Archive of SID

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۹ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۶ صفحات ۲۰-۱۳

مطالعه اگزون ۱۰ و انترون‌های آن از ژن CFTR در مبتلایان به بیماری فیبروز کیستیک در آذربایجان‌شرقی با استفاده از تکنیک PCR-SSCP

دکتر مرتضی جبارپور بنیادی: استادیار ژنتیک مولکولی پزشکی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز: نویسنده رابط
E-mail: bonyadim@tbzmed.ac.ir
امید عمرانی: مربی ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
دکتر نعمت بیلان: استاد بیماریهای کودکان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سل و بیماری های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر ماندانا رفیعی: دانشیار بیماریهای کودکان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماریهای کبد و گوارش، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر خلیل انصارین: دانشیار بیماریهای داخلی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سل و بیماری های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
سمیه کاظمی نسب: دانشجوی کارشناسی زیست شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

دریافت: ۸۵/۹/۱۱، **پذیرش**: ۸۶/۳/۲۳

چکیده

زمینه و اهداف: بیماری فیبروز کیستیک از شایعترین اختلالات ژنتیکی در بین کودکان بوده و غدد برون ریز بدن، دستگاه گوارش و تنفس را درگیر می‌سازد. الگوی وراثتی این بیماری بصورت اتوزوم مغلوب بوده و شیوع آن حدود ۱ در ۲۵۰۰ تولد زنده و فراوانی ناقلین حدود ۱ در ۲۵ فرد گزارش شده است. این بیماری از جهش در ژن (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator, CFTR) عارض می‌گردد. اکثر جهشهای شایع گزارش شده در بین مبتلایان از جمعیتهای مختلف، مربوط به اگزون ۱۰ این ژن می‌باشد. از جمله این جهش‌ها، جهش DeltaF508 بوده که در بین بیماران فیبروز کیستیک در کشورهای اروپایی با درصدهای بسیار بالایی گزارش شده است. کل موتاسیونهای شناخته شده در این اگزون تا حال در حدود ۶۵ نوع مختلف می‌باشد که در مقایسه با اگزونهای دیگر، این اگزون بیشترین فرکانس و تنوع را دربر می‌گیرد. گزارش جامعی از نوع و فرکانس جهشهای ژن CFTR در بین مبتلایان از منطقه شمالغرب کشور ارائه نشده است. هدف این مطالعه، بررسی جهش‌های اگزون ۱۰ با استفاده از تکنیک (Single Strand Conformation Polymorphism/HeteroDuplex analysis, SSCP) در بین مبتلایان بیماری فیبروز کیستیک از منطقه شمالغرب کشور می‌باشد.

روش بررسی: افراد مشکوک به بیماری فیبروز کیستیک بر اساس علائم بالینی و پاراکلینیکی توسط پزشکان متخصص، جهت بررسی مولکولی به مرکز ژنتیک تبریز ارجاع داده شدند. خونگیری از فرد مبتلا و والدین آنها بعد از اخذ رضایتنامه کتبی صورت گرفته و پس از استخراج DNA، توالی اگزون ۱۰ ژن CFTR با استفاده از تکنیک PCR-SSCP مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفت.

یافته ها: از ۹۵ خانواده مشکوک ارجاع داده شده، ۴۶ خانواده (با ۴۵ فرد مبتلا و والدین یک نوزاد فوت شده) بر اساس علائم کلینیکی و آزمایشگاهی جهت بررسی ژنتیکی انتخاب شدند. در بین خانواده های انتخاب شده، دوازده الگوی متفاوت باندی SSCP از اگزون ۱۰ ژن CFTR در مقایسه با فرد طبیعی در ۳۰ خانواده مبتلا (۶۵٪) مشاهده گردید. در بین این خانواده‌ها، ۱۲ فرزند مبتلا بصورت هموزیگوت (۲۴ کروموزوم) و ۱۷ فرزند مبتلای دیگر بصورت هتروزیگوت (۱۷ کروموزوم) تفاوت در الگو را نشان دادند. در یکی از خانواده‌ها، در والدین فرزند مبتلای فوت شده، تغییر بصورت هتروزیگوت (۲ کروموزوم) وجود داشت.

