Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۲، شماره ۱۲، صفحات ۹۷۴ تا ۹۷۸ ، (۱۳۸۳)

قدرت و دقت تشخیص روش PCR-Reverse Dot- Blot در تعیین ژنوتیپهای ژنهایHLA-Class II در پیوند ومقایسه آن با روشهای دیگر HLA Typing

دکتر مهدی زمانی (استادیار)
گروه ژنتیک پزشکی، مرکز طبی کودکان، بخش ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

مقدمه: ژنهای HLA کلاس II روی بازوی کوتاه کروموزوم ٦ قرار گرفته‌اند و بشدت چند شکلی هستند و هر کدام ازاین ژن‌ها دارای تعداد زیادی الل می‌باشند، بطوری که به هر فرد یک هویت ژنتیکی اختصاصی می‌دهد. این ژنها در پیوند اعضاء و مغز استخوان نقش حیاتی دارند. در پیوند، بویژه پیوند مغز استخوان، شرط اصلی گرفتن پیوند، یکسان بودن ژنوتیپ‌های ژن‌های HLA بویژه ژنهای HLA کلاس II در فرد گیرنده ودهنده می‌باشد، به همین دلیل تعیین دقیق ژنوتیپ این ژنها با قدرت تفکیک بالا ، در پیوند فوق العاده حیاتی است. در حال حاضر در کشور ما تایپ HLA از طریق روشهای سرولوژی ، مولکولیPCR-SSP و یا روشها ی مشابه انجام میگیرد، این روشها قدرت تفکیک پائینی دارند. اخیرا با استفاده از تکنیک مولکولی PCR-Reverse Dot-Blot کیت‌های را برای تعیین ژنوتیپ ژنهای HLA-DRB1، DRB3, DRB4, DRB5 DQB1, DQA1 طراحی و ساخته ام که قدرت تفکیک بالا (High resolution genomic typing of HLA) داشته و جزء تشخیص‌های سریع و دقیق می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر ، برای ارزیابی دقت و قدرت تفکیک روشهای مختلف HLA typing تعدادی نمونه رفرانس از WHO تهیه شد که ژنوتیپ آنها بر اساس توالی نوکلئوتیدهای آنها معلوم بود. نمونه‌های رفرانس با روشهای سرولوژی ، مولکولی PCR-SSP ، PCR-SSP-RFLP و روش PCR-Reverse Dot-Blot (مورد اخر با استفاده از این کیتها مذکور فوق) تایپ شدند.

یافته‌ها& نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد، روش سرولوژی و روشهای مولکولی PCR-SSP و PCR-SSP-RFLP توانایی تعیین دقیق اللها را ندارد و در اکثر موارد گروه‌های اللی را مشخص نمودند. در مقابل روش مولکولی PCR-Reverse Dot-Blot با استفاده از کیت‌های HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 DQB1, DQA1 همان ژنوتیپ نمونه‌های WHOرا نشان دادند.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ژن‌های HLA (ژنهای که آنتی ژنهای لکوسیتهای انسانی را کد گزاری می‌کنند) بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ٦ قرار داشته و دارای ۳ کلاس (I, II, III) می‌باشند. این ژنها بویژه ژنهای HLA کلاس II بشدت پلی مورفیسم هستند ، هر کدام ازاین ژن‌ها دارای تعداد زیادی الل می‌باشند. بطوری که به هر فرد یک هویت ژنتیکی اختصاصی می‌دهد و به سهم خود تنوع ژنتیکی را در هر جمعیتی ایجاد می‌کنند. این ژنها نقش اصلی را در سیستیم ایمنی بازی می‌کنند و در پیوند اعضا و مغز استخوان نقش حیاتی دارند. در پیوند، بویژه پیوند مغز استخوان، یکسان بودن و یا Matching ژنوتیپ‌های ژن‌های HLA بویژه ژنهای HLA کلاس II در فرد گیرنده ودهنده شرط اصلی گرفتن پیوند می‌باشد، در غیر اینصورت پیوند رد می‌شود. بنابر این، تعیین ژنوتیپ‌های این ژنها در پیوند فوق العاده ضروری و حیاتی است. از طرف دیگر روش HLA typing ، تعیین اللهای ژن‌های HLA ، دقت و قدرت تفکیک HLA typing امر مهم دیگری است که توجه جدی می‌طلبد و گرفتن پیوند در گرو تعیین دقیق اللها است. در حال حاضر در کشور ما ، HLA typing به دو طریق صورت می‌گیرد r4e ۱-روش سنتی سرولوژی ۲- روش مولکولی PCR-SSP ، درهر دو روش، نتیجه تایپینگ HLA نشان دهنده به مجموعه‌های از اللها است و نمی تواند دقیقا ژنوتیپ دهنده و گیرنده پیوند را مشخص کند. اخیرا با استفاده از تکنیک مولکولی PCR-Reverse Dot-Blot کیت‌های را برای تعیین ژنوتیپ ژنهای HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 DQB1, DQA1 طراحی و ساخته ام که قدرت تفکیک با لا (High resolution genomic typing of HLA) داشته و جزء تشخیص‌های سریع و دقیق می‌باشد.

