

تعیین میزان ژن‌های ناحیه اساسی کروموزوم ۲۱ در نمونه‌های جنینی

Quantitative Real -Time PCR با استفاده از روش CVS

المیرا شمسیان^۱، مهرداد هاشمی^۲، احمد رضا کامیاب^۳، مینا حیات نوسعید^۴،

میترا بهروز اقدم^۵، اعظم امیریان^۶، رضا مهدیان^{*}

۱، ۲، ۳ و ۵- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، کارشناس ارشد و دانشجوی کارشناسی ارشد
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه تخصصی زیست شناسی

۲- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

۴، ۶ و ۷- به ترتیب کارشناسان ارشد و استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انتستیتو پاستور
ایران، بخش پزشکی مولکولی، تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rezamahdian@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۹)

چکیده

هدف: بکار گیری روشی نوین بر پایه تکنیک Real-Time PCR کمی جهت تشخیص سریع پیش از تولد سندروم تریزو می ۲۱ (سندروم داون) در نمونه‌های CVS زنان باردار پرخطر بررسی شد. مواد و روش‌ها: از زنان بارداری که دیسک بالای ابتلای جنین به تریزو می ۲۱ را در غربالگری اولیه داشتند، نمونه پرز کوریونی گرفته شد. از نمونه خون افراد مبتلا به سندروم داون به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت تجاری، میزان ژن-های DSCAM و DYRK1A2 به صورت کمی سنجیده شد. نسبت تعداد کپی ژن‌های هدف به مرجع از طریق روش مقایسه‌ای سیکل آستانه ($\Delta\Delta Ct$) محاسبه گردید. یافته‌ها: نتایج حاصل از آنالیز نسبت ژن-های هدف به مرجع در افراد مبتلا به سندروم داون 0.9 ± 0.056 و در نمونه‌های جنینی نرمال 0.11 ± 0.02 بود که نشان دهنده حضور سه کپی از ژن‌های هدف در موارد تریزو می ۲۱ است. بحث و نتیجه‌گیری: تشخیص پیش از تولد با روش Real-Time PCR بر روی نمونه‌های پرز کوریونی امکان‌پذیر است. در حال حاضر روش‌های سیتوژنتیک برای تشخیص سندروم تریزو می ۲۱ به کار می‌روند. این روش‌ها عموماً زمان بر و پرهزینه بوده و نیاز به کشت سلول‌های زنده دارند. تکنیک مولکولی Real-Time PCR محدودیت‌های ذکر شده را نداشته، لذا می‌توان این تکنیک را به عنوان روشی دقیق با حساسیت بالا در تشخیص سریع پیش از تولد سندروم داون پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی

سندروم تریزو می ۲۱ ،
Real-Time PCR
میزان ژنی

مقدمه

Real-Time PCR ترکیبی از PCR معمولی و یک دستگاه فلوروفوتومتر است که قابلیت آنالیز همزمان چندین نمونه و مشاهده هر مرحله از تکثیر را فراهم می‌کند. در این سیستم از رنگ‌های فلورسنت نظیر رنگ ایترکاله I SYBR Green و یا پرروب‌های نشاندار (مانند پرروب‌های [®]TaqMan) استفاده می‌شود. در این سیستم میزان وجود ژن هدف بر اساس شدت فلورسانس مربوطه در مرحله خاصی از واکنش تعیین می‌گردد. در مطالعه حاضر، که در ادامه مطالعات انجام شده بر روی نمونه‌های خون بیماران و مایع آمنیوتیک زنان باردار در انسیتو پاستور ایران صورت گرفته است، کاربرد روش فوق برای تشخیص سریعتر سندرم تریزومی ۲۱ بر روی نمونه‌های پرز کوریونی (CVS) بررسی شده است.

گردآوری نمونه

نمونه‌های پرزهای کوریونی Chorionic Villus Samples (CVS) از ۲۰ زن باردار ۳۰ ساله و بالاتر شهر تهران، که از نظر ابتلا به سندرم تریزومی ۲۱ پر خطر بودند، بین هفتة ۱۰-۱۲ بارداری در آزمایشگاه خصوصی ژنتیک نوین و کوثر گرفته شد. قبل از گرفتن نمونه فرم رضایت‌نامه توسط مادران باردار تکمیل گردید. همچنین از ۷ نمونه خون بیماران مبتلا به سندرم داون به عنوان کنترل مثبت و ۷ نمونه افراد نرمال استفاده شد (جدول ۱). این مطالعه در سال ۱۳۸۸ در راستای طرح پژوهشی شماره ۴۱۷، پس از اخذ مصوبه کمیته اخلاقی انسیتو پاستور ایران، در بخش پژوهشکی مولکولی انجام شد.

جدول ۱- تعداد، دامنه سنی، هفتة نمونه‌گیری در افراد مورد مطالعه

تعداد کل	هفتة نمونه گیری	دامنه سنی	نمونه
۲۰	۹-۱۲	۲۶-۴۶	CVS
۷	_____	۲-۲۱	سندرم داون
۷	۹-۱۲	۲۶-۴۶	نرمال کنترل