نتیجه‌گیری: الگوی متفاوت باندی SSCP برای اگزون ۱۰ در مقایسه با افراد نرمال در ۴۶٫۷٪ از کروموزوم‌های مورد بررسی از خانواده‌های مبتلا از شمالغرب کشور مشاهده شد که ضرورت بررسی این اگزون را در قدم اول برای الگوهای مشخص شده نشان میدهد.

کلید واژه ها: فیبروز کیستیک، ژن CFTR، جهش، تکنیک SSCP/HD

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری فیبروز کیستیک (CF[1]) مهمترین عامل مرگ و میر در کودکان و شایعترین اختلال اتوزومی مغلوب در دنیا محسوب می‌شود. میزان شیوع این بیماری در حدود ۱ در ۲۵۰۰ تولد زنده و فراوانی حاملین ٤٪ می‌باشد(۱). ناراحتی‌های ریوی مزمن (همراه آلودگی پسودوموناس آئروجینوزا)، ناکارآمد بودن غدد خارجی پانکراس، افزایش غلظت کلرید در عرق (بیش از ٦٠mEq/l) و عقیم بودن مردان بدلیل CBAVD[2] از جمله علائم کلینیکی این بیماری محسوب می‌گردد(۲).

بیماری فیبروزکیستیک ناشی از جهش در ژن CFTR بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۷ (۷q۳۱،۲) می‌باشد(۳). این ژن دارای ۲۷ اگزون بوده و پروتئین کد شده توسط آن ۱۴۸۰ اسید آمینه دارد. این پروتئین بصورت کانال یونی در غشاء سلول‌های پوششی عمل کرده و عبور و خروج یونها را کنترل می‌کند. انواع مختلفی از موتاسیونها در ژن CFTR می‌توانند تنظیم و هدایت یونی کانال را بهم زده و سبب بروز بیماری شوند(۴و۵). به دلیل همین عملکرد ویژه پروتئین CFTR، نقص عمده در بیماران فیبروز کیستیک از قابلیت نفوذ غیرانتخابی یونهای سدیم و کلراید در سلولهای پوششی عارض می‌گردد(۲).

اکثر جهشهای شایع گزارش شده از ژن CFTR مربوط به اگزون ۱۰ این ژن می‌باشد که در مقایسه با اگزونهای دیگر، این اگزون بیشترین فرکانس و تنوع را دربر می‌گیرد. از جهش‌های صورت گرفته در این اگزون می‌توان به ۳۳ موتاسیون از نوع بدمعنی ، ۹ موتاسیون از نوع بی معنی، ۸ موتاسیون از نوع تغییر در قالب، ۲ موتاسیون از نوع درج یا حذف به صورت بدون تغییر در قالب رونویسی،۱۱ نوع پلی مورفیسم و ۲ موتاسیون از نوع تغییر در ویرایش را نام برد(۶).

در سال ۱۹۸۹، Kerem و همکارانش(۷) یک حذف سه نوکلئوتیدی در اگزون ۱۰ این ژن را شناسایی کردند (جهش Delta F508) که تاکنون شایعترین جهش شناخته شده در دنیا می‌باشد و مطالعه آن اولین قدم در تشخیص مولکولی بیماری فیروز کیستیک در جمعیت های مختلف دنیا بشمار می‌آید. این جهش مربوط به حذف اسید آمینه فنیل آلانین در موقعیت ۵۰۸ پروتئین CFTR است. جهش Delta F508، با توجه به منشاء قومی و نواحی جغرافیایی دارای فراوانی متفاوتی است مثلاً در کشورهای غرب اروپا فراوانی آن بین ۵۰ الی ۸۸٪، در نواحی آمریکای لاتین فراوانی بین ۲۰ تا ۵۸٪ ولی در کشورهای خاورمیانه این فراوانی کمتر از ۳۰٪ گزارش شده است. از جمله موتاسیون های دیگر این اگزون می‌توان به M469V ، G486X ، DeltaI507 و Q525X اشاره نمود. فراوانی موتاسیون‌های موجود در اگزون‌های دیگر ژن CFTR، در اروپا حدود ۲۴٪ گزارش شده است(۱۲–۸).

