خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۷ شماره ۴ زمستان ۸۹ (۲۲۰-۲۱۴)

مقاله پژوهشی

بررسی دو حذف ژنی موسوم به لپور و هندی ـ آسیایی در کلاستر ژن بتا گلوبین به صورت PCR دو گانه

فائزه رحیمی‌نژاد[۱]، راحله علی‌محمدی[۲]، پانتی فولادی[۱]، سمیرا فروغی[۱]، مرضیه فیض‌پور[۱]، رقیه وحیدی[۱]، مریم هاشمی[۱]، فائزه ملازاده[۱]، معصومه حیدری[۱]، مهدی دیلم صالحی[۳]، سیروس زینلی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

بتا تالاسمی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تک ژنی در دنیاست. اکثر موتاسیون‌های عامل بتا تالاسمی، از نوع نقطه‌ای هستند ولی در بعضی از موارد، موتاسیون‌ها سبب حذف بزرگ در کلاستر ژن بتا گلوبین می‌شوند. هدف از این مطالعه، تشخیص و بررسی دو حذف ژنی معروف به هندی ـ آسیایی و لپور به شیوه دوپلکس می‌باشد که سبب پاسخگویی سریع‌تر به مراجعین و بیماران می‌شود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. تحقیق بر روی ۳ نمونه حذف هندی ـ آسیایی و ۱۰ نمونه لپور انجام شد. در این تحقیق، بعد از اطمینان از وجود حذف لپور و هندی ـ آسیایی در نمونه‌های مورد مطالعه، سعی در تنظیم کردن Gap-PCR مربوط به شناسایی این دو حذف به صورت دوگانه(duplex) شد. PCR با استفاده از ۸ عدد آغازگر در دمای آنیلینگ ۶۸ درجه سانتی‌گراد با غلظت مورد نظر تنظیم شد و با شرایط ایجاد شده، به خوبی این دو حذف در یک واکنش قابل تشخیص بود.

یافته‌ها

با توجه به بررسی‌های انجام شده با روش Gap PCR ، نتایج ژل‌ها به صورت مولتی‌پلکس نشان داد که این دو حذف و باندهای اختصاصی مربوط به هر حذف، در یک PCR مولتی‌پلکس قابل ردیابی است.

نتیجه گیری

با توجه به اهمیت بررسی به روش مولتی‌پلکس، بررسی حذف‌های ژنی زنجیره بتا برای دو حذف لپور و هندی ـ آسیایی به صورت هم زمان، سریع، مطمئن و به راحتی قابل انجام است. این روش با توجه به صرفه‌جویی در وقت و مواد مصرفی به صرفه‌تر می‌باشد.

کلمات کلیدی: بتا تالاسمی، بتا گلوبین‌ها، حذف ژنی

تاریخ دریافت : ۸۸/۹/۲۵
تاریخ پذیرش : ۸۹/۷/۶

۱ـ کارشناس زیست‌شناسی ـ مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر
۲ـ دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی ـ دانشگاه علوم تحقیقات دانشگاه آزاد تهران
۳ـ کارشناس زیست‌شناسی سلولی و مولکولی ـ مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر
۴- مؤلف مسؤول: PhD ژنتیک انسانی ـ مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر ـ صندوق پستی: ۱۶۶۷-۱۳۱۸۵

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بتا تالاسمی، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تک ژنی در منطقه مدیترانه، شبه قاره هند، خاورمیانه و آسیای شرقی می‌باشد. بیماران مبتلا به بتا تالاسمی ماژور، می‌بایست هر ماه خون دریافت کنند. بتا تالاسمی مینور نیاز به درمان خاصی ندارد ولی تشخیص و غربالگری آن به ویژه مشاوره ژنتیک قبل از ازدواج، جهت پیشگیری از تولد کودک مبتلا بر اثر ازدواج دو ناقل بتا تالاسمی مینور، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در ایران نزدیک به ۲ میلیون ناقل بتا تالاسمی و حدود ۱۵۰۰۰ فرد مبتلا به بتا تالاسمی ماژور گزارش شده است(۱). غربالگری داوطلبین ازدواج از سال ۱۳۷۶ در کشور اجباری شده است. در برنامه کشوری مهار تالاسمی، زوج ناقل به یکی از چندین آزمایشگاه ژنتیک پزشکی در کشور جهت بررسی موتاسیون‌ها و امکان تشخیص قبل از تولد معرفی می‌شوند.

