SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

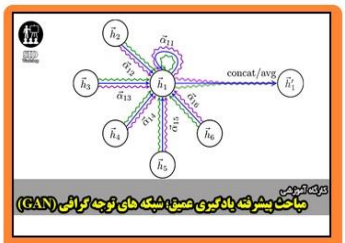
کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی (Graph Attention Networks)

کارگاه آنلاین مقاله نویسی IEEE و ISI ویژه فنی و مهندسی

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

بسمه تعالی

بررسی درصد فراوانی موتاسیون های مختلف بتاتالاسمی در موارد مراجعه به واحد PND انستیتو پاستور ایران

نویسندگان:حانیه مهدیاني* ، عاطفه ولايي ، مريم فرمهيني فراهاني ، زهره ميرزايي ، زهرا مقدم ، محبوبه مسعودي فرد، مرتضي كريمي پور ، سيروس زينلي

آدرس: انستیتو پاستور ایران ، بخش بیو تکنولوژي ، گروهPND _ Fax ،Tel : 6480780 , E-mail:zeinali@pasteur.ac.ir

چكيده : از آنجاييكه تالاسمي از شايعترين اختلالات ژنتيكي محسوب مي شود، لذا كنترل اين بيماري از اهميت بالايي برخوردار است . مطالعه ما به منظور بررسي در صد فراواني موتاسيونهاي مختلف تالاسمي بتا در افراد مراجعه كننده به واحد PND پاستور صورت گرفت. نتيجه حاصله بيانگر اين مطلب است كه بيشترين درصد فراواني مربوط به موتاسيون IVSII – I و كمترين درصد فراواني مربوط به موتاسيونهاي88-، 30-، 28-و CD30مي باشد و تعدادي از موتاسيونها در مراجعه كنندگان يافت نميشود.نتيجه اين مقاله ميتواند در بررسي هاي بعدي گروه و نيز ساير محققين كمك شاياني داشته باشد . كلمات كليدي : بتا تالاسمي ، موتاسيون ، PND .

مقدمه

تالاسمی شایعترین اختلال تک ژنی در جهان محسوب می شود. بدلیل گسترش بالای این بیماری، در سطح جهان کنترل تالاسمی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. به همین دلیل، تالاسمی یکی از معدود بیماری هایی است که از طریق روشهای بیولوژی مولکولی به منظور شناخت ارتباط بین پاتولوژی مولکولی و نوع فنوتیپ، مورد مطالعه قرارگرفته است. تالاسمی شامل گروهی از اختلالات ارثی در سنتز هموگلوبین است که همهٔ آنها با فقدان کامل و یا کاهش میزان یک یا بیش از یک زنجیرهٔ گلوبین در هموگلوبین مشخص می شود .

هموگلوبین انسان مخلوطی از پروتئین های مختلف است. اصلی ترین جزء آن، HbA است و به مقدار جزئی HbA2 که ۲/۵% کل را تشکیل می دهد. تعدادی هموگلوبین امبریونیک نیز وجود دارند که مهمترین آنها HbF نام دارد.ساختار این هموگلوبینها مشابه است. همهٔ آنها از دوجفت مجزا از زنجیره های گلوبین شناخته شده تشکیل شده اند. بجز برخی هموگلوبین های امبریونیک، همهٔ هموگلوبین های نرمال انسانی یک جفت زنجیره آلفا دارند که در HbA به دو زنجیرهٔ بتا ($\square_2\square_2$) در HbA_2 به دو زنجیرهٔ ($\square_2\square_2$) و در HbF به دو زنجیرهٔ γ ($\square_2\gamma_2$) متصل می شود. طبقه بندی تالاسمی براساس آن است که کدام زنجیره کمتر تولید می شود. زنجیره های مشابه بتا بوسیلهٔ خوشه ای از ژنها در کروموزوم ۱۱ و زنجیره های مشابه آلفا توسط خوشه ژنی بر روی کروموزوم ۱۶ کنترل می شوند.[1] تالاسمی به انواع $\square\square\square\gamma\square\delta\square\square\gamma\square$ تقسیم می شود:

