تکنیک قادر به شناسایی زنان ناقل نیست. زیرا ژن سالم واقع بر کروموزوم X فعال می‌تواند نتایج PCR در فرد ناقلی که دارای حذف بر روی کروموزوم دیگر است را کاملاً تغییر دهد و پاسخ کاذبی مشاهده شود. در ضمن در ۳۰ درصد موارد که به

مشکوک و کنترل‌های نرمال) توسط دستگاه  
NanoDrop (NanoDrop, USA) سنجیده شد و در دمای  
۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

#### Multiplex PCR

حذف در تمام بیماران این خانواده‌ها توسط  
Multiplex PCR (MPCR) تایید شد. MPCR روش خاصی از  
PCR است که در این روش می‌توان با مخلوط کردن چند جفت  
پرایمر، نواحی مختلفی از DNA را در یک واکنش PCR به طور  
همزمان تکثیر و از آن در تعیین حذف‌های ژنی و تشخیص ژنتیکی  
استفاده کرد (۱۴، ۱۵).

#### الکتروفورز

محصولات MPCR بر روی ژل آگارز ۲-۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی  
شده با اتیدیوم بروماید و با استفاده از اشعه ماورا بنفش مشاهده شد.  
باند‌های ظاهر شده با سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی سنجیده شدند. در افراد  
نرمال که دارای هر دو آگزون بودند دو باند واضح و مشخص مشاهده  
شد. در حالی که در بیماران دارای حذف قطع یک باند مربوط به آگزون  
سالم مشاهده شد (شکل ۱).

بعد از تایید حذف‌های بیماران برای تشخیص ناقلین از  
Real-Time PCR استفاده شد.

#### Real-Time PCR

سیستم Real-Time PCR بر اساس بررسی کمی میزان ماده  
فلورسانس عمل می‌کند و این سیگنال فلورسانس به نسبت میزان  
محصول PCR در واکنش افزایش می‌یابد. با ثبت میزان تابش در هر  
سیکل می‌توان واکنش را در طول فاز تصاعدی ثبت کرد و آن را با  
مقدار نمونه الگوی اولیه مطابقت داد. هر چه مقدار کپی‌های اولیه اسید  
نوکلئیک بیشتر باشد افزایش میزان فلورسانس و ورود به فاز تصاعدی  
زودتر اتفاق می‌افتد.

#### پرایمرهای مورد نیاز

پرایمرهای آگزون های ۴۷ و ۶ بر اساس طراحی Chamberlain و  
Beggs (۱۴، ۱۵) به شرکت Primm (South Korea) سفارش  
داده شد. توالی این پرایمرها به شرح زیر است:

توالی‌های زیر بر روی آگزون ۶، قطعه‌ای به طول ۲۰۲ جفت باز را  
تکثیر می‌کنند.

**Exon 6 F: CCACATGTAGGTCAAAAATGTAATGAA**

**Exon 6 R: GTCTCAGTAATCTTCTTACCTATGACTATGG**

این توالی‌ها بر روی آگزون ۴۷، قطعه‌ای به طول ۱۸۱ جفت باز را  
تکثیر می‌کنند.

**Exon47 F: CGTTGTTGCATTTGTCTGTTTCAGTTAC**

**Exon47 R: GTCAACCTTTATCCACTGGAGATTTG**

صورت تک موردی و غیرارثی هستند حتی با روش‌های غیرمستقیم نیز  
امکان شناسایی ناقلین آنها وجود ندارد. لازم به ذکر است روش‌های  
رایج تشخیص ناقلین مثل لکه‌گذاری ساترن، FISH، بررسی mRNA  
و آنالیز هاپلوتاایپ، علاوه بر وقتگیر بودن دارای حساسیت لازم و کافی  
برای شناسایی تمام ناقلین نیستند. لذا نیاز به یک روش دقیق و حساس و  
در عین حال ساده و ارزان که قابل استفاده در تمام آزمایشگاه‌های  
ژنتیک باشد، کاملاً مشهود است (۵، ۳).

