

بررسی تنوع ژنتیکی مارکر rs438601 در جمعیت اصفهان: یک مارکر آنکاها دهنده در تشخیص‌های مولکولی هموفیلی B

^{۱*}پریسا دری^۱، امین کریمی^۲، صادق ولیان بروجنی^{*}

۱- کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استاد گروه ژنتیک، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۳۰

چکیده

مقدمه: هموفیلی B یک بیماری ژنتیکی خونریزی دهنده مغلوب وابسته به جنس ناشی از جهش در ژن فاکتور IX انعقادی است. جهش‌ها در ژن فاکتور IX باعث ناکارآمدی یا عملکرد نادرست فاکتور IX انعقادی می‌شوند. روش ایده‌آل برای تشخیص مولکولی این بیماری آنالیز مستقیم جهش‌های ژنی است. اما با توجه به تعداد بالای جهش‌های شناسایی شده در ژن مزبور، مشخص نبودن طیف جهش‌های شایع آن، اندازه بزرگ ژن و طبیعت ناهمگن جهش‌ها، آنالیز مستقیم جهش بسیار وقت‌گیر و پرهزینه است. بنابراین بررسی غیرمستقیم جهش‌ها با روش آنالیز پیوستگی با استفاده از مارکرهای چندشکلی در ناحیه ژنی فاکتور IX گزینه مناسبی در تشخیص پیش از تولد و تشخیص ناقلین هموفیلی B می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه مارکر چندشکلی تکنوکلئوتیدی rs438601 در اینترون ۳ ژن فاکتور IX با روش Tetra-primer ARMS-PCR با پرایمرهای اختصاصی جدیداً طراحی شده در ۱۴۲ زن کنترل غیرخویشاوند در جمعیت اصفهان تعیین ژنتیک شد. سپس از نرمافزار GENEPOL برای تعیین فراوانی آللی و درصد هتروزیگوستی و از آزمون χ^2 برای بررسی تعادل هاردی-وینبرگ استفاده شد.

نتایج: فراوانی آللی برای آلل‌های C و G به ترتیب ۰.۷۱/۸۳٪ و ۰.۲۸/۱۷٪ محاسبه شد. هتروزیگوستی مشاهده شده ۰.۵۳/۵۲٪ می‌باشد. بررسی تعادل هاردی-وینبرگ نشان می‌دهد که جمعیت اصفهان برای مارکر rs438601 در تعادل است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که مارکر rs438601 به علت هتروزیگوستی بالا می‌تواند به عنوان مارکر تشخیصی مناسب برای آنالیز پیوستگی و شناسایی ناقلین هموفیلی B در نمونه‌ای از جمعیت ایرانی معرفی شود.

واژه‌های کلیدی: هموفیلی B، ژن فاکتور IX، rs438601، جمعیت اصفهان

* (نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۳۱۳-۷۹۳۲۴۵۶، پست الکترونیکی: svallian@sci.ui.ac.ir)

مقدمه

مارکرهای با میزان هتروزیگوستی بالا و درجه بالایی از گوناگونی ژنتیکی هستند^(۸). قابل توجه است که بررسی پلیمورفیسم DNA محدود به خانواده‌هایی می‌شود که بیماری در آن خانواده ارثی است و از نوع جهش ژئی جدید نیست^(۶). در بررسی ژن فاکتور IX جایی که هیچ توالی بسیار متغیر(Hypervariable) داخل یا نزدیک ژنی وجود ندارد، ۱۰ تا ۱۵٪ از خانواده‌ها هنوز احتیاج به مطالعات تشخیصی با مارکرهای خارج ژنی پیوسته یا تشخیص موتاسیون مستقیم برای دسترسی به نتایج آگاهی‌دهنده دارند^(۷).

تخمین زده می‌شود که مارکرهای چندشکلی (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) تکنوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism) به طور متوسط یک در هر ۱۰۰۰ جفت باز ژنوم رخ می‌دهند و ۹۰٪ از تنوعات توالی DNA در ژنوم انسان را تشکیل می‌دهند. SNPs(Mutational stability) تعداد زیاد و پایداری جهشی آنها را مارکرهای DNA مفیدی برای مطالعات ژنتیک جمعیت و برای نقشه‌یابی ژن‌های مستعد بیماری برای بیماری‌های پیچیده ساخته است. مطالعه عوامل تعیین‌کننده ژنتیکی بیماری‌های پیچیده توسط روش‌های آسان، سریع، ارزان و با عملکرد بالا برای تعیین ژنوتیپ SNP، آسان شده‌اند^(۹). ژن فاکتور IX انسان نیز شامل چندین SNP است که بیشتر آنها به زیرگروه قطعات چندشکلی حاصل از هضم آنزیمی RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisms تعلق دارند^(۱۰). با پیشرفت تکنیک‌های قوی در تشخیص SNPs، پیشنهاد شده است که SNPs می‌توانند برای نقشه‌یابی پیوستگی نامتعادل تمام ژنوم بیماری‌های رایج استفاده شوند.

