ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹
صفحه ۲۱-۱۳

تعیین میزان ژن‌های ناحیه اساسی کروموزوم ۲۱ در نمونه‌های جنینی CVS با استفاده از روش Quantitative Real -Time PCR

المیرا شمسیان[۱]، مهرداد هاشمی[۲]، احمدرضا کامیاب[۳]، مینا حیات نوسعید[۴]، میترا بهروز اقدم[۵]، اعظم امیریان[۶]، رضا مهدیان*[۷]

۱،۳و۵- 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،۶و۷- به ترتیب کارشناسان ارشد و استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو 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: بکارگیری روشی نوین بر پایه تکنیک Real-Time PCR کمی جهت تشخیص سریع پیش از تولد سندرم تریزومی ۲۱ (سندرم داون) در نمونه‌های CVS زنان باردار پرخطر بررسی شد. مواد و روش‌ها: از زنان بارداری که ریسک بالای ابتلای جنین به تریزومی ۲۱ را در غربالگری اولیه داشتند، نمونه پرز کوریونی گرفته شد. از نمونه خون افراد مبتلا به سندرم داون به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت تجاری، میزان ژن-های DYRK1A2 و DSCAM نسبت به ژن PMP22 در افراد مبتلا و نمونه‌های جنینی با تکنیک Real-Time PCR به صورت کمی سنجیده شد. نسبت تعداد کپی ژن‌های هدف به مرجع از طریق روش مقایسه‌ای سیکل آستانه (ΔΔCt) محاسبه گردید. یافته‌ها: نتایج حاصل از آنالیز نسبت ژن-های هدف به مرجع در افراد مبتلا به سندرم داون ۰/۰۹ ±۱/۵۶ و در نمونه‌های جنینی نرمال ۰/۱۱ ±۱/۰۲ بود که نشان دهنده حضور سه کپی از ژن‌های هدف در موارد تریزومی 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 سندرم تریزومی 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 سندرم داون پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی

**سندرم تریزومی۲۱ ،
Real-Time PCR ،
میزان ژنی**

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.2.7]

مقدمه

سندرم داون (تریزومی ۲۱) یکی از شایع‌ترین و شناخته شده‌ترین اختلالات کروموزومی است که به تنهایی 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 آلودگی محیط کشت و حتی گاهی اوقات رشد انتخابی سلول‌های مادری می‌باشد. برای تشخیص ۲ هفته وقت مورد نیاز است که باعث می‌شود زمان زیادی برای زنان باردار پرخطر از دست برود. از روش‌های سریعتر تشخیصی می‌توان تکنیک هیبریداسیون فلورسانس درجا Fluorescent In Situ Hybridization(FISH) را نام برد. اگرچه این روش سریع و معتبر است، ولی نیاز به سلول زنده دارد (۱۶، ۱۸). روش‌های مولکولی از جمله Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (QF-PCR) که بر 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، به‌ویژه 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.

Real-Time PCR ترکیبی از PCR معمولی و یک دستگاه فلوروفتومتر است که قابلیت آنالیز همزمان چندین نمونه و مشاهده هر مرحله از تکثیر را فراهم می‌کند. در این سیستم از رنگ‌های فلورسنت نظیر رنگ اینترکاله SYBR Green I و یا پروب‌های نشاندار (مانند پروب‌های 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 انستیتو 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 هفته ۱۲– ۱۰ 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 (جدول۱). این مطالعه در سال ۱۳۸۸ در راستای طرح پژوهشی شماره ۴۱۷، پس از اخذ مصوبه کمیته اخلاقی انستیتو پاستور ایران، در بخش پزشکی مولکولی انجام شد.

جدول۱– تعداد، دامنه سنی، هفته نمونه‌گیری در افراد مورد مطالعه

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.2.7]

مواد و روش‌ها

استخراج DNA

استخراج DNA طبق پروتکل کیت DNA Isolation Kit For Cells And Tissues (Roche, Germany) انجام شد. میزان خلوص و غلظت DNA با دستگاه نانوفتومتر (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 سندرم 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 توالی 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 آغازگرهای مناسب طراحی شدند. توالی و مشخصات آغازگرها در جدول ۲ آورده شده است.