آلفا تالاسمی : از آنجا که دو ژن آلفاگلوبین بر روی هر ژنوم هاپلوئید وجود دارد، آلفاتالاسمی براساس محصول نسبی هر دو ژن تقسیم بندی می شود :$\square$، $\square$

بتاتالاسمی : بتاتالاسمیشامل انواع زیر است :$\tilde{\square}$، $\square$ ، $\square$

شاخصه بتاتالاسمی افزایش میزان HbA_2 است که در اغلب اشکال $\tilde{\square}$ و $\square$ مشاهده می شود. موارد نادری از بتاتالاسمی یافت می شود که در آن میزان HbA_2 نرمال یا نزدیک به نرمال است که به آن $\square$Thalassemia HbA_2 نرمال گفته می شود که به دو زیر گروه تقسیم می شود :

- تیپ I که در آن تغییرات هماتولوژیک مشاهده نمی شود که بنام $\tilde{\square}$thalassemia Silent شناخته می شود.
- تیپ II که در آن یافته های هماتولوژیک مشابه نوع تیپیک بتاتالاسمی با افزایش HbA_2 است.

روش مطالعه

- شرایط خروج از مطالعه : تمامی بیماران مراجعه کننده به کلینیک ویژه با فنوتیپ بتا وارد مطالعه ما می شدند مگر بیمارانی که مشکوک باشند و یا افرادی که همکاری لازم را با گروه نداشته باشند.
- مراحل انجام مطالعه :

۱. تمامی بیماران مورد مطالعه پس از مشاهده و انجام آزمایشات خونشناسی (CBC و الکتروفورز) خود و والدینشان شامل غلظت هموگلوبین(F, A_2, A) ,MCV ,MCH ,MCHC و ... و تأیید مینور بودن وارد مطالعه شدند.(چارت۱)

۲. برای هر خانواده یک پرونده شامل ذکر نام و نام خانوادگی ، شمارهٔ پرونده ، محل تولد، اصلیت ، فنوتیپ و نسبت خانوادگی برای هر زوج و نیز والدین هر دو تشکیل گردید.

۳. از هر بیمار حجم ۱۰ سی سی خون گرفته شد که این نمونه ها در فالکون های حاوی EDTA در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری می شدند.

۴. نمونه ها پس از ذوب شدن به روش Salting Out تخلیص شد.[3]

۵. جهت بررسی نوع موتاسیون از تکنیک ARMS و جهت بررسی Linkage ازتکنیک RFLP استفاده گردید:

a. ARMS (Amplification Refractory Mutation System):[4]

بیماران براساس اصلیت طبقه بندی می شدند و آزمایشات ARMS با موتاسیون های شایع آن منطقه برای زوجین شروع می شد و در صورت پیدا نشدن موتاسیون با سایر موتاسیون ها ادامه پیدا می کرد. جهت تعیین موتاسیون از روش PCR (Polymerase Chain Reaction) استفاده شد که روش تعیین هر موتاسیون بسته به شرایط واکنش بهینه سازی گردیده، مورد استفاده تمام اعضاء گروه قرار گرفت. جمعاً بیست و نه سایت مختلف بررسی می شد و درنهایت در صورت یافت نشدن موتاسیون، نمونه DNA بیمار جهت تعیین نوع موتاسیون و تعیین توالی آماده می شد.

دمای Annealing در موتاسیون های مختلف برحسب نوع پرایمر موتانت، متفاوت می گردد. مثلاً موتاسیون IVS 1-110 دارای دمای Annealing ۶۹ درجه سانتیگراد می باشد و پرایمر Reverse مورد استفاده برای عمل RB, PCR است. . (شکل ۱)

سایتهای مورد بررسی شامل :

-101, -88, -87, -30, -29, -28, CD-5, CD-8, Fr8/9, CD-15, CD-16, CD-22, +22, CD-24, CD25/26, CD-30, IVS I-I, IVS I-5, IVS I-6, IVS I-25, IVS I-110, IVS I-130, CD 36/37, CD-37, CD37/39, Fr41/42, CD44, IVS II-I, IVS II-745.

b. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) :[5]

جهت بررسی Linkage از تکنیک RFLP استفاده گردید. در صورت دارا بودن فرزند ماژور، آزمایشات بر روی زوجین و فرزندشان انجام می گردید و در غیر اینصورت بررسی بر روی زوجین و والدین آنها صورت می گرفت. جمعاً ۶ سایت بررسی می شد که سه مورد از آنها داخل ژن بتا (AvaII, Rsa, Hinf) قرار دارند و در صورت عدم گویایی از سایر سایتها در خارج از ژن بتا(HincII,Gγ Hind III, XmnI 3') استفاده می شد.

