دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی – پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال شانزدهم – شماره ۷۹
اسفند ۱۳۸۷

راه‌اندازی روش لکه‌گذاری نقطه‌ای معکوس (Reverse Dot Blot) برای تعیین تیپ آلل‌های گروه HLA DRB*01

نویسندگان: مجید صفا[۱]، دکتر مهدی فروزنده‌مقدم*[۲]، دکتر علی‌اکبر پورفتح‌اله[۳]، دکتر حبیب نصیری[٤] و دکتر محمدجواد رسایی[٥]

۱. دانشجوی دکترای تخصصی هماتولوژی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی ایران
۲. دانشیار گروه بیوتکنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳. استاد گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
٤. استادیار گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
٥. استاد گروه بیوتکنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
نویسنده مسئول: E-mail: foroz@modares.ac.ir

وصول: ۸۵/۷/۹
ارسال اصلاحات: ۸۶/۵/۱
دریافت اصلاحات: ۸۶/۱۰/۱۶
ارسال اصلاحات: ۸۷/۶/۲۶
دریافت اصلاحات: ۸۷/۷/۲۷
پذیرش: ۸۷/۷/۳۰

چکیده

مقدمه و هدف: شناخت گروه‌های آللی و آلل‌های اختصاصی موجود در افراد پیامدهای مهمی را در پیوند عضو و سلول بنیادی و در مطالعات مرتبط با بیماری‌ها به‌دنبال دارد. کاربرد تعیین تیپ آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی به روش مولکولی در پیوند عضو، کیفیت بهتری را در این امر ایجاد می‌کند و به تعیین سازگاری دقیق‌تر با نتایج بالینی بهتر منجر می‌شود. در این مطالعه تکنیک هیبریداسیون نقطه‌ای معکوس به‌عنوان یک روش ساده و سریع برای تشخیص آلل‌های گروه HLA-DRB1*01 راه‌اندازی شد.

مواد و روش‌ها: ما به‌منظور تعیین تیپ آللی HLA-DRB1*01 با قدرت تفکیک بالا، آلل‌های این گروه را با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گروه آللی تکثیر کردیم. تکثیر DNA در صورتی رخ می‌دهد که آللی به صورت کاملاً مکمل با دو پرایمر انتخاب شده در DNA ژنومی وجود داشته باشد. این تکنیک اغلب منسوب به PCR-SSP است. سپس برای تشخیص اختصاصی این آلل‌ها (HLA-DRB1*0101,0102,0103,0104)، محصولات PCR نشاندار شده با بیوتین (با استفاده از پرایمرهای نشاندار با بیوتین) با پروب‌هایی که در انتهای ٥´ دارای گروه آمین بودند بر روی غشاء کربوکسیله شده هیبرید شدند. حضور محصولات PCR هیبرید شده با پروب اختصاصی، به وسیله استرپتاویدینکونژوگه با آلکالین‌فسفاتاز و سوبسترای NBT/BCIP ردیابی می‌شود.

نتایج: حضور هر کدام از آلل‌های اختصاصی به‌وسیله ظهور یک لکه روی غشاء شناسایی شد. نتایج به دست‌آمده حاصل از این تکنیک با روش‌های دیگر همخوانی داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج ما پیشنهاد می‌کند که تکنیک RDB برای تعیین تیپ HLA، یک روش سریع و حساس با دقت زیاد است و برای موارد استفاده بالینی مناسب است.

واژه‌های کلیدی: لکه‌گذاری نقطه‌ای معکوس، تعیین سازگاری آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی، قدرت تفکیک بالا، پیوند

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

مجموعه آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی (HLA: Human Leuckocyte Antigene) یکی از متنوع‌ترین سیستم‌های ژنتیکی شناخته شده‌است. هم اکنون بیش از ۲۰۰۰ آلل در این مجموعه وجود دارد که در مردمان سراسر دنیا شناخته شده‌است و در ۱۲ جایگاه ژنی بیان‌کننده کلاس یک و دو حضور دارند. شناخت گروه‌های آللی و آلل‌های اختصاصی موجود در افراد پیامدهای مهمی را در پیوند عضو و سلول بنیادی و در مطالعات مرتبط با بیماری‌ها به‌دنبال دارد. به ویژه لکوس DRB1 بیش‌ترین پلی‌مورفیسم را در بین این لکوس‌ها دارد و تعیین تیپ آن از اهمیت بیش‌تری برخوردار است. از جمله علل لزوم تعیین تیپ به روش مولکولی برای این ژن، حضور آن صرفاً در سطح تعداد کمی از سلول‌ها است[۱و۲].