در مطالعه حاضر برای ارزیابی دقت و قدرت تفکیک روشهای مختلف HLA typing ، نظیر سرولوژی ، مولکولی PCR-SSP , PCR-SSP-RFLP با روش PCR-Reverse Dot-Blot با استفاده از این کیتها مقایسه شدند. بدین منظور ، نمونه‌های رفرانس از WHO تهیه شد که ترتیب نوکلئوتیدهای آنها و در نتیجه ژنوتیپ آنها معلوم بود. نمونه‌ها با هر چهار روش ، HLA تایپ شدند و نتایج نشان داد، تنها روش تایپینگ مولکولی کیت‌های HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 DQB1, DQA1 دقیقا نتایج WHO نمونه‌های رفرانس را نشان می‌دهند.(تصویر ۱)

مواد و روش‌ها

نمونه‌های رفرانس از WHO تهیه که از نظر سرولوژی دارای آنتی ژنهای مشخص بودند و این نمونه‌ها با روشهای مولکولی PCR-SSP , PCR-SSP-RFLP و همچنین با روش PCR-Reverse Dot-Blot با استفاده از کیتهای فوق الذکر HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 DQB1, DQA1 ; تایپ شدند.

روش PCR-SSP: با استفاده از تعدادی پرایمرهای اختصاصی، ژن HLA class II تکثیر گردیدند. برای هر الل یا مجموعه اللها یک واکنش PCR صورت گرفت بعنوان مثال برای هر فرد در ژنهای DRB ، ۲٤ واکنش PCR صورت گرفت با توجه به مثبت و منفی بودن هر PCR ، الل یا مجموعه اللها DRB مشخص شدند.

روش PCR-SSP-RFLP: با استفاده از تعدادی پرایمرهای اختصاصی، هر کدام از ژنهای HLA class II بطور مجزا تکثیر گردیدند. در هر لوکوس برای هر مجموعه اللها یک واکنش PCR صورت گرفت و بعد با آنزیمهای محدود کننده محصولات PCR بریده شدند و نتایج تفسیر گردید. (۱)

در روش کیتها که بر اساس روش مولکولی RDB می‌باشد، همه اللهای هر ژن غربال می‌شوند به عنوان نمونه در HLA-DRB ٦۹ الل شناخته شده در جهان غربال گردید بدین ترتیب که : الیگونوکلئوتیدها ی اختصاصی (SSO) موتاسیونها با dttp دنباله دار شدند، بعد پروب‌های SSO روی غشای نایلونی غیر باردار قرار داده شدند. پروبهای SSO با محصولات نمونه‌های رفرانس که در طول PCR با Bit 11

www.SID.ir

Archive of SID

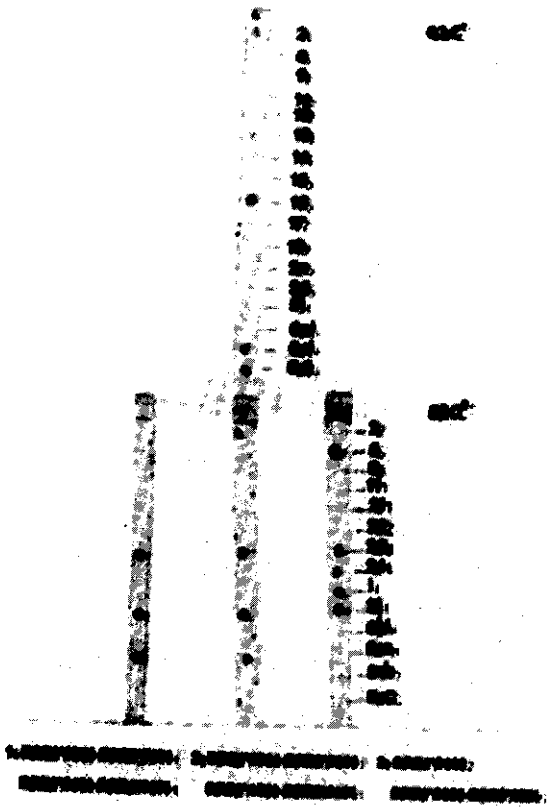
dUTP نشاندار شده‌اند هیبرید گردیدند و پروبهای هیبرید شده به عنوان سیگنالهای مثبت با روش غیر رادیواکتیو Chemiluminescence آشکار گردیدند. با تفسیر نتایج، ژنوتیپ‌های افراد برای ژنهای HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1 مشخص شدند (٤،٣،٢). میزان قدرت تفکیک در هر چهار متد برای ژنوتیپ‌های ژنهای HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 DQA1, DQB1 در نمونه‌های رفرانس تعیین شدند.