Real –Time PCR

در این آزمایش از دستگاه (Applied Biosystems, Foster City, CA) ABI 7300 استفاده شد. واکنش‌های Real–Time PCR به صورت سه تایی (Triplicate) در پلیت‌های ۹۶ چاهکی در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد که مخلوط واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix SYBR Green I (Applied Biosystems) ، ۲ میکرولیتر از آغازگرهای Forward ,Reverse اختصاصی هر ژن، ۵ میکرولیتر DNA ژنومی (۲۰ نانوگرم) و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر بود. برنامه زمانی- دمایی آن شامل سه مرحله می‌باشد، که مرحله اول ۹۵ 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 ۴۰ 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 فلورسنت طی واکنش، متناسب با میزان محصولات تولید شده از هر سیکل نور فلورسنت 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 آغازگرها (پرایمر دایمر) از ژل آگارز یک درصد استفاده شد. یک گرم پودر آگارز را در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر Tris- Borate-EDTA 0.5X 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.

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

نام ژن	نوع الیگو	ترتیب توالی	دمای ذوب	درصد GC	طول قطعه تکثیری (bp)
DSCAM	Fw	5'CCGGGCAGTCTAATTCCAGAAC3'	۶۰/۸	۵۵	۱۰۰
DSCAM	Rv	5'AGTATGTGCACTCAGAAACCAGCTG3'	۶۰/۷	۴۸	
DYRK1A	Fw	5'AATGGTGTGCACAGGATGTGAAC3'	۶۰/۷	۴۸	۱۰۶
DYRK1A	Rv	5'ATTCCGGTGAAACAAGTCATGAAG3'	۶۰/۲	۴۲	
PMP22	Fw	5'GGAGGAGAGAAGGCTTGAATGC3'	۶۰/۳	۵۵	۱۰۳
PMP22	Rv	5'GTTCCACATGCACACAGAAACG3'	۶۰/۰	۵۰	

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.2.7]

بهینه‌سازی واکنش Real –Time PCR

ابتدا جهت تعیین غلظت مناسب و عملکرد آغازگرها، از آن‌ها رقت‌های متوالی به‌صورت 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 DNA استاندارد جهت ترسیم منحنی استاندارد استفاده شد که رقت‌ها شامل ۳/۱۳، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ نانوگرم می‌باشد. واکنش رقت‌های متوالی برای آغازگرها و DNA استاندارد به صورت سه-تایی به همراه یک واکنش بدون حضور DNA الگو (Non-Template Control) برای هر ژن در پلیت ۹۶ چاهکی انجام شد. شیب منحنی استاندارد توسط بسته نرم افزاری Sequence Detection System دستگاه ABI 7300 تعیین گردید و میزان کارآیی واکنش PCR بر مبنای فرمول زیر محاسبه شد. شیب منحنی استاندارد قابل قبول بایستی بین ۳/۶- و ۳/۱- باشد.

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

در این مطالعه درصد کارایی PCR ژن *DSCAM*، *DYRK1A2* و *PMP22* به ترتیب ۱۰۰ و ۱۰۰ و ۹۹/۲ درصد به دست آمد.

آنالیز نتایج

در تکنیک Real-Time PCR برای هر واکنش PCR 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 جنینی 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 معنی‌دار بودن اختلاف‌های بین نتایج حاصل از نمونه‌ها از روش Student's T-test (۱۷) با استفاده از برنامه Excel شرکت مایکروسافت و نرم‌افزار تخصصی دستگاه Real-Time PCR مدل ABI7300 استفاده شد.

ΔCt =Ct ژن هدف – Ct ژن مرجع

$\Delta\Delta Ct$ =ΔCt (نمونه نرمال) – ΔCt (نمونه‌های مورد آزمایش)

نسبت ژنی $\text{ratio}=2^{-\Delta\Delta ct}$ که برابر است با نسبت تعداد کپی‌های ژن هدف به ژن مرجع *DSCAM / PMP22* و *DYRK1A2 / 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 ۵۰-۱۲/۵ نانوگرم در میکرولیتر به دست آمد. در این مطالعه، ازDNA 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 (شکل ۱ و ۲ و ۳)، درصد کارایی و راندمان تکثیری ژن *DSCAM* و *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 دایمر و یا قطعات غیراختصاصی می‌باشد (شکل۴). 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 (شکل۵).