همچنین بعضی جهش ها در جمعیت های ویژه‌ای بطور غیرمعمول شایع هستند که احتمالاً بدلیل زمینه ژنتیکی موجود (اثر بنیانگذاری) می‌باشد(۱۳).

روشهای مورد استفاده برای بررسی مولکولی ژن CFTR متفاوت می‌باشند که در این میان بهترین و ارزانترین روش استفاده از تکنیک SSCP/HD بوده که با توجه به عمومی بودن و اینکه تمامی یک قطعه را مورد آنالیز همزمان قرار می‌دهد بسیار مفید می‌باشد. بر اساس گزارشات انجام یافته، با کاربرد این تکنیک می توان بیش از ۹۷٪ موتاسیونهای نقطه‌ای و حذف شدگی‌های موجود در این ژن را تشخیص داد(۱۴).

با توجه به اینکه در منطقه شمالغرب کشور، بررسی جامع ژنتیکی بر روی مبتلایان به بیماری فیبروز کیستیک صورت نپذیرفته و همچنین با در نظر گرفتن اینکه اگزون ۱۰ این ژن بیشترین جهش‌ها در بین مبتلایان را متحمل می‌گردد، بررسی جهش‌های اگزون ۱۰ ژن CFTR با استفاده از تکنیک SSCP در بین مبتلایان بیماری فیبروز کیستیک از منطقه شمالغرب کشور هدف اصلی این مطالعه می‌باشد.

مواد و روش ها

معرفی بیمار و استخراج DNA:

در این مطالعه ۹۵ خانواده مبتلا از منطقه شمالغرب توسط متخصصین مربوطه به مرکز ژنتیک تبریز معرفی گردیدند. در مجموع ۴۶ خانواده (۴۵ فرد مبتلا و والدین یک نوزاد فوت شده) بر اساس علائم کلینیکی و آزمایشگاهی بیماری فیبروزکیستیک مانند تست عرق مثبت (>٦٠mEq/l) ، ناراحتیهای ریوی وگوارشی برای بررسی ژنتیکی انتخاب شدند. هر کدام از این خانواده ها دارای حداقل یک عضو مبتلا بوده که در اکثر موارد امکان دسترسی به شخص مبتلا وجود داشت. در مواردیکه نوزاد مشکوک به فیبروز کیستیک فوت شده بود، والدین آنها مورد بررسی قرار گرفتند. پس از جلب رضایت کامل، خونگیری از بیمار و والدین آنها (۱۲۹ نفر) به عمل آمد. پس از خونگیری، خون با مقداری EDTA (ماده ضد انعقاد خون) مخلوط شده و در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. استخراج DNA با روش اصلاح شده فنل ـ کلروفرم صورت پذیرفت(۱۵). بعد از لیز کردن سلول‌های گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید جدا و و در بافر SE، سدیم دو دسیل سولفات ۱۰٪ و پروتئیناز K، حل و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۶۰–۴۵ درجه سانتی‌گراد جهت تجزیه پروتئین های موجود و لیز کردن سلولهای سفید خون در بن ماری نگهداری شد. بعد از اضافه کردن فنل ـ کلروفورم به اندازه یکسان، محلول حاوی DNA جدا و به این مایع به حجم ۱ به۱۰ سدیم استات (3M) و دو برابر حجم خون اولیه اتانول مطلق سرد افزوده تا رشته DNA ظاهر گردد. رشته DNA حاصل در مقدار مناسبی از آب استریل شده و یا بافر TE حل شد.

1. Cystic fibrosis
2. Congenital bilateral absence of vas defran

www.SID.ir

Archive of SID

تکنیک PCR:

اگزون ۱۰ ژن CFTR با استفاده از روش PCR تکثیر گردید. در این روش، برای تکثیر قطعه مربوطه، یک جفت پرایمر مورد استفاده قرار گرفت که قبلاً در مقالات دیگر(۱۴) گزارش شده بود.

