پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره هفدهم شماره ۵۸ خرداد و تیر سال ۱۳۸۶ (۶۴-۵۷)

بررسی فراوانی پلی مورفیسم جایگاه SspI در اینترون II ژن بتا گلوبین در استان مازندران

هاله اخوان نیاکی (Ph.D.) *+ **سیامک شفیع زاده**(M.D.) ** **بهشته اصغری**(B.Sc.) ***
علی بنی هاشمی (B.Sc.) *** **ماندانا عزیزی** (B.Sc.) ***

چکیده

سابقه و هدف : با توجه به میزان تولد سالانه تالاسمی ماژور در کشور، پیشگیری از این بیماری از طریق تشخیص پیش از تولد از اولویت‌های بهداشتی است. در ایران در ۲۰-۱۰ درصد افراد ناقل تالاسمی، جهش ژنی ناشناخته باقی می‌ماند. در چنین مواردی بررسی پیوستگی ژنی با استفاده از جایگاه‌های چند شکلی داخل یا نزدیک ژن برای ردیابی کروموزوم حامل جهش یا طبیعی، جهت تشخیص پیش از تولد، قابل انجام است. جایگاه SspI که برای اولین بار در ایران مورد بررسی قرار می‌گیرد، داخل اینترون II ژن بتاگلوبین قرار دارد. هدف این مطالعه تعیین فراوانی چند شکلی این جایگاه در جمعیت استان مازندران می‌باشد.

مواد و روش‌ها : خون محیطی ۲۱۱ فرد ناقل تالاسمی ساکن استان مازندران تهیه شد. پس از استخراج DNA و تکثیر ناحیه ژنی بتاگلوبین حاوی جایگاه چند شکلی SspI با استفاده از روش واکنش زنجیره پلی مراز (PCR)، اثر آنزیم SspI با استفاده از ژل آگاروز ارزیابی شد.

یافته‌ها : از ۴۲۲ کروموزوم بررسی شده، ۲۰/۶ درصد برای جایگاه SspI منفی بود. جایگاه‌های منفی تقریبا به میزان برابر با آلل‌های سالم و جهش یافته همراه بودند (۱۱/۹ درصد و ۱۴/۳ درصد).

استنتاج : از بررسی جایگاه SspI برای ردیابی کروموزوم‌های حاوی آلل سالم و جهش یافته ژن بتاگلوبین می‌توان استفاده کرد.

واژه های کلیدی : تالاسمی، بتاگلوبین، پلی مورفیسم، SspI ، مازندران

مقدمه

تالاسمی شایع‌ترین اختلال تک‌ژنی در دنیا می‌باشد به طوری که حدود ۷ درصد جمعیت جهان و در ایران به طور متوسط ۵ درصد (حدود ۳ میلیون نفر) ناقل این بیماری هستند(۱-۳).

تالاسمی در اثر کاهش ساخت یکی از زنجیره‌های گلوبین ایجاد می‌شود. بررسی انواع جهش‌ها در ژن‌های گلوبین و تنوع ترکیب هموگلوبین اجازه تقسیم‌بندی تالاسمی‌ها را به دو گروه اصلی آلفا (α) و بتا (β) داده

* متخصص بیولوژی سلولی و ژنتیک، عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی بابل
** پزشک عمومی،
+ ✉ **مولف مسئول** : بابل- امیر کلا، آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان کودکان امیرکلا
*** کارشناس ژنتیک بیمارستان کودکان امیرکلا بابل

تاریخ دریافت : ۸۵/۵/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۵/۸/۲۷ تاریخ تصویب: ۸۶/۲/۱۲

www.SID.ir

است. ژن‌های αوβبه ترتیب بر روی اتوزوم‌های۱۶و۱۱ واقع شده‌اند و ازنظر ژنتیکی ساختمانی بسیارمشابه دارند. همه این ژن‌ها دارای۳اگزون و۲ اینترون می‌باشند.

