مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۳، شماره ۹، آذر ۱۳۹۴
صفحه: ۸۷۸-۸۷۰

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 23, No.9, Nov-Dec 2015
Pages:870-878

# تعیین ژنوتیپ مارکر rs2274625 در ژن NPHS2 مرتبط با سندروم نفروتیک در جمعیت اصفهان

لیلا اسماعیلی چمگردانی[۱]، علی جزایری[۲]، صادق ولیان بروجنی[۳*]

**چکیده**

**مقدمه:** سندرم نفروتیک یک بیماری ژنتیکی می‌باشد و به گروه بیماری‌های هتروژنی گلومرولی تعلق دارد که عمدتاً در کودکان اتفاق می‌افتد. بررسی پیوستگی با استفاده از مارکرهای چندشکلی تک نوکلئوتیدی(SNP) برای مطالعه مولکولی بیماری، به عنوان یک روش غیرمستقیم بکار می‌رود. در پایگاه‌های داده موجود تعداد زیادی از مارکرهای SNP در ژن NPHS2 معرفی شده است.

**روش بررسی:** در مطالعه حاضر وضعیت ژنوتیپی و همچنین اطلاع‌دهندگی مارکر rs2274625 واقع در ژن NPHS2 در ۱۲۰ فرد غیر خویشاوند سالم با استفاده از روش Tetra-primer ARMS PCR و پرایمرهای جدید طراحی شده، بررسی شد. در این مطالعه تخمین فراوانی آللی و وجود تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از پایگاه GenePop انجام شد. همچنین از نرم‌افزار Power Marker برای تعیین شاخص ظرفیت اطلاعاتی چندشکلی(PIC) استفاده شد.

**نتایج:** نتایج حاصل بیانگر فراوانی آللی ۹۷ و ۳ درصد به ترتیب برای آلل‌های C و T برای مارکر rs2274625 در جمعیت اصفهان بود. به علاوه بررسی تعادل هاردی واینبرگ نشان داد که جمعیت ذکر شده برای مارکر مربوطه در تعادل می‌باشد و میزان PIC برابر ۰/۵ درصد می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** در مجموع با توجه به نتایج به دست‌آمده از مطالعه حاضر، مارکر rs2274625 می‌تواند به عنوان یک مارکر تک نوکلئوتیدی در مطالعات پیوستگی برای ردیابی مولکولی جهش‌های ژن NPHS2 در تشخیص مولکولی سندرم نفروتیک در جمعیت اصفهان به عنوان نمونه‌ای از جمعیت ایرانی معرفی گردد.

**واژه‌های کلیدی:** NPHS2، آنالیز پیوستگی، چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی، جمعیت اصفهان

۱،۲- کارشناسی ارشد ژنتیک، بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۳- استاد ژنتیک، بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۳۱-۳۷۹۳۲۴۵۶، پست الکترونیکی: svallian@sci.ui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۲۴ تاریخ پذیرش:۱۳۹۴/۷/۲۳

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-31 ]

**مقدمه**

بیماری سندرم نفروتیک(NS (Nephrotic Syndrome, OMIM #۶۰۴۷۶۶) به عنوان یک بیماری اولیه است که به گروه بیماری‌های هتروژنی(Heterogenous) گلومرولی تعلق دارد. این بیماری عمدتاً در کودکان اتفاق می‌افتد(۱). از علائم این بیماری می‌توان به پروتئین اوری شدید، هیپوآلبومینمیا، هیپرلیپیدمیا و ادم اشاره کرد(۲). سندرم نفروتیک بسته به اینکه بیماران به درمان استروئید پاسخ دهند به دو گروه حساس و مقاوم به استروئید تقسیم می‌شود که سندرم نفروتیک مقاوم به استروئید هم‌چنین تیپ دو این بیماری نیز نام‌گذاری شده است(۳،۴).

تا به امروز حداقل ۲۴ ژن مختلف برای این بیماری شناسایی شده است که جهش در ژن NPHS2 در حال حاضر مرتبط با سندرم نفروتیک مقاوم به استروئید مطرح است(۵). این بیماری معمولاً به صورت آتوزومی مغلوب به ارث می‌رسد(۶). میزان بروز سالیانه این بیماری در بیشتر کشورهای غربی از جمله آمریکا و اروپا ۲/۷-۲ در هر ۱۰۰ هزار نفر می‌باشد(۷،۸).

