# تشخیص زنان ناقل دیستروفی عضلانی دوشن با استفاده از روش Real-Time PCR

مینا حیات نوسعید .M.Sc[۲،۱]، مرتضی کریمی‌پور .Ph.D[۱]، فرشته مریمی .M.D[۱]
رزیتا عدالت.M.Sc[۱]، حسین نجم‌آبادی .Ph.D[۳]، سیروس زینلی .Ph.D[۱]*

۱. انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد پزشکی مولکولی
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
۳. دانشگاه علوم بهزیستی و توان‌بخشی، مرکز تحقیقات ژنتیک

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۲۶۷-۱۳۱۸۵، انیستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی
پست الکترونیک: Email: sirouszeinali@yahoo.com

## چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۱۰/۲۱، پذیرش مقاله: ۸۶/۲/۳۰

**هدف:** شناسایی ناقلین بیماری دیستروفی عضلانی دوشن با استفاده از تکنیک Real-Time PCR

**مواد و روش‌ها:** بیماری دیستروفی عضلانی دوشن یک بیماری وابسته به جنس کشنده و غیر قابل درمان است که حدود ۷۰ درصد موارد، به علت حذف در اگزون‌های ژن دیستروفین ظاهر می‌شود. تنها راه حل ممکن برای پیش‌گیری از تولد این بیماران، شناسایی ناقلین است ولی تاکنون هیچ یک از روش‌های آزمایشگاهی توانایی تشخیص همه ناقلین را نداشته است. لذا روش Real-Time PCR به عنوان روشی مناسب و مطمئن برای شناسایی تمام ناقلین دارای حذف انتخاب شده است. وجود حذف در اگزون‌های ۴۷ و ۶ ژن دیستروفین در بیماران ۲۵ خانواده توسط Multiplex PCR تایید شد. سپس با تکنیک Real-Time PCR و با استفاده از رنگ SYBR Green، ناقلین اجباری و زنان مشکوک به ناقل بودن، مورد بررسی قرار گرفتند. در این کار اگزون ۸ فاکتور IX انعقادی هم به عنوان تعدیل کننده استفاده شد. آنالیز اطلاعات بر اساس متد مقایسه $\Delta\Delta C_T$ صورت گرفت.

**یافته‌ها:** با این روش میزان $^{-\Delta\Delta C_T}$ ۲در زنان ناقل حدود ۱/۰۹±۰/۲۱ ودر زنان سالم حدود ۰/۵۱±۰/۱ محاسبه شد و تقریبا تمام زنان ناقل مورد مطالعه با این روش غربال‌گری شدند.

**نتیجه‌گیری:** روش Real-Time PCR روشی حساس، دقیق و نسبتا ارزان برای شناسایی حذف‌ها و مضاعف شدگی‌ها و قابل استفاده برای تشخیص ناقلین DMD/BMD در آزمایشگاه‌های ژنتیک است.

**کلیدواژگان:** دیستروفی عضلانی دوشن/بکر، تشخیص ناقلین، Real-Time PCR

فصلنامه پزشکی باکتله، سال نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۵۰-۴۵

## مقدمه

بیماری تحلیل عضلانی دوشن/ بکر (DMD: OMIM # 310200, BMD: OMIM # 300376) یکی از شایع‌ترین اختلالات عصبی عضلانی در پسر بچه‌ها است، که به صورت صفت وابسته به کروموزوم X مغلوب انتقال می‌یابد (۱). این بیماری علایم خود را تا قبل از ۵ سالگی با تاخیر در کسب مهارت‌های حرکتی اولیه نشان می‌دهد. با افزایش سن (حدود ۸ تا ۱۰ سالگی) و پیشرفت تحلیل عضلات و همچنین هایپرتروفی کاذب اندام‌های حرکتی، فرآیند راه رفتن به طور کامل مختل می‌شود. این بیماران در اوایل دهه دوم زندگی به علت نارسایی تنفسی و قلبی با شرایط بسیار اسفباری می‌میرند (۱). شیوع این بیماری یک در ۳۵۰۰ نوزاد پسر است. DMD/BMD در اثر جهش در ژن دیستروفین که در جایگاه ژنی Xp21 واقع است، ایجاد می شود. این ژن با داشتن ۲/۴۰۰/۰۰۰ جفت باز، ۷۹ اگزون و تولید mRNA ای به طول ۱۴ کیلوباز بزرگترین ژن شناخته شده در انسان است.