در این تحقیق بعد از مطالعات (۹-۶) و بر اساس بررسی‌های انجام  
شده و امکانات موجود، برای اولین بار در ایران اقدام به شناسایی  
ناقلین بیماری دوشن از طریق Real-Time PCR شد.  
Real-Time PCR سیستم یکنواختی است که در آن عمل شناسایی  
و تکثیر در یک زمان صورت می‌گیرد. در این سیستم تشخیصی یک  
ماده فلورسانس طی واکنش متناسب با میزان محصولات هر سیکل آزاد  
می‌شود و میزان فلورسانس آن توسط نمایانگر شناسایی و تثبیت می‌شود.  
اولین بار هیگوچی و همکاران با اضافه کردن اتیدیوم بروماید به  
مخلوط PCR، پیشگامان این تکنیک شدند. ولی امروزه روشی  
مشابه ولی متناسب‌تر جایگزین اتیدیوم بروماید شده است و آن  
استفاده از یک رنگ ویژه متصل شونده به DNA نظیر  
SYBR Green است. با توجه به مزایا و قدرت تشخیص بالا، این  
سیستم به عنوان روشی متناسب برای تشخیص ناقلین دوشن انتخاب شد  
(۱۲-۱۰). وجود تنها یک نسخه از ژن سالم دیتروفین در افراد ناقل  
منجر به تولید محصول کمتری در ابتدای فاز تصاعدی تکثیر نسبت به  
ژن‌ها نرمال که دارای دو نسخه سالم از این ژن هستند، می‌شود.  
این کمبود محصول می‌تواند راهگشای مناسبی برای تمایز این افراد  
از هم باشد.

#### مواد و روش‌ها

##### انتخاب بیماران

پس از ارائه توضیحات کافی مربوط به طرح و پر کردن فرم رضایت  
نامه، بیماران، خانواده‌های آنها و افراد کنترل وارد مطالعه شدند. به این  
ترتیب که ابتدا ۲۵ خانواده دارای بیمار دوشنی انتخاب شدند که در  
آنها ۱۰ زن ناقل اجباری بودند. همچنین ۱۵ زن مشکوک به ناقل بودن  
نیز وجود داشت. آنها دارای فرزند پسر مبتلایی بودند که به صورت تک  
موردی این بیماری را نشان داده بود و سابقه دیگری در خویشاوندان  
آنها وجود نداشت. در این ۲۵ خانواده ۲۰ دختر مشکوک به ناقل بودن  
نیز مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین بر روی ۱۰ زن سالم به عنوان  
کنترل، آزمایش‌ها انجام شد. بیماران انتخاب شده، حذف در آگزون‌های  
۴۷ و ۶ را نشان داده بودند.

##### استخراج DNA

DNA مورد نیاز از گلبول‌های سفید خون محیطی، توسط روش  
salting out پس از لیز و شستشوی گلبول‌های قرمز استخراج  
شد (۱۳). غلظت DNAهای استخراج شده (بیماران، افراد ناقل و

### تشخیص ناکلین دوشن به روش Real-Time PCR

همچنین ژن تعدیل کننده قسمتی از آگزون ۸ فاکتور IX انعقادی است که توالی پرایمرهای آن در زیر آورده شده. این پرایمرها قطعه‌ای در حدود ۲۰۷ جفت باز را تکثیر می‌کنند.

Exon 8 F IX: CTTCTCAAATTTGGATCTGGC  
Exon 8 F IX: TCCCCACTATCTCCTTG

### مخلوط واکنش

برای هر واکنش مخلوطی به حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. مواد تشکیل دهنده این مخلوط عبارتند از:

dNTP 0.4mM (Roche, Germany), MgCl<sub>2</sub> 3mM, PCR یافر شامل 100nM Flurserine, bio-rad و SYBR Green 0.2-2X (Invitrogen, USA 100, Tris 20mM) و 100nM Flurserine, USA (Bio-Rad) و بافری ۲X باید مواد دیگری چون پرایمرها به میزان ۷ میکرومول و دو واحد آنزیم DNA 100ng, smarTaq DNA polymerase (Cinnagen, Iran) الگو و آب برای رساندن حجم مخلوط واکنش به ۲۵ میکرولیتر به مخلوط بافری اضافه شود. واکنش‌های هر نمونه DNA برای هر سه پرایمر، سه سری و به صورت همزمان انجام شد و میانگین CT‌های به دست آمده از هر آگزون محاسبه شد. برای انجام واکنش Real-Time PCR از برنامه زیر استفاده شد.

۹۴ درجه سانتی‌گراد تقلیب اولیه DNA الگو در چرخه اول در مدت زمان ۱ دقیقه و سپس، سه برنامه دمایی زیر، ۳۸ چرخه تکرار شد: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه. سپس در چرخه نهایی دما ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد تا سنتز رشته‌ها به طور کامل انجام شود. Real-Time PCR در دستگاه cycler iQ-Optical system software (version 3/01a) Bio-RAD انجام شد.