سندرم داون (تریزومی ۲۱) یکی از شایع‌ترین و شناخته شده‌ترین اختلالات کروموزومی است که به تنها یک علت عمده عقب ماندگی ذهنی در بین کودکان است. وجود یک نسخه اضافی از کروموزوم شماره ۲۱ انسانی موجب تغییرات پاتولوژیک ناشی از بیان غیرطبیعی ژن‌های مستقر بر روی این کروموزوم می‌شود (۹). در افراد مبتلا به سندرم تریزومی ۲۱ علائم کلینیکی عمدتاً به صورت ویژگی‌های ظاهری، عقب ماندگی ذهنی و نقایص قلبی بروز می‌نماید. میزان شیوع این بیماری یک در ۱۰۰۰-۷۰۰ تولد زنده بوده و با افزایش سن مادر (مخصوصاً در مادران ۳۵ سال یا مسن‌تر)، این میزان به مراتب بیشتر می‌شود (۱۱). بنابراین به علت شیوع بالای این بیماری، تشخیص سریع و پیش از تولد آن ضروری به نظر می‌رسد (۱۱). روش استاندارد برای تشخیص پیش از تولد سندرم داون روش سیتوژنتیک (کاریوتیپ-G-Banding) در مرحله متافاز تقسیم سلولی است. با این حال این تکنیک دارای محدودیت‌هایی از جمله احتمال آسودگی محیط کشت و حتی گاهی اوقات رشد انتخابی سلول‌های مادری می‌باشد. برای تشخیص ۲ هفتة وقت مورد نیاز است که باعث می‌شود زمان زیادی برای زنان باردار پرخطر از دست برود. از روش‌های سریعتر تشخیصی می‌توان تکنیک هیبریداسیون Fluorescent In Situ Hybridization(FISH) را فلورسانس درجا نام برد. اگرچه این روش سریع و معتر است، ولی نیاز به سلول زنده دارد (۱۶، ۱۸). روش‌های مولکولی از جمله Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (QF-PCR) مبنای تکثیر نشانگرهای تکراری مولکولی (STRs) طراحی شده، باید برای یک جمعیت هدف متناسب با الگوی STR آن جمعیت طراحی شود (۸، ۱۵، ۱۶) و از سوی دیگر نیاز به سیستم الکتروفورز موئین دستگاه توالیگر (Sequencer) دارد. لذا معرفی روشی مولکولی که در زمان کوتاه و با دقت زیاد امکان تشخیص تریزومی ۲۱، به ویژه در بارداری‌های پر خطر را فراهم کند، ضروری به نظر می‌رسد. در حال حاضر تکنیک Real-Time PCR روش مولکولی جدیدی است که می‌تواند به عنوان یک روش سریع و دقیق در تشخیص سندرم داون بکار گرفته شود.

مواد و روش‌ها

میکرولیتر از Master Mix SYBR Green I (Applied Biosystems) Forward, Reverse, ۲ میکرولیتر از آغازگرهای اختصاصی هر ژن، ۵ میکرولیتر DNA ژنومی (۲۰ نانوگرم) و ۰/۵ میکرولیتر آب مقطر بود. برنامه زمانی - دمایی آن شامل سه مرحله می‌باشد، که مرحله اول درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و بعد ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه که سیکل متوالی تکرار گردید و مرحله سوم جهت ترسیم منحنی ذوب به صورت ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، سپس ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه و ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه است. در این مطالعه از رنگ فلورسانس ویژه متصل شونده به DNA به نام SYBR Green I استفاده شد، که تنها پس از اتصال به DNA دو رشته‌ای سیگنال فلورسانس قوی منتشر می‌کند. این رنگ فلورسنست طی واکنش، متناسب با میزان محصولات تولید شده از هر سیکل نور فلورسنست ساطع کرده و میزان نشر فلورسانس آن توسط نمایانگر دستگاه شناسایی و ثبت می‌شود (۱۲).

الکتروفورز با ژل آگارز (Agarose gel electrophoresis) جهت تأیید تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیراختصاصی و جفت شدن آغازگرهای (پرایمر دایمیر) از ژل آگارز یک درصد استفاده شد. یک گرم پودر آگارز را در ۱۰۰ میلی لیتر بافر Tris-Borate-EDTA ۰.۵X حل کرده و با رنگ اتیدیوم بروماید مخلوط گردید، سپس محصولات تکثیری هر ژن در واکنش Real-Time PCR در ژل آگارز بارگذاری و الکتروفورز انجام شد.

استخراج DNA

DNA Isolation Kit For DNA طبق پروتکل کیت Cells And Tissues (Roche, Germany) انجام شد. میزان خلوص و غلظت DNA با دستگاه نانوفوتومتر (IMPLEN, Germany) سنجیده شد. اسیدهای نوکلئیک در طول موج ۲۶۰ نانومتر و پروتئین‌ها در ۲۸۰ نانومتر بیشترین جذب نوری را دارند. نمونه‌های با نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر بین ۱/۶ تا ۱/۸ جهت سنجش Real-Time PCR انتخاب شده و نمونه‌های با نسبت جذب نوری کمتر از ۱/۶ از مطالعه حذف شدند.

طراحی آغازگر

در این مطالعه ژن‌های DSCAM, DYRK1A2 به عنوان ژن‌های هدف واقع بر ناحیه اساسی سندروم داون کروموزوم ۲۱ (Down Syndrome Critical Region, DSCR 21q22.2) و ژن PMP22 واقع بر روی کروموزوم ۱۷ (17p11.2) به عنوان ژن مرجع انتخاب شدند. پس از اخذ متوالی ژن‌های هدف و مرجع از سایت اینترنتی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> و با استفاده از نرم افزارهای Primer Express (Applied Biosystems) و Gene runner مشخصات آغازگرهای مناسب طراحی شدند. متوالی و مشخصات آغازگرهای در جدول ۲ آورده شده است.

Real-Time PCR

در این آزمایش از دستگاه ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA) استفاده شد. واکنش‌های Real-Time PCR به صورت سه تایی (Triuplicate) در پلیت‌های ۹۶ چاهکی در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد که مخلوط واکنش شامل ۱۲/۵

جدول ۲- متوالی آغازگرهای طراحی شده برای ژن‌های هدف و مرجع

نام ژن	نوع الیگو	ترتیب متوالی	دمای ذوب	درصد GC	طول قطعه تکثیری (bp)
<i>DSCAM</i>	Fw	5'CCGGGCAGTCTAATTCCAGAAC3'	۶۰/۸	۵۵	۱۰۰
	Rv	5'AGTATGTGCACTCAGAAACCAGCTG3'	۶۰/۷	۴۸	۱۰۶
<i>DYRK1A</i>	Fw	5'AATGGTGTGCACAGGATGTGAAC3'	۶۰/۷	۴۸	
	Rv	5'ATTCCGGTGAAACAAGTCATGAAG3'	۶۰/۲	۴۲	
<i>PMP22</i>	Fw	5'GGAGGGAGAGAAGGCTGAATGC3'	۶۰/۳	۵۵	۱۰۳
	Rv	5'GTTCCACATGCACACAGAAACG3'	۶۰/۰	۵۰	

نمونه‌ها از روش Student's T-test (۱۷) با استفاده از برنامه Real-Excel شرکت مایکروسافت و نرمافزار تخصصی دستگاه Real-Time PCR مدل ABI7300 استفاده شد.