F:GCAGAgTACCTgAAACAggA
R:CATTCACAgTAgCTTACCCA

پرایمر مورد بررسی علاوه بر ناحیه اگزونی، ناحیه اینترونی مربوط به اگزون ۹ و اگزون ۱۰ را نیز شامل می‌شد. برای انجام PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، از MgCl2 با غلظت نهایی 1.5 mM، بافر PCR با غلظت نهایی 1X، آنزیم Taq پلیمراز یک واحد، dNTP با غلظت نهایی 0.2 mM و ngDNA ۱۰۰ استفاده گردید. واکنش PCR با ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه جهت جدا کردن رشته های DNA از همدیگر شروع شده و سپس چرخه های بعدی بصورت، ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد برای یک دقیقه تنظیم شده بود که این چرخه برای ۲۸ بار تکرار شده و بعد از تکمیل چرخه ها، آخرین چرخه با ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه به اتمام رسید.

محصول PCR اگزون ۱۰ ژن CFTR، ۴۹۵ جفت باز (شکل۱) است که برای مشاهده محصولات PCR از ژل آگاروز ۱/۵٪ استفاده شد.

تکنیک SSCP/HD:

پس از عملکرد بهینه PCR و عدم وجود بند اضافی، محصول PCR با استفاده از تکنیک SSCP/HD مورد بررسی قرار گرفت. مقدار ۶ میکرولیتر از بافر SSCP (فرمآمید ۹۵٪، ۱۰۰ میلی مولار NaOH، برموفنل بلو ۲۵٪ و زایلن سیانول ۲۵٪) را به ۳ میکرولیتر محصول PCR افزوده و آن را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد حرارت داده و سپس سریعاً محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. در این هنگام ۵ میکرولیتر از محصول SSCP بر روی ژل آکریل آمید ۱۰٪ با ولتاژ ۲۵۰ به مدت ۵ ساعت الکتروفورز گردید. برای مشاهده الگوی باندی حاصل، از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد(۱۶).

در مواردی که بیمار حالت هموزیگوت را برای یک تغییر در الگوی SSCP نشان می‌داد جهت اینکه تغییر موجود خود را به صورت هتروزیگوت نشان دهد(در بعضی موارد الگوی باندی SSCP در حالت هتروزیگوت بهتر قابل تشخیص است وهمچنین با استفاده از آنالیز هترودپلکس می توان مشخص کرد که بیمار برای چه الگویی بصورت هموزیگوت است)، آنالیز هترودوپلکس مورد استفاده قرار می‌گرفت.

یافته ها

در مجموع ۴۳ کروموزوم (۴۶،۷٪) متعلق به ۳۰ خانواده، الگوی باندی متفاوت SSCP در مقایسه با افراد نرمال نشان دادند. در این خانواده ها، ۱۲ الگوی متفاوت SSCP که با الگوی SSCP فرد طبیعی نیز متفاوت بودند مشاهده گردید. در مجموع برای چنین الگوهای باندی SSCP ، ۱۲ کودک بصورت هموزیگوت و۱۷ کودک بصورت هتروزیگوت بودند. در این بررسی، الگوهای مشاهده شده جهت تسهیل، بصورت گروه های مختلف تقسیم بندی شدند(جدول ۱).