با توجه به این‌که تولد یک فرزند مبتلا به تالاسمی ماژور سبب مشکلات جسمی و روحی برای فرد مبتلا و خانواده او و همچنین هزینه‌های درمانی بسیار و عوارض اقتصادی و اجتماعی خواهد شد، پیشگیری از تولد یک نوزاد مبتلا می‌تواند بهترین روش جلوگیری از وقوع این مشکلات باشد. در حال حاضر ۱۰ درصد جمعیت شمال کشور ناقل تالاسمی بوده و در صورت عدم پیشگیری از تولد نوزاد تالاسمی ماژور انتظار می‌رود سالانه ۱۵۰ مورد تولد جدید تالاسمی ماژور در استان مازندران اتفاق افتد. این در حالی است که تنها راه‌های پیشگیری از تالاسمی ماژور انصراف زوج‌های ناقل از ازدواج با یکدیگر و یا در صورت ازدواج، تشخیص پیش از تولد با استفاده از روش‌های مولکولی و سقط جنین مبتلا به این بیماری می‌باشد.

با وجود این‌که براساس آزمایش‌های مولکولی ۲۰۰ جهش متفاوت به ژن بتاگلوبین نسبت داده شده است، در اکثر مناطق جهان، ۱۰-۶ جهش بیش از ۹۵ درصد آلل‌های جهش یافته را شامل می‌شود(۴).

در کشور ایران به دلیل گوناگونی جمعیت ناشی از مهاجرت‌ها و سلطه اقوام متفاوت در طول تاریخ، جهش‌های زیادی گزارش گردیده است. طبق بررسی‌های به عمل آمده بیش از ۴۰ جهش متفاوت در ژن بتاگلوبین در جمعیت ایران، گزارش شده است(۹- ۵، ۳). اما هنوز در برخی از مناطق ایران جهش در ۲۰-۱۰ درصد افراد تالاسمی مینور ناشناخته باقی مانده و در نتیجه تشخیص مولکولی با روش معمول آزمایشگاهی مانند روش سیستم تکثیر حساس به جهش ARMS[1] یا لکه نقطه‌ای معکوس RDB [2] میسر نمی‌باشد در چنین مواردی از روش‌های متداول آزمایشگاهی مانند چند شکلی ساختار فضایی تک رشته ای SSCP [3] یا الکتروفورز ژل با تغییر ماهیت گرادیان DGGE [4] یا بررسی پیوستگی ژنی با استفاده از چند شکلی یک جایگاه خاص نزدیک یا داخل آن ژن در فرد ناقل و افراد خانواده وی استفاده می‌شود(۱۴-۱۰).

پلی‌مرفیسم(Polymorphism) به تفاوت‌های موجود در توالی‌های ژنوم افراد جمعیت اطلاق می‌شود. به طور متوسط ۲ نوکلئوتید از هر ۱۰۰۰ نوکلئوتید در ژنوم دو نفر با یکدیگر فرق دارند. اگر نقطه چند شکلی توسط آنزیم محدود کننده خاصی قابل شناسایی و برش باشد می‌توان با تکثیر بخشی از DNA که حاوی توالی قابل شناسایی توسط آن آنزیم باشد و اثر دادن آنزیم مربوطه بر روی آن، وجود یا عدم وجود این جایگاه چند شکلی را نشان داد. به دست آمدن قطعات DNA با طول‌های متفاوت به دنبال اثر یک آنزیم محدودکننده به خصوص بر روی چند شکلی یک توالی را پلی‌مورفیسم طول قطعات محدود کننده یا RFLP [5] گویند .

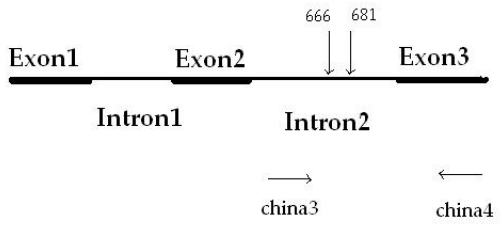
در اطراف ژن بتاگلوبین تا کنون حداقل ۱۸ RFLP متفاوت شناسایی شده است(۱۷- ۱۵). اکثر این جایگاه‌ها هم در جمعیت ایرانی از پلی مورفیسم کمی برخوردارند و هم از ژن بتاگلوبین فاصله دارند. با توجه به وجود یک نقطه گرم برای وقوع نوترکیبی (hot spot for recombination) در نزدیکی انتهای '۵ ژن بتا گلوبین(۱۹،۱۸) احتمال نوترکیبی و اشتباه در تشخیص آلل جهش یافته با بررسی پیوستگی ژنی وجود دارد(۲۰). احتمال خطا با استفاده از نشانه‌های داخل ژن بتاگلوبین درصورت چندشکلی بودن آن‌ها کم‌تر خواهد بود. اما تا کنون تنها یک جایگاه با چند شکلی قابل توجه در داخل ژن بتاگلوبین در جمعیت ایرانی گزارش

