مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۹، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات ۹۳ تا ۹۶

Original Article

تشخیص سریع سندرم تریزومی ۲۱ با استفاده از تکنیک Real-time PCR کمی

احمد رضا کامیاب[۱]، ناصر مسروری[۲]، مینا حیات نوسعید[۲]، سمیه جمالی[۳]، مهرداد هاشمی[۴]، مرتضی کریمی‌پور[۵]، غلامرضا جوادی[۶]، رضا مهدیان[۵]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
[۲] کارشناس ارشد ژنتیک، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران
[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
[۴] استادیار، گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۵] استادیار، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران
[۶] دانشیار، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده

سابقه و هدف: *پیشگیری از تولد بیماران مبتلا به سندرم داون (تریزومی ۲۱) از اولویت‌های وزارت بهداشت می‌باشد. هدف این مطالعه، تشخیص سریع بیماران مبتلا به سندرم داون با استفاده از تکنیک Real-time PCR کمی به منظور پایه‌گذاری روشی جدید برای تشخیص قبل از تولد است.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، ابتدا از افراد مورد مطالعه نمونه خون گرفته شد. پس از استخراج DNA ژنومی، میزان ژن DYRK1A2 در لنفوسیت‌های افراد مبتلا به سندرم داون و طبیعی با تکنیک Real-time PCR کمی سنجش شد.*

یافته‌ها: *نسبت ژنی DYRK1A2/PMP22 در لنفوسیت‌های افراد طبیعی و بیماران مبتلا به تریزومی ۲۱ به ترتیب ۰/۰۹±۱ و ۰/۱۳±۱/۶۸ به دست آمد ($p<0/001$) که حضور سه کپی از ژن DYRK1A2 در افراد تریزومی ۲۱ را نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *نسبت ژنی DYRK1A2/PMP22 مبتلایان به سندرم داون به طور معنی‌داری بیشتر از افراد طبیعی است. بنابراین از تکنیک Real-time PCR کمی با استفاده از DNA ژنومیک می‌توان بعنوان روشی بسیار دقیق، معتبر و نوین در تشخیص سریع تریزومی ۲۱ استفاده کرد.*

واژگان کلیدی: *سندرم داون، تریزومی ۲۱، میزان ژنی، تشخیص سریع و پیش از تولد، Real-time PCR.*

مقدمه

سندرم داون (تریزومی ۲۱) یکی از ناهنجاری‌های کروموزومی شایع (۱ در هر ۸۰۰ تولد) است که تشخیص و پیشگیری از تولد بیماران مبتلا به این سندرم از اولویت‌های وزارت بهداشت می باشد. بیشتر مبتلایان در دوره جنینی یا اوایل نوزادی از بین می‌روند. مارتینز- فریاس گزارش داد که به نظر می‌رسد اولین شواهد مربوط به سندرم داون مربوط به تمدن تلتکا مکزیک در سال ۵۰۰ میلادی است (۱). علت زمینه‌ای اصلی بروز این بیماری در همه جمعیت‌ها و نژادها سن بالای مادر گزارش شده است. در مادران بالای ۴۵ سال خطر تولد نوزاد مبتلا به سندرم داون بسیار افزایش یافته و به ۱:۴۰ می‌رسد (۲). بیماران مبتلا به سندرم داون بیشتر از افراد طبیعی در معرض بیماری‌هایی چون لوسمی، آلزایمر زودرس، بیماریهای عفونی و مشکلات تنفسی قرار می‌گیرند

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، احمدرضا کامیاب
(**email**: kamyab10000@gmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۱۱/۲۹
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/٤/۳

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-30]

(۳،۴). در افراد بالغ، عموما علایم پیری زودرس به همراه کاهش فعالیت و عملکرد تیموس دیده می‌شود (۸-۵).