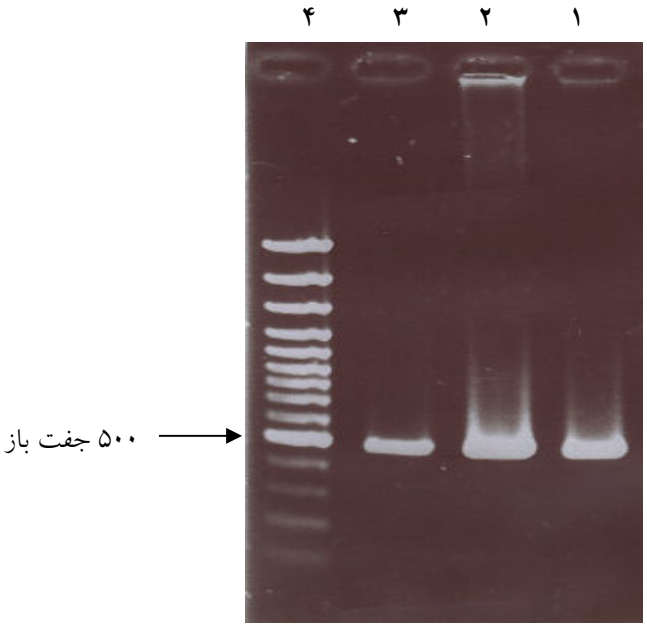
در خانواده های شماره یک الی سه، یکی از والدین الگوی شماره I و والد دیگر الگوی شماره II را نشان داده و کودک نیز در این خانواده ها بصورت هموزیگوت دارای الگوی شماره II بود(شکل۲). در خانواده شماره چهار، نیز هر کدام از والدین و حتی فرزند نیز دارای الگوی متفاوت (هتروزیگوت ترکیبی) نسبت به فرد طبیعی بودند(پدر الگوی شماره II، مادر الگوی شماره VII و فرزند دارای الگوی شماره III) (شکل۳). در خانواده شماره پنج نیز کودک به دلیل ابتلا به فیبروز کیستیک فوت شده بود و والدین آن بصورت هتروزیگوت دارای الگوی شماره IV بودند(شکل۴). در خانواده شماره شش الگوی پدر و مادر متفاوت (پدر دارای الگوی شماره VIII و مادر دارای الگوی شماره VI) و کودک نیز برای الگوی پدر بصورت هموزیگوت بود(شکل۵). در خانواده شماره هفت کودک برای الگوی شماره IV بصورت هتروزیگوت و تنها والد آنالیز شده آن یعنی پدر بصورت هتروزیگوت شماره V بود. در هشت خانواده مورد بررسی (خانواده های شماره هشت الی پانزده) فرزند الگوی هموزیگوت و در پانزده خانواده دیگر (خانواده های شماره شانزده الی سی) فرزند الگوی هتروزیگوت را نشان داد.

جدول ۱: تعداد الگوهای مشاهده شده در خانواده های مورد بررسی بصورت گروه‌بندی در این جدول ارائه شده است.

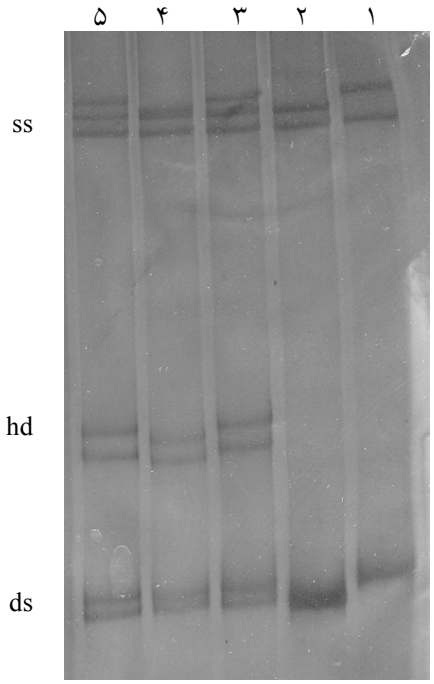
شماره الگو	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	تعداد کل
تعداد بیمار هموزیگوت	–	۶	–	۲	–	–	–	۱	۲	۱	–	–	۱۲
تعداد بیمار هتروزیگوت	۲	۴	۱	۲	–	–	–	–	۶	–	۱	۱	۱۷

www.SID.ir

Archive of SID



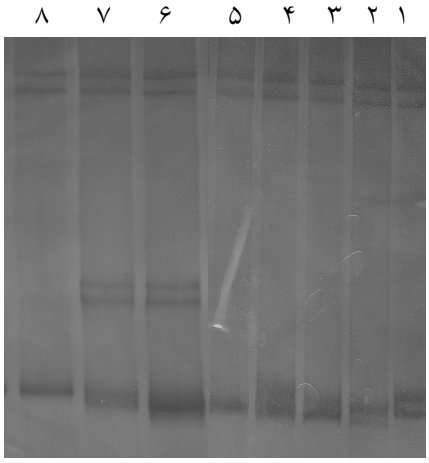
شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR از اگزون ۱۰ ژن CFTR؛ در ستون‌های ۱ و ۲ و ۳ محصول PCR از اگزون ۱۰ و در ستون ۴ مارکر DNA مشاهده میشود.