۶۰ درصد از موارد این بیماری ناشی از حذف ژنی و ۵ درصد ناشی از مضاعف شدگی‌ها در یک یا تعداد بیشتری از اگزون‌های موجود در یکی از دو ناحیه داغ در ژن دیستروفین است. بقیه موارد نیز ناشی از جهش نقطه‌ای است. ۷۰ درصد جهش‌ها به صورت ارثی از یک مادر ناقل منتقل می‌شود و ۳۰درصد موارد به صورت تک موردی (Sporadic) روی می‌دهد(۲).

باتوجه به این که هیچ درمان قطعی برای این بیماران تا به امروز ارائه نشده است تنها راه حل ممکن پیشگیری از تولد این بیماران است. لذا برای رسیدن به این هدف باید تمام ناقلین این بیماری شناسایی شوند.

بر خلاف توانایی بالای تکنیک Multiplex PCR درشناسایی بیماران مبتلا به DMD/BMD این تکنیک قادر به شناسایی زنان ناقل نیست. زیرا ژن سالم واقع بر کروموزوم X فعال می‌تواند نتایج PCR در فرد ناقلی که دارای حذف بر روی کروموزوم دیگر است را کاملا تغییر دهد و پاسخ کاذبی مشاهده شود. در ضمن در ۳۰ درصد موارد که به

صورت تک موردی و غیرارثی هستند حتی با روش‌های غیرمستقیم نیز امکان شناسایی ناقلین آنها وجود ندارد. لازم به ذکر است روش‌های رایج تشخیص ناقلین مثل لکه‌گذاری ساترن، FISH، بررسی mRNA و آنالیز هاپلوتایپ، علاوه بر وقتگیر بودن دارای حساسیت لازم و کافی برای شناسایی تمام ناقلین نیستند. لذا نیاز به یک روش دقیق وحساس و در عین حال ساده و ارزان که قابل استفاده در تمام آزمایشگاه‌های ژنتیک باشد، کاملا مشهود است (۵ ،۳).

در این تحقیق بعد از مطالعات (۹-۶) و بر اساس بررسی‌های انجام شده و امکانات موجود، برای اولین بار در ایران اقدام به شناسایی ناقلین بیماری دوشن از طریق Real-Time PCR شد. Real-Time PCR سیستم یکنواختی است که در آن عمل شناسایی و تکثیر در یک زمان صورت می‌گیرد. در این سیستم تشخیصی یک ماده فلورسانس طی واکنش متناسب با میزان محصولات هر سیکل آزاد می‌شود و میزان فلورسانس آن توسط نمایانگر شناسایی و تثبیت می‌شود. اولین بار هیگوچی و همکاران با اضافه کردن اتیدیوم بروماید به مخلوط PCR، پیشگامان این تکنیک شدند. ولی امروزه روشی مشابه ولی مناسب‌تر جایگزین اتیدیوم بروماید شده است وآن استفاده از یک رنگ ویژه متصل شونده به DNA نظیر SYBR Green است. با توجه به مزایا و قدرت تشخیص بالا، این سیستم به عنوان روشی مناسب برای تشخیص ناقلین دوشن انتخاب شد (۱۲-۱۰). وجود تنها یک نسخه از ژن سالم دیستروفین در افراد ناقل منجر به تولید محصول کمتری در ابتدای فاز تصاعدی تکثیر نسبت به زنان نرمال که دارای دو نسخه سالم از این ژن هستند، می‌شود. این کمبود محصول می‌تواند راهگشای مناسبی برای تمایز این افراد از هم باشد.

## مواد و روش‌ها

### انتخاب بیماران

پس از ارائه توضیحات کافی مربوط به طرح و پر کردن فرم رضایت نامه، بیماران، خانواده‌های آنها و افراد کنترل وارد مطالعه شدند. به این ترتیب که ابتدا ۲۵ خانواده دارای بیمار دوشنی انتخاب شدند که در آنها ۱۰ زن ناقل اجباری بودند. همچنین ۱۵ زن مشکوک به ناقل بودن نیز وجود داشت. آنها دارای فرزند پسر مبتلایی بودند که به صورت تک موردی این بیماری را نشان داده بود و سابقه دیگری در خویشاوندان آنها وجود نداشت. در این ۲۵ خانواده ۲۰ دختر مشکوک به ناقل بودن نیز مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین بر روی ۱۰ زن سالم به عنوان کنترل، آزمایش‌ها انجام شد. بیماران انتخاب شده، حذف در اگزون‌های ۴۷ ویا ۶ را نشان داده بودند.