فراوانی آللی و درجه هتروزیگوستی مارکرهای چندشکلی معمولاً در جمعیت‌های مختلف متفاوت است. بنابراین به منظور مشخص نمودن مناسب بودن یک مارکر SNP جهت غربالگری(Screening) ژنوم در یک جمعیت، لازم است ابتدا وضعیت آن مارکر از لحاظ هتروزیگوستی و تنوع آللی به طور ویژه بررسی شود^(۱۱).

هموفیلی B یک بیماری خونریزی دهنده مغلوب وابسته به X است که توسط کمبود یا ناهنجاری فاکتور IX انعقادی ایجاد می‌شود. این بیماری به طور عمده در اثر جهش در ژن فاکتور IX ایجاد می‌شود^(۱,۲). شیوع آن ۱ در ۲۵ تا ۳۰ هزار پسر متولد شده زنده می‌باشد^(۲,۳). ژن فاکتور IX یک گلیکوپروتئین ۴۱۵ آمینواسیدی را رمز می‌کند که به طور طبیعی در پلاسمما وجود دارد و یک جز ضروری از آثار ایجادی می‌باشد. این پروتئین یک سرین پروتئاز وابسته به ویتامین K است^(۴).

جهش‌های بیماری‌زای مختلفی در ژن فاکتور IX در جمعیت‌های مختلف شناسایی شده است. این دامنه وسیع از جهش‌ها، نشان دهنده ناهمگنی مولکولی وسیع در بیماران هموفیلی B می‌باشد^(۱). گرچه مردان بیمار از زنان ناقل متولد می‌شوند، اما بیش از ۵۰٪ از موارد به عنوان نتیجه جهش‌های جدید می‌باشند. بیش از ۱۰۰۰ جهش بیماری‌زای مختلف که منجر به بیماری هموفیلی B می‌شوند در انسان گزارش شده است. به علاوه، حدود ۳٪ از بیماران هموفیلی B حذف‌های بزرگ در ژن فاکتور IX انعقادی دارند^(۳).

تشخیص ناقلين زن و تشخیص پیش از تولد بیماری هموفیلی B می‌تواند در سطح وسیعی از خانواده‌ها با استفاده از تشخیص مستقیم جهش‌های بیماری‌زا(Causative mutations) در ژن فاکتور IX و یا روش غیر مستقیم توسط آنالیز پیوستگی انجام شود^(۵). به دلیل اندازه بزرگ و پیچیدگی ژن فاکتور IX و طبیعت ناهمگن(Heterogenous) جهش‌ها، روش مستقیم زمان بر و گران قیمت است^(۶,۷). بنابراین، بررسی پلیمورفیسم‌های ژن فاکتور IX مناسب‌ترین راه برای تشخیص پیش از تولد و تشخیص ناقلين هموفیلی B به نظر می‌رسد. خصوصاً در مواردی که شناسایی جهش ژن به آسانی امکان‌پذیر نبوده یا جهش ناشناخته باشد^(۶). با استفاده از آنالیز پیوستگی، جهش ژنی (کروموزوم دارای جهش) در یک شجره‌نامه خاص توسط یک مارکر پیوسته دنبال می‌شود. لازم است مارکر مورد استفاده آگاهی‌دهنده باشد. بهترین مارکرهای آگاهی‌دهنده،

نتایج این مطالعه می‌تواند در تشخیص‌های پیش از تولد هموفیلی B و همچنین تقویت اطلاعات ساختاری ژنتیکی جمعیت ایرانی مورد استفاده قرار گیرد. نمونه‌های استفاده شده در این مطالعه مربوط به جمعیت اصفهان می‌باشد.