### آنالیز اطلاعات

سنجش کمی میزان آگزون‌های DMD بر اساس مقایسه Threshold (CT) با روش مقایسه  $\Delta\Delta C_T$  صورت گرفت. اندازه‌گیری کمی مقدار ژن در سیکل‌هایی از واکنش PCR که در فاز تصاعدی قرار دارند، انجام می‌پذیرد. نرم افزار دستگاه Real-Time PCR بعد از انجام واکنش PCR به صورت اتوماتیک Threshold Cycle را برای استفاده کننده مشخص می‌کند. به ازای کل ناحیه‌ای که رابطه تصاعدی برقرار است می‌توان نقطه‌ای را انتخاب کرد و از آن خط Threshold یا آستانه را رسم کرد. معمولاً این آستانه بالاتر از خط پایه در نظر گرفته می‌شود. Threshold نشان دهنده میزانی از محصول است که در آن همه نمونه‌ها به صورت تصاعدی تکثیر می‌شوند. Threshold cycle چرخه‌ای است که در آن هر نمونه تکثیر تصاعدی خود را شروع می‌کند. به عبارتی دیگر سیکلی را که در آن خط Threshold منحنی PCR را قطع می‌کند

در این روش یکی از آگزون‌های انتخابی DMD به عنوان آگزون مرجع (reference exon) که در حقیقت آگزون نرمال است و آگزون دیگر DMD به عنوان آگزون مورد آزمایش (test exon) و یا آگزونی که حذف و یا مضاعف شده است مدنظر قرار می‌گیرد. آگزون ۸ فاکتور IX انعقادی نیز به عنوان تعدیل کننده (Endogenous reference) انتخاب شده است.

به منظور تایید صحت انتخاب این سه ژن برای هر سه ژن به صورت هم‌زمان سریال رقت از DNA تهیه و نمودار استاندارد برای هر سه قطعه ترسیم شد و نسبت به slope به دست آمده از این خط efficiency محاسبه شد. با توجه به این که efficiency‌های به دست آمده (آگزون ۴۷-۹۱۴، آگزون ۶-۹۳۶، آگزون ۸ فاکتور IX ۰/۹۲۳) اختلاف محسوسی ندارند لذا می‌توان efficiency هر سه ژن را برابر و از روش مقایسه  $\Delta\Delta C_T$  استفاده کرد. به این ترتیب ابتدا از سه CT به دست آمده برای هر آگزون میانگین گرفته شد. با تفاضل میانگین CT به دست آمده از هر آگزون DMD از میانگین CT ژن تعدیل کننده  $\Delta C_T$  محاسبه می‌شود و از تفاضل دو  $\Delta C_T$  به دست آمده فاکتوری به نام  $\Delta\Delta C_T$  به دست می‌آید (طبق فرمول ذیل) که در نهایت  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  محاسبه می‌گردد.

$$\Delta\Delta C_T = [mC_{TII}(\text{endogenous reference}) - mC_{TDMO}(\text{reference exon})] - [mC_{TII}(\text{endogenous reference}) - mC_{TDMO}(\text{test exon})]$$

انتظار می‌رود میزان  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  برای ژن نرمال حدود ۱، برای ژن ناقل دارای حذف ۰/۵ و برای ژن ناقل دارای مضاعف شدگی در حدود ۲ به دست آید.

### Melting Curve Analysis

به منظور تایید صحت قطعه تکثیر شده و اطمینان از نبود باندهای غیراختصاصی و همچنین اتصال پرایمر دایمرها به یکدیگر از نمودار ذوب یا melt curve استفاده شد. در این نمودار بر اساس تنها پیک مشاهده شده برای هر جفت پرایمر در Tm منحصر به فرد خودش، اختصاصی بودن محصول تولید شده اثبات شد (شکل ۲B و ۲C).

### یافته‌ها

از ۲۵ بیمار مورد نظر حذف ۱۶ بیمار در آگزون ۴۷ و ۹ بیمار در آگزون ۶ توسط multiplex PCR مشخص شد (شکل ۱). سپس زنان منتسب به این بیماران مورد آزمایش قرار گرفتند. برای وضوح بیشتر، نمودارها و CT‌های به دست آمده از یک ژن ناقل و یک ژن سالم و نحوه محاسبات در زیر آمده است.