میانگین نسبت تعداد کپی ژن‌های هدف به ژن مرجع *DSCAM/PMP22* و *DYRK1A2/PMP22* در نمونه‌های نرمال ۱/۰۲± ۰/۱۱ و در افراد مبتلا به سندرم داون ۱/۵۶± ۰/۰۹ ($p\ value<0.001$) به دست آمد که امکان افتراق بیماران مبتلا به سندرم داون را از نمونه‌های سالم فراهم می‌کند. مقایسه منحنی-

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.2.7]

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 آمنیوتیک، 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 *DYRK1A2* و *DSCAM* واقع بر ناحیه اساسی کروموزوم ۲۱ انسانی، و ژن مرجع *PMP22* 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 سندرم 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 آمنیوسنتز و نمونه برداری از پرزهای کوریونی (CVS) می‌باشند. مزیت اصلی CVS امکان انجام زودتر آن نسبت به آمنیوسنتز می‌باشد. CVS معمولاً بین هفته‌های ۱۰ تا ۱۲ بارداری صورت می‌گیرد، در حالی که آمنیوسنتز از هفته ۱۶ بارداری توصیه می‌شود. بنابراین در صورت مبتلا بودن جنین، CVS امکان انجام سقط در هفته‌های 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 (تقریبا 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).

بافت پرزهای کوریونی CVS از دو رده سلولی مجزا 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 آمنیوسنتز استفاده کرد (۱). اگر چه تنها حدود ۲-۱ درصد نمونه‌های CVS موزائیک می‌باشند و احتمال خطا در تشخیص تریزومی بعلت موزایسم 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 آمنیوتیک و هم سلول‌های پرز کوریونی مورد استفاده قرار داد. اما تکنیک‌های مبتنی بر PCR را می‌توان بر روی DNAی استخراج شده از مایع آمنیوتیک 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 به‌دست آمده با QF-PCR فاقد موارد مثبت یا منفی کاذب بوده است. اگر چه با استفاده از روش‌های مولکولی معمولاً در عرض ۴۸-۲۴ 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 آمنیوتیک می‌باشد در حالی که مطمئن‌ترین روش برای نمونه‌های CVS، روش‌های مبتنی بر PCR می‌باشد (۲).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.2.7]

تکنیک Real-Time PCR به عنوان یک ابزار قدرتمند برای تعیین دقیق تعداد کپی‌های DNA بوده و قابلیت گسترده‌ای برای آنالیز بیان ژن‌ها دارد، لذا جهت بررسی میزان DNAی آزاد شده در مایعات بدن و میزان دوبرابر شدن یا کاهش ژن در مطالعات سرطان و .... مورد استفاده قرار می گیرد (۱۸). تکنیک Real-Time PCR نیاز به مرحله آنالیز جداگانه ندارد و در نتیجه خطر آلودگی 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 مرجع *DSCAM/PMP22* و *DYRK1A2/PMP22* در نمونه‌های خون در افراد مبتلا به سندرم داون ۰/۱۶ ± ۱/۷۱ و در افراد نرمال ۰/۱۰ ± ۱/۰۱ گزارش شد (۶). در مورد مایع آمنیوتیک نمونه‌های جنینی داون ۰/۰۹±۱/۶۱ و در نمونه‌های جنینی نرمال ۰/۰۵±۱/۰۳ 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.