ژن مرجع $Ct = Ct_{\text{ژن هدف}} - Ct_{\text{ژن آزمایش}}$ (نمونه‌های مورد آزمایش) – $\Delta Ct = Ct_{\text{ژن هدف}} - Ct_{\text{ژن نرمال}}$ نسبت ژنی $= 2^{-\Delta Ct}$ که برابر است با نسبت تعداد کبی‌های ژن هدف به ژن مرجع *DYRK1A2 / PMP22* و *DSCAM / PMP22* که انتظار می‌رود در افراد بیمار ۱/۵ برابر افراد نرمال باشد.

یافته‌ها

غلظت مناسب برای آغازگرها ۱۰ پیکومول در میکرولیتر و برای DNA ۱۲/۵-۵۰ نانوگرم در میکرولیتر به دست آمد. در این مطالعه، از DNA الگو با غلظت ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر استفاده شد. با ترسیم منحنی استاندارد بر اساس لگاریتم غلظت DNA و تعداد سیکل‌های واکنش PCR و تعیین شیب آن برای هر ژن *DSCAM* (شکل ۱ و ۲ و ۳)، درصد کارایی و راندمان تکثیری ژن *DYRK1A2* و *PMP22* به ترتیب ۱۰۰ و ۱۰۰ و ۹۹/۲ به دست آمد که بیانگر درستی روش مقایسه‌ای سیکل آستانه در سنجش نسبی داده‌های کمی Real-Time PCR است. برای هر واکنش تکثیری منحنی ذوب یا منحنی تفکیک (Dissociation curve) ترسیم شد. نتایج به دست آمده از آنالیز منحنی ذوب در این مطالعه نشان می‌دهد که تکثیر اختصاصی محصول هر ژن و عدم وجود محصولات غیر اختصاصی نظیر آغازگر دائمی و یا قطعات غیراختصاصی می‌باشد (شکل ۴). علاوه بر این، محصولات PCR هر ژن در ژل الکتروفورز بارگذاری شد که تصویر ژل الکتروفورز باندهای مربوط به تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر را تأیید نمود (شکل ۵).

میانگین نسبت تعداد کپی ژن‌های هدف به ژن مرجع *DYRK1A2/PMP22* و *DSCAM/PMP22* در نمونه‌های نرمال $1/56 \pm 0/09$ و در افراد مبتلا به سندروم داون $1/02 \pm 0/11$ و در افراد مبتلا به سندروم داون $0/09 < 0/001$ (p value) به دست آمد که امکان افتراق بیماران مبتلا به سندروم داون را از نمونه‌های سالم فراهم می‌کند. مقایسه منحنی-

بهینه‌سازی واکنش Real-Time PCR

ابتدا جهت تعیین غلظت مناسب و عملکرد آغازگرها، از آن‌ها رقت‌های متوالی به صورت ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۳ پیکومول در میکرولیتر تهیه و واکنش Real-Time PCR انجام گردید. همچنین برای تعیین غلظت مناسب واکنش PCR از رقت‌های متوالی استاندارد جهت ترسیم منحنی استاندارد استفاده شد که رقت‌ها شامل ۳/۱۳، ۶/۲۵، ۱۱، ۲۵ و ۵۰ نانوگرم می‌باشد. واکنش رقت‌های متوالی برای آغازگرها و DNA استاندارد به صورت سه-تایی به همراه یک واکنش بدون حضور الگو (-Non-Template Control) برای هر ژن در پلیت ۹۶ چاهکی انجام شد. شب منحنی استاندارد توسط بسته نرم افزاری Sequence Detection System دستگاه ABI 7300 تعیین گردید و میزان کارایی واکنش PCR بر مبنای فرمول زیر محاسبه شد. شب منحنی استاندارد قابل قبول باشیستی بین ۳/۶-۳/۱ و باشد.

$$\% \text{ PCR efficiency} = [10^{(-1/\text{SLPOE})} - 1] \times 100$$

در این مطالعه درصد کارایی PCR ژن *DSCAM* و *DYRK1A2* به ترتیب ۱۰۰ و ۱۰۰ و ۹۹/۲ درصد به دست آمد.

آنالیز نتایج

در تکنیک PCR برای هر واکنش یک منحنی تکثیر (Amplification plot) ترسیم می‌شود. پس از پایان هر واکنش، دستگاه بر اساس میانگین میزان شدت نور فلورسنت دریافتی خط آستانه (Threshold line) را رسم می‌کند. محل برخورد منحنی تکثیری و خط آستانه را سیکل آستانه (Cycle of Threshold) گویند. سیکل آستانه (Ct) همواره در محدوده تکثیر لگاریتمی PCR قرار می‌گیرد. بدیهی است Ct به طور معکوس با مقدار اولیه DNA ژنومی متناسب است. در این مطالعه میزان Ct بدست آمده از افراد مبتلا به داون و نمونه جنبی نرمال بر اساس روش مقایسه سیکل آستانه مورد آنالیز قرار گرفت. ابتدا میزان تفاوت Ct ژن هدف و Ct ژن مرجع در فرد نرمال تعیین شد (ΔCt) و در ادامه $\Delta\Delta Ct$ که اختلاف بین ΔCt نمونه‌های طبیعی و نمونه‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهد، محاسبه گردید. در ادامه جهت بررسی معنی دار بودن اختلاف‌های بین نتایج حاصل از

بافت پرزهای کوریونی CVS از دو رده سلولی مجرزا به نامهای اکتودرم کوریونی (تروفوبلاست) و مزودرم اکتودرمی (هسته مزانشیمی) تشکیل شده است (۱۳، ۱۴). گاهی اوقات در مطالعه سیتوژنتیک CVS، ناهنجاری خود را به صورت موزاییک نشان می‌دهد. در این صورت، می‌توان برای تایید تشخیص از آمنیوستز استفاده کرد (۱). اگر چه تنها حدود ۱-۲ درصد نمونه-های CVS موزاییک می‌باشند و احتمال خطأ در تشخیص تریزومی بعلت موزاییسم نمونه بسیار اندک است (۳).