### استخراج DNA

DNA مورد نیاز از گلبول‌های سفید خون محیطی، توسط روش salting out پس از لیز و شستشوی گلبول‌های قرمز استخراج شد(۱۳). غلظت DNAهای استخراج شده (بیماران، افراد ناقل و مشکوک و کنترل‌های نرمال) توسط دستگاه NanoDrop (NanoDrop, USA) سنجیده شد و در دمای ۴۰درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### Multiplex PCR

حذف در تمام بیماران این خانواده‌ها توسط Multiplex PCR (MPCR) تایید شد. MPCR روش خاصی از PCR است که در این روش می‌توان با مخلوط کردن چند جفت پرایمر، نواحی مختلفی از DNA را در یک واکنش PCR به طور همزمان تکثیر و از آن در تعیین حذف‌های ژنی و تشخیص ژنتیکی استفاده کرد (۱۴، ۱۵).

### الکتروفورز

محصولات MPCR بر روی ژل آگارز ۲-۱/۵درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید و با استفاده از اشعه ماورا بنفش مشاهده شد. باندهای ظاهر شده با سایز مارکر ۱۰۰جفت بازی‌سنجیده‌شدند. در افراد نرمال که دارای هر دو اگزون بودند دو باند واضح و مشخص مشاهده شد. در حالی که در بیماران دارای حذف فقط یک باند مربوط به اگزون سالم مشاهده شد (شکل ۱).

بعد از تایید حذف‌های بیماران برای تشخیص ناقلین از Real-Time PCR استفاده شد.

### Real-Time PCR

سیستم Real-Time PCR بر اساس بررسی کمی میزان ماده فلورسانس عمل می‌کند و این سیگنال فلورسانس به نسبت میزان محصول PCR در واکنش افزایش می‌یابد. با ثبت میزان تابش در هر سیکل می‌توان واکنش را در طول فاز تصاعدی ثبت کرد و آن را با مقدار نمونه الگوی اولیه مطابقت داد. هر چه مقدار کپی‌های اولیه اسید نوکلییک بیشتر باشد افزایش میزان فلورسانس و ورود به فاز تصاعدی زودتر اتفاق می‌افتد.

### پرایمرهای مورد نیاز

پرایمرهای اگزون های ۴۷ و۶ بر اساس طراحی Chamberlain و Beggs (۱۴، ۱۵) به شرکت Primm (South Korea) سفارش داده شد. توالی این پرایمرها به شرح زیر است:

توالی‌های زیر بر روی اگزون ۶، قطعه‌ای به طول ۲۰۲ جفت باز را تکثیر می‌کنند.

**Exon 6 F: CCACATGTAGGTCAAAAATGTAATGAA**

**Exon 6 R: GTCTCAGTAATCTTCTTACCTATGACTATGG**

این توالی‌ها بر روی اگزون ۴۷، قطعه‌ای به طول ۱۸۱ جفت باز را تکثیر می‌کنند.

**Exon47 F: CGTTGTTGCATTTGTCTGTTTCAGTTAC**

**Exon47 R: GTCAACCTTTATCCACTGGAGATTTG**

همچنین ژن تعدیل کننده قسمتی از اگزون ۸ فاکتور IX انعقادی است که توالی پرایمرهای آن در زیر آورده شده. این پرایمر ها قطعه‌ای در حدود ۲۰۷ جفت باز را تکثیر می کنند.

**Exon 8 F IX: CTTCCTCAAATTTGGATCTGGC**

**Exon 8 F IX: TCCCCCACTATCTCCTTG**

**مخلوط واکنش**

برای هر واکنش مخلوطی به حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. مواد تشکیل دهنده این مخلوط عبارتند از:

dNTP 0.4mM (Roche, Germany), $MgCl_2$ 3mM, PCR بافر شامل 100nM Flurseine, bio-rad و SYBR Green 0.2-2X (Invitrogen , USA 100،Tris 20mM) و (Bio-Rad100) nM Flurseine, USA)، بعد از تهیه مخلوط بافری ۲X باید مواد دیگری چون پرایمرها به میزان ۷پیکومول و دو واحد آنزیم DNA 100ng، smarTaq DNA polymerase (Cinnagen, Iran) الگو و آب برای رساندن حجم مخلوط واکنش به ۲۵ میکرولیتر به مخلوط بافری اضافه شود. واکنش‌های هر نمونهDNA برای هر سه پرایمر، سه سری و به صورت همزمان انجام شد و میانگین CTهای به دست آمده از هر اگزون محاسبه شد. برای انجام واکنش Real-Time PCR از برنامه زیر استفاده شد.

۹۴ درجه سانتی‌گراد تقلیب اولیه DNA الگو در چرخه اول در مدت زمان ۱ دقیقه و سپس، سه برنامه دمایی زیر، ۳۸ چرخه تکرار شد: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه. سپس در چرخه نهایی دما ۲ دقیقه در ۷۲درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد تا سنتز رشته‌ها به طور کامل انجام شود. Real-Time PCR در دستگاه cycler iQ-Optical system software (version 3/01a) Bio-RAD انجام‌شد.