کاربرد تعیین تیپ آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی به روش مولکولی در پیوند عضو، کیفیت بهتری را در این امر ایجاد می‌کند و به تعیین سازگاری دقیق‌تر با نتایج بالینی بهتر منجر می‌شود. تعیین سازگاری آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی در چندین سطح تشخیص برای آلل‌ها می‌تواند، انجام شود. تعیین تیپ با قدرت تفکیک بالا سعی در بیان دقیق این نکته‌است که چه آلل‌هایی در جایگاه‌های ژنی یک فرد قرار دارند. برای پیوند مغز استخوان تعیین سازگاری با قدرت تفکیک بالا، به منظور افزایش بقاء طولانی مدت پیوند و کم کردن بیماری پیوند علیه میزبان (GVHD: Graft Versus Host Disease) مورد نیاز است[۳]. چندین روش مولکولی تعیین تیپ HLA ابداع شده‌اند که نشان‌دهنده پل مورفیسم خیلی زیاد ژن‌های آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی است[٤] که از میان این روش‌ها PCR-SSP و PCR-SSP روش‌های معمول‌تر هستند[۵]. در این مطالعه تلاش بر این بود که از مزایای هر دو تکنیک استفاده شود. به همین منظور آلل‌های لکوس HLA-DRB1 به چندین گروه آللی تقسیم‌بندی شدند و یک جفت پرایمر اختصاصی برای هر گروه آللی در نظر گرفته شد. بعد از تکثیر اختصاصی هر گروه آللی از پروب‌های اولیگونوکلئوتیدی برای تعیین اختصاصی هر آلل استفاده گردید، در این تحقیق HLA-DRB1*01 به عنوان اولین گروه آللی که باید تکثیر شود در نظر گرفته شده و هر یک از آلل‌های (0104* , 0103* , 0102* , 0101*) در این گروه توسط پروب‌های اختصاصی شدن ردیابی شدند.

مواد و روش‌ها

یک روش تغییر یافته خارج‌سازی نمک (salting out) با استفاده از دترجنت‌های لباسشویی به جای پروتئیناز K برای استخراج DNA از نمونه‌های خون محیطی افراد سالم به‌کار گرفته شد[٦و۷]. در این روش ابتدا سلول‌های خونی با استفاده از یک ماده ایزوتون حاوی سوکروز، لیز شد و سپس با استفاده از پودر لباسشویی (که حاوی بسیاری از مواد مورد نیاز برای استخراج DNA است) استخراج انجام گردید. همچنین چند نمونه DNA ژنومی که تیپ HLA آن‌ها توسط روش‌های استاندارد تعیین شده بود، از (IHWG: International Histocompatibility Workshop Group) دریافت گردید. به‌منظور تعیین تیپ آللی HLA-DRB1*01 با قدرت تفکیک بالا، آلل‌های این گروه را با استفاده از پرایمرهای اختصاصی این گروه آللی تکثیر کردیم. این پرایمرهای اختصاصی برای ناحیه‌ای در اگزون۲ از ژن HLA-DRB1 طراحی شدند. پرایمر (5′- Forward TTTCTTGTGGCAGCTTAAGTTTGAA) که بازهای انتهای 3′ آن برای این گروه آللی اختصاصی است و با دیگر آلل‌های DRB1 یا دیگر لوکوس‌ها واکنش نمی‌دهد. در مقابل، پرایمر برگشت (Reverse) که انتهای 5′ آن با Biotin (5′-ACTCGCCGCTGCACTGTGAACGT) نشاندار شده برای همه گروه‌های آللی مشترک است و می‌توان با بکارگیری پرایمرهای رفت (forward) اختصاصی، برای تکثیر گروه‌های آللی دیگر نیز اقدام کرد. برای واکنش‌های PCR در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر از ۱۰۰-۵۰ نانوگرم DNA ژنومیک (نمونه‌های کنترل استاندارد HLA-DRB1*0101, 0102, 0103,0104) یک واحد DNA پلیمراز، ۰/۲ میلی‌مول dNTP، ۲ میلی‌مول $MgCl_2$ و بافر 1XPCR (۵۰ میلی‌مول KCl، ۲۰ میلی‌مول Tris-HCl با pH=۸/٤) استفاده کردیم.