بیش از ۲۰۰ موتاسیون مختلف در مورد بتا تالاسمی گزارش شده است که در هر جمعیت، موتاسیون‌های خاصی وجود دارد. از این ۲۰۰ نوع موتاسیون، تعداد قابل ملاحظه‌ای مربوط به جهش‌های حذفی هستند. این حذف‌ها از حدود چند جفت باز تا چند کیلو باز از خوشه ژنی بتا گلوبین را پوشش می‌دهند(۲).

بیشتر این حذف‌ها منجر به حذف قسمت یا تمامی خوشه ژنی بتا و تمامی این حذف‌ها منجر به فنوتیپ تالاسمی می‌شود. اهمیت این حذف‌های ژنی کمتر از سایر جهش‌های مولکولی ژن بتا نمی‌باشد اما مطالعه‌ها و دانستنی‌ها در مورد این جهش‌ها اندک و مطالعه‌هایی که به بررسی این حذف‌ها مرتبط شود، بیش از پیش لازم است. این حذف‌ها ممکن است ژن‌های β ، δ و حتی گاما را تحت تاثیر قرار دهند و سبب کاهش($\delta\beta^{+}$) و یا فقدان($\delta\beta^{o}$) زنجیره‌های β و δ شوند.

در میان حذف‌های ژنی در بتا گلوبین، چندین حذف به علت نوترکیبی‌های جدید ایجاد می‌شود. در نوترکیبی به علت کراسینگ اور، در یک سری از ژن‌های به هم پیوسته، یک شکستی ایجاد شده و پس از به هم پیوستگی دوباره ژن‌ها، یک ترکیب جدید از ژن‌های به هم پیوسته قبلی به وجود می‌آید. در این شرایط، ژن قبلی در اکثر موارد شکسته شده و یا آن خوشه ژنی غیر فعال می‌شود.

حذف هندی ـ آسیایی(Asian – Indian) یکی از این نوع حذف‌ها است که در سال ۱۹۸۱جونز و همکارانش در یک بیمار هندی ناقل تالاسمی از نوع $A\gamma\delta\beta^{o}$)، پیدا کردند.

در این نمونه، نقص ژنی سبب دو حذف کوچک در دو طرف یک منطقه معکوس شده بین ژن‌های بتا و گاما گلوبین می‌شد. این اولین گزارش حذف و وارونه‌شدگی در انسان بود. نام این حذف ـ معکوس‌شدگی، به هندی ـ آسیایی معروف شد. در این نقص ژنی، حذف اول در ۸۳۴ جفت باز از IVS2 ژن Aγ تا اگزون 3 این ژن رخ می‌دهد. حذف دوم در حدود ۷/۴۶ کیلو باز می‌باشد که از اگزون ۳ ژن δ تا منطقه UTR ′۳ ژن بتا ادامه می‌یابد. این حذف فقط در افراد ناقل از منطقه خاورمیانه و شبه قاره هند گزارش شده است. در این افراد علاوه بر ژن‌های بتا و دلتا، ژن Aγ نیز حذف می‌شود. در نتیجه هموگلوبین جنینی این افراد، فقط زنجیره Gγ را تولید می‌کند. مقدار HbF این افراد نیز بالا می‌باشد(۳).

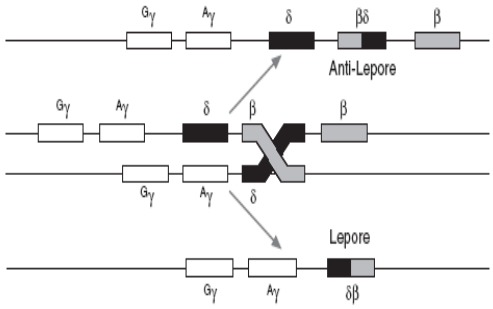
نوترکیبی دیگری نیز وجود دارد که هموگلوبین لپور(Lepore) را تولید می‌کند. هموگلوبین لپور اولین بار در سال ۱۹۵۸ به عنوان یک ساختمان هموگلوبینی که سبب فنوتیپ تالاسمی می‌شود معرفی شد(۴).