**آنالیز اطلاعات**

سنجش کمی میزان اگزون‌های DMD بر اساس مقایسه Threshold (CT) با روش مقایسه $\Delta\Delta C_T$ صورت گرفت. اندازه‌گیری کمی مقدار ژن در سیکل‌هایی از واکنش PCR که در فاز تصاعدی قرار دارند، انجام می‌پذیرد. نرم افزار دستگاه Real-Time PCR بعد از انجام واکنش PCR به صورت اتوماتیک Threshold Cycle را برای استفاده کننده مشخص می کند. به ازای کل ناحیه‌ای که رابطه تصاعدی برقرار است می‌توان نقطه‌ای را انتخاب کرد و از آن خط Threshold یا آستانه را رسم کرد. معمولا این آستانه بالاتر از خط پایه در نظر گرفته می‌شود. Threshold نشان دهنده میزانی از محصول است که در آن همه نمونه‌ها به صورت تصاعدی تکثیر می‌شوند. Threshold cycle چرخه‌ای است که در آن هر نمونه تکثیر تصاعدی خود را شروع می کند. به عبارتی دیگر سیکلی را که در آن خط Threshold منحنی PCR را قطع می کند Threshold Cycle گفته می‌شود. در این چرخه میزان واقعی از نمونه DNA الگوی اولیه نمایان می‌شود و تعداد کپی نمونه اولیه قابل اندازه گیری است (۱۶).

در این روش یکی از اگزون‌های انتخابی DMD به عنوان اگزون مرجع (reference exon) که در حقیقت اگزون نرمال است و اگزون دیگر DMD به عنوان اگزون مورد آزمایش (test exon) و یا اگزونی که حذف و یا مضاعف شده است مدنظر قرار می گیرد. اگزون ۸ فاکتور IX انعقادی نیز به عنوان تعدیل کننده (Endogenous reference) انتخاب شده است.

به منظور تایید صحت انتخاب این سه ژن برای هر سه ژن به صورت هم‌زمان سریال رقت ازDNA تهیه و نمودار استاندارد برای هر سه قطعه ترسیم شد و نسبت به slope به دست آمده از این خط efficiency محاسبه شد. با توجه به این که efficiencyهای به دست آمده (اگزون۴۷-۰/۹۱۴، اگزون۶-۰/۹۳۶، اگزون ۸ فاکتور IX ۰/۹۲۳) اختلاف محسوسی ندارند لذا می‌توان efficiency هر سه ژن را برابر و از روش مقایسه $\Delta\Delta C_T$ استفاده کرد. به این ترتیب ابتدا از سه CT به دست آمده برای هر اگزون میانگین گرفته شد. با تفاضل میانگین CT به دست آمده از هر اگزون DMD از میانگین CT ژن تعدیل کننده $\Delta C_T$ محاسبه می‌شود و از تفاضل دو $\Delta C_T$ به دست آمده فاکتوری به نام $\Delta\Delta C_T$ به دست می‌آید (طبق فرمول ذیل) که در نهایت $2^{-\Delta\Delta C_T}$ محاسبه می گردد.

$$\Delta\Delta C_T = [mC_{TH}(\text{endogenous refrence}) - mC_{TDMD}(\text{refrence exon})] - [m\,C_{T\,H}(\text{endogenous refrence}) - m\,C_{T\,DMD}(\text{test exon})]$$

انتظار می‌رود میزان $2^{-\Delta\Delta C_T}$ برای زن نرمال حدود ۱، برای زن ناقل دارای حذف ۰/۵ و برای زن ناقل دارای مضاعف شدگی در حدود ۲ به دست آید.

## Melting Curve Analysis

به منظور تایید صحت قطعه تکثیرشده و اطمینان از نبود باندهای غیراختصاصی و همچنین اتصال پرایمر دایمرها به یکدیگر از نمودار ذوب یا melt curve استفاده شد. در این نمودار بر اساس تنها پیک مشاهده شده برای هر جفت پرایمر در Tmمنحصر به فرد خودش، اختصاصی بودن محصول تولید شده اثبات شد (شکل ۲B و ۳B).

## یافته‌ها

از ۲۵ بیمار مورد نظرحذف ۱۶ بیمار در اگزون ۴۷ و ۹ بیمار در اگزون ۶ توسط multiplex PCR مشخص شد (شکل ۱).

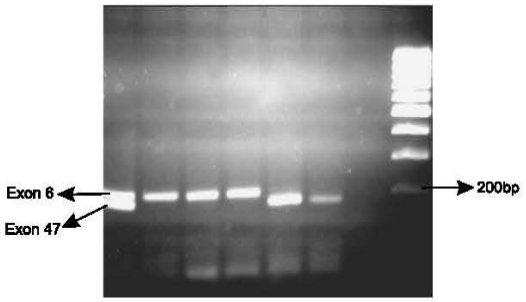
سپس زنان منتسب به این بیماران مورد آزمایش قرار گرفتند. برای وضوح بیشتر، نمودارها وCTهای به دست آمده از یک زن ناقل و یک زن سالم و نحوه محاسبات در زیر آمده است.