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندروف اجرا گردید. برنامه واکنش PCR شامل یک دناتوراسیون اولیه ۹٤°C به مدت ۱۰ دقیقه و به‌دنبال آن ۳۵ سیکل متوالی دناتوراسیون در ۹٤°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ٦۲°C به مدت ۲۰ ثانیه و دمای پلیمریزاسیون ۷۲°C به مدت ٤۰ ثانیه انجام شد. سیکل نهایی تکثیر در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه خاتمه یافت. جهت تأیید انجام عمل PCR، محصول بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). به منظور اطمینان از عملکرد صحیح

Archive of SID

www.SID.ir

پرایمرهای اختصاصی گروه 01*، بر روی چند نمونه DNA ژنومیک که از پیش تعیین شده بود که گروه آللی 01* را ندارند، همراه با یک نمونه استاندارد 01* واکنش PCR انجام شد (شکل ۲).

با طراحی ٤ پروب اولیگونوکلئوتیدی آلل‌های 0101، 0102، 0103 و 0104 در گروه آللی HLA-DRB1*01 با تک تک پروب‌ها مورد آنالیز قرار گرفتند. یک پروب هم به‌عنوان کنترل برای ناحیه‌ای مشترک از تمام آلل‌های این گروه طراحی گردید (جدول ۱).

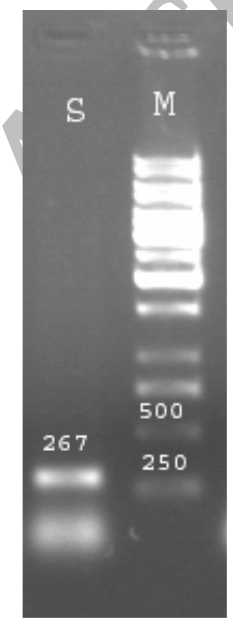
جدول ۱. توالی پروب‌های اولیگونوکلئوتیدی که برای تشخیص آلل‌های مختلف استفاده شده‌است.

نام‌پروب	توالی	اختصاصیت
P_1	NH2 – TGG AAC AGC CAG AAG GAC - 3′	HLADRB1*0101 HLADRB1*0102 HLADRB1*0103 HLADRB1*0104 HLADRB1*01 (Control)
P_2	NH2 – ACG GGG CTG TGG AGA G - 3′	
P_3	NH2 – CTG GAA GAC GAG CGG G - 3′	
P_4	NH2 – GGG GTT GTG GAG AGC TT - 3′	
G_2	NH2 – TGC AGA CAC AAC TAC GGG - 3′	