در سال ۱۹۶۱، باگلیونی و همکارانش توانستند ساختمان این زنجیره را که از ادغام بین ژن‌های دلتا و بتا ایجاد می‌شود، تشخیص دهند. علت ایجاد این حذف، نوترکیبی نامساوی هومولوگوس و طول مقدار حذف شده، در حدود ۷/۴ کیلو باز بود(۵).

حداقل تا به حال سه نوع هموگلوبین لپور شناسایی شده است(Washington Boston ، Hollandia، Baltimore). تفاوت این سه هموگلوبین به علت تفاوت در محل شکستگی، جهت ایجاد کراسینگ اور می‌باشد که سبب ایجاد ژن ادغامی می‌شود(۲).

لازم به ذکر است در الکتروفورز هموگلوبین، هموگلوبین D ، G و لپور هر سه با هم نشان داده می‌شود و به صورت افتراقی نشان داده نمی‌شود. در نتیجه برای اطمینان از وجود هموگلوبین لپور، حتماً باید از روش‌های مولکولی استفاده کرد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱: نحوه ایجاد هموگلوبین لپورو آنتی‌لپور(۶)

برای بررسی این حذف‌ها از دو روش مستقیم و غیر مستقیم استفاده می‌شود. در روش غیر مستقیم، از نتایج گویایی و یا عدم گویایی RFLP در سه منطقه Hinf1β ، Ava2β و ψβ ′۳ استفاده بیشتر می‌شود. در روش مستقیم، از روش‌های MLPA ، Real-time PCR و Gap PCR برای تشخیص حذف‌ها استفاده می‌شود. روش Gap-PCR ، روشی ساده، سریع وارزان می‌باشد. این روش برای شناسایی حذف‌های شناخته شده δβ – تالاسمی، هموگلوبین لپور و انواع موتاسیون‌های حذفی تداوم ارثی هموگلوبین جنینی(HPFH) استفاده می‌شود. این روش تنها توانایی شناسایی حذف‌هایی با دامنه مشخص را دارد ولی قادر به شناسایی افراد دارای حذف‌های ناشناخته با دامنه بزرگ و نامشخص نیست(۷).

برای تشخیص حذف‌های ناشناخته، باید از روش‌های MLPA و Real-Time استفاده کرد. با استفاده از روش MLPA ، با نزدیک ۴۰ پروب به ردیابی منطقه حذف پرداخته می‌شود، ولی حدود دقیق حذف با این روش قابل شناسایی نمی‌باشد(۹، ۸). Real-time دارای محدودیت مشابه و حتی بیشتر است یعنی با این روش، محدوده حذف باید مشخص شده باشد. بعد از مشخص شدن محل حذف، می‌توان برای آن آغازگرهای اختصاصی طراحی کرد. هدف این مطالعه، تشخیص و بررسی دو حذف ژنی معروف به هندی ـ آسیایی و لپور به شیوه دوپلکس بود. این دو حذف از حذف‌های شناخته شده می‌باشد و نیازی به بررسی با دو روش Real-Time و MLPA ندارد و با بررسی دوپلکس این دو حذف، بررسی با سرعت عمل بیشتر و هزینه کمتر قابل انجام است.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام گرفته از نوع تجربی ـ کاربردی بود. در این تحقیق، نمونه‌ها با توجه به اندکس‌های خونی و نتایج آزمایش‌های هماتولوژی از میان افراد مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی کوثر، برای بررسی‌های مولکولی مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌ها از میان افرادی که نتیجه اندکس‌های خونی غیر طبیعی داشتند،(مقدار MCV < 80fl ، MCH<27 pg ، هموگلوبین A2 نرمال و HbF افزایش یافته و یا نرمال) انتخاب شدند. در این مطالعه، از اشخاصی که دارای حذف قطعی بودند به عنوان کنترل مثبت و تعدادی از افراد سالم تحت عنوان کنترل منفی استفاده گردید. DNA مورد نیاز از گلبول‌های سفید خون محیطی استخراج شد. سپس با استفاده از روش ARMS ، به بررسی حذف‌های نقطه‌ای شایع در ایران پرداخته شد. نمونه‌هایی که حذف نقطه‌ای نداشتند، با روش GAP-PCR برای وجود یا عدم وجود حذف، مورد بررسی قرار گرفتند.