همان‌طور که در شکل ۲A مشاهده می‌شود در فرد مورد مطالعه اگزون ۴۷ در سیکل ۱۹ و اگزون ۶ در سیکل ۱۸/۹ به آستانه رسیده است. همچنین ژن تعدیل کننده در سیکل ۱۹ وارد فاز تصاعدی شده است. با قرار دادن این اطلاعات در فرمول، میزان $2^{-\Delta\Delta C_T}$، ۰/۹ به دست

آمد. این مقدار به علت نزدیک بودن به عدد ۱ نشان دهنده نرمال بودن این فرد است. در نتیجه تعداد کپی هر سه ژن مورد آزمایش برابر خواهد بود. محاسبه $2^{-\Delta\Delta C_T}$ به صورت زیر انجام شد.

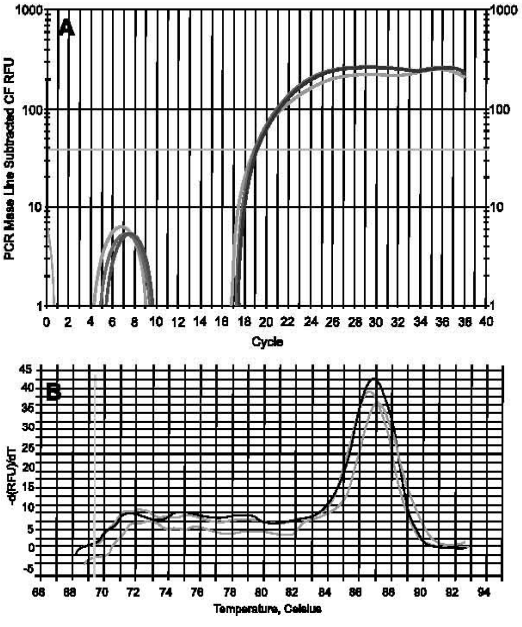
$\Delta\Delta C_T=[(19-18.9)-(19-19)] =0.1$

$2^{-\Delta\Delta C_T}=2^{-0.1}=0.9$



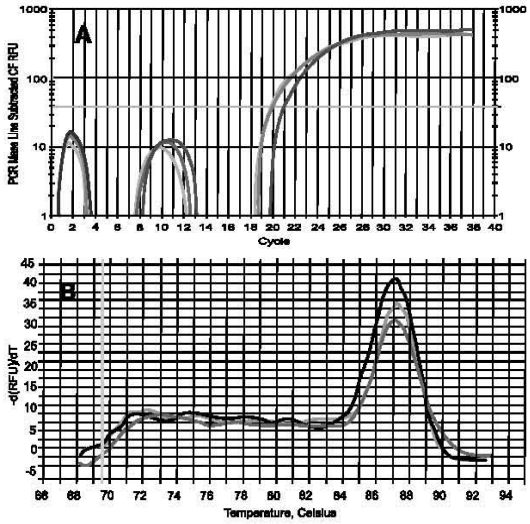

**شکل ۱: چاهک شماره ۱: نمونه نرمالی است که وجود دو اگزون ۴۷ و ۶ را نشان می‌دهد. چاهک شماره ۲ ، ۳ و ۴ : نمونه های بیماری هستند که حذف اگزون ۴۷ آن ها تأیید شد. چاهک شماره ۵ و ۶ : نمونه های بیماری هستند که حذف اگزون ۶ آن ها تایید شد.**

| Well Description | Well Identifier | Ct | Melt Temp |
|---|---|---|---|
| A3 | Ex on 47 | 19 | 86.5 |
| A6 | Ex on 6 | 18.9 | 86.5 |
| A10 | H | 19 | 86.5 |




**شکل ۲: اطلاعات مربوط به یک زن سالم**
**A: انطباق هر سه نمودار واضح است.**
**B: تنها پیک مشاهده شده مربوط به باند اصلی است و هیچ گونه باند غیر اختصاصی وجود ندارد.**

| Well Description | Well Identifier | Ct | Melt Temp |
|---|---|---|---|
| C4 | Ex on 47 | 20.9 | 86.5 |
| C7 | Ex on 6 | 19.9 | 86.5 |
| C8 | H | 19.7 | 86.5 |