برای اتصال پروب‌ها غشاء نایلونی (Biodyne C) حاوی گروه‌های کربوکسی، ابتدا توسط اتیل ۳-۳- دی متیل آمینو پروپیل کربودی آمین (EDC) ١٦ درصد غشاء مذکور فعال گردید و سپس پروب‌ها که در انتهای 5′ خود حاوی گروه آمین بودند، توسط دستگاه مینی‌بلاتر به غشاء متصل گردیدند. برای انجام هیبریداسیون غشاء فوق ابتدا در یک میلی‌لیتر بافر هیبریداسیون 2XSSPE شامل ۱۸۰ میلی‌مول کلریدسدیم (NaCl)، ۱۰ میلی‌مولار دی‌سدیم دی‌هیدروژن فسفات ($Na_2H_2PO_4$) و یک میلی‌مولار اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) و سدیم دو دسیل سولفات ۰/۱ درصد در دمای ٤٢°C به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور گشت. سپس ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) نشاندار با بیوتین به‌وسیله جوشاندن ۱۰ دقیقه‌ای دناتوره و به نوار فوق اضافه گردیده و عمل هیبریداسیون به مدت یک ساعت در دمای ٤٢°C انجام گرفت. پس از عمل هیبریداسیون غشاء دوباره با بافر 4XSSPE و SDS ۰/۱ درصد در دمای ٤٦°C به مدت ۱۰ دقیقه شستشو گردید. به‌دنبال آن عمل بلاکینگ غشاء با BSA ۰/۱ درصد انجام گرفت و سپس با ۵ واحد استرپتاویدین (Streptavidin) کونژوگه با آلکالن فسفاتاز به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق مجاور گردید. ظهور رنگ آبی تیره با سوبسترای NBT/BCIP طی مدت ۲۰ دقیقه صورت پذیرفت که با روش چشمی قابل ارزیابی است (شکل ۳).

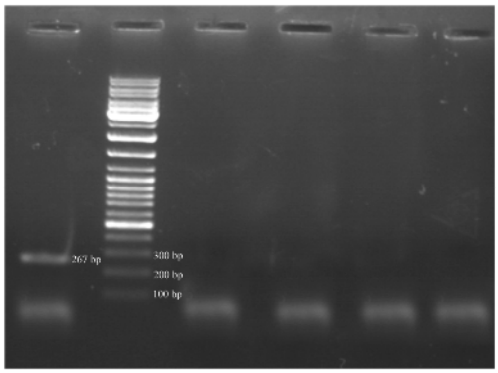
نتایج

نتایج حاصل از سیستم کاوشگر PCR-Reverse Dot Blot برای نمونه‌های استاندارد*0101،*0102،*0103 و *0104 نشان داده شده‌است (شکل ۷). برای هر نمونه ۳ بار تست مورد نظر تکرار شد تا دقت و صحت آن مورد ارزیابی قرار گیرد. به منظور بررسی اختصاصیت تکنیک RDB (Reverse Dot Blot) در تشخیص افراد دارای آلل‌های مذکور، تعدادی نمونه DNA که با قدرت تفکیک پایین (low resolution) تیپ‌بندی شده بودند و HLA-DRB1*01 گزارش شده بودند را مورد بررسی قرار دادیم. مثبت شده آزمون PCR برای این نمونه‌ها در واقع پرایمرهای ما را مورد تأیید قرار دادند. سپس برای تعیین آلل اختصاصی گروه 01* مربوط به این نمونه‌ها، ۲ نمونه که با تکنیک هیبریداسیون نقطه‌ای معکوس 0102* تیپ‌بندی شدند، برای سکانس (Sequencing) فرستاده شد. نتایج حاصل از روش هیبریداسیون نقطه‌ای معکوس با نتایج حاصل از سکانس مورد تأیید قرار گرفت و هر دو روش ۲ نمونه مذکور را 0102* نشان دادند (شکل۸).

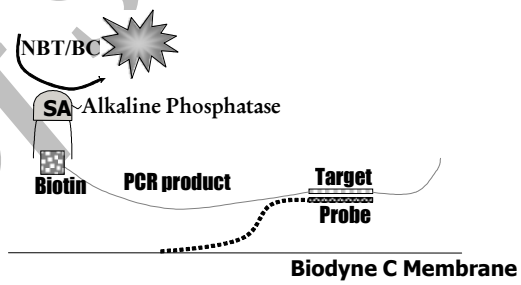


شکل ۱. نتیجه واکنش PCR اختصاصی گروه HLA DRB1*01

Archive of SID
www.SID.ir



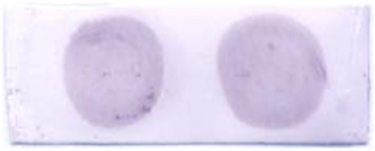
شکل ۲. نتیجه واکنش PCR به‌منظور بررسی اختصاصیت پرایمرها. در اولین ستون ۱ از سمت چپ محصول PCR کنترل مثبت، ستون ۲ سایز مارکر، ستون‌های ۳، ٤ و ٥ مربوط به نمونه‌هایی غیر از گروه DRB1*01 و ستون ٥ متعلق به کنترل منفی است.