تعداد نمونه‌های دارای حذف ۷۵ نفر بود که ۳ نفر دارای حذف هندی ـ آسیایی و ۱۰ نفر دارای حذف لپور بودند. ادامه کار در نمونه‌های دارای حذف‌های لپور و هندی ــ آسیایی پیگیری شد. سپس برای تنظیم PCR دوپلکس، نمونه‌ها با آغازگرهای مخصوص تشخیص این دو حذف با توجه به مقاله کریج مورد بررسی قرار گرفتند(۱۰)(جدول ۱).

جدول ۱: توالی آغازگرهای استفاده شده در PCR ، آغازگرهای H مربوط به بررسی حذف هندی ـ آسیایی و آغازگرهای E مربوط به بررسی حذف لپور می‌باشد.

	توالی آغازگرهای بررسی حذف
H1	ATGCCATAAAGCACCTGGATG
H2	GAGCTGAAGAAAATCATGTGTGA
H3	TAACCATATGCATGTATTGCC
H4	CAATGTATCATGCCTCTTTGCAC
H5	GCAGCCTCACCTTCTTTCATGG
E1	GACACACATGACAGAACAGCCAAT
E2	CGATCTTCAATATGCTTACCAAG
E3	CATTCGTCTGTTTCCCATTCTA

در بررسی حذف لپور، از آغازگرهای E3 و E1 به عنوان آغازگرهایی که باند موتان را با طول ۷۷۷ جفت باز نشان می‌داد و از آغازگرهای E3 و E2 به عنوان

Archive of SID
www.SID.ir

آغازگرهایی که باند نرمال را به طول ۹۱۵ جفت باز تکثیر می‌کرد، استفاده شد. در بررسی حذف هندی ـ آسیایی نیز H5 و H4 باندی به طول ۶۶۵ جفت باز و H2 و H1 باندی به طول ۱۱۹۵ جفت باز رادر فرد طبیعی ایجاد می‌کنند. آغازگرهای H3 و H1 ، قطعه موتان با طول ۳۲۷ و آغازگرهای H5 و H2 ، قطعه موتان به طول ۳۷۱ جفت باز ایجاد می‌نمایند. در بررسی حذف‌های لپور و هندی ـ آسیایی چه به صورت جداگانه و چه به صورت دوپلکس، PCR با شرایط زیر انجام شد: ۳ دقیقه دناچوراسیون در دمای ۹۳ºC ، ۱ دقیقه دناچوراسیون در دمای ۹۳ºC ، ۱ دقیقه آنیلینگ در دمای ۶۸ ºC ، ۱ دقیقه اکستنشن در دمای ۷۲ºC و ۲ دقیقه اکستنشن اضافی در دمای ۷۲ºC.

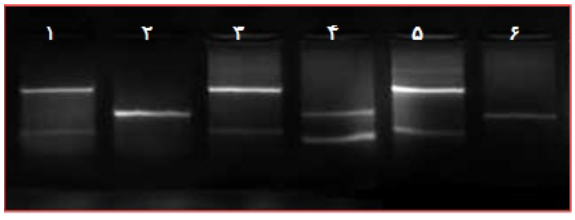
یافته‌ها

از کل مراجعین به آزمایشگاه که ناقل تالاسمی بودند، ۳ نفر ناقل حذف از نوع هندی ـ آسیایی و ۱۰ نفر ناقل حذف لپور بودند. این حذف‌ها بعداً توسط همکاران با روش MLPA تایید شد.

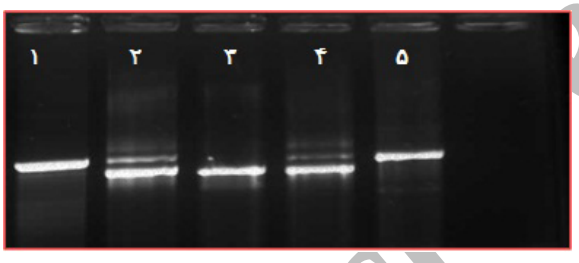
نمونه DNA این افراد ابتدا به صورت جداگانه برای هر حذف مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا به این صورت که برای هر نمونه دو تیوب در نظر گرفته شد، آغازگرهای مربوط به تکثیر قطعه موتان در تیوب اول و آغازگرهای مربوط به تکثیر قطعه نرمال در تیوب دوم ریخته شد. در صورتی که فرد نرمال باشد فقط قطعه مربوط به تکثیر قطعه نرمال، در ژل قابل رؤیت می‌باشد(چاهک ۱ و ۲ از شکل ۲). در تیوب‌های ۳ و۴ به علت هتروزیگوت بودن در چاهک ۳ ، قطعه موتان تکثیر شد(با طول ۷۷۷جفت باز) که با اختلاف کمی پایین‌تر از قطعه نرمال(چاهک ۴ با طول ۹۱۵ جفت باز) قرار گرفت. این بررسی دو تیوبی، برای حذف هندی ـ آسیایی نیز صورت گرفت که در فرد هتروزیگوت باند موتان قابل تشخیص است(شکل ۳).

