مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۲، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۳
صفحه: ۱۵۳۲-۱۵۲۴

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 22, No.5, Nov-Dec 2014
Pages: 1524-1532

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

پریسا دری[۱]، امین کریمی[۲]، صادق ولیان بروجنی[*۳]

۱،۲- کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استاد گروه ژنتیک، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۱۰

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 ژنوتیپ شد. سپس از نرم‌افزار GENEPOP برای تعیین فراوانی آللی و درصد هتروزیگوسیتی و از آزمون χ^2 برای بررسی تعادل هاردی-وینبرگ استفاده شد.

نتایج: فراوانی آللی برای آلل‌های C و G به ترتیب ۷۱/۸۳٪ و ۲۸/۱۷٪ محاسبه شد. هتروزیگوسیتی مشاهده شده 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 هتروزیگوسیتی 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.sc.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-11]

مقدمه

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 پلاسما وجود دارد و یک جز ضروری از آبشار انعقادی 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 ناقلین 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 ناقلین 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، مارکرهای با میزان هتروزیگوسیتی 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 ژنی 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 تک‌نوکلئوتیدی (SNP: 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. تعداد زیاد و پایداری جهشی(Mutational stability)SNPs، 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 هتروزیگوسیتی 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 هتروزیگوسیتی و تنوع آللی به طور ویژه بررسی شود(۱۱).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-11]

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 ناقلین بیماری هموفیلی B در جمعیت ایرانی می‌باشد. در این رابطه شناسایی مارکرهایی با میزان هتروزیگوسیتی 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 انجام نشده است، بنابراین مطالعه حاضر به بررسی ویژگی‌های یکی از مارکرهای این ژن در جمعیت اصفهان می‌پردازد. در پایگاه داده‌ها (ALFRED، SNPper 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 اینترون شماره ۳ ژن فاکتور IX جهت مطالعه بیشتر خصوصیات و آگاهی‌دهندگی مارکر در جمعیت اصفهان انتخاب گردید(۱۴-۱۲).

در مطالعه‌ای در ایران توسط Ghandil و همکاران فراوانی آللی و درصد هتروزیگوسیتی 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 آلل مغلوب و هتروزیگوسیتی rs438601 در افراد بیمار و خانواده‌شان نشان داده شد(۷). در پایگاه داده ALFRED فراوانی آلل C و G و هتروزیگوسیتی مورد انتظار rs438601، برای جمعیت آفریقایی، جمعیت اروپایی، جمعیت هندی، جمعیت برزیلی و جمعیت مالزیایی گزارش شده است(۱۲). همچنین در پایگاه داده SNPPER فراوانی آلل C و G و درصد هتروزیگوسیتی 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).

نتایج این مطالعه می‌تواند در تشخیص‌های پیش از تولد هموفیلیB و همچنین تقویت اطلاعات ساختاری ژنتیکی جمعیت ایرانی مورد استفاده قرارگیرد. 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 غیرخویشاوند ضروری است(۱۵)، در مطالعه حاضر، نمونه‌گیری خون از ۱۴۲ زن غیرخویشاوند 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 روش رسوب نمک استفاده شد. برای بررسی خلوص DNA 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 اسپکتروفتومتر 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 اینترون 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-11]

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 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 بررسی قرارگرفت(۹،۱۷). توالی چهار پرایمر داخلی پیشرو(FI: Forward Innerprimer) آلل C، خارجی پیرو (RO: Reverse outerprimer) آلل C، خارجی پیشرو (FO: Forward Outerprimer) آللG، 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 FO آلل G را تکثیر می‌کنند. اندازه محصول برای آللC: ۱۸۶، آلل G: ۲۸۳ و دو پرایمر خارجی: ۴۲۰ می‌باشد.

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

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی (5′ > 3′)	طول پرایمر	Tm (°C)
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;

PCR بر روی نمونه‌های DNA ژنومی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf -آلمان) طبق جدول ۲ انجام شد. شرایط واکنش PCR شامل: ۱µl از پرایمر FI (۱۰Pm)، ۱/۲µl از پرایمر RI (۱۰Pm)، ۰/۳µl از پرایمر FO (۱۰Pm)، ۰/۳µl از پرایمر RO (۱۰Pm)، ۰/۵µl از Taq DNA Polymerase (۵U/µl)، ۱/۵µl از dNTP mix (۱۰mM)، ۳/۵µl از PCR Buffer (۱۰X)، ۱µl از $MgCl_2$ (۵۰mM) و ۱µl از Chromosome DNA که با ddH_2O به حجم ۲۵µl رسانیده 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.