روش بررسی

از آنجایی که در مطالعات بررسی عدم تعادل پیوستگی نمونه‌ای به اندازه ۱۰۰ فرد غیرخوشاوند ضروری است(۱۵)، در مطالعه حاضر، نمونه‌گیری خون از ۱۴۲ زن غیرخوشاوند سالم از نظر بیماری هموفیلی B در جمعیت اصفهان انجام شد، نمونه‌گیری به طور تصادفی انجام شد. نمونه‌ها کلاً از جمعیت اصفهان گرفته شده‌اند و به عنوان نمونه‌ای از جمعیت ایران در نظر گرفته شدند. به این صورت که پس از کسب رضایت‌نامه کتبی از تمام افراد، ۱۰ میلی‌لیتر خون تام فرد در لوله حاوی یک میلی‌لیتر از EDTA با غلظت ۰/۵M جمع‌آوری و پس از ثبت اطلاعات افراد بر روی آن تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در استخراج DNA ژنومی از خون، از DNA روش رسوب نمک استفاده شد. برای بررسی خلوص ژنومی به روش کیفی از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد و بر اساس شدت باندها مقدار نمونه مورد استفاده جهت انجام واکنش PCR مورد تخمین قرار گرفت. ارزیابی کمی DNA ژنومی با استفاده از میزان جذب نور محلول حاوی DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر به دست آمد. در این مطالعه با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی (پایگاه داده‌های ALFRED، SNPper و NCBI) مارکرهای واقع در ناحیه ژنی فاکتور IX بررسی شدند و از بین مارکرهای موجود، مارکر چند شکلی تک نوکلئوتیدی rs438601 در اینtronون شماره ۳ ژن فاکتور IX با توالی C/G جهت مطالعه بیشتر انتخاب گردید (۱۴-۱۲).

نمونه‌های DNA ژنومی، با روش Tetra-primer ARMS-PCR(Tetra-primer Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction) تعیین ژنوتیپ شدند. تکنیک Tetra-primer ARMS-PCR یک روش سریع، آسان و ارزان قیمت برای تعیین ژنوتیپ

به هر حال با توجه به تعداد بالای جهش‌های شناسایی شده در ژن فاکتور IX و مشخص نبودن طیف جهش‌های شایع آن، بررسی مارکرهای چند شکلی در ناحیه ژنی فاکتور IX گزینه مناسبی در تشخیص پیش از تولد و تشخیص ناقلين بیماری هموفیلی B در جمعیت ایرانی می‌باشد. در این رابطه شناسایی مارکرهایی با میزان هتروزیگوستی و تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت ایرانی ضروری می‌باشد. با توجه به این که تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر بررسی مارکرهای آگاهی‌دهنده مرتبط با ژن فاکتور IX در جمعیت اصفهان نشده است، بنابراین مطالعه حاضر به بررسی ویژگی‌های یکی از مارکرهای این ژن در جمعیت اصفهان می‌پردازد. در پایگاه داده‌ها (ALFRED و NCBI) مارکرهای مختلفی در ناحیه ژنی فاکتور IX معرفی شده است که پس از بررسی بیوانفورماتیکی این مارکرها، مارکر چند شکلی تک نوکلئوتیدی rs438601 با توالی C/G واقع در اینtron شماره ۳ ژن فاکتور IX جهت مطالعه بیشتر خصوصیات و آگاهی‌دهنده‌ی مارکر در جمعیت اصفهان انتخاب گردید(۱۴-۱۲).

در مطالعه‌ای در ایران توسط Ghandil و همکاران فراوانی آلی و درصد هتروزیگوستی مارکر مزبور با روش PCR/RFLP با استفاده از هضم آنزیمی با XmnI در ۱۰۰ زن ناقل ایرانی (با حداقل یک فرزند بیمار هموفیلی B) محاسبه شد(۲). به علاوه در یک مطالعه در جمعیت هندی بر روی مارکر rs438601 با روش PCR/RFLP توسط Chowdhury و همکاران، فراوانی آل مغلوب و هتروزیگوستی مارکر rs438601 در افراد بیمار و خانواده‌شان نشان داده شد(۷). در پایگاه داده ALFRED، برای جمعیت آفریقایی، جمعیت اروپایی، جمعیت هندی، جمعیت بزریلی و جمعیت مالزیایی گزارش شده است(۱۲). همچنین در پایگاه داده SNPPer فراوانی آل C و G و درصد هتروزیگوستی rs438601، در جمعیتی از نیجریه، جمعیتی از ژاپن، جمعیتی از چین و در ساکنین ایالت اوتاوا(Utah) (در آمریکای شمالی) با تباری از شمال و غرب اروپا گزارش شده است(۱۳).