پس از بررسی دو تیوبی، به بررسی تک تیوبی نیز پرداخته شد. به این نحو که آغازگرهای نرمال و موتان مربوط به حذف‌های لپور و هندی ـ آسیایی(هر کدام جداگانه) یک جا به نمونه اضافه شد(شکل‌های ۴ و ۵).

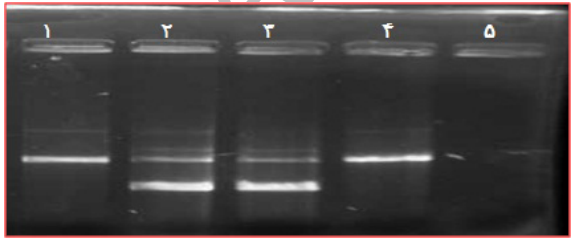
شکل ۲: در چاهک ۱ و ۲ کنترل نرمال، چاهک ۳ و ۴ فرد هتروزیگوت لپور و ۵ و ۶ و ۷ و ۸ نمونه فرد هتروزیگوت می‌باشد.



شکل ۳: چاهک شماره ۱ و ۲ نمونه فرد نرمال، ۳ و ۴ نمونه فرد هتروزیگوت هندی ـ آسیایی و نمونه ۵ و ۶ نمونه نرمال می‌باشد.



شکل ۴: فرد ناقل لپور، از سمت چپ نمونه ۱ فرد نرمال، فرد شماره ۲ هتروزیگوت، فرد شماره ۳ هموزیگوت، فرد شماره ۴ هتروزیگوت لپور و شماره ۵ نیز فرد نرمال می‌باشد.

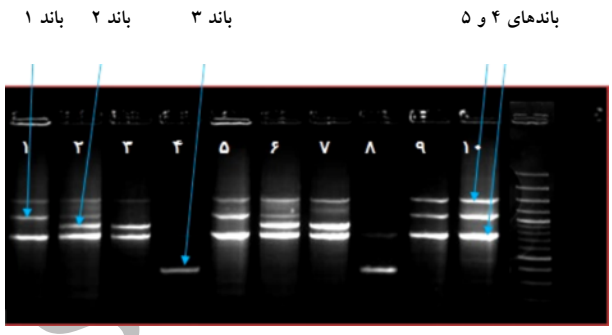


شکل ۵: بررسی حذف هندی ـ آسیایی، چاهک شماره ۱ نرمال، شماره ۲ هتروزیگوت، شماره ۳ نیز هتروزیگوت و چاهک شماره ۴ نمونه فرد نرمال است.

در مرحله آخر به بررسی حذف‌ها به صورت دوپلکس پرداخته شد. به این معنا که آغازگرهای موتان و نرمال

Archive of SID
www.SID.ir

مربوط به هر دو حذف یک جا و در یک تیوب ریخته شد(شکل ۶). در واقع آن چه در این شکل دیده می‌شود، هدف تحقیق می‌باشد که به طور واضح، باندهای مربوط به هر حذف قابل ردیابی است.



شکل ۶: چاهک شماره ۱ نرمال، شماره ۲ هترو لپور، شماره ۳ همولپور، شماره ۴ هندی ـ آسیایی، شماره ۵ نمونه نرمال، شماره ۶ هترولپور،۷ همولپور، شماره ۸ هندی ـ آسیایی و شماره‌های ۹ و ۱۰ نرمال هستند. باند ۱ باند نرمال، باند ۲ باند مربوط به لپور، باند ۳ باند مربوط به حذف هندی ـ آسیایی و باندهای ۴ و ۵ باندهای غیر اختصاصی هستند. چاهک آخر نیز سایز مارکر ۱۰۰ می‌باشد.