با توجه به اهمیت تشخیص پیش از تولد در پیشگیری از تولد کودکان مبتلا به این سندرم، روش‌های مختلف تشخیصی بکارگرفته شده است. روش آنالیز کروموزومی سیتوژنتیک یا شمارش کروموزومی (کاریوتیپ)، اولین روشی بود که در تشخیص تریزومی ۲۱ استفاده شد. در اواخر دهه ۸۰ میلادی برای شناسایی تریزومی ۲۱ تکنیک FISH معرفی شد (۱۱-۹). پس از ابداع تکنیک واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) و اتمام پروژه ژنوم انسان، روش‌های مولکولی نوینی جهت تشخیص و شناسایی افراد مبتلا به تریزومی ۲۱ ایجاد گردیدند. تکنیک QF-PCR یکی از روش‌های معمول است که بر مبنای تکثیر نشانگرهای مولکولی واقع بر کروموزوم ۲۱ عمل می‌کند (۱۲،۱۳). در حال حاضر علاوه بر روش‌های ذکر شده، از تکنیک Multiplex PCR نیز به عنوان روشی سریع در تشخیص تریزومی ۲۱ استفاده می‌شود (۱۴،۱۵). این روش‌ها در کنار مزایا و قابلیت‌های تشخیصی، محدودیت‌های خاص خود را دارند. لذا معرفی روشی مولکولی که در زمان کوتاه و با دقت زیاد امکان تشخیص تریزومی ۲۱، بویژه در بارداری‌های پر خطر را فراهم کند، ضروری به نظر می‌رسد. تحقیق حاضر به منظور بررسی توانایی تکنیک Real-time PCR در افتراق نمونه‌های بیماران مبتلا به تریزومی ۲۱ از نمونه‌های افراد سالم طراحی و اجرا گردید تا با استفاده از نتایج آن راه برای تشخیص قبل از تولد تریزومی ۲۱ هموارتر گردد.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، با همکاری آزمایشگاه‌های خصوصی ژنتیک و مراکز مشاوره، ۲۰ فرد مبتلا به سندرم داون انتخاب و پس از اخذ رضایت نامه از خانواده بیماران، از هر بیمار ۲ میلی‌لیتر خون محیطی گرفته شد. هم‌چنین ۱۰ فرد طبیعی نیز به عنوان گروه شاهد بررسی شدند.

استخراج DNA از خون محیطی با استفاده از روش رسوب گذاری با نمک اشباع انجام شد. در این روش ابتدا نمونه خون با آب مقطر سرد (۴ درجه سانتی‌گراد) شستشو شد. پس از مرحله یخچال، با دستگاه سانتریفوژ (eppendorfe 4804R) لنفوسیت‌ها را رسوب داده و به آن بافر لیز کننده هسته (NaCl 150 mM, Tris 15mM, EDTA 10 mM PH=7.5)، شوینده SDS ده درصد، آنزیم پروتئیناز K (20 mg/ml) افزوده و به صورت شبانه انکوبه شد. پس از افزودن کلریدسدیم ۶ مولار و سانتریفوژ، به ترتیب اتانول ۹۶ و ۷۰ درصد (Merk) اضافه گردید. در نهایت به DNA استخراج شده بافر TE (Tris 10 mM , EDTA 1 mM , PH=7-8) افزوده و انکوباسیون انجام گرفت. سپس غلظت DNA تخلیص شده با دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (ND-1000) تعیین گردید.

در طراحی پرایمر، پس از اخذ توالی ژن‌های هدف و مرجع، برای ژن DYRK1A2 مستقر در ناحیه اساسی (Critical Region) کروموزوم ۲۱ (21q2.22) به عنوان ژن هدف، و ژن PMP22 واقع بر کروموزوم ۱۷ (17p11.2) به عنوان ژن مرجع پرایمرهای مناسب طراحی شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- توالی و نوع الیگونوکلئوتیدهای ژن هدف و مرجع.