1. Amplification Refractory Mutation System
2. Reverse Dot Blot

3. Single Strand Conformation Polymorphism
4. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
5. Restriction Fragment Length Polymorphism

Archive of SID
www.SID.ir

گردیده است (جایگاه AvaII در اینترون II ژن بتاگلوبین). بررسی‌های اولیه انجام شده در جمعیت مدیترانه‌ای و آفریقایی نشان می‌دهد که یک جایگاه چند شکلی در نوکلئوتید ۶۶۶ در اینترون II ژن بتاگلوبین وجود دارد که توسط آنزیم محدود کننده SspI قابل تشخیص است (۲۱،۱۲) (شکل شماره ۱). در نتیجه درصورت چند شکلی بودن این جایگاه در جمعیت استان مازندران، می‌توان از این جایگاه برای تشخیص قبل از تولد تالاسمی با بررسی پیوستگی ژنی استفاده کرد.



شکل شماره ۱: موقعیت جایگاه SspI در اینترون II ژن بتا گلوبین و جایگاه پرایمرهای China3 و China4

آنزیم SspI توالی AAT^ATT را شناسایی می کند. در صورت وجود این توالی و برش، آن را با علامت + و در صورت فقدان آن و تبدیل توالی مخصوص SspI به توالی AAT GTT به دلیل جهش در نوکلئوتید ۶۶۶ ، آنرا باعلامت- نشان می‌دهند.

هدف از انجام این مطالعه که برای اولین بار در ایران انجام شده است، تعیین فراوانی چند شکلی جایگاه مخصوص آنزیم SspI در استان مازندران بوده است تا در صورتی‌که فراوانی این چند شکلی بالاتر از ۱۰ درصد باشد، به عنوان یک روش مناسب در بررسی پیوستگی ژنی جهت پیشگیری قبل از تولد بیماری بتا تالاسمی به کار رود. در این مطالعه خون محیطی ۲۱۱ فرد ناقل تالاسمی ساکن استان مازندران تهیه شد. برای هر نمونه خون پس از استخراج DNA ناحیه ژنی بتا گلوبین که حاوی جایگاه چندشکلی SspI می‌باشد ابتدا تکثیر شد و سپس تحت تاثیر آنزیم SspI قرار گرفت، و نتیجه اثر آنزیم پس از انجام الکتروفورز برروی ژل آگارز ارزیابی گردید.

مواد و روش ها

۱- نمونه‌های DNA : بعد از جمع‌آوری نمونه خون ۲۱۱ فرد ناقل تالاسمی که طی سه نسل متمادی در استان مازندران متولد شده‌اند، و اعضای خانواده آن‌ها در صورت وجود، DNA به روش تخریب قلیایی (Alkalin Lysis) استخراج گردید.

۲- تکثیر DNA به روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR[1]) : بخشی از اگزون ۳ و اینترون ۲ ژن بتا گلوبین توسط پرایمرهای China 3 و China 4

China 3: 5' GT GTACA CATATT GAC CAAA 3'
China 4: 5' TT GCA CGA CCA GAC ACA CGA 3'

(جایگاه پرایمرهای China 3 و China 4 در اینترون ۲ و اگزون ۳ ژن بتا گلوبین در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.) با استفاده از دستگاه حرارتی Techgene از کمپانی Techne انگلستان تکثیر شد. شرایط تکثیر DNA بدین شرح است: ۹۵ در جه سانتیگراد ۴ دقیقه، ۹۵ درجه سانتیگراد ۲ دقیقه، ۵۴ درجه سانتیگراد ۳ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دو بار سپس ۳۷ بار ۹۵ درجه سانتیگراد یک دقیقه، ۵۴ درجه سانتیگراد یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد یک دقیقه و ۳۰ ثانیه و نهایتا ۷۲ درجه سانتیگراد ۱۰ دقیقه. صحت تکثیر DNA به طول ۴۲۲ جفت باز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد کنترل گردید.