بحث

حذف‌های ژن آلفا – گلوبین روی کروموزوم p ۱۳/۳ ۱۶ ، در ۸۰ تا ۹۰ درصد موارد، علت اصلی مولکولی آلفا تالاسمی می‌باشد. اما نوترکیبی‌ها در خوشه ژنی بتا گلوبین روی کروموزوم p ۱۵/۴ ۱۱ ، علت فقط ۱۰ درصد از بتا تالاسمی‌ها است. در دنیا بیش از ۵۰ حذف مربوط به آلفا تالاسمی و ۶۰ حذف مربوط به بتا تالاسمی شناخته شده است. در واقع شیوع حذف‌ها در آلفا تالاسمی خیلی بیشتر از بتا تالاسمی است(۱۱). با توجه به این شیوع کم حذف‌ها در بتا تالاسمی، هیچ گزارشی از بررسی به صورت مولتی و یا دوپلکس از این حذف‌ها داده نشده است. اما باید به این نکته توجه کرد که بعد از بررسی موتاسیون‌های نقطه‌ای که علت اصلی بتا تالاسمی می‌باشد، به بررسی حذف‌ها در این ژن می‌پردازند و اگر بتوان تمام حذف‌های شایع در ایران را با هم بررسی کرد، مسلماً دستاورد علمی مهمی است که تمام آزمایشگاه‌های تشخیص طبی می‌توانند برای صرفه‌جویی در وقت و هزینه از آن استفاده کنند. با توجه به این که بررسی چندین حذف آلفا در حال حاضر به سهولت انجام می‌شود، این کار گشایشی در شروع راه‌اندازی بررسی حذف‌های بتا به صورت مولتی است. لازم به ذکر است با توجه به روش‌های مختلف برای تشخیص حذف‌ها از جمله MLPA ، Real Time و Gap-PCR ، مسلماً تشخیص با روش Gap-PCR ارزان‌تر و سریع‌تر می‌باشد. پس بهینه‌سازی این روش در تشخیص حذف‌ها مهم به نظر می‌رسد. باید در نظر گرفت که با روش MLPA ، تعداد کثیری از حذف‌ها قابل ردیابی است ولی با روش Real-Time ، فقط حذفی که در محدوده آغازگر است قابل شناسایی می‌باشد. روش MLPA که دارای حداقل ۴۰ پروب برای بررسی کلاستر ژن بتا است، به بررسی حذف‌ها در یک محدوده می‌پردازد و ارزش و کارایی بالایی دارد. ولی باید این مساله را در نظر گرفت که روش MLPA ، صرفاً به بررسی حذف‌ها بدون دادن اطلاعات از نوع حذف می‌پردازد. حسن استفاده ازروش GAP-PCR در بررسی حذف‌ها چه به صورت جداگانه و چه به صورت مولتی پلکس این است که با توجه به شناخت حذف‌های شایع در منطقه ایران، می‌توان با هزینه خیلی کمتر از هزینه روش MLPA ، به بررسی این حذف‌ها پرداخت. البته لازم به ذکر است که حذف هندی ـ آسیایی، شیوع زیادی در ایران ندارد ولی دو حذف لپور و Sicilian ، از حذف‌های نسبتاً شایع‌تر در ایران هستند. در ضمن در بررسی انجام شده، هیچ گزارشی از روش بررسی دو حذف هندی ـ آسیایی و لپور به طور هم زمان تا به حال داده نشده است.

نتیجه‌گیری

در بررسی به صورت مولتی‌پلکس به علت این که باید از چندین جفت آغازگر استفاده شود، مشکلات خاصی وجود دارد. هماهنگ کردن دمای آنیلینگ و سایر دماهای PCR ، کار دشواری است چون طراحی آغازگرهای زیادی که بتواند در تمام این دماها هماهنگی داشته باشد و یا این که آغازگرها خود با هم دایمر ندهند، کار وقت‌گیر و به نسبت پیچیده‌ای است.

در این بررسی از ۸ عدد آغازگر استفاده شده و آغازگرها از ابتدا طبق مقاله کریج، برای بررسی حذف به

Archive of SID

www.SID.ir

صورت جداگانه طراحی شدند، ولی برای بررسی بـه روش مولتی، از همان آغازگرها استفاده شد و بعد از بررسی‌هـای زیاد PCR به صورت مولتی پلکس، توانستیم دمای مناسـب و مقدار آغازگرهای لازم را برای بررسـی ایـن دو حـذف، پیدا کنیم.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسـیله از مـساعدت و همکـاری کلیـه بیمـاران و خـانواده‌هـای آن‌هـا و نیـز هـم یـاری تمـام همکـاران در آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتـر زینلـی، تـشکر و قـدردانی می‌گردد.