نام ژن	نوع الیگونوکلئوتید	توالی پرایمر
PMP22	Fw	GGAGGAGAGAAGGCTTGAATGC
PMP22	Rv	GTTCCACATGCACACAGAAACG
DYRK1A2	Fw	AATGGTGTGCACAGGATGTGAAC
DYRK1A2	Rv	ATTCCGGTGAAACAAGTCATGAAG

در این مطالعه از دستگاه Real-time PCR مدل ABI 7300 استفاده شد. واکنش Real-time-PCR کمی با استفاده از DNA ژنومی به صورت سه‌تایی (Triplicate) در پلیت ۹۶ چاهکی و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش‌ها شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Sybr-Green Master Mix (Applied Biosystems)، یک میکرولیتر از هر پرایمر Forward و Reverse اختصاصی ژن‌های مورد نظر و ۱۰نانوگرم DNA ژنومیک بود. به این مخلوط آب مقطر افزوده شد تا به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برسد. برنامه زمانی-گرمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد. مرحله اول ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ سیکل متوالی و مرحله نهایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد.

در آنالیز کمی Real-time PCR، بر اساس سیکل‌های آستانه (Ct) به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سندرم داون) و نمونه‌های شاهد (طبیعی) و با استفاده از فرمول ΔΔCt، نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق $ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید.

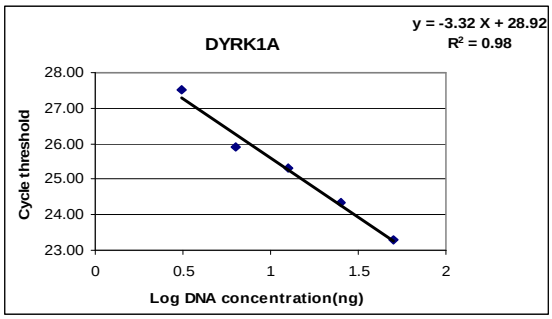
جهت محاسبات آماری از برنامه Excel شرکت میکروسافت، Student T-test و بسته نرم افزاری (SDS v 2.1) Real-time PCR ABI7300 استفاده گردید.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-30]

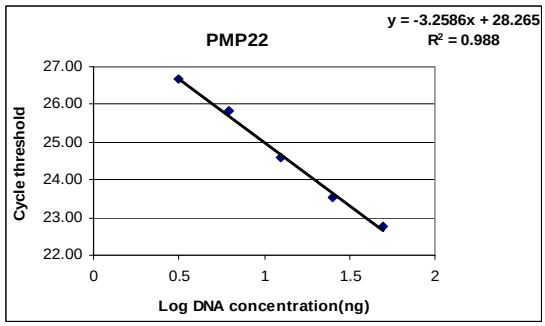
یافته‌ها

برای تعیین کیفیت واکنش‌های انجام شده توسط دستگاه Real-time PCR، رسم منحنی استاندارد (Standard curve) لازم و ضروری است. بنابراین از رقت‌های متوالی DNA استاندارد (طبیعی) جهت ترسیم منحنی استاندارد استفاده شد. نسبت ژنی DYRK1A2/PMP22 در لنفوسیت‌های افراد طبیعی و بیماران مبتلا به تریزومی ۲۱ به ترتیب ۱±۰/۰۹ و ۱/۶۸±۰/۱۳ به دست آمد ($p<0/001$) که حضور سه کپی از ژن DYRK1A2 در افراد تریزومی ۲۱ را نشان داد.

در این مطالعه میزان کارآیی واکنش زنجیره پلیمراز هر دو ژن هدف و مرجع ۹۹ درصد به دست آمد (نمودارهای ۱ و ۲).