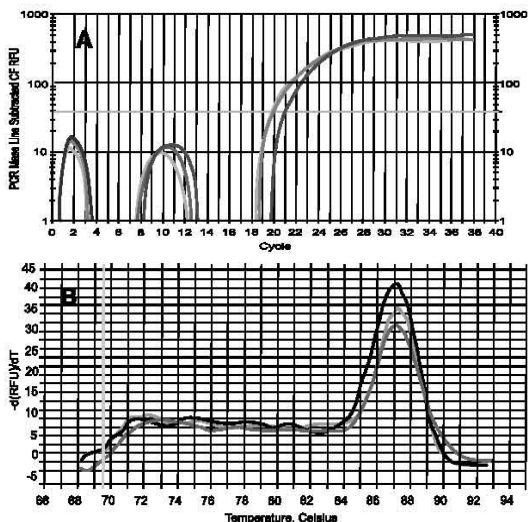
همان‌طور که در شکل ۲A مشاهده می‌شود در فرد مورد مطالعه آگزون ۴۷ در سیکل ۱۹ و آگزون ۶ در سیکل ۱۸/۹ به آستانه رسیده است. همچنین ژن تعدیل کننده در سیکل ۱۹ وارد فاز تصاعدی شده است. با قرار دادن این اطلاعات در فرمول، میزان  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  ۰/۹ به دست

آمد. این مقدار به علت نزدیک بودن به عدد ۱ نشان دهنده نرمال بودن این فرد است. در نتیجه تعداد کپی هر سه ژن مورد آزمایش برابر خواهد بود. محاسبه  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  به صورت زیر انجام شد.

$$\Delta\Delta C_T = [(19-18.9)-(19-19)] = 0.1$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-0.1} = 0.9$$

Well Description	Well Identifier	Ct	Melt Temp
C4	● Ex on 47	20.9	86.5
C7	● Ex on 6	19.9	86.5
C8	● H	19.7	86.5



شکل ۳: اطلاعات مربوط به یک زن ناقل اجباری که فرزندان وی در اگزون ۲۷ حذف را نشان داده اند.  
**A:** لگاریتمی نمودار مربوط به اگزون ۲۷ یک سیکل دیرتر به آستانه رسیده است.  
**B:** ذوب: تنها پیک مشاهده شده مربوط به باند اصلی است و هیچ گونه باند غیر اختصاصی وجود ندارد.

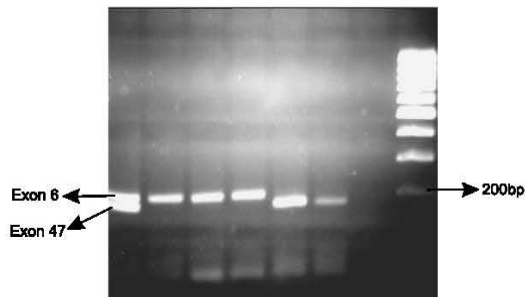
در شکل ۳A فرد مورد مطالعه، زن ناقل اجباری است که فرزندان مبتلای وی دارای حذف در اگزون ۴۷ اند، لذا اگزون ۴۷ در این فرد به عنوان اگزون مورد آزمایش و اگزون ۶ به عنوان اگزون مرجع در نظر گرفته شد. با توجه به نمودارها، اگزون ۶ در سیکل ۱۹/۹ به آستانه رسیده است در حالی که اگزون ۴۷ به علت فقدان یک کپی، یک سیکل دیر تر به آستانه رسیده است که در محاسبات صورت گرفته در نهایت میزان  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  ۰/۵ به دست آمد. این مقدار دقیقاً نصف مقدار  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  محاسبه شده در فرد نرمال است و فقدان یک کپی از اگزون ۴۷ را اثبات می کند. محاسبه  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  به صورت زیر انجام شد.

$$\Delta\Delta C_T = [(19.7-19.9)-(19.7-20.9)] = 1$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-1} = 0.5$$