شکل ۳. ایجاد واکنش رنگزایی آنزیماتیک در اثر اتصال محصول PCR به پروبی که با یک لینکر به سطح جامد متصل است. محصول PCR با استفاده از پرایمر نشاندار با بیوتین تولید شده‌است. استرپتویدین کونژوگه با آنزیم آلکالن فسفاتاز جهت شناسایی محصول PCR و تولید رنگ از سوبسترا استفاده شده‌است.

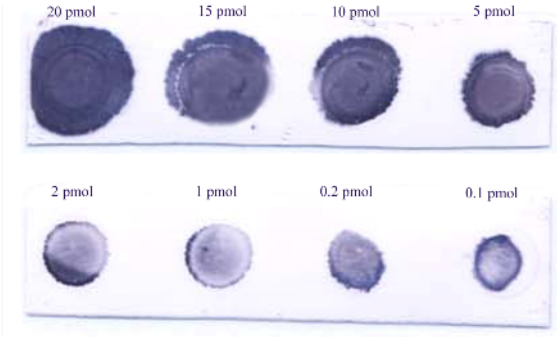
غلظت بافری	دمای واکنش	مرحله
4X SSPE	٤٢	Hybridization
2X SSPE	٤٦	Washing

شکل ٤ و جدول ۲. تأثیر غلظت بافر هیبریداسیون و شستشو روی میزان تولید رنگ و نتیجه واکنش (با شکل ٥ و جدول ۳ مقایسه شود).

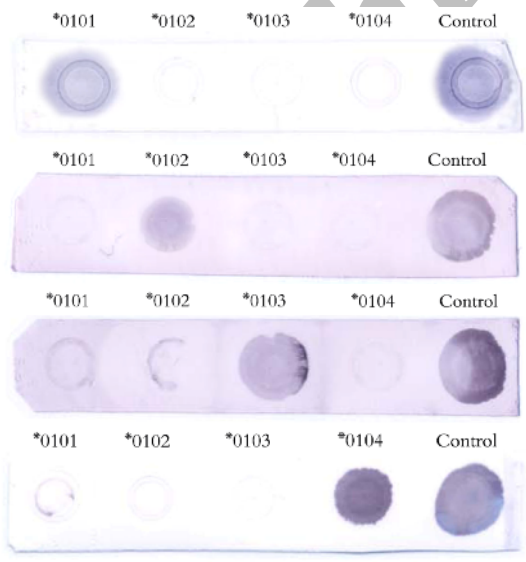


غلظت بافری	دمای واکنش	مرحله
2X SSPE	٤٢	Hybridization
4X SSPE	٤٦	Washing

شکل٥ و جدول ۳. تأثیر غلظت بافر هیبریداسیون و شستشو روی میزان تولید رنگ و نتیجه واکنش

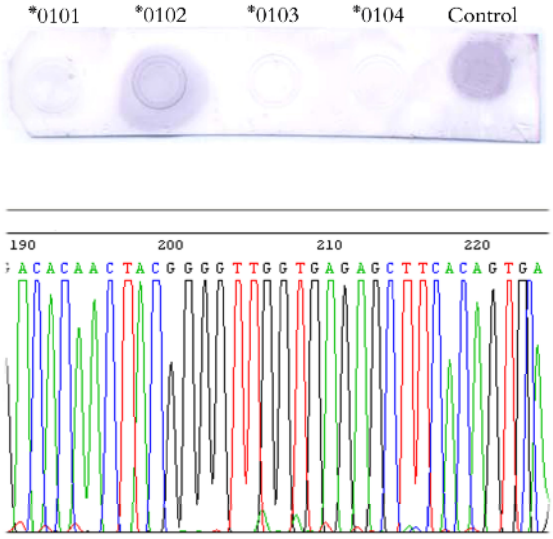


شکل ۶. ظهور هیبریدهای محصول PCR نشاندار با غلظت‌های مختلف پروب G_2. حتی با کم‌ترین غلظت پروب نتایج خوبی به دست آمد.