دمای Annealing برحسب پرایمرهای مختلف در سایتهای مختلف متفاوت است. مثلاً در AvaII دمای Annealing ، ۶۵ درجه سانتیگراد می باشد. (شکل ۲)

پس از اتمام PCR ، آنزیم موردنظر را به همراه بافر به PCR Product اضافه می کنیم. برای این منظور به هر تیوب میزان ۱/۷ از این مواد که شامل ۱ بافر به همراه ۰/۷ آنزیم است را اضافه کرده و به مدت ۱۸-۲۰h در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می دهیم.

۶. الکتروفورز: نمونه ها پس از PCR توسط الکتروفورز افقی مورد بررسی قرار گرفتند.

به PCR Product میزان ۲۰% حجمی Loading اضافه می گردید و سپس برحسب تکنیک در ژل ۱/۵% آگارز با ولتاژ ۸۵-۸۰ برای ARMS و در ژل ۲% آگارز با ولتاژ ۷۰-۶۵ برای RFLP الکتروفورز می شد.

بحث و نتیجه گیری :

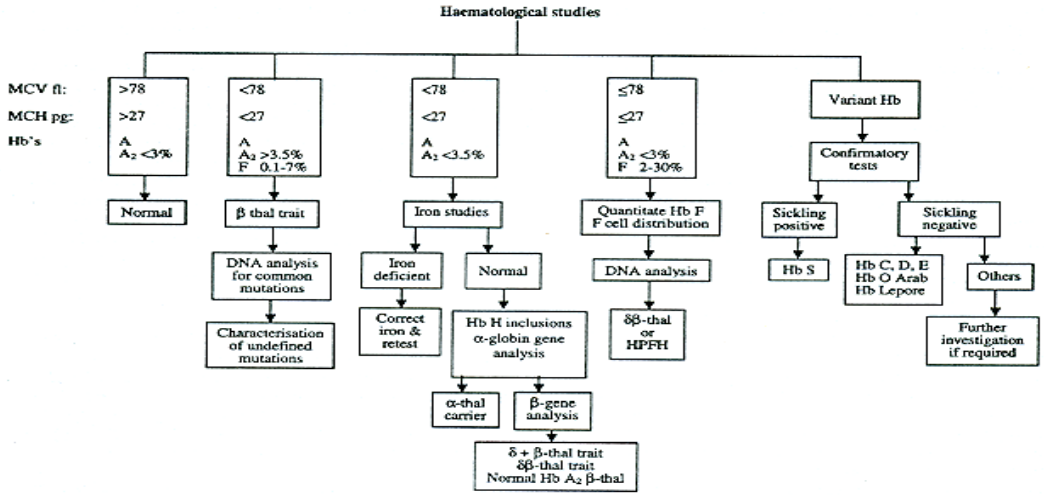
تعداد ۱۲۵ بیمار وارد مطالعه ما شدند که از این تعداد در ۲۲ نفر معادل ۱۷/۶% موتاسیون یافت نشد که این افراد جهت Sequencing فرستاده شدند.

در ۱۰۳ نفر افرادی که موتاسیون آنها پیدا شد بیشترین درصد فراوانی را IVS II-I با ۳۶/۸ درصد بخود اختصاص می داد و پس از آن به ترتیب Fr 8/9 با اختلاف فاحش ۷/۲ درصد موارد و C36-37 و CD5 با ۵/۶ درصد فراوانی بیشترین آمار با بخود اختصاص دادند.