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

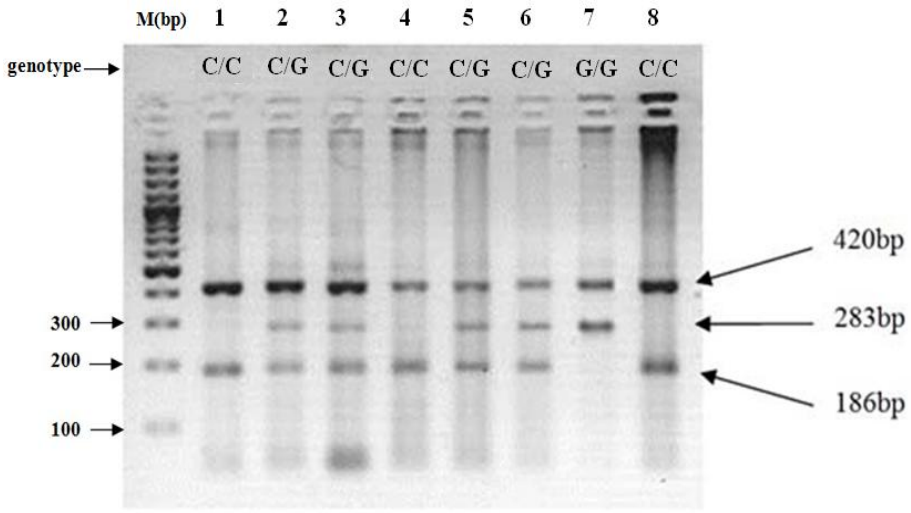
مرحله	دما (°C)	مدت زمان
۱- Primery Denaturation	۹۴	۵ دقیقه
۲- Denaturation	۹۴	۳۰ ثانیه
۳- Annealing	۶۴	۵۰ ثانیه
۴- Extension	۷۲	۵۰ ثانیه
۵- تکرار مرحله شماره ۲ تا ۴ (۳۰ سیکل)		
۶- Final Extension	۷۲	۱۰ دقیقه

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-11]

داده‌های به دست آمده از تعیین ژنوتیپ افراد شامل تخمین فراوانی آللی، درجه هتروزیگوسیتی و فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار فنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت با استفاده از نرم‌افزار پایگاه GENEPOP تجزیه و تحلیل شد(۱۸). تعادل هاردی-وینبرگ (HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium) با استفاده از آزمون Chi square (χ^2) برای جایگاه مارکر rs438601 در جمعیت اصفهان بررسی شد. تعادل هاردی وینبرگ بیان می‌کند که در جمعیتی با جفت‌گیری تصادفی بدون انتخاب، جهش، یا مهاجرت فراوانی-های آللی و فراوانی‌های ژنوتیپی از نسلی به نسل دیگر ثابت هستند و به علاوه یک ارتباط ساده بین فراوانی‌های آللی و فراوانی‌های ژنوتیپی وجود دارد(۱۹،۲۰).

نتایج

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



شکل ۱: تعیین ژنوتیپ مارکر rs438601 با روش Tetra-primer ARMS-PCR در نمونه‌ای از جمعیت ایران (جمعیت اصفهان).
محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲٪. تفکیک شدند. هر ستون نشان‌دهنده نمونه PCR یک فرد است. اندازه محصول PCR برای آلC: 186bp، آلG: 283bp و دو پرایمر خارجی به عنوان کنترل: 420bp می‌باشد که در سمت راست شکل قابل مشاهده است.

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

۱- تعداد افراد مشاهده شده و مورد انتظار در هر ژنوتیپ که در جدول ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود از ۱۴۲ فرد، ۶۴ نفر ژنوتیپ C/C، ۷۶ نفر ژنوتیپ C/G و ۲ نفر ژنوتیپ G/G داشتند.

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

ژنوتیپ	ژنوتیپ های مشاهده شده	ژنوتیپ های مورد انتظار
C و C	۶۴	۷۳/۱۶۶۱
C و G	۷۶	۵۷/۶۶۷۸
G و G	۲	۱۱/۱۶۶۱

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-11]

۲- فراوانی آللی مارکرrs438601، به طوری که فراوانی مشاهده شده برای آلل‌های C و G به ترتیب ۷۱/۸۳٪ و ۲۸/۱۷٪ بود.