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR از اگزون ۱۰ ژن CFTR در خانواده های شماره یک الی سه، بر روی ژل پلی آکریل آمید. ستون شماره ۲ متعلق به فرد بیمار (بصورت هموزیگوت) می‌باشد و ستون‌های ۴ و ۵ به ترتیب مربوط به مادر و پدر است. با توجه به ستون ۳ (مخلوط محصول PCR از فرد بیمار و یک فرد سالم)، فرد بیمار برای الگوی پدر بصورت هموزیگوت می باشد، ستون ۱ متعلق به یک فرد سالم است.
SS: DNA تک رشته‌ای، hd: هترودوپلکس ، ds: DNA دو رشته‌ای.

www.SID.ir

Archive of SID

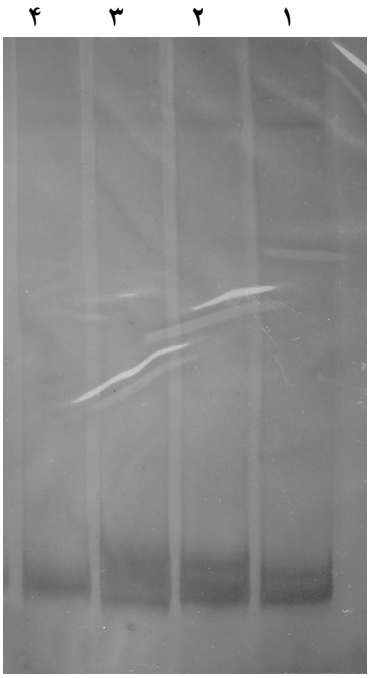


شکل ۳: الگوی مشاهده شده از اگزون ۱۰ در خانواده شماره ۴. الگوی فرد بیمار (ستون ۶) نسبت به الگوی پدر و مادر(به ترتیب ستون‌های ۲و۷) متفاوت می‌باشد. ستون‌های ۵ و۸ متعلق به اگزون ۱۰ از افراد سالم می‌باشند. ستونهای دیگر متعلق به دیگر مبتلایان با الگوهای متفاوت است که توضیح داده شده اند.

شکل ۴: الگوی باندی SSCP مشاهده شده از اگزون ۱۰ در خانواده شماره۵. پدر و مادر(به ترتیب ستون‌های ۱و۲) بصورت هتروزیگوت دارای الگو IV می-باشند. ستون ۳ مربوط به الگوی باندی مشاهده شده از یک فرد سالم است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵: آنالیز SSCP از اگزون ۱۰ برای خانواده شماره ۶. آنالیز هترودوپلکس فرد مبتلا (مخلوط PCR از یک فرد بیمار و یک فرد سالم) در ستون ۲ شبیه الگوی پدر (ستون ۳) بوده ولی نسبت به الگوی مادر (ستون ۱) متفاوت می‌باشد. الگوی مشاهده شده در فرد سالم در ستون ۴ نشان داده شده است.

بحث

پس از یافتن ژن CFTR در سال ۱۹۸۹ توسط Kerem و همکاران، تاکنون حدود هزار نوع موتاسیون مختلف در این ژن شناخته شده است. پراکندگی این جهش‌ها در نواحی اگزون، اینترون و پروموتر می‌باشد. با وجود این تعداد زیاد موتاسیون، جهش های اگزون ۱۰ این ژن نسبت به بقیه جهش ها در دنیا غالب بوده و در این میان جهش Delta F508 که مربوط به یک حذف سه نوکلئوتیدی در این اگزون است، شایعترین(۶۶٪) جهش شناخته شده است(۶). معمولاً اولین قدم در تشخیص مولکولی بیماری فیبروز کیستیک بررسی اگزون ۱۰ ژن CFTR می‌باشد. برای این منظور روش های متفاوتی از جمله dHPLC[1]، SSCP، هیبریداسیونASO[2] ، و آنالیز هتروپلکس و آنالیز با استفاده از آنزیم های محدودالاثر مورد استفاده قرار می گیرد(۱۵و۱۷). در این تحقیق پس از تکثیر اگزون ۱۰ ژن مربوطه و همچنین قسمتی از نواحی اینترونی دو طرف آن، بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمرازی، متعاقب آن از تکنیک SSCP (چند شکلی فضایی تک رشته DNA) استفاده شد. با استفاده از این تکنیک و با توجه به اساس آن، هرگونه تغییری در ساختار نوکلئوتیدی منجر به ایجاد شکل فضایی متفاوت و در نتیجه الگوی متفاوت باندی نسبت به فرد طبیعی بر روی ژل می‌شود. بنابراین با راه اندازی این تکنیک می توان تمام موتاسیون‌ها و چند شکلی‌های موجود در اگزون ۱۰ ژن CFTR و نواحی اینترونی اطراف آنرا مورد بررسی قرار داد و با انجام یک آزمایش تمام این تغییرات را بررسی کرد. البته نباید وجود تغییراتی که ساختار فضایی مشابه ایجاد می‌کنند و یا آنهایی را که سبب تغییر در ساختار فضایی تک رشته DNA نمی‌شوند، نادیده گرفت. در این حالات می‌بایست پس از SSCP از تکنیک توالی‌یابی DNA نیز استفاده کرد.