روش‌های مولکولی سریع‌تر از کاریوتیپ انجام می‌گیرند، لذا از این روش‌ها بطور گسترده‌ای برای تشخیص ناهنجاری‌های کروموزومی جنسی و اتوزومی رایج استفاده می‌شود. تکنیک FISH را می‌توان هم بر روی سلول‌های کشت داده شده مایع آمنیوستیک و هم سلول‌های پرز کوریونی مورد استفاده قرار داد. اما تکنیک‌های مبتنی بر PCR را می‌توان بر روی DNA استخراج شده از مایع آمنیوستیک کشت نشده و نمونه‌های CVS استفاده نمود (۲). در مطالعات انجام شده از سال ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۴ با روش FISH گاهی اوقات نتایج منفی کاذب گزارش شده است. در حالی که نتایج به دست آمده با QF-PCR فاقد موارد مثبت یا منفی کاذب بوده است. اگر چه با استفاده از روش‌های مولکولی معمولاً در عرض ۴۸-۴۸ ساعت جواب نهایی بدست می‌آید، این تکنیک‌ها محدودیت‌هایی هم دارند. مثلاً، این روش‌ها تنها حدود ۷۵٪ از کل ناهنجاری‌های کروموزومی را که با کاریوتیپ تشخیص داده می‌شود، را نشان می‌دهند. با این حال روش‌های مولکولی اگر برای تشخیص تریزومی‌های ۱۳، ۱۸ و ۲۱ مورد استفاده قرار گیرند، بسیار کمک کننده هستند و با توجه به امکان انجام آزمایش به طور همزمان بر روی تعداد زیاد نمونه، آن را به عنوان روش برتر برای بررسی‌های گسترده و یا غربالگری انتخاب می‌کنند و در مواردی که نیاز باشد، از کاریوتیپ استفاده می‌شود. نتایج مطالعه دیگری نیز نشان داده است که کاریوتیپ مطمئن‌ترین روش برای تشخیص تریزومی‌ها در نمونه‌های مایع آمنیوستیک می‌باشد در حالی که مطمئن‌ترین روش برای نمونه‌های CVS، روش‌های مبتنی بر PCR می‌باشد (۲).

های تکثیری ژن‌های هدف و ژن مرجع در فرد سالم در شکل ۶ و ۷ و در فرد بیمار در شکل ۸ و ۹ نشان داده شده است.

بحث

این مطالعه، در ادامه مطالعات مقدماتی بر روی نمونه‌های خون و مایع آمنیوستیک، جهت تشخیص سریع پیش از تولد تریزومی ۲۱ انجام شده است (۶، ۱۰). بدین منظور، از تکنیک Real-Time PCR کمی برای سنجش تعداد کپی‌های ناحیه اساسی کروموزوم ۲۱ بر روی نمونه‌های CVS استفاده شد. ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق شامل ژن‌های هدف DSYKIA2 و PMP22 واقع بر ناحیه اساسی کروموزوم ۲۱ انسانی، و ژن مرجع DSCAM واقع بر کروموزوم ۱۷ می‌باشند. در افراد بیمار (تریزومی ۲۱) سه کپی از کروموزوم ۲۱ و در افراد نرمال دو کپی وجود دارد. بنابراین، از نظر تئوری، نسبت ژن‌های موجود بر کروموزوم ۲۱ ۱/۵ برابر افراد نرمال است (۵). در مطالعه حاضر، نسبت‌های بدست آمده برای ژن‌های فوق امکان تفکیک نمونه‌های بیماران مبتلا به سندروم داون از گروه کنترل نرمال فراهم آورد و حضور سه نسخه از کروموزوم ۲۱ در گروه بیماران تایید شد.

روش‌های تهاجمی تشخیص پیش از تولد شامل آمنیوستز و نمونه برداری از پرزهای کوریونی (CVS) می‌باشند. مزیت اصلی CVS امکان انجام زودتر آن نسبت به آمنیوستز می‌باشد. CVS معمولاً بین هفته‌های ۱۰ تا ۱۲ بارداری صورت می‌گیرد، در حالی که آمنیوستز از هفته ۱۶ بارداری توصیه می‌شود. بنابراین در صورت مبتلا بودن جنین، CVS امکان انجام سقط در هفت‌های پایین‌تر بارداری را که مشکلات کمتری برای مادر به همراه دارد، فراهم می‌کند (۱، ۴). همچنین با توجه به قانون شرع اسلامی، سقط جنین بایستی تا قبل از چهار ماه و ده روز قمری (تقریباً چهار ماهگی خورشیدی) از دوران بارداری انجام شود. در گذشته انجام CVS، احتمالاً به دلیل گرفتن CVS قبل از هفته ۱۰ بارداری، در مواردی با نقص عضو نوزادان متولد شده همراه بود. از زمانی که CVS پس از هفته ۱۰ انجام می‌شود، این عوارض بسیار نادر بوده و حتی ممکن است مستقیماً به نمونه‌برداری CVS مربوط نباشد (۱، ۴).