1. Polymerase Chain Reaction

Archive of SID
www.SID.ir

۳- اثر آنزیم : DNA تکثیر شده به روش PCR تحت تاثیر ۱۰ واحد آنزیم SspI در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت نتیجه اثر آنزیم بر روی ژل آگاروز ۳ درصد بررسی شد. موقعیت جایگاه SspI در اینترون II ژن بتاگلوبین در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.

در صورت برش جایگاه پلی مورفیک توسط آنزیم SspI طول قطعات مورد انتظار ۲۰۰ ، ۱۶ ، ۲۰۶ جفت باز خواهد بود و در صورت عدم برش آن جایگاه توسط آنزیم، طول قطعات حاصله ۲۱۶ و ۲۰۶ جفت باز خواهد بود .

یافته ها

۱) فراوانی چند شکلی :

۴۲۲ کرموزوم متعلق به۲۱۱ ناقل بتا تالاسمی ساکن استان مازندران بررسی شد. ۱۲۷ نفر (۲۵۴ کروموزوم درجایگاه SspI) ژنوتیپ +/+ ، ۸۱ نفر (۱۶۲ کروموزوم) ژنوتیپ -/+ و ۳ نفر (۶ کروموزوم) ژنوتیپ -/- داشتند.

جدول شماره ۱ فراوانی جایگاه‌های + و - SspI را نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که فراوانی جایگاه‌های + و - SspI به ترتیب ۷۹/۴ درصد و ۲۰/۶ درصد در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد.

۲) توزیع جایگاه‌های + و - در میان آلل‌های سالم و جهش یافته :

به دلیل در دست نداشتن نمونه خون افراد همه خانواده‌ها، تنها در ۱۶۸ نفر از ۲۱۱ فرد مطالعه شده، اختصاص جایگاه + یا - به آلل جهش یافته یا سالم با بررسی پیوستگی ژنی در خانواده امکان پذیر بود. نتایج بررسی پیوستگی ژنی بین آلل سالم یا جهش یافته در جایگاه SspI در جدول شماره ۲ مشخص گردیده، این نتایج نشان می‌دهد که ۲۰ آلل طبیعی (۱۱/۹ درصد) و ۲۴ آلل جهش یافته (۱۴/۳ درصد) دارای جایگاه SspI – هستند.

جدول شماره ۱ : فراوانی جایگاه های + و - SspI درافراد ناقل بتا تالاسمی ساکن استان مازندران

جایگاه	تعداد (درصد)
+	۳۳۵ (۷۹/۴)
-	۸۷ (۲۰/۶)
جمع	۴۲۲ (۱۰۰)

جدول شماره ۲ : توزیع جایگاه های + و - SspI در میان آلل های سالم و جهش یافته در افراد ناقل بتا تالاسمی در استان مازندران

جایگاه	آلل جهش یافته	آلل سالم
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
+	۱۴۴ (۸۶/۷)	۱۴۸ (۸۸/۱)
-	۲۴ (۱۴/۳)	۲۰ (۱۱/۹)
جمع	۱۶۸ (۱۰۰)	۱۶۸ (۱۰۰)

بحث

این مطالعه اولین گزارش از فراوانی چند شکلی جایگاه SspI در جمعیت ایرانی و به‌طور خاص در استان تالاسمی خیز مازندران است. نتایج بر روی ۴۲۲ کروموزوم (۲۱۱ کروموزوم طبیعی و ۲۱۱ کروموزوم دارای جهش در ژن بتا گلوبین) نشان می‌دهد که فراوانی چند شکلی جایگاه SspI ۲۰/۶ درصد است. توزیع جایگاه‌های + و - میان آلل‌های سالم و جهش یافته حاکی از این امر است که جایگاه منفی تقریبا به میزان مشابهی با آلل‌های سالم و جهش یافته همراه است: به ترتیب ۱۱/۹ درصد و ۱۴/۳ درصد. در تنها مطالعه‌ای که توسط براون (Braun) و همکارانش (۱۹۹۵) بر روی جمعیت‌های آفریقایی و مدیترانه‌ای انجام گرفت فراوانی چند شکلی در جایگاه SspI حدود ۱۴ درصد گزارش