**شکل ۳: اطلاعات مربوط به یک زن ناقل اجباری که فرزندان وی در اگزون ۴۷ حذف را نشان داده اند.**
**A: لگاریتمی :نمودار مربوط به اگزون ۴۷ یک سیکل دیرتر به آستانه رسیده است.**
**B: ذوب : تنها پیک مشاهده شده مربوط به باند اصلی است و هیچ گونه باند غیر اختصاصی وجود ندارد.**

در شکل ۳A فرد مورد مطالعه، زن ناقل اجباری است که فرزندان مبتلای وی دارای حذف در اگزون ۴۷ اند، لذا اگزون ۴۷ در این فرد به عنوان اگزون مورد آزمایش و اگزون ۶ به عنوان اگزون مرجع در نظر گرفته شد. با توجه به نمودارها، اگزون ۶ در سیکل ۱۹/۹به آستانه رسیده است در حالی که اگزون ۴۷ به علت فقدان یک کپی، یک سیکل دیر تر به آستانه رسیده است که در محاسبات صورت گرفته در نهایت میزان $2^{-\Delta\Delta C_T}$، ۰/۵ به دست آمد. این مقدار دقیقا نصف مقدار $2^{-\Delta\Delta C_T}$ محاسبه شده در فرد نرمال است و فقدان یک کپی از اگزون ۴۷ را اثبات می کند. محاسبه $2^{-\Delta\Delta C_T}$ به صورت زیر انجام شد.

$\Delta\Delta C_T =[(19.7-19.9)-(19.7-20.9) ] =1$

$2^{-\Delta\Delta C_T}=2^{-1}=0.5$

در نهایت نتایج به دست آمده به شرح زیر است. میزان $2^{-\Delta\Delta C_T}$ در زنان سالم حدود۱/۰۹±۰/۲۱ در زنان ناقل حدود۰/۵۱±۰/۱ محاسبه شد و هیچ تداخلی در نتایج مشاهده نشد.

با استفاده از Real-Time PCR ناقل بودن در ۲۵ مادر این بیماران تایید شد. در این ۲۵ خانواده ۲۰ دختر مشکوک به ناقل بودن نیز وجود داشت. از این ۲۰ دختر، ۱۲ نفر سالم و ۸ نفر ناقل تشخیص داده شدند.

## بحث

بیماری دوشن یکی از بیماری‌های نسبتا شایع ژنتیکی در ایران است. این بیماری غیرقابل درمان و شدیدا ناتوان کننده است و تمامی بیماران در دهه دوم زندگی در بدترین شرایط و به علت درگیری عضلات تنفسی و قلبی می‌میرند. وجود یک فرزند مبتلا درخانواده با آگاهی از سرانجام دردناک بیماری، بسیار اسفبار است. اگر خانمی ناقل این بیماری باشد احتمالا نیمی از فرزندان پسر او بیمار خواهندشد. لذا اهمیت تشخیص به موقع ناقلین در این خانواده‌ها کاملا مشخص است. دختران خویشاوند فرد بیمار، اعم از خواهر، خاله یا دختر خاله‌ها در معرض خطر ناقل بودن هستند. لذا شناسایی این ناقلین و توانایی تشخیص دقیق آنها قبل از بارداری در پیشگیری از تولد نوزاد مبتلا بسیار مهم است (۱۷).

از روش‌های غیرمستقیم برای تشخیص ناقلین DMD/BMD می‌توان به روش آنالیز اتصالی (Linkage analysis) اشاره کرد. در این روش از نشانگرهای ژنتیکی استفاده می‌شود. نشانگرهای ژنتیکی به هر مشخصه یکسان بر روی دو کروموزوم همولوگ می گویند که امکان تمایز همولوگ ها را فراهم می‌سازد. به این ترتیب می‌توان نحوه وراثت ژن عامل بیماری را با دنبال کردن نحوه انتقال نشانگرهای متصل به ژن مورد نظر مشخص کرد (۲). اما تمام روش‌های غیرمستقیم برای تمام نمونه‌ها پاسخگو نیستند. از جمله، مواردی که بیمار فوت کرده باشد؛ بیماری به صورت تک موردی در خانواده‌ای بروز کرده باشد و یا خویشاوندان فرد بیمار در دسترس نباشند یا تمایل به همکاری نداشته باشند. در این موارد بهتر است از روش‌های مستقیم برای تشخیص ناقلین استفاده شود.