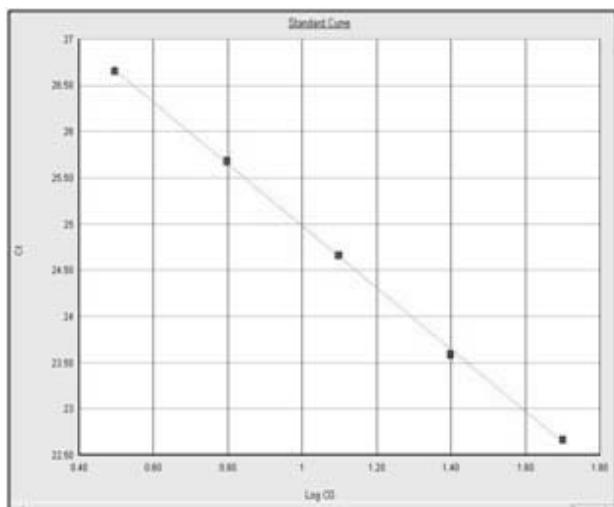
خود را انجام دادند (۵). نتایج مطالعه *Hu* و همکاران بر روی نمونه‌های مایع آمنیوتیک جنین‌های مبتلا به داون $1/69 \pm 0/17$ و در جنین‌های نرمال $1/06 \pm 0/14$ با $p < 0/001$ محاسبه شده است. *Yang* و همکاران در سال ۲۰۰۵ از نمونه‌های آمنیوسیت جنینی و ۱۴ نمونه خون نرمال و ۱۴ نمونه خون داون برای مطالعات خود استفاده کردند (۱۵). نتایج مطالعه *Yang* و همکاران بر روی نمونه‌های مایع آمنیوتیک و خون محیطی افراد مورد مطالعه نشان داد که میزان DNA مربوط به مارکر *D21S167* نسبت به *IGF-1* در جنین‌های مبتلا به سندروم داون $2/5 \pm 7/0$ و در جنین‌های نرمال $1/1 \pm 3/0$ و همچنین میزان ژن *S100B* نسبت به *IGF-1* در جنین‌های مبتلا به سندروم داون $7/0 \pm 19/1$ و در جنین‌های طبیعی $2/5 \pm 6/3$ بود. همچنین نتایج به دست آمده توسط این گروه نشان داد که *D21S167* نسبت به *IGF-1* در خون افراد داون *S100B* $0/8 \pm 6/1$ و افراد نرمال $0/4 \pm 2/3$ و همچنین میزان ژن *S100B* نسبت به *IGF-1* در افراد بیمار داون $2/1 \pm 15/6$ و در افراد نرمال $0/1 \pm 6/4$ بود. درنهایت این گروه تفاوت بین دو گروه جنینی نرمال و داون را از نظر آماری مورد بررسی قرار داده و تفاوت آماری معنی‌دار ($p < 0/0379$) را تایید کرده‌اند اگر چه نتایج مطالعات انجام شده امکان تفکیک دو گروه نرمال و تریزومی ۲۱ را با استفاده از این تکنیک تایید می‌کنند اما بعضًا دقت لازم را در نسبت‌هایی که به دست آورده‌اند، نداشته‌اند، در حالی که نتایج به دست آمده از نمونه‌های CVS در این مطالعه دقیق‌تر بوده و به نسبت مورد انتظار ($1/5$ به 1) نزدیک‌تر می‌باشند.

تقدیر و تشکر

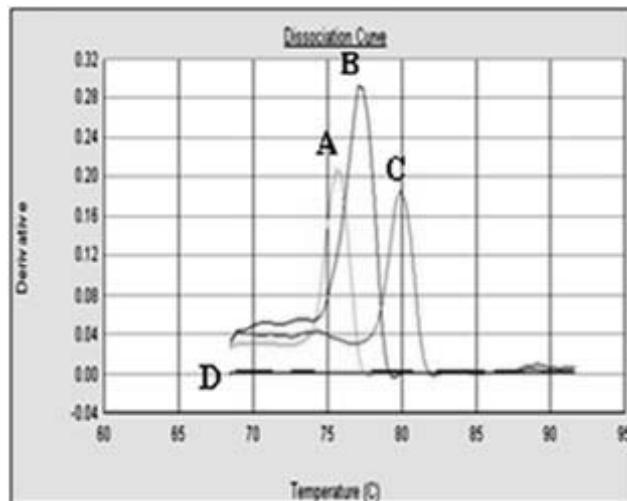
از آقایان دکتر محمد تقی اکبری و دکتر سیروس زینلی و پرسنل محترم بخش پزشکی مولکولی انسٹیتو پاستور ایران که در انجام این مطالعه با ما همکاری نمودند، نهایت تشکر را دارم.

تکنیک Real-Time PCR به عنوان یک ابزار قدرتمند برای تعیین دقیق تعداد کپی‌های DNA بوده و قابلیت گستردگی برای آنالیز بیان ژن‌ها دارد، لذا جهت بررسی میزان DNA آزاد شده در مایعات بدن و میزان دوباره شدن یا کاهش ژن در مطالعات سرطان و مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۸). تکنیک Real-Time PCR نیاز به مرحله آنالیز جداگانه ندارد و در نتیجه خطر آلدگی و اختلاط نمونه‌ها کاهش می‌یابد (۷). همچنین تشخیص بیماری در مدت زمان بسیار کم و آنالیز همزمان نتایج نمونه‌های متعدد امکان پذیر می‌باشد. همچنین در این تکنیک نیاز به سلول زنده و کشت سلول نمی‌باشد (۱۸). پیش از انجام مطالعه حاضر، از تکنیک Real-Time PCR همزمان با انجام کاریوتیپ بر روی نمونه‌های خون و مایع آمنیوتیک استفاده شد تا صحت تکنیک تایید گردد، همچنین در صورت وجود اختلافات بتوان دلیل آن را پیگیری کرد. نتایج میانگین نسبت تعداد کپی ژن‌های هدف به ژن *DYRK1A2/PMP22* و *DSCAM/PMP22* در نمونه‌های خون در افراد مبتلا به سندروم داون $1/71 \pm 0/16$ و در افراد نرمال $1/01 \pm 0/10$ گزارش شد (۶). در مورد مایع آمنیوتیک نمونه‌های جنینی داون $1/61 \pm 0/09$ و در نمونه‌های جنینی نرمال $1/03 \pm 0/05$ به دست آمد (۱۰). نتایج بدست آمده از تکنیک Real-Time PCR با نتایج حاصل از آنالیز کروموزومی کاریوتیپ مقایسه گردیدند که دو تکنیک نتایج یکدیگر را تایید نمودند.