تنوع و فرکانس موتاسیون های موجود در اگزون ۱۰ ژن CFTR در بررسی‌های انجام‌گرفته در نقاط مختلف دنیا، بطور متفاوتی گزارش شده‌است. برای مثال در کشورهای چک(۱۸)، یونان(۱)، برزیل(۲)، اروگوئه(۱۹) وترکیه(۹) به ترتیب۷۲٪، ۵۵٪، ۴۸٫۷٪، ۴۱٪ و۳۰٪ از موتاسیون‌های تشخیص داده شده مربوط به اگزون ۱۰ می‌باشد و همچنین برای کشورهای اروپای غربی میزان جهش‌های موجود در اگزون ۱۰ را حدود ۷۶٪ گزارش نموده‌اند. مطالعه ما در این منطقه نیز میزان موتاسیون‌های اگزون ۱۰ را ۴۶٫۷٪ نشان داده است که در مقایسه با کشور های اروپایی کمتر و نزدیک به گزارشات ارائه شده از کشورهای ترکیه و آمریکای لاتین است. در مطالعه حاضر، وجود ۱۲ نوع الگوی متفاوت باندی SSCP نسبت به یکدیگر و نسبت به فرد سالم، نشان‌دهنده وجود فرکانس بالایی از انواع جهشهای مختلف در اگزون ۱۰ ژن CFTR در این منطقه می‌باشد که مطابق با گزارشات ارائه شده از جمعیتهای دیگر است. اطلاعات بدست آمده از جمعیت مورد بررسی نشانگر این است که این جمعیت در مقایسه با جمعیتهای گزارش شده از کشورهای اروپایی دارای میزان بالایی از هتروژنی جهشی در اگزونهای مختلف ژن CFTR می‌باشد. در کشورهای

1. Denaturing High Performance Liquid Chromatography
2. Allele-Specific Oligonucleotide Hybridization

www.SID.ir

Archive of SID

اروپایی، ۷۵ درصد از جهشها در اگزون ۱۰ متمرکز شده ولی در مبتلایان به بیماری فیبروز کیستیک این جمعیت نظیر جمعیتهای گزارش شده از ترکیه و آمریکای لاتین، تنها در حدود ۴۶ درصد از موتاسیونها در اگزون ۱۰ متمرکز شده و بقیه موتاسیونها، در اگزونهای دیگر این ژن اتفاق افتاده است.

در یکی از خانواده‌های بررسی شده، کودک به دلیل ابتلا به بیماری فیبروزکیستیک فوت شده بود. با بررسی ژنتیکی والدین سالم آن در این مطالعه، الگوی هر دو والد بصورت هتروزیگوت مشخص گردید. همچنین دو کودک مبتلا نیز برای این الگو بصورت هموزیگوت تشخیص داده شدند. بنابراین به نظر می‌رسد که این یافته نشانگر این است که کودک فوت شده با احتمال خیلی زیاد، برای چنین الگویی بصورت هموزیگوت بوده که به دلیل شدت بالای بیماری فوت شده است. در چنین خانواده هایی امکان تشخیص ناقلین و همچنین امکان تشخیص قبل از تولد با استفاده از تکنیک مذکور و تکنیک تعیین توالی، وجود دارد.