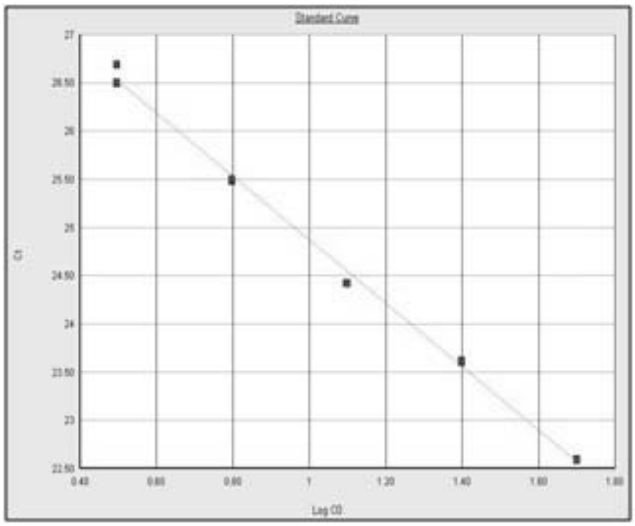
تا کنون هیچ مطالعه‌ای برای تعیین تریزومی ۲۱ بر روی نمونه‌های CVS با استفاده از تکنیک Real-Time PCR انجام نشده است. Zimmermann و همکاران در سال ۲۰۰۲ آمنیوسیت‌های کشت داده شده ۱۰ جنین مبتلا به تریزومی ۲۱ و خون محیطی ۱۱ فرد به ظاهر سالم را مورد مطالعه قرار دادند (۱۸). نتایج مطالعه Zimmermann و همکاران بر روی نمونه‌های مایع آمنیوتیک نشان داد که مقدار ΔCt در افراد مبتلا به تریزومی ۲۱ برابر ۰/۲ ±۰/۰ و در افراد نرمال برابر ۰/۲ ± ۰/۶- 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 ۲۲- ۱۶ هفته بودند و همچنین خون ۷ کودک با ویژگیهای ظاهری سندرم داون و خون ۷۴ فرد سالم آزمایشات خود را انجام دادند (۵). نتایج مطالعه Hu و همکاران بر روی نمونه‌های مایع آمنیوتیک جنین‌های مبتلا به داون ۰/۱۷±۱/۶۹ و در جنین‌های نرمال ۰/۱۴±۱/۰۶ با $p< ۰/۰۰۱$ 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 سندرم داون ۲/۵ ± ۷/۰ و در جنین‌های نرمال ۱/۱ ± ۳/۰ و همچنین میزان ژن *S100B* نسبت به *IGF-1* در جنین‌های مبتلا به سندرم داون ۷/۰ ± ۱۹/۱ و در جنین‌های طبیعی ۲/۵ ± ۶/۳ بود. همچنین نتایج به دست آمده توسط این گروه نشان داد که D21S167 نسبت به *IGF-1* در خون افراد داون ۰/۸ ±۶/۱ و افراد نرمال ۰/۴ ± ۲/۳ و همچنین میزان ژن *S100B* نسبت به *IGF-1* در افراد بیمار داون ۲/۱ ± ۱۵/۶ و در افراد نرمال ۰/۱ ± ۶/۴ بود. درنهایت این گروه تفاوت بین دو گروه جنینی نرمال و داون را از نظر آماری مورد بررسی قرار داده و تفاوت آماری معنی‌دار ($p <۰/۰۳۷۹$) 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 بعضاً دقت لازم را در نسبت‌هایی که به‌دست آوردند، نداشته‌اند، در حالی که نتایج به دست آمده از نمونه‌های CVS در این مطالعه دقیق‌تر بوده و به نسبت مورد انتظار (۱/۵ به ۱) نزدیک‌تر می‌باشند.

تقدیر و تشکر

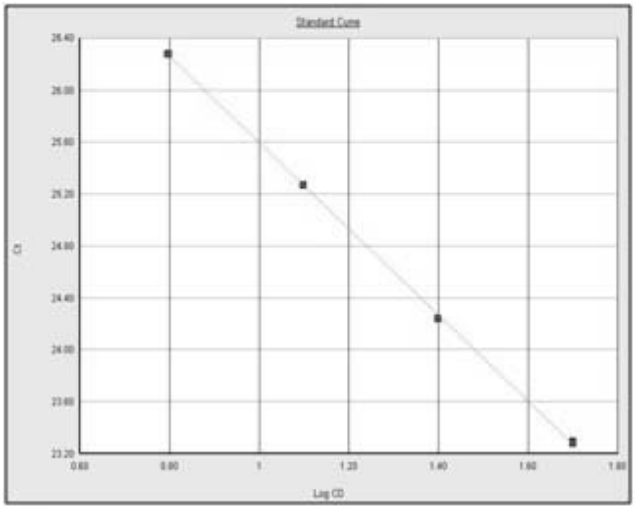
از آقایان دکتر محمدتقی اکبری و دکتر سیروس زینلی و پرسنل محترم بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران که در انجام این مطالعه با ما همکاری نمودند، نهایت تشکر را دارم.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