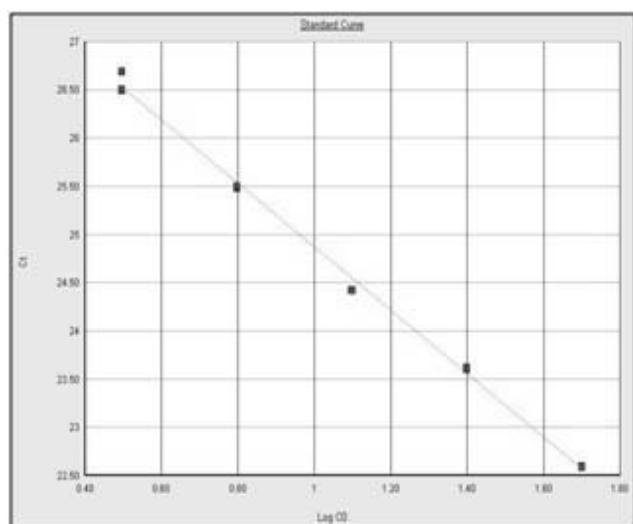
تا کنون هیچ مطالعه‌ای برای تعیین تریزومی ۲۱ بر روی نمونه‌های CVS با استفاده از تکنیک Real-Time PCR انجام نشده است. Zimmermann و همکاران در سال ۲۰۰۲ آمنیوسیت‌های کشت داده شده ۱۰ جنین مبتلا به تریزومی ۲۱ و خون محیطی ۱۱ فرد به ظاهر سالم را مورد مطالعه قرار دادند (۱۸). نتایج مطالعه Zimmermann و همکاران بر روی نمونه‌های مایع آمنیوتیک نشان داد که مقدار ΔCt در افراد مبتلا به تریزومی ۲۱ برابر $0/2 \pm 0/0$ و در افراد نرمال برابر $0/2 \pm 0/6$ بود. *Hu* و همکاران در سال ۲۰۰۴ روی نمونه‌های خون و مایع آمنیوتیک ۳۹ زن باردار با ۳۵ سال سن یا بالاتر که در سه ماهه دوم بارداری و دارای سن حاملگی ۱۶-۲۲ هفته بودند و همچنین خون ۷ کودک با ویژگی‌های ظاهری سندروم داون و خون ۷۴ فرد سالم آزمایشات



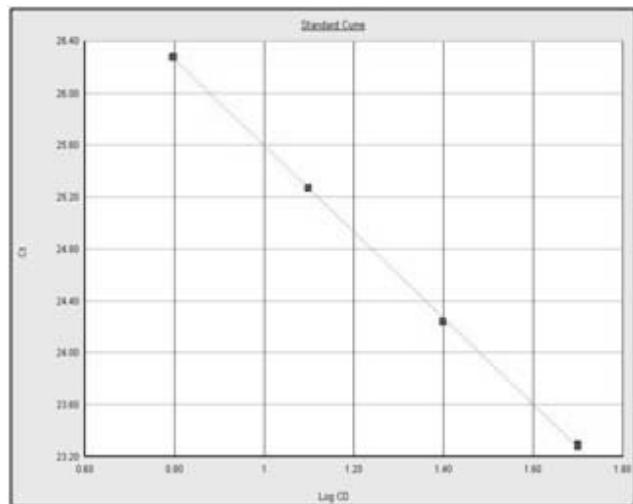
شکل ۳- منحنی استاندارد ژن *PMP22* براساس لگاریتم غلظت (محور افقی) و تعداد سیکل‌های واکنش PCR (محور عمودی). $-3/34 = \text{شیب خط (SLOPE)}_{\text{SLPOE}} = 0/99 = \text{ضریب تعیین} .(R^2)$



شکل ۴- منحنی تفکیک (ذوب) که بر اساس دما (محور افقی) و مشتق سیگنال فلورسنت دریافتی دستگاه Real-Time PCR (محور عمودی) ترسیم می‌شود. A منحنی تفکیک ژن مرجع *PMP22* را نشان می‌دهد که قطعه تکثیری مورد نظر در دمای ۷۶ درجه سانتی‌گراد دناטורه می‌شود. B منحنی تفکیک ژن هدف دناتوره می‌شود. C منحنی تفکیک ژن هدف *DYRKIA2* است که قطعه تکثیری مورد نظر در دمای ۷۸ درجه سانتی‌گراد دناטורه می‌شود. D بیانگر عدم جفت شدن آغازگر (پرایمر دایمر) است. سطح زیر منحنی بیانگر میزان محصولات تکثیری حاصل از PCR است.

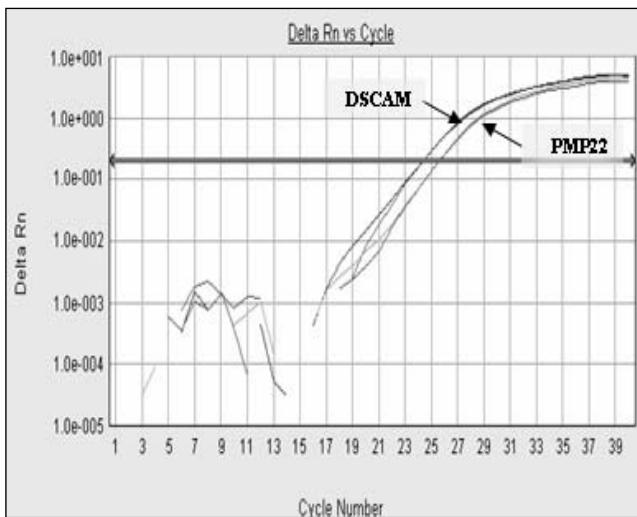


شکل ۱- منحنی استاندارد ژن *DSCAM* براساس لگاریتم غلظت (محور افقی) و تعداد سیکل‌های واکنش PCR (محور عمودی). $-3/30 = \text{شیب خط (SLOPE)}_{\text{SLPOE}} = 0/99 = \text{ضریب تعیین} .(R^2)$