نتیجه گیری

در جمعیت شمالغرب کشور، با بررسی اگزون ده از ژن CFTR با استفاده از تکنیک SSCP امکان تشخیص درصد بالایی از مبتلایان به فیبروز کیستیک وجود خواهد داشت.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از همکاران دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، روسای مراکز تحقیقاتی بیماریهای سل و ریه و کاربردی دارویی کمال تشکر را دارند. همچنین از سرکار خانم ابراهیمی و خانواده های مبتلا که کمال همکاری را در این مطالعه داشتند، سپاسگذار می‌باشند. بودجه این پروژه توسط مرکز تحقیقات بیماریهای سل و ریه دانشگاه علوم پزشکی تبریز تامین و در آن مرکز اجرا گردید.

References

1. Kanavakis E, Efthymiadou A, Strofalis S, Doudounakis S,Traeger-Synodinos J, Tzetis M. Cystic fibrosis in Greece: molecular diagnosis, haplotypes, prenatal diagnosis and carrier identification amongst high-risk individuals. *Clin Genet* 2003; **63**: 400–409.
2. Araujo FG, Novaes FC, Santos NP, Martins VC, Souza SM, Santos SE, et al. Prevalence of deltaF508, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005; **38** (1):11-5.
3. Estivill X, Farrall M, Scambler PJ, Bell GM, Hawley KM, Lench NJ, et al. A candidate for the cystic fibrosis locus isolated by selection for methylation-free islands. *Nature* 1987; 30-May 6; **326**(6116): 840-5.
4. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; **8**; 245(4922):1066-73.
5. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. 1989; **8**; 245(4922):1059-65.
6. Wine JJ, Kuo E, Hurlock G and Moss RB. Comprehensive Mutation Screening in a Cystic Fibrosis Center. *Pediatrics* 2001*;* **107**:281-286
7. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; **8**; 245(4922):1073-80.
8. Dawson KP and Frossard PM. A hypothesis regarding the origin and spread of the cystic fibrosis mutation DF508. *Q J Med* 2000; **93**:313–315
9. Onay T, Zielenski J, Topaloglu O, Gokgoz N, Kayserili H, Apak MY, et al. Cystic fibrosis mutations and associated haplotypes in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Biol*. 2001; **73**(2): 191-203.
10. Visich A, Zielenski J, Castan˜os C, Diez G, Grenoville M, Segal E, et al. Complete screening of the CFTR gene in Argentine cystic fibrosis patients. *Clin Genet* 2002; **61**: 207–213.
11. Jalalirad M, Houshmand M, Mirfakhraie R, Goharbari MH, Mirzajani F. .First study of CF mutations in the CFTR gene of Iranian patients: detection of DeltaF508, G542X, W1282X, A120T, R117H, and R347H mutations. *J Trop Pediatr*. 2004; **50**(6): 359-61.
12. Karjoo M, Bahremand M, Mihandoust G. Cystic fibrosis in southern Iran. *J Trop Pediatr* 1984; **30**(4): 195-6.
13. Davies J, Alton E, Griesenbach U. Cystic fibrosis modifier genes. *J R Soc Med* 2005; **98**: 47-54.
14. Liechti-Gallati S., Schneider V., Neeser D. and Kraemer R. Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and any other human genetic disease. *Eur J Hum Genet* 1999; **7**, 590–598.
15. Miller SA, Dykes DD, and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**(3): 1215.

www.SID.ir

Archive of SID

16. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC: Analysis of the VNTR locus D1S80 by PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991; **48**:137-144.
17. Ferrie RM, Schwarz MJ, Robertson NH, Vaudin S, Super M., Malone G. et al. Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. *Am J Hum Genet* 1992; **51**(2): 251-62.
18. Dork K, Macek M, Mekus F, Tümmler B, Sakmaryova I, Krebsova A, et al. A novel 21 kilobase deletion, CFTRdele2, 3(21kB), in the CFTR Gene: A Cystic Fibrosis Mutation of Slavic Origin Common in Central and East Europe. *Human Genetics* 2000; **106 (3):** 259-268.
19. Luzardo G., Aznarez I., Crispino B., Mimbacas A., Martinez L., Poggio R. et al. Cystic fibrosis in Uruguay. *Genetics and Molecular Research* 2002; **1**: 32-38.

www.SID.ir