یافته ها

نتایج تایپینگ با روش‌های سرولوژی و مولکولی PCR-SSP و PCR-SSP-RFLP قادر به شناسای الل‌های نمونه‌های رفرانس WHO نشدند هر چند که قدرت تشخیصی این روشها به ترتیب از راست به چپ بهتر بود. یعنی روش PCR-SSP-RFLP بهتر از روشهای سرولوژی و مولکولی PCR-SSP بود.

در این روشها نتایج بعضی یا مجموعه‌ای از اللها را مشخص می‌کند. ولی نتایج با روش کیتها توانست تمامی اللها را با قدرت تفکیک بالا شناسائی کند و در لوکوسهای DRB توانست نه تنها دقیقا اللهای ژن HLA-DRB1 را مشخص کند بلکه ژنهای DRB3, DRB4, DRB5 را نیز تعیین نمود.

در تمامی نمونه‌های رفرانس WHO نتایج حاصل به طریقه کیتها برخلاف روشهای سرولوژی و PCR-SSP و PCR-SSP-RFLP دقیقاً با نتایج حاصل از سکانس آنها مطابقت داشت و ژنوتیپ‌های هر نمونه عین ژنوتیپ‌های Who بودند. برای روشن شدن موضوع، بعنوان مثال یکی از نمونه‌ها با جزئیات آن توضیح داده می‌شود: نمونه‌ای (با ژنوتیپ رفرانس WHO : DRB1*0401/1402) با روش سرولوژی مشخص شده بود که دارای آنتی ژنهای DR4 , DR14 است، در حالی که هر کدام از این آنتی ژنهای بترتیب دارای ٢١و ٢٢ الل هستند و هم چنین در روش SSP نیز این مشکل وجود دارد بطوری که در همین نمونه نتایج حاصل از PCR-SSP , بندهای محصولات PCR به طول ٢٥٩bp و ١٥١/١٢٩bp را بترتیب نشان داد که بند اول نشان می‌دهد فرد دارای یکی از ٢٤ الل 1122, 1410, 0401-22 و دومی نشان می‌دهد فرد دارای یکی از ١٢ الل 1402-3, 1406, 1409, 1412-13, 1417, 1418-19, 1421, 1318 می‌باشد.



تصویر ١- نمونه‌ای از تعیین ژنوتیپ‌های ژنهای HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, به روش PCR-Reverse Dot-Blot تا استفاده از کیت‌های ساخته شده . ژنوتیپ‌های هر فرد برای چهار ژن مذکور در زیر هر نمونه داده شده است. شماره اولیگو نوکلئوتیدها ی اختصاصی(SSO) که بر روی غشاها قراردارند در سمت راست آنها قید گردیده است.

در اصل هر کدام از این اللها مولکول پروتیین متفاوتی را تولید می‌کند.. در روش PCR-SSP-RFLP هر چند دقت و قدرت تفکیک بالا می‌رود ولی هنوز در بیشتر موارد مجموعه‌ای از اللها مشخص می‌شود و در این نمونه مورد نظر نیز الل 0401 مشخص نگردید. وقتی که نمونه فوق را با روش کیت HLA-DRB ژنوتایپ کردیم، دقیقا ژنوتیپ آنها را برای

www.SID.ir

Archive of SID

ما مشخص نمود به عبارت دیگر مجموعه اللی را نشان نداد بلکه اللهای اصلی ویا در اصل ژنوتایپ واقعی هر ژن را معلوم کرد (تصویر ۱).