بررسی قرارگرفت(۹،۱۷). توالی چهار پرایمر داخلی پیشرو(PI: Forward Innerprimer) آلل C، خارجی پیرو(RO: Reverse outerprimer) آلل C، خارجی پیشرو(FO: Forward Outerprimer) آلل G، داخلی پیرو(RI: Reverse Innerprimer) آلل G در جدول ۱ نشان داده شده است. با انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) دو پرایمر خارجی FO و RO محصولی جهت کنترل مثبت ایجاد می‌کنند، همچنین پرایمرهای FI و RO آلل C و پرایمرهای RI و آلل G را تکثیر می‌کنند. اندازه محصول برای آلل C ۱۸۶، آلل G ۲۸۳ و دو پرایمر خارجی: ۴۲۰ می‌باشد.

چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی می‌باشد. در این تکنیک از دو جفت پرایمر برای تکثیر دو آلل مختلف یک SNP در یک واکنش PCR منفرد استفاده می‌شود. دو پرایمر خارجی در فاصله‌های متفاوت از نوکلئوتید چند شکل قرار گرفته‌اند به طوری که دو آلل گوناگون با اندازه مختلف مخفف را ایجاد می‌نمایند. بنابراین می‌توان دو آلل مختلف SNP را بر اساس اختلاف اندازه‌ای که دارند به کمک الکتروفورز بر روی ژل شناسایی نمود(۹،۱۶). با استفاده از پایگاه‌های NCBI و Primer1 چهار پرایمر برای تکثیر مارکر rs438601 طراحی شد و سپس با استفاده از نرمافزار Oligo نسخه ۷/۵۶ صحت این پرایمرها مورد

جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده استفاده در روش Tetra-primer ARMS-PCR

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی > 3'(5')	طول پرایمر	(°C) Tm
FI (داخلی پیشرو آلل C)	AGTCCTCCTCATTATCATGGCCGAC	۲۵	۶۰/۱
RO (خارجی پیرو آلل C)	AGAAACAGCCAGATAAAGCCTCC	۲۳	۶۱/۴
FO (خارجی پیشرو آلل G)	CAGTCCAACCCTCTAACCCA	۲۰	۶۰/۵
RI (داخلی پیرو آلل G)	GGGAAGGACAATCATGGAAGGGCATC	۲۶	۶۲/۱

RO: Reverse outer primer; FO: Forward outer primer; RI: Reverse inner primer, FI: Forward inner primer;

از ۱۰ µl (۱۰X) PCR Buffer (۵۰ mM MgCl₂) و ۱ µl از ۱ µl (۱۰X) dNTP mix (۵U/µl)، ۱ µl از Chromosome DNA و ۰.۵ µl Eppendorf (آلمان) طبق جدول ۲ انجام شد. کلیه محصولات واکنش بر روی ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۸۲ ولت رانده شد و ژل به دست آمده با دستگاه ژل داکیومنتیشن عکسبرداری شد.

PCR بر روی نمونهای DNA ژنومی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) شرایط واکنش PCR شامل: ۱ µl از پرایمر FI (۱۰ Pm)، ۱/۲ µl از پرایمر RI (۱۰ Pm)، ۰.۳ µl از پرایmer FO (۱۰ Pm)، ۰.۳ µl از Taq DNA Polymerase (۱۰ Pm)، ۰.۵ µl از dNTP mix (۵U/µl)، ۱/۵ µl از ۰.۵ mM dNTP و ۰.۵ µl از ۱۰ mM PCR Buffer است.

جدول ۲: برنامه بهینه شده نهایی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر مارکر rs438601

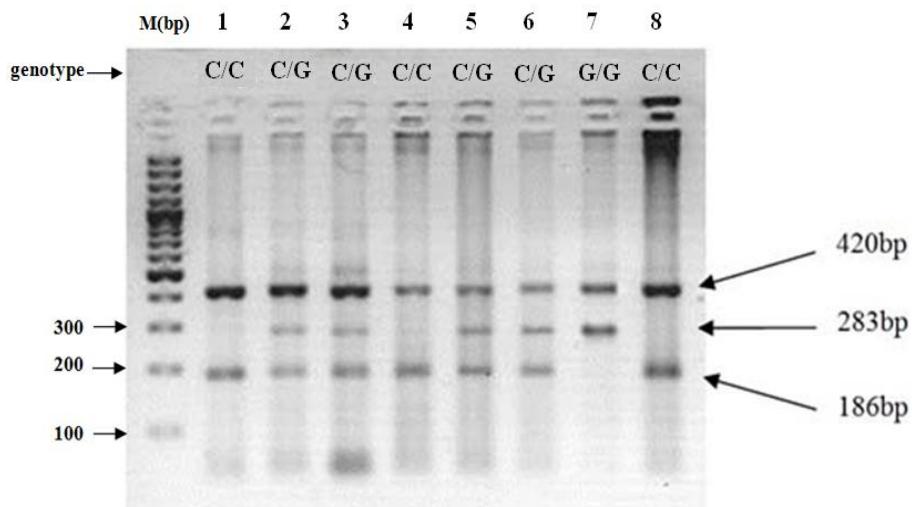
مرحله	دما (°C)	مدت زمان
Primery Denaturation -۱	۹۴	۵ دقیقه
Denaturation -۲	۹۴	۳۰ ثانیه
Annealing -۳	۶۴	۵۰ ثانیه
Extension -۴	۷۲	۵۰ ثانیه
Final Extension -۶	۷۲	۱۰ دقیقه
-۵- تکرار مرحله شماره ۲ تا ۴ (۳۰ سیکل)		