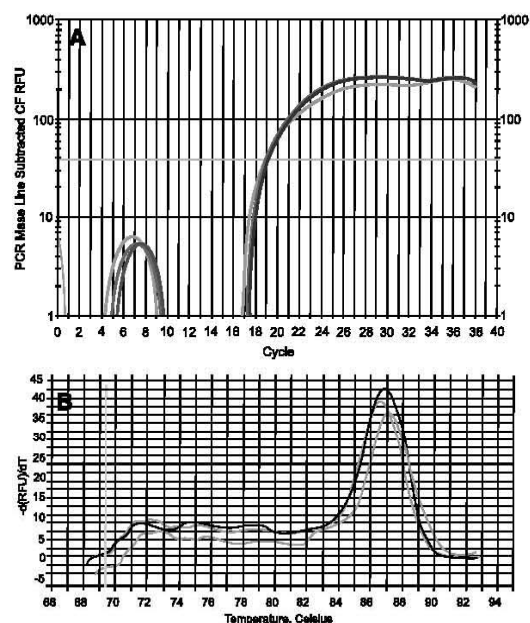
در نهایت نتایج به دست آمده به شرح زیر است. میزان  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  در زنان سالم حدود  $1/0.9 \pm 0/1$  در زنان ناقل حدود  $0/51 \pm 0/1$  محاسبه شد و هیچ تداخلی در نتایج مشاهده نشد.

با استفاده از Real-Time PCR ناقل بودن در ۲۵ مادر این بیماران تایید شد. در این ۲۵ خانواده ۲۰ دختر مشکوک به ناقل بودن نیز وجود داشت. از این ۲۰ دختر، ۱۲ نفر سالم و ۸ نفر ناقل تشخیص داده شدند.



شکل ۴: چاهک شماره ۱: نمونه نرمالی است که وجود دو اگزون ۲۷ و ۶ را نشان می دهد. چاهک شماره ۲، ۳ و ۴: نمونه های بیماری هستند که حذف اگزون ۲۷ آن ها تایید شد. چاهک شماره ۵ و ۶: نمونه های بیماری هستند که حذف اگزون ۶ آن ها تایید شد.

Well Description	Well Identifier	Ct	Melt Temp
A3	● Ex on 47	19	86.5
A6	● Ex on 6	18.9	86.5
A10	● H	19	86.5



شکل ۵: اطلاعات مربوط به یک زن سالم  
**A:** انطباق هر سه نمودار واضح است.  
**B:** تنها پیک مشاهده شده مربوط به باند اصلی است و هیچ گونه باند غیر اختصاصی وجود ندارد.

## تشخیص ناقلین دوشن به روش Real-Time PCR

شناسایی کردند و نسبت آگزون مورد آزمایش (test exon) به آگزون مرجع را در افراد ناقل دارای حذف  $0/52 \pm 0/12$  و در ناقلین دارای مضاعف شدگی  $1/56 \pm 0/18$  و در افراد سالم  $1/02 \pm 0/17$  به دست آوردند (۴). آنها همچنین برای تایید تشخیص ناقلین از شناساگرهای هیبریدی نیز استفاده کردند. نتایج به دست آمده از هر دو روش با هم مقایسه شدند و طبق نظر آنها روش Green SYBR به طور واضحی کارایی بالاتری نسبت به شناساگرهای هیبریدی دارد و دارای مزایای زیر است: ساده، ارزان، قابل دسترس، کوتاه بودن مدت زمان لازم برای به دست آوردن نتایج آزمایش (چند ساعت) و همچنین نیاز نداشتن به طراحی هیچ گونه شناساگر اختصاصی. اما عدم توانایی Green SYBR در شناسایی محصولات اختصاصی از غیر اختصاصی و غیرممکن بودن تکثیر قطعات کنترل و قطعه ژن دیستروفین مورد نظر در یک لوله، از نقاط ضعف این تکنیک به شمار می رود (۴، ۱۲، ۲۱).

تراورسو و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶ توانایی Real-Time PCR کمی را بر اساس شناساگرهای TaqMan جهت تشخیص مضاعف شدگی یا حذف های هموزیگوتی در بیماران DMD/BMD بررسی کردند. یکی از دو آگزون DMD به عنوان مرجع و دیگری به عنوان exon test انتخاب شده بود. همچنین برای تعدیل اطلاعات به دست آمده از ژن PLP1 (Proteolipid 1) نیز کمک گرفته شده بود. آنها با استفاده از روش  $\Delta\Delta C_T$  نتایج زیر را به دست آوردند: نمونه های نرمال  $1/19 - 0/83$ ، زنان ناقل دارای حذف  $0/60 - 0/29$  و مردان دارای مضاعف شدگی  $2/42 - 1/77$  (۵).