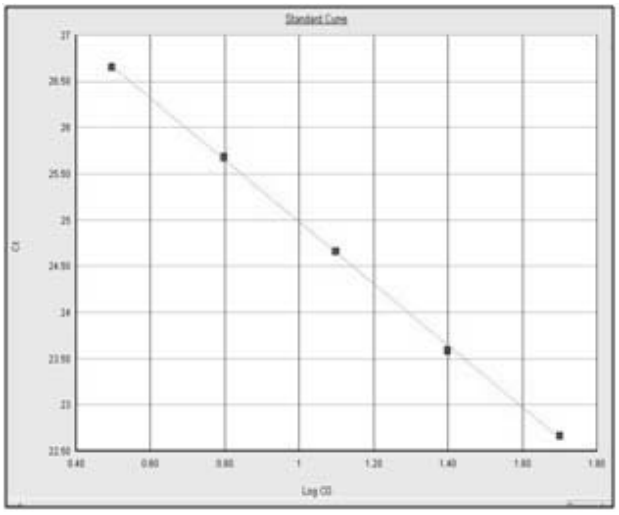
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.2.7]



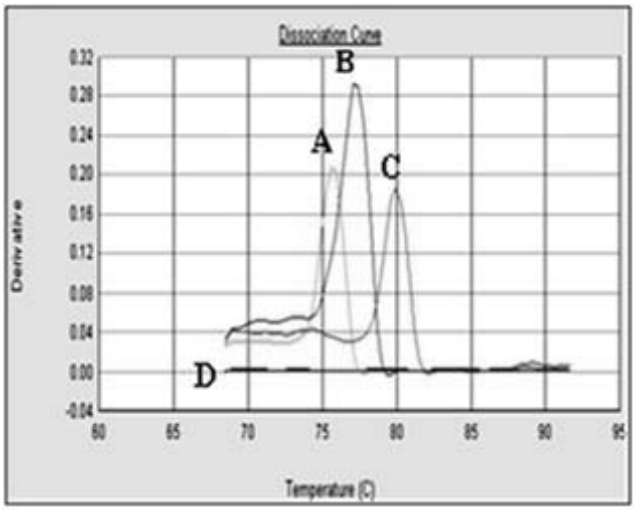
شکل ۱- منحنی استاندارد ژن *DSCAM* براساس لگاریتم غلظت DNA (محور افقی) و تعداد سیکل‌های واکنش PCR (محور عمودی). ۳/۳۰- = شیب خط (SLPOE)، ۰/۹۹ = ضریب تعیین (R^2).



شکل ۲- منحنی استاندارد ژن *DYRK1A2* براساس لگاریتم غلظت DNA (محور افقی) و تعداد سیکل‌های واکنش PCR (محور عمودی). ۳/۳۱- = شیب خط (SLPOE)، ۰/۹۹ = ضریب تعیین (R^2).



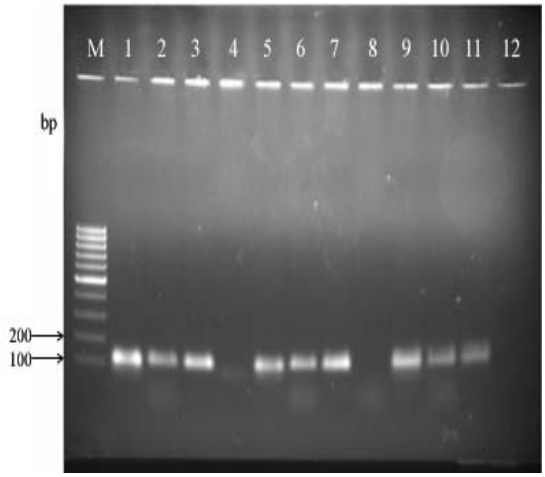
شکل ۳- منحنی استاندارد ژن *PMP22* براساس لگاریتم غلظت DNA (محور افقی) و تعداد سیکل‌های واکنشPCR (محور عمودی). ۳/۳۴- = شیب خط (SLOPE)، ۰/۹۹ = ضریب تعیین (R^2).