جفتگیری تصادفی بدون انتخاب، جهش، یا مهاجرت فراوانی‌های آللی و فراوانی‌های ژنتیکی از نسلی به نسل دیگر ثابت هستند و به علاوه یک ارتباط ساده بین فراوانی‌های آللی و فراوانی‌های ژنتیکی وجود دارد (۱۹، ۲۰).

نتایج

نمونه‌های DNA با روش Tetra-primer ARMS-PCR برای مارکر rs438601 تعیین ژنتیک شدند (شکل ۱).

داده‌های به دست آمده از تعیین ژنتیک افراد شامل تخمین فراوانی آللی، درجه هتروزیگوستی و فراوانی ژنتیکی مشاهده شده و مورد انتظار فنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت با استفاده از نرم‌افزار پایگاه GENEPOP تجزیه و تحلیل شد (۱۸). تعادل هاردی-وینبرگ (Hardy-Weinberg Equilibrium Chi square) با استفاده از آزمون χ^2 برای جایگاه مارکر rs438601 در جمعیت اصفهان بررسی شد. تعادل هاردی وینبرگ بیان می‌کند که در جمعیتی با



شکل ۱: تعیین ژنتیک مارکر rs438601 با روش Tetra-primer ARMS-PCR در نمونه‌ای از جمعیت ایران (جمعیت اصفهان). محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۰/۲٪ تکیک شدند. هر ستون نشان‌دهنده نمونه PCR یک فرد است. اندازه محصول PCR برای آلل C ۲۸۳bp و آلل G ۲۸۳bp و دو پرایمر خارجی به عنوان کنترل ۴۲۰bp می‌باشد که در سمت راست شکل قابل مشاهده است.

۱- تعداد افراد مشاهده شده و مورد انتظار در هر ژنتیک که در جدول ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود از ۱۴۲ فرد، ۶۴ نفر ژنتیک C/G و ۷۶ نفر ژنتیک C/G داشتند.

پس از تعیین آلل‌های ۱۴۲ زن کنترل غیرخویشاوند در جمعیت اصفهان، ژنتیک افراد مطالعه به صورت فایل ورودی به پایگاه اینترنتی GENEPOP داده شد. نتایج حاصل شامل سه قسمت بود:

جدول ۳: بررسی ژنتیک مارکر rs438601 در نمونه‌ای از جمعیت ایران (جمعیت اصفهان)

ژنتیک	ژنتیک‌های مشاهده شده	ژنتیک
۷۳/۱۶۶۱	۶۴	C و C
۵۷/۶۶۷۸	۷۶	C و G
۱۱/۱۶۶۱	۲	G و G

۰.۵۳/۵۲٪ می‌باشد. در حالی که هتروزیگوستی مورد انتظار برای جمعیت اصفهان ۰.۴۰/۶۱٪ محاسبه شد. به دنبال آن هموزیگوستی مشاهده شده برای جمعیت اصفهان ۰.۴۶/۴۷٪ می‌باشد. در صورتی که هموزیگوستی مورد انتظار جمعیت اصفهان ۰.۵۹/۳۸٪ بود.

۲- فراوانی آللی مارکر rs438601، به طوری که فراوانی مشاهده شده برای آلل‌های C و G به ترتیب ۰.۷۱/۸۳٪ و ۰.۲۸/۱۷٪ بود.