شکل ۷. نتایج حاصل از هیبریداسیون نمونه‌های استاندارد 0101, 0102, 0103,0104. کنترل مثبت و لکه‌های اختصاصی در همه نوارها مشخص است. هیچ یک از آلل‌ها با پروب‌های غیراختصاصی واکنش نداده‌اند.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۸. ظهور هیبرید محصول PCR نشاندار شده نمونه نامعلوم و نتیجه حاصل از تعیین توالی (Sequencing) آن قطعه از DNA، با نتایج آزمایش و نوع آلل تشخیص داده شده با روش لکه‌گذاری نقطه‌ای معکوس (reverse dot blot) مطابقت دارد.

بحث

هم اکنون روش‌های مختلفی برای تعیین تیپ HLA مورد استفاده قرار می‌گیرد. بعضی از این روش‌ها بر پایه تکثیر اختصاصی یک قسمت از ژن بنا شده‌اند که به آن‌ها SSP (Sequence Specific Priming) گفته می‌شود [۸]. بر پایه این روش‌ها، برای جستجوی تمام آلل‌های یک لکوس اختصاصی مثل DRB1 که حاوی بیش از ۳۰۰ آلل است، تعداد زیادی پرایمر نیاز داریم. روش دیگر برای جستجوی پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی بر پایه پروب‌های اولیگونوکلئوتیدی اختصاصی توالی (SSOP: Sequence Specific Oligonucleotide Probe) است. تعیین تیپ HLA با قدرت تفکیک بالا توسط روش SSOP نیاز به تعداد زیادی پروب دارد و ایجاد شرایط ویژه هیبریداسیون برای پروب‌های مذکور کار دشواری است [۹]. اما، ترکیب تکنیک‌های SSP و SSOP می‌تواند بر مشکلات ذکر شده غلبه کند. به همین لحاظ، ما از پرایمرهای اختصاصی گروه آللی برای تکثیر گروه آللی DRB1*01 و از پروب‌های اختصاصی برای شناسایی آلل‌های مربوطه در این گروه‌استفاده کردیم. بنابراین با این روش تنها تعداد محدودی پروب استفاده خواهد شد. تکنیک مذکور که بر پایه هیبریداسیون در فاز جامد است، تکنیک لکه‌گذاری نقطه‌ای معکوس (RDB) نامیده می‌شود که از حساسیت، اختصاصیت و سرعت عمل خوبی برخوردار است[۱۰]. همچنین نسبت به روش‌های دیگر هم دارای مزایایی است. به‌عنوان مثال روش PCR-RFLP نیازمند تهیه آنزیم‌های محدودکننده خاص با هزینه بالا و همین طور فراهم‌سازی شرایط مناسب برای عملکرد صحیح چنین آنزیم‌هایی است و یا روش ARMS نیازمند انجام مکرر واکنش PCR تحت شرایط مناسب است به‌طوری که کوچک‌ترین تغییری در غلظت‌های دزوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات‌ها (dNTPs) و کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، پرایمر و تغییرات دمایی می‌تواند سبب نتایج مثبت و منفی کاذب گردد [۱۱]. از دیگر مزایای تکنیک RDB این است که نیازمند لوازم و موادگران نبوده و به آسانی در هر آزمایشگاهی که بتوان PCR و شرایط هیبریداسیون را اجرا ساخت، قابل انجام است. نکته قابل بحث دیگر در رابطه با تکنیک RDB انتخاب غشاء و نحوه تثبیت پروب‌ها بر روی غشاء است. مواد مختلفی به‌عنوان فاز جامد برای روش SSOP مورد استفاده قرار گرفته‌است و در این میان غشاهای نایلونی جایگزین غشاءهای نیتروسلولزی شده‌اند[۱۲].