۳- هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جدول ۴ نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می‌شود هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت اصفهان ۵۳/۵۲٪ می‌باشد. در حالی که هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای جمعیت اصفهان ۴۰/۶۱٪ محاسبه شد. به دنبال آن هموزیگوسیتی مشاهده شده برای جمعیت اصفهان ۴۶/۴۷٪ می‌باشد. در صورتی که هموزیگوسیتی مورد انتظار جمعیت اصفهان ۵۹/۳۸٪ بود.

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

آلل	فراوانی	هتروزیگوسیتی (درصد)		هموزیگوسیتی (درصد)	
		مشاهده شده	مورد انتظار	مشاهده شده	مورد انتظار
C	۰/۷۱۸۳				
G	۰/۲۸۱۷	۵۳/۵۲۱	۴۰/۶۱۱	۴۶/۴۷۸	۵۹/۳۸۸

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 ژنوتیپ های 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 $p<۰/۰۵$ مقایسه گردید. مقدار χ^2 محاسبه شده برای مارکر rs438601 از مقدار χ^2 حاصل از جدول احتمال با درجه آزادی ۱ و $p<۰/۰۵$ 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 فراوانی۷۱/۸۳٪ و آلل G (آلل مغلوب) با فراوانی۲۸/۱۷٪ می‌باشند. بر اساس اطلاعات پایگاه داده ALFRED فراوانی آلل C و G، برای جمعیت آفریقایی به ترتیب ۸۸٪ و ۱۲٪، برای جمعیت اروپایی ۷۸٪ و ۲۲٪، برای جمعیت هندی ۹۴٪ و ۶٪، برای جمعیت برزیلی ۹۷٪ و۳٪ و برای جمعیت مالزیایی ۱۰۰٪ و ۰٪ گزارش شده است(۱۲). همچنین براساس اطلاعات پایگاه داده SNPPER فراوانی آلل C و G، در جمعیتی از نیجریه ۹۵٪ و ۵٪، در جمعیتی از ژاپن و نیز در جمعیتی از چین ۱۰۰٪ و ۰٪ و در ساکنین ایالت اوتاوا(Utah) (در آمریکای شمالی) با تباری از شمال و غرب اروپا ۷۹٪ و۲۱٪ 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 (MAF: Minor Allele Frequency) (G)، ۲۱٪ گزارش شده 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)، ۱۸٪ در افراد بیمار و خانواده‌شان نشان داده شد (۷).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-11]

درصد هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای مارکر rs438601 در جمعیت اصفهان ۵۳/۵۲٪ است که بیشتر از درصد هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۴۰/۶۱٪) می‌باشد. بر اساس اطلاعات پایگاه داده ALFRED هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جمعیت آفریقایی ۲۱٪، در جمعیت اروپایی ۳۴٪، در جمعیت هندی ۱۱٪، در جمعیت برزیلی ۶٪ و در جمعیت مالزیایی ۰٪ می‌باشد(۱۲). همچنین بر اساس اطلاعات پایگاه داده SNPPER درصد هتروزیگوسیتی در جمعیتی از نیجریه ۲٪، در جمعیتی از ژاپن و نیز در جمعیتی از چین ۰٪ و در ساکنین اوتاوا با تباری از شمال و غرب اروپا ۹٪ می‌باشد(۱۳). بررسی هتروزیگوسیتی در ایران توسط Ghandil و همکاران هتروزیگوسیتی ۳۸٪ را برای مارکر مزبور نشان داد(۲). Chowdhury و همکاران در جمعیت هندی هتروزیگوسیتی rs438601 را در افراد بیمار و خانواده‌شان ۲۳٪ به دست آوردند(۷). بر اساس نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، درصد هتروزیگوسیتی مارکر rs438601 در جمعیت اصفهان بیشتر از مقادیر گزارش شده در دیگر جمعیت‌ها است.

پس از تخمین فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی 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 با مقدار χ^2 حاصل از جدول احتمال با درجه آزادی ۱ و $p<۰/۰۵$ 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 ژنی 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 ژنی فاکتور IX به دلیل فراوانی آللی و درجه هتروزیگوسیتی 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 جمعیت شناسی 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.

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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-11]

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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-11]

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]

[1-3]*Department 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.sc.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-11]