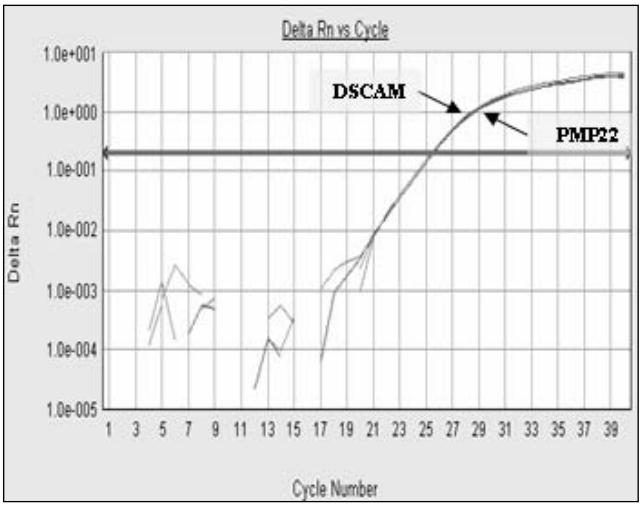
شکل ۴- منحنی تفکیک (ذوب) که بر اساس دما (محور افقی) و مشتق سیگنال فلورسنت دریافتی دستگاه Real-Time PCR (محور عمودی) ترسیم می‌شود. A منحنی تفکیک ژن مرجع *PMP22* را نشان می‌دهد که قطعه تکثیری مورد نظر در دمای ۷۶ درجه سانتی‌گراد دناتوره می‌شود. B منحنی تفکیک ژن هدف *DYRK1A2* است که قطعه تکثیری مورد نظر در دمای ۷۸ درجه سانتی‌گراد دناتوره می‌شود. C منحنی تفکیک ژن هدف *DSCAM* است که قطعه تکثیری مورد نظر در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد دناتوره می‌شود. D بیانگر عدم جفت شدن آغازگر (پرایمر دایمر) است. سطح زیر منحنی بیانگر میزان محصولات تکثیری حاصل از PCR است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

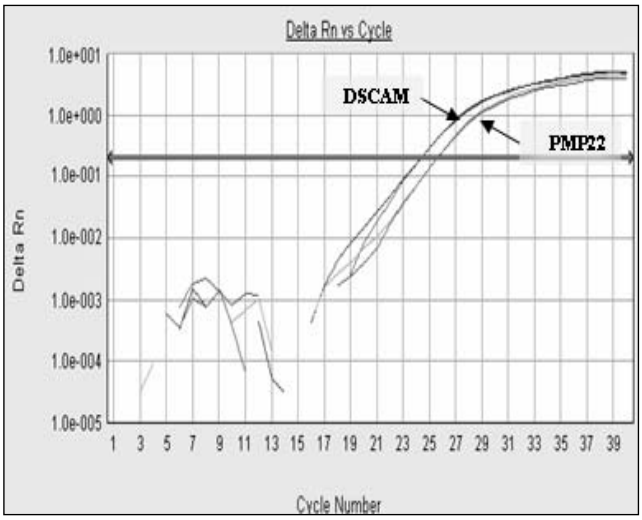
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.2.7]