۳- هتروزیگوستی و هموزیگوستی مشاهده شده و مورد انتظار در جدول ۴ نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می‌شود هتروزیگوستی مشاهده شده در جمعیت اصفهان

جدول ۴: فراوانی آللی و درصد هتروزیگوستی و هموزیگوستی مارکر rs438601 در نمونه‌ای از جمعیت ایران (جمعیت اصفهان)

آلل	فراوانی	مشاهده شده	موردنظر	مشاهده شده	هموزیگوستی (درصد)	موردنظر	مشاهده شده	هموزیگوستی (درصد)
C	۰/۷۱۸۳	۵۳/۵۲۱	۰/۶۱	۴۶/۴۷۸	۰.۵۹/۳۸۸	G	۰/۲۸۱۷	

جمعیت اروپایی ۰.۷۸٪ و ۰.۲۲٪، برای جمعیت هندی ۰.۹۴٪ و ۰.۶٪، برای جمعیت بزریلی ۰.۹۷٪ و ۰.۳٪ و برای جمعیت مالزیایی ۰.۱۰۰٪ و ۰٪ گزارش شده است(۱۲). همچنین براساس اطلاعات پایگاه داده SNPPer فراوانی آلل C و G، در جمعیتی از نیجریه ۰.۹۵٪ و ۰.۵٪، در جمعیتی از ژاپن و نیز در جمعیتی از چین ۰.۱۰۰٪ و ۰٪ و در ساکنین ایالت اوتاوا(Utah) (در آمریکای شمالی) با تباری از شمال و غرب اروپا ۰.۷۹٪ و ۰.۲۱٪ گزارش شده است(۱۳). مقایسه نتایج به دست آمده از این مطالعه با اطلاعات موجود در پایگاه داده ALFRED و SNPPer نشان می‌دهد که فراوانی آلل C در جمعیت اصفهان کمتر از سایر جمعیت‌ها است، در حالی که فراوانی آلل G بیشتر از سایر جمعیت‌ها است. همچنین در مطالعه‌ای در ایران توسط Ghandil و همکاران فراوانی آللی مارکر مزبور با روش PCR/RFLP با استفاده از هضم آنزیمی با XmnI در ۱۰۰ زن ناقل ایرانی (با حداقل یک فرزند بیمار هموفیلی B) محاسبه شد و فراوانی آلل مغلوب است(۲). به علاوه در یک مطالعه در جمعیت هندی بر روی مارکر rs438601 با روش PCR/RFLP توسط Chowdhury و همکاران فراوانی آلل مغلوب (G)، ۰.۱۸٪ در افراد بیمار و خانواده‌شان نشان داده شد(۷).

همچنین در این مطالعه تعادل هاردی-وینبرگ برای جایگاه مارکر rs438601 در جمعیت ایران توسط آزمون χ^2 بررسی شد. بدین منظور پس از تخمین فراوانی ژنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت مارکر با استفاده از سایت اینترنتی GENEPOP، مقدار χ^2 محاسبه گردید و با مقدار χ^2 حاصل از جدول احتمال با درجه آزادی ۱ و $p < 0.05$ مقایسه گردید. مقدار χ^2 محاسبه شده برای مارکر rs438601 از مقدار χ^2 حاصل از جدول احتمال با درجه آزادی ۱ و $p < 0.05$ کوچکتر بود. نتایج نشان می‌دهد که مارکر rs438601 در جمعیت اصفهان در تعادل هاردی-وینبرگ قرار دارد.

بحث

این مطالعه به منظور بررسی خصوصیات مارکر rs438601 در جمعیت اصفهان به عنوان نمونه‌ای از جمعیت ایرانی انجام شده است که خود به انتخاب مناسب مارکرهای مورد استفاده در تشخیص مولکولی جهش‌های ژن فاکتور IX به روش غیرمستقیم کمک می‌نماید. در مطالعه حاضر نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ مارکر rs438601 نشان دهنده آلل C (آلل غالب) با فراوانی ۰.۷۱/۸۳٪ و آلل G (آلل مغلوب) با فراوانی ۰.۲۸/۱۷٪ می‌باشند. بر اساس اطلاعات پایگاه داده ALFRED فراوانی آلل C و G، برای جمعیت آفریقایی به ترتیب ۰.۸۸٪ و ۰.۱۲٪، برای

با مقدار χ^2 حاصل از جدول احتمال با درجه آزادی ۱ و $p < 0.05$ مشخص شد که این مارکر در جمعیت اصفهان در تعادل هاردی-وینبرگ قرار دارد. این موضوع نشان می‌دهد که به احتمال زیاد عوامل بر هم زننده تعادل هاردی-وینبرگ همانند جهش، انتخاب، رانش ژئی و ازدواج‌های غیرتصادفی در این جمعیت برای جایگاه مارکر rs438601 اثر قابل توجهی نداشتند.