از روش‌های مستقیم می‌توان به روش‌های زیر اشاره کرد: (Multiplex Ligation- dependent Probe Amplification: MLPA) این روش می‌تواند ۴۰ توالی مختلف DNA را در یک لوله و با یک جفت پرایمرمورد بررسی قرار دهد (۲۰). (Multiplex Amplifiable Probe Hybridization: MAPH)، در این روش تمام ۷۹ اگزون ژن دیستروفین از نظر حذف و مضاعف شدگی‌ها با تکثیر هم زمان تمام شناساگرها در یک واکنش با استفاده از تنها یک جفت پرایمر بررسی می‌شوند (۲۰). درتکنیک‌های MAPH و MLPA توانایی تکثیر تعداد زیادی از جایگاه‌ها توسط یک جفت پرایمر وجود دارد. از مزایای مهم این روش می‌توان به غربال‌گری هم زمان تمام ۷۹ اگزون ( کل قطعه کدکننده ژن دیستروفین) اشاره کرد. ولی برای استفاده در آزمایش‌های معمول باید مشکلات زیر را نیز مدنظر قرار داد. آنالیزهای مورد نیاز در دو تکنیک MLPA و MAPH به دلیل دشواری و وقت‌گیر بودن، حداقل به ۲ روز زمان نیاز دارد. به علاوه استفاده از دستگاه الکتروفورز مویینه‌ای و دستگاه تعیین توالی اتوماتیک با ابزارها و هزینه‌های اضافی، مورد نیاز است (۵، ۱۸، ۱۹، ۲۰).

جانکورت و همکاران طی یک طرح تحقیقاتی اقدام به تشخیص ناقلین بیماری DMD/BMD توسط تکنیک Real-Time PCR با استفاده از SYBR Green کردند. آنها ۱۰۰درصد نمونه‌های ناقل را شناسایی کردند و نسبت اگزون مورد آزمایش (test exon) به اگزون مرجع را در افراد ناقل دارای حذف ۰/۵۲±۰/۱۲ و در ناقلین دارای مضاعف شدگی ۱/۵۶±۰/۱۸ و در افراد سالم ۱/۰۲۲±۰/۱۷ به دست آوردند (۴). آنها همچنین برای تایید تشخیص ناقلین از شناساگرهای هیبریدی نیز استفاده کردند. نتایج به دست آمده از هر دو روش با هم مقایسه شدند و طبق نظر آنها روش Green SYBR به طور واضحی کارایی بالاتری نسبت به شناساگرهای هیبریدی دارد ودارای مزایای زیر است: ساده، ارزان، قابل دسترس، کوتاه بودن مدت زمان لازم برای به دست آوردن نتایج آزمایش (چند ساعت) و همچنین نیاز نداشتن به طراحی هیچ گونه شناساگر اختصاصی. اما عدم توانایی Green SYBR در شناسایی محصولات اختصاصی از غیراختصاصی و غیرممکن بودن تکثیر قطعات کنترل و قطعه ژن دیستروفین مورد نظر در یک لوله، از نقاط ضعف این تکنیک به شمار می‌رود (۴، ۱۲، ۲۱).

تراورسو و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶ توانایی Real-Time PCR کمی را بر اساس شناساگرهای TaqMan جهت تشخیص مضاعف‌شدگی یا حذف‌های هموزیگوتی در بیماران DMD/BMD بررسی کردند. یکی از دو اگزونDMD به عنوان مرجع و دیگری به عنوان exon test انتخاب شده بود. همچنین برای تعدیل اطلاعات به دست آمده از ژن PLP1 (Proteolipid 1) نیز کمک گرفته شده بود. آنها با استفاده از روش $\Delta\Delta C_T$ نتایج زیر را به دست آوردند:

نمونه‌های نرمال ۱/۱۹–۰/۸۳، زنان ناقل دارای حذف ۰/۶۰–۰/۲۹ و مردان دارای مضاعف‌شدگی ۲/۴۲–۱/۷۷ (۵).

در نهایت با بررسی‌های صورت گرفته و امکانات موجود روش مستقیم real-time PCR و استفاده از رنگ فلورسانتیSYBR Green و آنالیز توسط روش مقایسه $\Delta\Delta C_T$ انتخاب شد. در کار صورت گرفته ۱۰۰درصد موارد ناقل اجباری به درستی تشخیص داده شدند و با توجه به عدم مغایرت نتایج به دست آمده با نتایج جانکورت و تراورسو، قابل‌اطمینان بودن آزمایش صورت گرفته، ثابت شد.

## نتیجه‌گیری

در نهایت با بررسی تقریبا تمام روش‌های موجود برای تشخیص ناقلین می‌توان چنین نتیجه گرفت که برای ایجاد روشی آسان، ساده، ارزان، سریع و قابل دسترس برای انجام آزمایش‌های معمول و قابل اعتماد نیاز به تکنیکی است که بتوان به راحتی و با حداقل امکانات موجود در آزمایشگاه‌ها از آن برای تشخیص ناقلین استفاده کرد. تا کنون Real-Time PCR کمی، بهترین روش در رسیدن به این هدف محسوب می‌شود و مقایسه انجام شده بین نتایج حاصله از Green SYBR و شناساگرهای هیبریدی حاکی از این حقیقت است که استفاده از Green SYBR عملی‌تر خواهد بود (۴).