Archive of SID

www.SID.ir

شده است(۲۱) اما در این مطالعه به دلیل نداشتن نمونه ژنوم سایر افراد خانواده، اختصاص جایگاه‌های SspI مثبت و SspI منفی به آلل سالم یا جهش یافته انجام نگرفت. درخصوص فراوانی این چند شکلی در جمعیت هندی یا آسیایی هیچ اطلاعی وجود ندارد. با توجه به شیوع تالاسمی در ایران و جهان و این‌که تولد یک فرزندمبتلا به‌تالاسمی ماژور سبب مشکلات جسمی و روحی برای فرد مبتلا وخانواده او می‌شود وهمچنین هزینه‌های درمانی سنگینی را برکل جامعه وارد می‌آورد، پیشگیری از تولد یک نوزاد مبتلا می‌تواند بهترین روش برای جلوگیری از بروز این‌گونه مشکلات می‌باشد(۲۲). کم هزینه‌ترین و آسان‌ترین راه پیشگیری از تولد فرد تالاسمی ماژور انصراف زوج‌های ناقل تالاسمی از ازدواج با یکدیگر است. اما باتوجه به شیوع بالای افراد تالاسمی مینور در استان مازندران (۱۰ درصد جمعیت) و کاهش انصراف از ازدواج درمیان زوج‌های ناقل به دلیل افزایش امکانات شبکه آزمایشگاهی کشوریِ تشخیص پیش از تولد تالاسمی(۲۳)، لازم است امکانات و روش‌های تشخیص جهش در زوج‌های ناقل تالاسمی و فرزندان آینده آنان افزایش یابد. از آن‌جا که طبق بررسی‌های انجام شده، تشخیص مستقیم جهش ژنی بین ۲۰-۱۰ درصد موارد در کشور امکان‌پذیر نمی‌باشد(۷،۶،۳)، باید علاوه بر روش مستقیم تشخیص جهش از روش‌های غیر مستقیم مانند بررسی پیوستگی ژنی با استفاده از چند شکلی طول قطعات محدود کننده (RFLP) نیز سود جست. لازمه استفاده از این روش، شناخت قبلی چند شکلی جایگاه‌های داخل یا نزدیک ژن مورد مطالعه و گویا بودن آن جایگاه برای خانواده درگیر بیماری است. مسلما هرچه فراوانی چند شکلی یک جایگاه در جمعیتی بیش‌تر باشد (حداکثر ۵۰ درصد)، احتمال قابل استفاده بودن آن جایگاه درمطالعه پیوستگی ژنی در یک خانواده درگیر بیماری بیش‌تر خواهد بود. پلی‌مورفیسمِ حدود۱۰ درصد یا بیش‌تر، از ارزش مناسبی جهت بررسی و ردیابی یک آلل به خصوص برخوردار است. مسأله دیگر در انتخاب چند شکلی یک جایگاه در بررسی پیوستگی ژنی برای تشخیص بیماری‌ها، محل آن جایگاه است. زیرا هر چه جایگاه مورد نظر از محل جهش، فاصله بیش‌تری داشته باشد، احتمال نوترکیبی هنگام تقسیم میوز و انتقال آن جایگاه به روی کروموزوم همتای خود و در نتیجه اشتباه در تجزیه وتحلیل داده‌ها افزایش خواهد یافت(۲۰). از آن‌جا که اکثر جایگاه‌های چند شکلی خانواده ژنی بتاگلوبین خارج از ژن بتا گلوبین واقع شده‌اند و در نتیجه احتمال نو ترکیبی وجود دارد و نیز برخی از آن‌ها از فراوانی کمی برخوردارند(۲۵،۲۴)، شناسایی و استفاده از جایگاه‌های داخل ژنی با افزایش چند شکلی در ژنوم افراد یک جمعیت خاص، ایده‌آل خواهد بود.

با توجه به این که تا کنون تنها یک جایگاه با چند شکلی قابل توجه در داخل ژن بتا گلوبین در جمعیت ایرانی مورد توجه و بررسی قرار گرفته است (جایگاه AvaII در اینترون II)، بررسی و تعیین فراوانی چند شکلی دیگر جایگاه‌های داخل ژنی مانند SspI ضروری به نظر می‌رسید. به علاوه هزینه بالای آنزیم محدود کننده AvaII در مقایسه با سایر آنزیم‌های محدود کننده معمول در بررسی پیوستگی ژنی، عملا استفاده از جایگاه AvaII

Archive of SID

www.SID.ir