بحث

در مجموعه‌ای از مقالات نتایج HLA typing به طریقه‌های سرلوژی را با روشهای مولکولی با قدرت تفکیک پایین (SSP) و یا (PCR-RFLP) مقایسه کرده‌اند و نتایج بدست آمده نشان داده که تفاوت نتیجه بین این روشها وجود دارد که قابل توجه در پیوند می‌باشد. (۱) این مطالعات اهمیت روشهای مولکولی بویژه روش SSO (الیگوهای اختصاص برای ترتیب نوکلئو تیدها) که دارای توان قدرت تفکیک بالاست، آشکار می‌سازد (۴،۳،۲) و بکار گیری روشهای مولکولی را برای تعیین گیرنده و دهنده پیوند توصیه می‌کند. همچنین نقش مهم HLA-DRB را در پیوند نشان می‌دهد (۵،۱). بنابراین در این مطالعه با استفاده از کیتهای HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 DQB1, DQA1 ; (مبتنی بر PCR-Reverse Dot-Blot) که دارای قدرت تفکیک بالاست، ژنوتیپ ژنهای HLA-Class II در نمونه‌های رفرانس WHO تعیین شدند و میزان قدرت تفکیک در هر چهار متد برای ژنوتیپ‌های ژنهای HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQB1, DQA1 در نمونه‌های رفرانس تعیین شدند. نتایج تایپینگ با روش‌های سرولوژی , مولکولی؛ PCR-SSP-RFLP و PCR-SSP نتوانستند الل‌های نمونه‌های رفرانس WHO را دقیقاً بشناسایی کنند و فقط بعضی و یا مجموعه‌ای از اللها را مشخص کردند. هر چند که روش مولکولی PCR-SSP ، همانطوری که در سایر مطالعات نشان داده شده، نسبت به روش سرولوژی و روش PCR-SSP-RFLP نسبت به هر دو روش سرولوژی و PCR-SSP از توانائی بهتری برخوردار بودند ولی قادر بشناسائی همه اللهای نمونه‌های رفرانس نگردید.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعیین ژنوتیپ‌های HLA class II با استفاده ازکیتهای HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 DQB1, DQA1 ; قادر است دقیقا همه اللهای ژنهای HLA class II را در سطح DNA مشخص نماید.

بطوری که در ژنهای DRB ، ۶۹ الل را مشخص نمود ویکی از مزایای این روش این است که در صورت مواجه شدن با الل یا موتاسیون جدید نتیجه برای آن الل قابل تفسیر نخواهد بود و مارا به وجود موتاسیون جدید آگاه می‌سازد. این در حالی است‌که در روشهای سرولوژی و PCR-SSP اطلاعاتی در مورد موتاسیون جدید در آن مجموعه اللی را نشان نمی دهد. (۷،۶) بدین ترتیب نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تکنیک PCR-Reverse Dot-Blot روش دقیق و قابل اطمینان برای تعیین ژنوتیپ‌های ژنهای HLA-Class II بویژه درافراد گیرنده ودهنده پیوند مغز استخوان می‌باشد و اگر Matching بین افراد گیرنده ودهنده پیوند مغز استخوان با این روش معلوم شود، شانس گرفتن پیوند فوق العاده بالا خواهد بود، این در حالی است که با روشهای سرولوژی و یا روش‌های مولکولی با قدرت تفکیک پایین مثل روش PCR-SSP انتظار ریسک خیلی بالا بویژه در افراد غیر فامیل گیرنده ودهنده پیوند وجود دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Ota M, Seki T, Fukushima H, Tsuji K, Inoko H. HLA-DRB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. Tissue Antigens 1992: 39:187-202

2. Zamani M, Spaepen M, Buyse I, Marynen P, Bex M, Bouillon R and Cassiman JJ. Improved risk assessment for IDDM by analysis of amino acids in HLA- DQ and DRB1 loci. Eur J Human Genetics 1994-A: 2:177-184

3. Zamani M, De Hert M, Spaepen M, Hermans M, Marynen P, Cassiman JJ and Peuskens J. Study of the possible association of HLA class II, CD4 and CD3 polymorphisms with schizophrenia. Am J Medical Genetics 1994-B: 54:372-377

4. Zamani M, Gu XX, Spaepen M, Vandevyver C, Raus J, Marynen P, Carton H and Cassiman JJ. Importance of HLA-DRB1 and DQA1 genes and of the amino acid polymorphisms in the functional domain of DRB1 chain in Multiple Sclerosis. J of Neuroimmonology 1995: 59:77-82.

5. Wolpl A, Fischer M, Eiermann T, Goldmann SF. Comparison of HLA typing and retyping data in patients with bone marrow transplantation. B In Transfusionsmed: 1994 32:266-9

6. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MCNM, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI. phototyping: Comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 and DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). Tissue Antigens 46:355-367, 1995

7. Nataf S, Hourmant MH, Herry P, Cesbron A, Bonneville F, Cheneau ML, Muller JY, Soulillou JP, Bignon JD. Kidney transplantation and HLA-DR Compatibility evaluated by genomic analysis. Rev Fr Transfus Hemobiol; 36:179-89, 1993

www.SID.ir