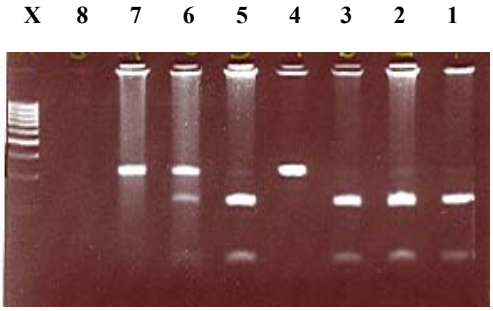
در بیماران مورد مطالعه هیچ گزارشی از موتاسیون های -101 , -29, -87, Fr41/42, CD8 CD 15, C25-26, CD24, CD37, CD16, IVS I-130 وجود نداشت و برخی موتاسیون ها از جمله -88 ,-30 ,-28 و CD30 فقط یک مورد گزارش معادل ۰/۸ درصد فراوانی داشتند.(جدول ۱)

References:

1.
2. Hoffman R., Benz E J., Shattil SJ., Furie B., Cohen HJ., Silberstein LE., Mc Glave P. *Hematology, Basic principles and Practice* (2000) 3rd ed.-churchill livingstone, Philadelphia, Pennsylvania , 29: 485-510.
3. Old JM. *Blood Reviews* (2003) Elsevier science Ltd. 17: 43-53.
4. Sambrook J., Russell D. *Molecular cloning (a laboratory manual)* (2001) 3rd ed. Cold Spring Harbor, NewYork .
5. Old JM., Varawalla NY., Weatherall DJ., *The rapid detection and prenatal diagnosis of thalassemia in the Asian Indian and Cypriot populations in the UK*. Lancet (1990): 336-834.
6. Weatherall DJ., Clegg JB. *The thalassemia syndromes* (2001) 4th ed-edn. Black well

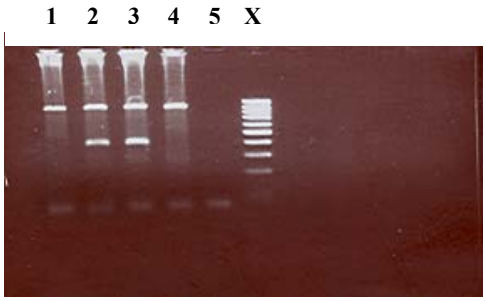


چارت۱: متد بررسی یافته های هماتولوژیک بیماران برای ورود به مطالعه[2]



شکل ۲: DNA خرد شده با انزیم AvaII-□ در یکي از مراجعین

+: Digested DNA strand
-: Undigested DNA strand
1, 2, 3. +/+ samples
4.-/- sample
5. +/+ control
6. +/- control
7.-/- control
8. Blank



شکل ۱: موتاسیونIVS 1-110 یافت شده در یکي از مراجعین

1. Without any mutation
2. Carrier
3. Positive Control
4. Normal Control
5. Blank
x. 100bp Size marker

جدول ۱: بررسي درصد فراواني موتاسيونهاي يافت شده در مراجعين به واحد PND انستيتوپاستور.

نوع موتاسيون	تعداد افراد	درصد
IVS II-I	46	36.8
IVS I-5	6	4.8
IVS I-110	3	2.4
C 36-37	7	5.6
Fr 8/9	9	7.2
-25	2	1.6
IVS I-I	2	1.6
CD5	7	5.6
IVS II-745	3	2.4
IVS I-6	4	3.2
CD44	4	3.2
-88	1	0.8
-30	1	0.8
-28	1	0.8
C22	2	1.6
C37-39	2	1.6
+22	2	1.6
C30	1	0.8
Unknown	22	17.6
مجموع	125	100%

SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

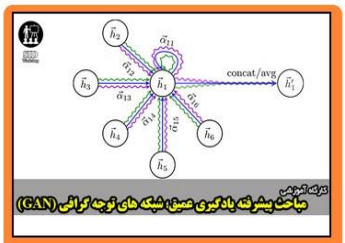
کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی (Graph Attention Networks)

کارگاه آنلاین مقاله نویسی IEEE و ISI ویژه فنی و مهندسی