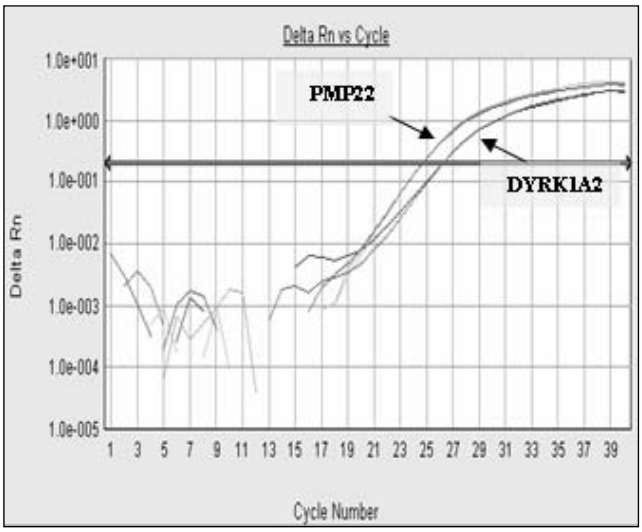
شکل ۵- الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد. چاهک ۴ واکنش NTC (عدم حضور DNA الگو) و باند چاهک‌های ۱ و ۵ و ۹ بیانگر محصولات تکثیری ژن هدف *DSCAM* را نشان می‌دهد. طول قطعه تکثیری ۱۰۰ جفت باز است. چاهک ۸ واکنش NTC (عدم حضور DNA الگو) و باند چاهک‌های ۲ و ۶ و۱۰ بیانگر محصولات تکثیری ژن هدف *DYRK1A2* را نشان می‌دهد. 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 ۱۰۰جفت بازی را نشان می‌دهد.



شکل ۶- منحنی تکثیری ژن *DSCAM* (Ct =۲۴/۵۷) و *PMP22* (Ct =۲۴/۶۰) در فرد کنترل نرمال. هر دو منحنی 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 فلورسنتی دریافتی =ΔRn $(Rn^+ - Rn^-, Rn^+=$).



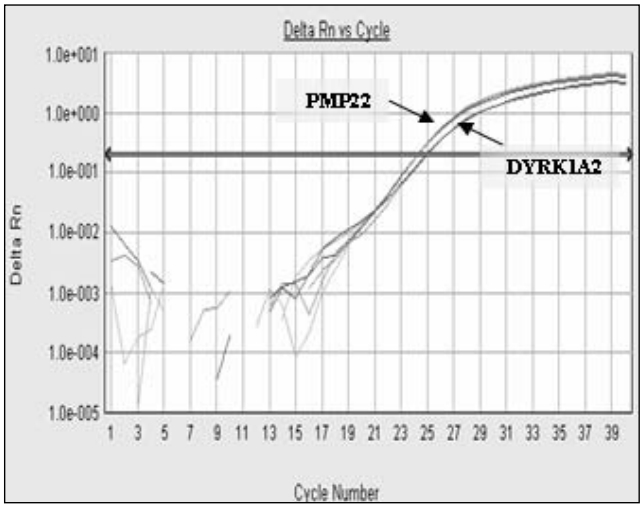
شکل ۷- منحنی تکثیری ژن *DSCAM* (Ct =۲۴/۳۰) و *PMP22* (Ct =۲۵/۴۸) در بیمار مبتلا به سندرم تریزومی۲۱. اختلاف منحنی تکثیری ژن *DSCAM* و *PMP22* به اندازه نیم سیکل آستانه است. (محور افقی تعداد سیکل‌های PCR و محور عمودی ΔRn را نشان می‌دهد. رنگ فلورسنت زمینه = Rn^-، کل رنگ فلورسنتی دریافتی=$(\Delta Rn= Rn^+ - Rn^-, Rn^+$).



شکل ۸- منحنی تکثیری ژن *DYRK1A2* (Ct =۲۶/۱۳) و *PMP22* (Ct =۲۶/۵۹) در فرد کنترل نرمال. هر دو منحنی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.2.7]

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 فلورسنتی دریافتی=Rn^+ ,$\Delta Rn= Rn^+ - Rn^-$).



شکل ۹- منحنی تکثیری ژن *DYRK1A2* (Ct =۲۴/۸۸) و *PMP22* (Ct =۲۴/۲۱) در بیمار مبتلا به سندرم تریزومی۲۱. 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=Rn^+ ,$\Delta Rn= Rn^+ - Rn^-$).

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.
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. Mysłek-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. Shahrokhi 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.2.7]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.2.7] [Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]