در مجموع، با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، مارکر rs438601 واقع در ناحیه ژئی فاکتور IX به دلیل فراوانی آلی و درجه هتروزیگوستی بالا می‌تواند به عنوان مارکر تشخیصی مناسب در آنالیز پیوستگی و شناسایی جهش‌های بیماری‌زا در بیماری هموفیلی B معرفی شود. همچنین این مارکر می‌تواند در ایجاد بانک اطلاعاتی مارکرهای ایرانی جهت مطالعات جمعیت‌شناسی مولکولی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان جهت تأمین بودجه این پژوهش در قالب پژوهانه تشکر و قدردانی می‌گردد. قابل ذکر است که این مقاله منتج از پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی خانم پریسا دری می‌باشد.

درصد هتروزیگوستی مشاهده شده برای مارکر rs438601 در جمعیت اصفهان $0.53/52\%$ است که بیشتر از درصد هتروزیگوستی مورد انتظار ($0.40/61\%$) می‌باشد. بر اساس اطلاعات پایگاه داده ALFRED هتروزیگوستی مورد انتظار در جمعیت آفریقایی 0.21% ، در جمعیت اروپایی 0.34% ، در جمعیت هندی 0.11% ، در جمعیت بزریلی 0.06% و در جمعیت مالزیایی 0.0% می‌باشد(۱۲). همچنین بر اساس اطلاعات پایگاه داده SNPPer درصد هتروزیگوستی در جمعیتی از نیجریه 0.02% ، در جمعیتی از ژاپن و نیز در جمعیتی از چین 0.0% و در ساکنین اوتاوا با تباری از شمال و غرب اروپا 0.09% می‌باشد(۱۳). بررسی هتروزیگوستی در ایران توسط Ghandil و همکاران هتروزیگوستی 0.38% را برای مارکر مذبور نشان داد(۲). Chowdhury و همکاران در جمعیت هندی هتروزیگوستی rs438601 را در افراد بیمار و خانواده‌شان 0.23% به دست آوردند(۷). بر اساس نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، درصد هتروزیگوستی مارکر rs438601 در جمعیت اصفهان بیشتر از مقادیر گزارش شده در دیگر جمعیت‌ها است. پس از تخمین فراوانی‌های آلی و ژنتیکی داده‌ها، وجود تعادل هاردی-وینبرگ با استفاده از آزمون χ^2 مورد بررسی قرار گرفت. با مقایسه مقدار χ^2 محاسبه شده برای مارکر rs438601

References:

- 1- Mahajan A, Chavali S, Kabra M, Chowdhury M, Bharadwaj D. *Molecular characterization of hemophilia B in North Indian families: identification of novel and recurrent molecular events in the factor IX gene*. Haematologica 2004; 89(12): 1498-503.
- 2- Ghandil P, Farhud D, Zeinali S, Ghadiri A. *Diagnosis of Hemophilia B Carriers, Using Taq I and Xmn I Polymorphisms of the FactorIX Gene in Iranian Individuals*. Iran J Public Health 2003; 32(3): 1-6.
- 3- Yan S, Wu G. *Descriptively probabilistic relationship between mutated primary structure of coagulation factor IX and clinical severity of hemophilia B*. J Applied Res 2009; 9(3): 100-6.
- 4- Karimipour M, Zeinali S, Graham Tuddenham E, Nafissi N, Lak M, Green P. *Molecular Characterization of the Factor IX Gene in 28 Iranian Hemophilia B Patients*. Iran J Blood Cancer 2009; 1(2): 43-7.