در نهایت با بررسی های صورت گرفته و امکانات موجود روش مستقیم real-time PCR و استفاده از رنگ فلورسانتی SYBR Green و آنالیز توسط روش مقایسه  $\Delta\Delta C_T$  انتخاب شد. در کار صورت گرفته ۱۰۰ درصد موارد ناقل اجباری به درستی تشخیص داده شدند و با توجه به عدم مغایرت نتایج به دست آمده با نتایج جانکورت و تراورسو، قابل اطمینان بودن آزمایش صورت گرفته، ثابت شد.

## نتیجه گیری

در نهایت با بررسی تقریباً تمام روش های موجود برای تشخیص ناقلین می توان چنین نتیجه گرفت که برای ایجاد روشی آسان، ساده، ارزان، سریع و قابل دسترس برای انجام آزمایش های معمول و قابل اعتماد نیاز به تکنیکی است که بتوان به راحتی و با حداقل امکانات موجود در آزمایشگاه ها از آن برای تشخیص ناقلین استفاده کرد. تا کنون Real-Time PCR کمی، بهترین روش در رسیدن به این هدف محسوب می شود و مقایسه انجام شده بین نتایج حاصله از Green SYBR و شناساگرهای هیبریدی حاکی از این حقیقت است که استفاده از Green SYBR عملی تر خواهد بود (۴).

اما باید در استفاده از SYBR Green این نکته را نیز مدنظر قرار داد که به علت حساسیت فوق العاده بالای این آزمایش هر چه قدرت و توانایی های دستگاه مورد استفاده بالاتر باشد میزان خطا در شناسایی ناقلین به حداقل می رسد.

## بحث

بیماری دوشن یکی از بیماری های نسبتاً شایع ژنتیکی در ایران است. این بیماری غیرقابل درمان و شدیداً ناتوان کننده است و تمامی بیماران در دهه دوم زندگی در بدترین شرایط و به علت درگیری عضلات تنفسی و قلبی می میرند. وجود یک فرزند مبتلا در خانواده با آگاهی از سرانجام دردناک بیماری، بسیار اسفبار است. اگر خانمی ناقل این بیماری باشد احتمالاً نیمی از فرزندان پسر او بیمار خواهند شد. لذا اهمیت تشخیص به موقع ناقلین در این خانواده ها کاملاً مشخص است. دختران خویشتند فرد بیمار، اهم از خواهر، خاله یا دختر خاله ها در معرض خطر ناقل بودن هستند. لذا شناسایی این ناقلین و توانایی تشخیص دقیق آنها قبل از بارداری در پیشگیری از تولد نوزاد مبتلا بسیار مهم است (۱۷).

از روش های غیرمستقیم برای تشخیص ناقلین DMD/BMD می توان به روش آنالیز اتصالی (Linkage analysis) اشاره کرد. در این روش از نشانگرهای ژنتیکی استفاده می شود. نشانگرهای ژنتیکی به هر مشخصه یکسان بر روی دو کروموزوم همولوگ می گویند که امکان تمایز همولوگ ها را فراهم می سازد. به این ترتیب می توان نحوه وراثت ژن عامل بیماری را با دنبال کردن نحوه انتقال نشانگرهای متصل به ژن مورد نظر مشخص کرد (۲). اما تمام روش های غیرمستقیم برای تمام نمونه ها پاسخگو نیستند. از جمله، مواردی که بیمار فوت کرده باشد؛ بیماری به صورت تک موردی در خانواده ای بروز کرده باشد و یا خویشتندان فرد بیمار در دسترس نباشند یا تمایل به همکاری نداشته باشند. در این موارد بهتر است از روش های مستقیم برای تشخیص ناقلین استفاده شود.

از روش های مستقیم می توان به روش های زیر اشاره کرد: (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification: MLPA) این روش می تواند ۴۰ توالی مختلف DNA را در یک لوله و با یک جفت پرایمر مورد بررسی قرار دهد (۲۰). (Multiplex Amplifiable Probe Hybridization: MAPH) در این روش تمام ۱۷۹ آگزون ژن دیستروفین از نظر حذف و مضاعف شدگی ها با تکثیر هم زمان تمام شناساگرها در یک واکنش با استفاده از تنها یک جفت پرایمر بررسی می شوند (۲۰). در تکنیک های MAPH و MLPA توانایی تکثیر تعداد زیادی از جایگاه ها توسط یک جفت پرایمر وجود دارد. از مزایای مهم این روش می توان به غربالگری هم زمان تمام ۱۷۹ آگزون (کل قطعه کدکننده ژن دیستروفین) اشاره کرد. ولی برای استفاده در آزمایش های معمول باید مشکلات زیر را نیز مدنظر قرار داد. آنالیزهای مورد نیاز در دو تکنیک MLPA و MAPH به دلیل دشواری و وقت گیر بودن، حداقل به ۲ روز زمان نیاز دارد. به علاوه استفاده از دستگاه الکتروفورز موینه ای و دستگاه تعیین توالی اتوماتیک با ابزارها و هزینه های اضافی، مورد نیاز است (۵، ۱۹، ۲۰).