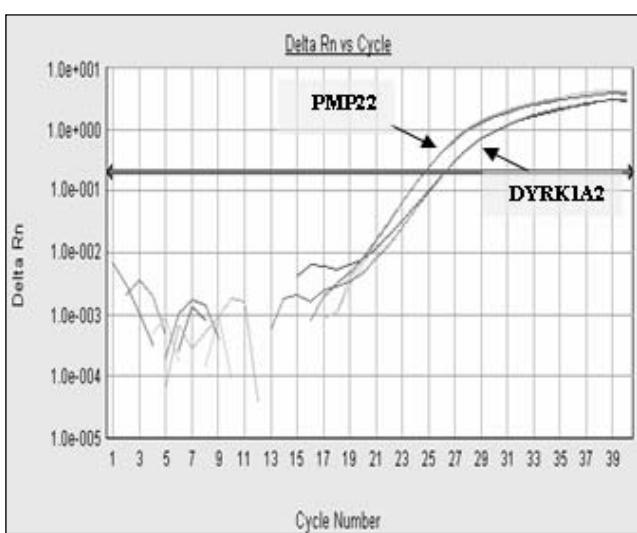


شکل ۲- منحنی استاندارد ژن *DYRKIA2* براساس لگاریتم غلظت (محور افقی) و تعداد سیکل‌های واکنش PCR (محور عمودی). $-3/31 = \text{شیب خط (SLOPE)}_{\text{SLPOE}} = 0/99 = \text{ضریب تعیین} .(R^2)$

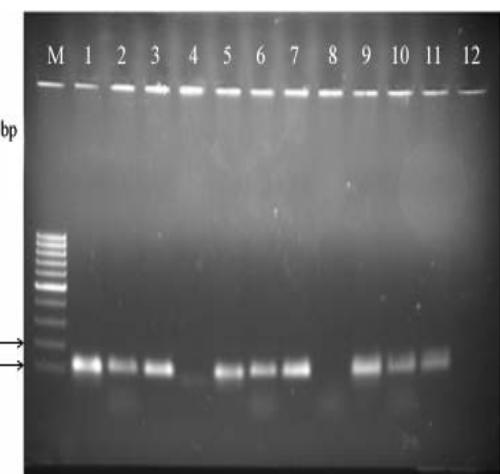
PCR و محور عمودی بیانگر ΔRn یا اختلاف رنگ فلورسنت دریافتی توسط دستگاه Real-Time PCR از رنگ زمینه است (رنگ فلورسنت زمینه = Rn^-). کل رنگ فلورسنتی دریافتی = $(Rn^+ - Rn^-)$, $Rn^+ =$



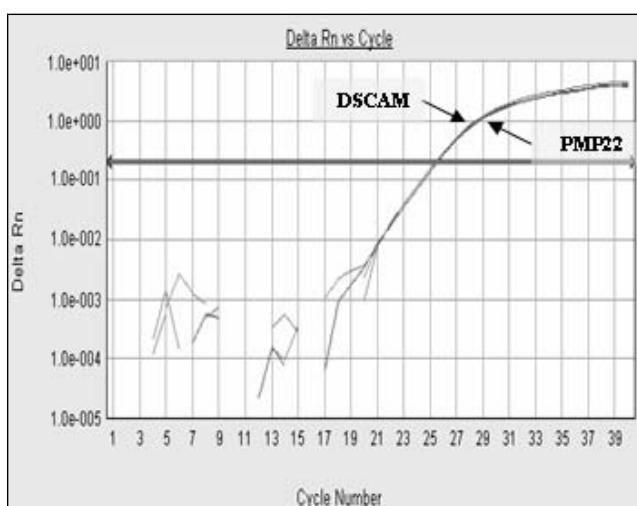
شکل ۷- منحنی تکثیری ژن *DSCAM* ($Ct = 24/30$) و *PMP22* ($Ct = 25/48$) در بیمار مبتلا به سندروم تریزوومی ۲۱. اختلاف منحنی تکثیری ژن *DSCAM* و *PMP22* به اندازه نیم سیکل آستانه است. (محور افقی تعداد سیکل‌های PCR و محور عمودی ΔRn را نشان می‌دهد. رنگ فلورسنت زمینه = Rn^- , کل رنگ فلورسنتی دریافتی = $(\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-)$, $Rn^+ =$.



شکل ۸- منحنی تکثیری ژن *DYRKIA2* ($Ct = 26/13$) و *PMP22* ($Ct = 26/59$) در فرد کنترل نرمال. هر دو منحنی