نمودار۱- منحنی استاندارد ژن DYRK1A2، ۳/۳۲۴- = شیب خط، R^2 = ۰/۹۸



نمودار۲- منحنی استاندارد ژن PMP22، ۳/۳۵۸- = شیب خط، R^2 = ۰/۹۹

بحث

در این مطالعه بیماران مبتلا به سندرم داون و گروه شاهد طبیعی جهت سنجش نسبت ژنی با دستگاه Real-time PCR به صورت کمی مورد مطالعه قرار گرفتند. ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق شامل ژن هدف (DYRK1A2) واقع بر کروموزوم ۲۱ انسانی، و ژن مرجع (PMP22) واقع بر کروموزوم ۱۷ بودند. در این مطالعه، امکان تفکیک نمونه‌های بیماران مبتلا به سندرم داون از گروه شاهد طبیعی فراهم آمد و حضور سه کپی (نسخه) از کروموزوم ۲۱ در گروه بیماران تایید شد. این یافته علمی با روش‌های استاندارد متداول شامل آنالیز کروموزومی سیتوژنتیک (کاریوتیپ) تایید گردید.

از روش Real-time PCR در سنجش میزان بیان ژنی (۱۵) و سنجش میزان ژنی (۱۳،۱۷) در تشخیص تریزومی ۲۱ استفاده شده است. Yali Hu و همکارانش بر روی هفت نمونه بیمار مطالعه کردند و ژن GAPDH را به عنوان ژن مرجع انتخاب نمودند (۱۷) که بیشتر در مطالعات بیان ژنی استفاده می‌شود و برای مطالعات ژنومیک و سنجش میزان ژنی مناسب نمی‌باشد. انتخاب ژن مرجع در مطالعات سنجش میزان ژنی اهمیت بسیاری دارد، زیرا میزان ژن هدف نسبت به این ژن مقایسه و محاسبه می‌گردد. بنابراین بایستی میزان ژن هدف به صورت نرمال و دایزومی باشد. از این رو در مطالعه انجام شده ژن PMP22 به عنوان ژن مرجع انتخاب گردید. این ژن دارای ویژگی‌های لازم به عنوان ژن مرجع است و هر گونه تغییر در میزان ژنی (حذف یا اضافه شدن) به صورت فنوتیپ بیماری بارز می‌شود و نیازی به آزمایشات ژنتیک مولکولی جهت شناسایی افراد سالم برای این ژن نمی‌باشد. حذف در ژن PMP22 منجر به بیماری HNPP و مضاعف شدن منجر به بیماری شارکوت-ماری توث می‌شود.

در تشخیص بیماری سندرم داون از روش‌های متفاوتی استفاده می‌شود. در حال حاضر از روش‌های آنالیز سیتوژنتیک (کاریوتایپ) و تکنیک FISH به عنوان روشی استاندارد و دقیق در تشخیص بعد و پیش از تولد سندرم داون استفاده می‌شود. این روش‌ها دقت زیادی دارند، اما با این وجود از نظر بالینی بسیار کاربر، پرهزینه و زمان‌بر هستند. همچنین به سلول زنده جهت کشت سلولی نیاز دارند. در تکنیک QF-PCR پس از پروسه تکثیر با واکنش زنجیره پلیمراز، یک مرحله پساتکثیری نیز ضروری است، اما در تکنیک Real-time PCR نیاز به این مرحله نمی‌باشد و تمامی پروسه کاری در یک مرحله انجام می‌شود. همچنین در تکنیک HGQ-PCR با تکثیر دو ژن همولوگوس مثل فسفوفروکتوکیناز I کبدی و عضلانی (که بر روی کروموزوم ۱ و ۲۱ قرار دارند) و مقایسه کیفی شدت باندهای تکثیری، به میزان ژنی کروموزوم ۲۱ پی می‌برند. امروزه تکنیک‌های دقیق، آسان و سریع جایگزین تکنیک‌های دشوار و زمان‌بر شده‌اند. تکنیک Real-time PCR یکی از جدیدترین روش‌های مولکولی است که در زمینه‌های متفاوتی از آن استفاده می‌شود (۱۶،۱۸). از مزایای تکنیک Real-time PCR نسبت به روش‌های ذکر شده می‌توان دقت زیاد، حساسیت بالا، آسان بودن پروسه آزمایش، تشخیص بیماری در مدت زمان بسیار

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-30]

کم، بررسی و آنالیز هم‌زمان نمونه‌های زیاد (ظرفیت پذیری بالا) و عدم نیاز به سلول‌های زنده را نام برد.