اما باید در استفاده از SYBR Green این نکته را نیز مدنظر قرار داد که به علت حساسیت فوق‌العاده بالای این آزمایش هر چه قدرت و توانایی‌های دستگاه مورد استفاده بالاتر باشد میزان خطا در شناسایی ناقلین به حداقل می رسد.

## تشکر و قدردانی

در این طرح از مساعدت و همکاری کلیه بیماران و خانواده‌های محترم آنها، جهت در اختیار گذاشتن نمونه و همچنین از پشتیبانی و همیاری تمامی همکاران گروه ژنتیک بخش بیوتکنولوژی تشکر و قدردانی می گردد.

## References

1. Thompson M, Mcinnes R, Willard H. The molecular and biochemical basis of genetic disease, Thompson & Thompson genetics in medicine, W.B. Saunders company, Philadelphia,1966; 289-294

2. Worton RG, Thompson MW. Genetics of Duchenne musculardystrophy. Annu Rev. Genet, 1988; 22: 601-629

3. Ligon AH, Kashork CD, Richards CS, Shaer LG. Identification of female carriers for Duchenne and Becker muscular dystrophies using a FISH-based approach. Human Genetics. 2000; 8: 293-298

4. Joncourt F, Neuhaus B, Jostarndt-Foegen K, Kleinle S, Steiner B,Gallati S. Rapid identification of female carriers of DMD/BMD by quantitative Real-time PCR. Human mutations, 2004; 93: 385-391

5. Raverso M, Malnati M, Minetti C, Regis S, Tedeschi S, Pedemonte M, Bruno C, Biassoni R, Zara F. Multiplex Real Time PCR for detection of detection of deletions and duplications in dystrophin gene. Biochemical and Biophysical Research communications, 2006; 339: 145-150

6. Wilke K, Duman B, Horst J. Diagnosis of haploidy and triploidy based on measurement of gene copy number by Real-time PCR. Human mutations, 2000; 16: 431-436

7. Ruize-ponte C, Loidi L, Vega A, Carracedo A, Barros F. Rapid Real-time fluorescent PCR gene dosage test for the diagnosis of DNA duplications and deletions. Clinical chemistry, 46: 1574-1582

8. Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analysis of SMN1 and SMN2 based on real-time LightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. American journal of human genetics, 2002; 70: 358-368

9. Kim SW, Lee KS, Jin HS, Lee TM, Koo SK, Lee YJ, Jung SC. Rapid detection of duplication/deletion of the PMP22 gene in patients with Charcot-Marie-Touth disease type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsy by real-time quantitative PCR using SYBR Green I dye. Medical science,2003; 18: 727-732

10. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology, 1992; 10: 413-417

11. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, and Watson R. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions.Biotechnology, 1993; 11: 1026-1030

12. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isacs JD, Markham AF. Real-time PCR based on SYBR Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. BMC Biotechnology, 2003; 3: 18

13. Miller SA, Dykes D D, Polesky HF. Asimple salting out for extracting DNA from human nucleated cell. Nucleic Acids Research, 1988; 16(3): 1215

14. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplication.Nucleic Acid Researches,1998; 16: 11140-11156

15. Beggs AH, Koeing M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Human genetics,1990; 86: 45-48

16. Livak K. Comparative Ct method. In: ABI Prism 7700 SequenceDetection System, User Bulletin 2, PE Applied Biosystems, 1997; 11–15

17. Panigrahi I. Carrier Detection and prenatal Diagnosisin Duchenne/Becker Muscusar Dystrophy. Indian pediatrics, 2001; 38: 631-639

18. Schouten JP, Mcelqunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acid Researches, 2002; 30: 57

19. White S, Kalf M, Liu Q, Villerius M, Engelsma D, Kriek M, Vollebregt E, Bakker B, Van Ommen GJB, Breuning MH, Dunnen JT. Comprehensive detection of genomic duplications and deletions in the DMD gene by use of multiplex amplifiable probe hybridization. American journal of human genetics, 2000; 71: 365-374

20. Sellner LN, Taylor GR. MLPA MAPH new techniques for detection of gene deletions, Human Mutation, 2004; 23: 413-419

21. Kim SW, Lee KS, Jin HS, Lee TM, Koo SK, Lee YJ, Jung SC. Rapid detection of duplication/deletion of the PMP22 gene in patients with Charcot-Marie-Touth disease type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsy by real-time quantitative PCR using SYBR Green I dye. Journal of Korean medical science, 2003; 18: 727-732