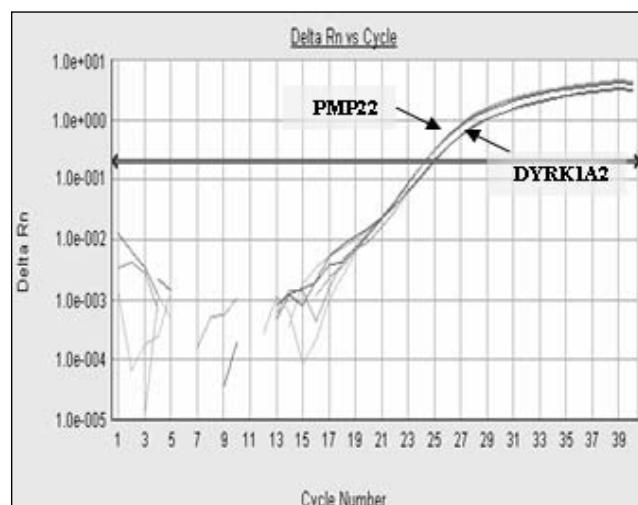
شکل ۵- الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد. چاهک ۴ واکنش عدم حضور DNA (الگو) و باند چاهک‌های ۱ و ۵ و ۹ بیانگر محصولات تکثیری ژن هدف *DSCAM* را نشان می‌دهد. طول قطعه تکثیری ۱۰۰ جفت باز است. چاهک ۸ واکنش NTC (عدم حضور DNA الگو) و باند چاهک‌های ۲ و ۶ و ۱۰ بیانگر محصولات تکثیری ژن هدف *DYRKIA2* را نشان می‌دهد. طول قطعه تکثیری ۱۰۶ جفت باز است. چاهک ۱۲ واکنش NTC (عدم حضور DNA الگو) و باند چاهک‌های ۳ و ۷ و ۱۱ محصولات تکثیری ژن مرجع *PMP22* را نشان می‌دهد. طول قطعه تکثیری ۱۰۳ جفت باز است. چاهک *M* مارکرهای نشانگر Size (Markers) با اندازه ۱۰۰ جفت بازی را نشان می‌دهد.



شکل ۶- منحنی تکثیری ژن *DSCAM* ($Ct = 24/57$) و *PMP22* ($Ct = 24/57$) در فرد کنترل نرمال. هر دو منحنی همپوشانی داشته و اختلافی را نشان نمی‌دهند. محور افقی بیانگر تعداد چرخه‌های

5. Hu Y ZM, Z Xu, X Wang, Cui H. 2004. Quantitative Real-Time PCR technique for rapid prenatal diagnosis of Down syndrome. *Prenat. Diagn.* 24: 4.
6. Kamyab Ra. 2008. Application of Genomic DNA Quantitative Real-Time PCR method in diagnosis of Down syndrome. 74-91.
7. Kathy Mann CD, Susan P Fox, Zoe Docherty , Caroline Mackie Ogilvie. 2004. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *European Journal of Human Genetics* 12.
8. Mansfield E. 1993. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet*: 2:43-50.
9. Myslęk-Prucnal M SL G-OA. 2008. The diagnostics and developmental stimulation of small children with 21 trisomy in compliance with thyroid function. *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw*: 14:4.
10. Shahrokh F. 2009. Diagnostic Value of Real time quantitative PCR for prenatal detection of trisomy 21 in amniocyte samples obtained from high risk pregnancies. 30-41.
11. Thompson T. 2001. Genetics in medicine. 6th: 182-188.
12. Vaerman J SP II. 2004. Evaluation of Real-Time PCR data. *J Biol Regul Homeost Agents*: 18:212-4.
13. Waters Jonathan J. MK, Grimsley Lee , Mackie Ogilvie Caroline , Donaghue Celia , Staples Leonie , Hills Alison , Adams Tracey , Wilson Christine. 2007. Complete discrepancy between QF-PCR analysis of uncultured villi and karyotyping of cultured cells in the prenatal diagnosis of trisomy 21 in three CVS. *Prenat Diagn* 332-9.
14. Waters Jonathan J. WS, Levett Lisa J. , Liddle Stuart , Akinfenwa Yinka 2006. Complete discrepancy between abnormal fetal karyotypes predicted by QF-PCR rapid testing and karyotyped cultured cells in a first-trimester CVS. *Prenat Diagn* 892-7.
15. Yang YH, M. S. Nam, and E. S. Yang. 2005. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 by real-time quantitative polymerase chain reaction with amplification of small tandem repeats and S100B in chromosome 21. *Yonsei Med* 46: 193.
16. Yu-ning Zhu S-mL, Jian-fei You, Bo Zhu, Mei-yu Yu. 2009. Novel Real-Time PCR assay for rapid prenatal diagnosis of Down syndrome: A prospective study of 563 amniocytes. *Clinical Biochemistry*: 42: 672-5.
17. Yuan JS RA CF SCJ. 2006. Statistical analysis of Real-Time PCR data. *BMC Bioinformatics*: 6.
18. Zimmermann BL, L Holzgreve,W Hahn,S . 2008. Real-time quantitative PCR for the detection of fetal aneuploidies. *Method in Molecular Biology*: 444:95-109.

همپوشانی داشته و اختلافی را نشان نمی‌دهند. محور افقی بیانگر تعداد چرخه‌های PCR و محور عمودی بیانگر ΔRn یا اختلاف رنگ فلورسنت دریافتی توسط دستگاه Real-Time PCR از رنگ زمینه است (رنگ فلورسنت زمینه = Rn^- ، کل رنگ فلورستی دریافتی = $\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$, $Rn^+ =$ دریافتی).



شکل ۹- منحنی تکثیری ژن ($Ct = 24/88$) *DYRKIA2* و (Ct = 24/21) *PMP22* در بیمار مبتلا به سندروم تریزوومی ۲۱. اختلاف منحنی تکثیری ژن *DSCAM* و *PMP22* به اندازه نیم سیکل آستانه است. (محور افقی تعداد سیکلهای PCR و محور عمودی ΔRn را نشان می‌دهد. رنگ فلورسنت زمینه = Rn^- ، کل رنگ فلورستی دریافتی = $\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$, $Rn^+ =$ دریافتی).

منابع

1. Chorionic villus sampling (CVS). <http://www.dsa-uk.com/>
2. Allan Caine AEM, C Anthony Parkin, Jonathan J Waters, John A Crolla. 2005. Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment. *Lancet*: 366: 123-28.
3. Allen S. K. LA, Gould C. P. , MacDonald F., Larkins S., Davison E. V. . 2006. Rapid prenatal diagnosis of common trisomies: discordant results between QF-PCR analysis and karyotype analysis on long-term culture for a case of trisomy 18 detected in CVS. *Prenat Diagn* 1160-7.
4. Ellard PTS. 2007. Emery's elements of medical genetics. 13th: 391-476.