در رابطه با تثبیت پروب روی غشاء، به‌وسیله اضافه کردن گروه‌های نوکلئوفیل همانند گروه‌های آمین یا تیول و یا اضافه کردن دم‌پلی T به‌وسیله آنزیم ترمینال دزوکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز به انتهای ′3 پروب‌های در حال سنتز، می‌توان آن‌ها را فعال کرد[۱۳]. غشاء انتخاب شده باید دارای گروه‌های کربوکسیل آنیونیک باشد تا با پروب‌های دارای گروه آمین یا تیول واکنش دهد. از میان غشاهای با بار منفی، تنها غشاء IAM و Biodyne C قادر به اتصال به پروب‌های تغییر یافته هستند که در این تحقیق از غشاء Biodyne C استفاده شد. در این تحقیق از ترکیب EDC برای فعال‌سازی غشاء استفاده کردیم. ترکیب EDC گروه‌های کربوکسیل غشاء را به شکل O-acylurea تبدیل می‌کند که این فرم حد واسط می‌تواند به گروه‌های آمین حمله کرده و بین غشاء و پروب پیوند آمیدی برقرار کند [۱۴]. اتصالات غیراختصاصی به‌وسیله فعل و انفعلات الکتروستاتیک، هیدروفوبیک یا شیمیایی می‌توانند حساسیت این سنجش را کاهش دهند [۱۵]. گروه‌های کربوکسیل فعال شده می‌توانند با هر نوکلئوفیل موجود در

Archive of SID
www.SID.ir

محلول واکنش دهند. پس از تثبیت اولیگونوکلئوتید، غیرفعال‌سازی جایگاه‌های فعال ضروری است که در مطالعات انجام گرفته توسط زانگ (Zhange) و همکارانش هیدروکسیل آمین و NaOH ۰/۱ نرمال حداکثر کارآیی در غیرفعال‌سازی گروه‌های استر در کوتاه‌ترین زمان را داشتند که هیدروکسید سدیم (NaOH) به‌دلیل سهولت دسترس و تأثیر بهتر انتخاب گردید [۱۶]. اما راه‌اندازی تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز – لکه‌گذاری نقطه‌ای معکوس (PCR-reverse dot blot) معمولاً با مشکلاتی نیز همراه‌است. یکی از مشکلات عمده طراحی پروب‌های مناسب برای تشخیص پلی‌مورفیسم‌ها است که آزادی عمل در انتخاب هر ناحیه‌ای از ژن برای هیبریداسیون وجود ندارد. بالاخص زمانی که تعداد زیادی پروب همزمان تحت یک شرایط هیبریداسیون باید قرار گیرند [۱۷]. در تکنیک RDB تمام پروب‌های متصل شده به غشاء باید Tm تقریباً یکسانی حداکثر ۲°C اختلاف داشته باشند که در این تحقیق این نکته در طراحی پروب‌ها رعایت شده و نتایج حاصل این امر را تأیید کرد. از دیگر مشکلات این تکنیک می‌توان عدم وجود سیستم اتوماسیون آن به صورت گسترده در آزمایشگاه‌ها نام برد [۱۸]. پالوماکی (Palomaki) و همکارانش اختصاصیت تکنیک RDB را برای آزمایش‌هایی که بر روی بیماران مبتلا به بیماری سیستیک فیبروزیس در ایالات متحده انجام دادند ۹۹/٤ درصد گزارش کردند. از طرف دیگر پالوماکی در تحقیقی که بین سال‌های ۱۹۹٦ تا ۲۰۰۱ در آمریکا برای بیماری CF انجام داد حساسیت این تست را ۹۷/۹ درصد گزارش کرد [۱۹]. با وجود ابداع تکنیک‌های جدید در مقوله تعیین ژنوتیپ، تکنیک RDB همچنان یکی از روش‌های متداول مورد استفاده در دنیا است [۲۰] همچنین این تکنیک در کشور ما برای تشخیص بیماری‌هایی مثل تالاسمی استفاده می‌شود[۲۱].

در این مطالعه تمام مشاهداتی که از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز – لکه‌گذاری نقطه‌ای معکوس به دست آمد با روش‌های استاندارد دیگر همخوانی داشت و همین مسأله این تکنیک را به‌عنوان یک روش مناسب برای تیپ‌بندی مولکولی HLA با اختصاصیت و حساسیت بالا مطرح می‌کند.