از یافته‌های فوق نتیجه‌گیری می‌شود که تکنیک Real-time PCR یکی از جدیدترین روش‌های مولکولی است که قادر است با دقت زیاد، حساسیت بالا و در مدت زمان بسیار کم، نمونه‌های زیادی را به طور هم‌زمان و بدون نیاز به سلول‌های زنده آنالیز نماید. بنابراین می‌توان از این تکنیک به عنوان روشی دقیق، قابل اعتماد و با حساسیت بالا در تشخیص سریع سندرم تریزومی ۲۱ استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از بیماران، خانواده محترم آنها و از همکاران گرامی در بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران کمال تشکر را داریم. قابل ذکر است که این پروژه با شماره ثبت ۴۱۷ و کمک هزینه مالی انستیتو پاستور ایران انجام یافته است.

REFERENCES

1. Martinez-Frias ML. The real earliest historical evidence of Down syndrome. Am J Med Genet A 2005;132:231.
2. Mueller RF, Young ID. Emery's elements of medical genetics. Edinburgh Übersicht: Churchill Livingstone; 1995.
3. Epstein CJ. The consequences of chromosome imbalance Principles, mechanisms, and models. In: Barlow P, Green PB, Wylie CC, editors. The consequences of chromosome imbalance Principles, mechanisms, and models. Cambridge: Cambridge University Press; 1986.
4. King RA, Rotter JI, Motulsky AG. The genetic basis of common diseases. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2002.
5. Larocca LM, Valitutti S, Castellino F, Maggiano N, Musiani P. Alterations in thymocyte subpopulations in Down's syndrome (trisomy 21). Clin Immunol Immunopathol 1988;49:12.
6. Lau LL, Spain LM. Altered aging-related thymic involution in T cell receptor transgenic, MHC-deficient, and CD4-deficient mice. Mech Ageing Dev 2000;114:101-21.
7. Rabinowe SL, George KL, Adri MN, Eisenbarth GS. Trisomy 21 (Down's syndrome): autoimmunity, aging and monoclonal antibody-defined T-cell abnormalities. J Autoimmun 1989;2:6.
8. Seger R, Stroder J. On the influence of age on immunity in Down's syndrome. Eur J Pediatr 1977;124:11.
9. Acar H, Yildirim MS, Kaynak M. Reliability and efficiency of interphase-fish with alpha-satellite probe for detection of aneuploidy. Genet Couns 2002;13:11-17.
10. Li F, Wu B, Wang J, Zhong H, Heng W. Molecular cytogenetic detection of trisomy 21 in interphase nuclei and metaphase chromosomes. Chin Med J (Engl) 1999;112:5.
11. Witters I, Legius E, Matthijs G, van Schoubroeck D, van Assche FA, Fryns JP. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 in 5049 consecutive uncultured amniotic fluid samples by fluorescence in situ hybridisation (FISH). Prenat Diagn 2002;22:5.
12. Mansfield ES. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. Hum Mol Genet 1993;2:43-50.
13. Yang YH, Yang ES. 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 J 2005;46:5.
14. Blake D, Tan SL, Ao A. Assessment of multiplex fluorescent PCR for screening single cells for trisomy 21 and single gene defects. Mol Hum Reprod 1999;5:1166-75.
15. Findlay I, Toth T, Quirke P, Papp Z. Same day diagnosis of Down's syndrome and sex in single cells using multiplex fluorescent PCR. Mol Pathol 1998;51:4.
16. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol 2000;25:169-93.
17. Hu Y, Zheng M, Xu Z, Wang X, Cui H. Quantitative real-time PCR technique for rapid prenatal diagnosis of Down syndrome. Prenat Diagn 2004;24:704-707.
18. ponchel F, Leong FT, Douglas SH. Real-time PCR on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangement, gene amplifications and micro gene deletions. BMC Biotechnol 2005;3:18.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-30]