- 5- Bezemer ID, Arellano AR, Tong CH, Rowland CM, Ireland HA, Bauer KA, et al. *F9 Malmo, factor IX and deep vein thrombosis*. Haematologica 2009; 94(5): 693-9.
- 6- Zahedmehr A, Delmaghani S, Sharifian R, Lak M, Zeinali S. *The frequencies of three Factor IX-Linked restriction fragment length polymorphisms in Iranian patients with hemophilia B*. Iran J Med Sci 2004; 29(1): 26-30.
- 7- Chowdhury MR, Kabra M, Menon PS. *Factor IX gene polymorphisms in Indian population*. Am J Hematol 2001; 68(4): 246-8.
- 8- Mitchell C, Mitchell C, Krause A. *New FACTOR IX linked marker alleles in African Haemophilia B patients*. Haemophilia 2007; 13(5): 642-4.
- 9- Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. *An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms*. Nucleic Acids Res 2001; 29(17): e88.
- 10- Bowen DJ. *Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights*. J Clin Pathol Mol Pathol 2002; 55(2): 127-44.
- 11- Chan V, Yam I, Yip B, Au P, Shing MK, Li CK, et al. *Single nucleotide polymorphisms of the factor IX gene for linkage analysis in the southern Chinese population*. Br J Haematol 2000; 111(2): 540-3.
- 12- Cheung KH, Osier MV, Kidd JR, Pakstis AJ, Miller PL, Kidd KK. *ALFRED: an allele frequency database for diverse populations and DNA polymorphisms*. Nucleic Acids Res 2000; 28(1): 361-3.
- 13- Riva A, Kohane IS. *SNPper: retrieval and analysis of human SNPs*. Bioinformatics 2002; 18(12): 1681-5.
- 14- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. *dbSNP: the NCBI database of genetic variation*. Nucleic Acids Res 2001; 29(1): 308-11.
- 15- Meng Z, Zaykin DV, Xu C-F, Wagner M, Ehm MG. *Selection of genetic markers for association analyses, using linkage disequilibrium and haplotypes*. Am J Human Genet 2003; 73(1): 115-30.
- 16- Okayama N, Fujimura K, Nakamura J, Suehiro Y, Hamanaka Y, Hinoda Y. *Evaluation of a new efficient procedure for single-nucleotide polymorphism genotyping: tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction*. Clin Chem Lab Med 2004; 42(1): 13-6.
- 17- Collins A, Ke X. *Primer1: Primer Design Web Service for Tetra-primer ARMS-PCR*. Open Bioinform J 2012; 6: 55-8.
- 18- Raymond M, Rousset F. *GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism*. J Hered 1995; 86(3): 248-9.
- 19- Guo SW, Thompson E. *Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles*. Biometrics. 1992;48(2):361-72.
- 20- Engels WR. *Exact tests for Hardy-Weinberg proportions*. Genetics 2009; 183(4): 1431-41.

Genetic variation of rs438601 marker in the Iranian Population: An informative marker for molecular diagnosis of hemophilia B

Dorri P(MSc)¹, Karimi A(MSc)², Vallian-Borujeni S(PhD)^{*3}

¹⁻³Department of Biology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received: 20 Jan 2014

Accepted: 2 Oct 2014

Abstract

Introduction: Hemophilia B is an X-linked recessive genetic disease caused by mutations in the coagulation Factor IX gene. Mutations in the Factor IX gene result in dysfunction or deficiency of coagulation factor of IX. Direct mutation analysis involves the ideal method for molecular diagnosis of the disease. However, due to the high number of identified mutations in the gen, the lack of a common mutation spectrum, the large size of the gene, and the heterogeneous nature of its mutations, direct mutation analysis is regarded expensive and time-consuming. Alternatively, indirect investigation of the mutations by use of linkage analysis applying polymorphic markers present in the factor IX gene region could be considered as an appropriate approach for prenatal diagnosis and carrier detection of haemophilia B.

Methods: In the present study the single nucleotide polymorphic marker rs438601 in the intron 3 of factor IX gene was genotyped by Tetra-primer ARMS-PCR method with newly desingd specific primers on 142 unrelated control females in the Isfahan (a city in Iran) population. Then the allele frequency and degree of heterozygosity were estimated utilizing GENEPOP program. Moreover, χ^2 test was applied in order to investigate the Hardy-Weinberg equilibrium.

Results: Allele frequency was reported as 71.83% and 28.17%, respectively for C and G alleles. Observed heterozygosity was 53.52% and Analysis of deviations from Hardy-Weinberg equilibrium demonstrated that the Isfahanian population were in equilibrium for rs438601 marker.

Conclusion: The study findings demonstrated that rs438601 marker due to high heterozygosity could be suggested as an appropriate diagnostic marker in linkage analysis and carrier detection of hemophilia B in regard with a sample of Iranian population.

Keywords: Factor IX Gene; Hemophilia B; Isfahan Population; Rs438601

This paper should be cited as:

Dorri P, Karimi A, Vallian-Borujeni S. *Genetic variation of rs438601 marker in the iranian population: an informative marker for molecular diagnosis of hemophilia B*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 22(5): 1524-32.

***Corresponding author:** Tel: +98 313 7932456, Email: svallian@sci.ui.ac.ir