References :

1- Abolghasemi H, Amid A, Zeinali S, Radfar MH, Eshghi P, Rahiminejad MS, *et al*. Thalassemia in Iran: Epidomology, Prevention, and management. J Pediatr Hematol Oncol 2007; 29(4): 233-8.
2- Weatherall DJ, Clegg JB. Weatherall DJ. The thalassaemia syndromes. 4th ed. Oxford: Wiley-blackwell; 2001. p. 151.
3- Jones RW, Old JM, Trent RJ, Clegg JB, Weatherall DJ. Major rearrangement in the human-globin gene cluster. Nature 1981; 291: 39-44.
4- Gerald PS, Diamond LK. The diagnosis of thalassemia trait by starch block electrophoresis of the hemoglobin. Blood 1958; 13(1): 61-9.
5- Baglioni C. The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. Proc Natl Acad Sci U S A 1962; 48: 1880-6.
6- Trent RJ. Diagnosis of the haemoglobinopathies. Clin Biochem Rev 2006; 27(1): 27-38.
7- Babashah S, Jamali S, Mahdian R, Hayat Nosaeid M, Karimipoor M, Maryami F, *et al*. Accurate detection of unknown deletions in Beta-Globin gene cluster in beta thalassemia carriers using Real-time PCR and MLPA. Sci J Iran Blood Tranfus Org 2009; 5(4): 247- 55. [Article in Farsi]
8- Alimohammadi R, Raeisi M, Ebrahimi A, Fallah S, Kianfar S, Massudifar M, *et al*. Comparison of MLPA method for detection of known and unknown deletions in Beta globin gene cluster with old methods (Real-Time, RFLP, Gap-PCR). Qom Medical University Journal 2009; 4(8): 5-10. [Article in Farsi]
9- Craig JE, Barnetson RA, Prior J, Raven JL, Thein SL. Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. Blood 1994; 83(6): 1673-82.
10- Harteveld CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, den Dunnen JT, White SJ, *et al*. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha and beta - thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation - dependent probe amplification. J Med Genet 2005; 42 (12): 922-31.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

Detection of the Lepore and Asian-Indian beta-globin gene deletions with duplex-PCR

Rahimi Nezhad F.[1], Ali Mohammadi R.[2], Fuladi P.[1], Foroughi S.[1], Feiz Pour M.[1], Vahidi R.[1], Hashemi M.[1], Mola Zadeh F.[1], Heidari M.[1], Deilam Salehi M.[1], Zeinali S.[1]

[1]*Kowsar Human Genetics Research Center, Tehran, Iran*
[2]*Science and Research Center of Islamic Azad University, Tehran, Iran*

Archive of SID

Abstract

Background and Objectives

Beta-thalassemia is one of the most common single-mutation diseases. These mutations cause decreased beta-globin protein synthesis or even deletion. Most of the mutations in beta-globin gene are point mutations but there are some small and big deletions in beta-globin gene cluster. The goal of this research is to detect and study two deletions (Lepore, Asian-Indian) with duplex-PCR.

Materials and Methods

This study was done on 3 Asian-Indian deletion samples and 10 Lepore samples. After detecting two deletions (Lepore and Asian-Indian), we started setting Gap-PCR in these two known deletions. Duplex-PCR with 8 different primers for detecting Lepore and Asian-Indian deletions simultaneously was set at 68ºC annealing temperature; these two deletions can be detected easily in one reaction with this new method.

Results

The results show that detecting Lepore and Asian-Indian deletions with multiplex PCR is practical, and the specific bands for each deletion are detectable.

Conclusions

Detecting these two deletions in one reaction (Duplex-PCR) is practical. This method is easy, reliable, and fast; it is also economical and saves both time and money.

Key words: Beta-thalassemia, Beta-globins, Gene deletion
Sci J Iran Blood Transfus Org 2011; 7(4): 214-220

Received: 16 Dec 2009
Accepted: 28 Sep 2010

Correspondence: Zeinali S., PhD of Human Genetics. Kowsar Human Genetics Research Center. P.O.Box: 13185-1667, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 66506801; Fax : (+9821) 88939141
E-mail: *zeinali@kawsar.ir*

www.SID.ir