منابع

1. Von Salome J, Gylensteen U, Bergstrom TF. Full length sequence analysis of the HLA-DRB1 locus suggests urgent origin of alleles; Immunogenetics: 2007:59(4):261-71.
2. Tiercy J-M (2002).Molecular basis of HLA polymorphism: implication in clinical transplantation, Transplant Immunology, 9: 137-180.
3. Begovich A, Erlich A (1995). HLA typing for bone marrow transplantation, JAMA, 273: 586-591.
4. Doxiadis II, Claas FH (2003). The history of HLA and its methods, Dev Ophtalmol, 36: 5-11
5. Erlich A, Opelz G, Hanson G(2001). HLA DNA Typing and transplantation, Immunity, 14: 347-356.
6. Drabek J, Petrek M (2002). A sugar, laundry detergent and salt method for extraction of deoxy ribonucleic acid from blood, Biomed papers, 146:37-39.
7. Nasiri H, Forouzande M, Rasaee MJ, Rahbarizadeh F, Modified Salting-Out Method: High-Yield, High-Quality Genomic DNA Extraction from Whole Blood Using Laundry Detergent, J Clin Lab Anal. 2005;19(6):229-32
8. Gerlach J (2002). Human lymphocyte antigen molecular typing; how to identify the 1250+ alleles out there, Arch Pathol Lab Med, 126: 281-4.
9. Allen M, Eriksson I, Liu I, Gyllensten U(1998). High resolution genetic typing of class II HLA DRB1 locus using group specific amplification and SSO hybridization in microplates, Hereditas, 129: 161-167.
10. Francois J, PLamade F, Aviens O, Edouard E, Ballaguer P, Nicolas J, Clot J (1992).Generic HLA DRB1 Gene oligotyping by a non radioactive reverse dot blot methodology, Hum Immun, 35: 215-222.
11. Pavlovic S, Uroseuic J, Dureinouic T, Janic D, Krivokapic-Dokmanovic L(2002).Rapid characterization of β-thalassemia mutations by reverse dot blot and allele-specific PCR analysis. Jugoslov Med Biohem, 21: 283-286.
12. Kevin D Jones (2001). Membrane immobilization of nucleic acids, IVD Technology.
13. Haffmann-La R (2000). 5′ 3′ modifi tech sheet.doc, Technical Sheet.
14. Zhang Y, Coyne MY, Will SG, et al (1991). Single base mutational analysis of cancer and genetic. Diseases using membrane bound modified oligonucleotides, Nucleic Acids Res, 19: 3929-33.
15. Schollen E, Vandenberk P, Cassiman J, Matthijs G (1997). Development of Reverse dot-blot system for Screening of mitochondrial DNA mutations associated with Leber hereditary optic atrophy, Clinica Chemistry, 43: 18-23.
16. Colah RB, Gorakshakar AC, Lu CY, Nadkami AH, Desai SN, Pawar AR, et al. (1997). Application of covalent reverse dot blot hybridization for rapid prenatal diagnosis of the common Indian thalassemia syndromes, Indian J Haematol Blood Transfus, 15: 10-13
17. Chen D, Endres W, Meyer S, Stangel W (1994). A polymerase chain reaction –sequence specific oligonucleotide procedure for HLA class II typing using biotin and digoxigenin labeled probes simultaneously in hybridization, Hum Immunol, 39: 25-30.
18. Lappin S, Cahlik J, Gold B (2001). Robot printing of Reverse Dot Blot Arrays for Human Mutation Detection, Molecular Diagnostics, 3: 178-188.
19. Bert G (2003). Origin and utility of the reverse dot-blot, Expert Rev Mol Diagn, 3: 143-152.
20. Li D, Liao C, Li J, Hungey Xi. Prenatal diagnosis of beta thalassemia by reverse dot blot hybridization in southern china. Hemoglobin, 2006; 30(3):365-70.
21. Derakhshande-peykar P, Akhavan-niaki H, Tamaddoni A, Ghavidel-Parsa S, Rahmani M, Babrzadeh F, Dilmaghani-Zadeh M, Farhad D. Distribution of beta thalassemia mutation in the north province of Iran. Hemoglobin; 2007: 31(3)351-6.

Archive of SID

www.SID.ir