جانکورت و همکاران طی یک طرح تحقیقاتی اقدام به تشخیص ناقلین بیماری DMD/BMD توسط تکنیک Real-Time PCR با استفاده از SYBR Green کردند. آنها ۱۰۰ درصد نمونه های ناقل را

همیاری تمامی همکاران گروه ژنتیک بخش بیوتکنولوژی تشکر و قدردانی می‌گردد.

## تشکر و قدردانی

در این طرح از مساعدت و همکاری کلیه بیماران و خانواده‌های محترم آنها، جهت در اختیار گذاشتن نمونه و همچنین از پشتیبانی و

## References

1. Thompson M, McInnes R, Willard H. The molecular and biochemical basis of genetic disease, Thompson & Thompson genetics in medicine, W.B. Saunders company, Philadelphia, 1966; 289-294
2. Worton RG, Thompson MW. Genetics of Duchenne muscular dystrophy. *Annu Rev. Genet*, 1988; 22: 601-629
3. Ligon AH, Kashork CD, Richards CS, Shaer LG. Identification of female carriers for Duchenne and Becker muscular dystrophies using a FISH-based approach. *Human Genetics*. 2000; 8: 293-298
4. Joncourt F, Neuhaus B, Jostardt-Foegen K, Kleinie S, Steiner B, Gallati S. Rapid identification of female carriers of DMD/BMD by quantitative Real-time PCR. *Human mutations*, 2004; 93: 385-391
5. Raverso M, Mainati M, Minetti C, Regis S, Tedeschi S, Pedemonte M, Bruno C, Biassoni R, Zara F. Multiplex Real Time PCR for detection of deletions and duplications in dystrophin gene. *Biochemical and Biophysical Research communications*, 2006; 339: 145-150
6. Wilke K, Duman B, Horst J. Diagnosis of haploidy and triploidy based on measurement of gene copy number by Real-time PCR. *Human mutations*, 2000; 16: 431-436
7. Ruize-ponte C, Loidi L, Vega A, Carracedo A, Barros F. Rapid Real-time fluorescent PCR gene dosage test for the diagnosis of DNA duplications and deletions. *Clinical chemistry*, 46: 1574-1582
8. Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analysis of SMN1 and SMN2 based on real-time LightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *American journal of human genetics*, 2002; 70: 358-368
9. 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. *Medical science*, 2003; 18: 727-732
10. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 1992; 10: 413-417
11. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, and Watson R. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 1993; 11: 1026-1030
12. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isacs JD, Markham AF. Real-time PCR based on SYBR Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*, 2003; 3: 18
13. Miller SA, Dykes D D, Polesky HF. A simple salting out for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acids Research*, 1988; 16(3): 1215
14. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acid Researches*, 1998; 16: 11140-11156
15. Beggs AH, Koeing M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Human genetics*, 1990; 86: 45-48
16. Livak K. Comparative Ct method. In: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, User Bulletin 2, PE Applied Biosystems, 1997; 11-15
17. Panigrahi I. Carrier Detection and prenatal Diagnosis in Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *Indian pediatrics*, 2001; 38: 631-639
18. Schouten JP, McElquinn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acid Researches*, 2002; 30: 57
19. White S, Kaif M, Liu Q, Villerius M, Engelsma D, Kriek M, Vollebregt E, Bakker B, Van Ommen GJB, Breuning MH, Dunnen JT. Comprehensive detection of genomic duplications and deletions in the DMD gene by use of multiplex amplifiable probe hybridization. *American journal of human genetics*, 2000; 71: 365-374
20. Sellner LN, Taylor GR. MLPA MAPH new techniques for detection of gene deletions, *Human Mutation*, 2004; 23: 413-419
21. 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. *Journal of Korean medical science*, 2003; 18: 727-732