ژن مرتبط با این بیماری NPHS2 می‌باشد که در ناحیه کروموزومی 1q25-31 واقع شده و به عنوان ژنی که علت سندرم نفروتیک در دوران کودکی است در سال ۲۰۰۰ شناسایی شد(۹). اندازه ژن ۲۵ کیلو باز و ناحیه کدکننده ژن ۱۱۴۹ جفت باز طول دارد و دارای ۸ اگزون می‌باشد(۱۰،۱۱). ژن NPHS2 یک پروتئین اینتگرال غشایی ۴۲ کیلو دالتون به نام پودوسین را کد می‌کند. این پروتئین یک عضو از خانواده Stomatin پروتئین‌ها و شامل ۳۸۳ اسید آمینه می‌باشد(۱۲،۱۳). پروتئین پودوسین در پودوسیت‌های اسلایت دیافراگم کلیه بیان می‌شود و نقش کلیدی در فیلتراسیون دیواره گلومرولی دارد(۱۴). پودوسیت‌ها مجموعه‌های سلولی هستند که از یک جسم سلولی(Cell body)، زائده‌های بزرگ(Major processes) و زائده‌های پامانند(Foot Processes) (FPs) تشکیل‌شده‌اند که FPs پودوسیت‌ها نقش عمده‌ای در برقراری نفوذپذیری انتخابی، پایداری ساختار و عملکرد فیلتراسیون دیواره گلومرولی دارند. اغلب فرم‌های سندرم نفروتیک در اثر اختلال در پودوسیت‌ها به وجود می‌آیند و موتاسیون در ژن NPHS2 که پروتئین پودوسین را کد می‌کند باعث شروع زودرس پروتئین آوری، ناپدیدشدن FPs، جدا شدن پودوسیت ها از غشا پایه گلومرولی و در نهایت از دست رفتن برگشت‌ناپذیر پودوسیت‌ها می‌شود(۱۵،۱۶). بیش از ۵۰ موتاسیون بیماری‌زا در ژن NPHS2 تاکنون شناسایی و گزارش‌شده است. موتاسیون‌های گزارش شده تمام طول ژن را شامل می‌شوند و این موتاسیون‌ها هر نوع تغییر و تبدیل شامل موتاسیون‌های حذفی، بدمعنا و بی‌معنا می‌باشند(۸).

مارکرهای چندشکلی به عنوان روش متناوبی در تشخیص مولکولی بیماری‌های ژنتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱۷). مارکرهای چندشکلی تک نوکلئوتیدی SNP: Single nucleotide polymorphism شایع‌ترین چندشکلی‌ها در ژنوم انسان هستند و تخمین زده می‌شود که به طور متوسط در هر فاصله ۲۹۰bp در ژنوم وجود دارند(۱۸).

هر SNP نشان‌دهنده یک تغییر تک نوکلئوتیدی در ژنوم است و در اکثر موارد حالت دو آللی دارد. یک جایگاه تک‌نوکلئوتیدی معمولاً زمانی به عنوان یک SNP در نظر گرفته می‌شود که فراوانی آلل مغلوب آن در جمعیت ۱٪ یا بیشتر باشد. چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی مزایای شناخته‌شده و قابل توجه بسیاری در آنالیز پیوستگی دارد که از جمله آنها می‌توان به شمار زیاد، پراکندگی، پایداری، پیوستگی شدید و حتی سرعت و توان بالای سیستم‌های تعیین SNP اشاره کرد. یکی از ویژگی‌های مهم یک مارکر اطلاع‌دهنده این است که هتروزیگوتی آن بالا باشد. فراوانی آللی و درجه هتروزیگوتی مارکرهای چندشکلی معمولاً در جمعیت‌های مختلف متفاوت است(۱۷،۱۹). بنابراین در مطالعات پیوستگی برای شناسایی افراد ناقل(Heterozygous carrier)(هتروزیگوت) و تشخیص پیش از تولد به روش غیرمستقیم، مارکرهای مورد استفاده بایستی در جمعیت تحت مطالعه به طور جداگانه بررسی شوند.

تاکنون هیچ مطالعه‌ای مبنی بر بررسی مارکرهای چند شکل در ژن NPHS2 در جمعیت ایرانی انجام نشده است. در پایگاه‌های داده انواع مارکرهای چند شکل در ژن NPHS2 معرفی شده است. از بین مارکرهای چند شکل موجـود، rs2274625 در اینتـرونی ژن انتخاب شد.



[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-31 ]

**روش بررسی**

نمونه‌گیری خون و استخراج DNA: در این مطالعه نمونه‌های خون از تعداد ۱۲۰ فرد سالم و غیر خویشاوند جمع‌آوری شد. انتخاب افراد به صورت تصادفی از بین داوطلبان بزرگسال سالم از لحاظ بیماری‌های کلیوی خصوصاً سندرم نفروتیک در شهر اصفهان انجام شده است. این جمعیت به عنوان نمونه‌ای از کل جمعیت ایران در این مطالعه در نظر گرفته شده است. پس از کسب رضایت‌نامه کتبی از همه افراد شرکت‌کننده در مطالعه، مقدار ۱۰-۵ میلی‌لیتر از خون محیطی این افراد برای استخراج DNA بر روی EDTA با غلظت ۰/۵ مولار جمع‌آوری شد. DNA از سلول‌های لوکوسیت خون به روش نمک اشباع استخراج گردید و سپس کمیت و کیفیت آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت(۲۱).

روش نمونه‌گیری با توجه به فرمول زیر می‌باشد که حداقل افراد موردنیاز برای این مطالعه با توان ۸۰ درصد به گونه‌ای که آنالیزهای آماری انجام گرفته قابل اطمینان باشند، ۱۲۰ به دست آمد(۲۰).

$$n = \frac{r+1}{1}\frac{p^{*}(1-p^{*})(Z_{\beta}+Z_{\frac{\alpha}{2}})^{2}}{(p_1-p_2)^{2}}$$

انتخاب مارکر و تعیین ژنوتیپ: کلیه مارکرهای SNP موجود در ژن NPHS2 توسط نرم‌افزار Haploview و پایگاه داده UCSC Genome browser موردبررسی قرار گرفتند (۲۲) و در نهایت مارکر rs2274625 در ناحیه اینترونی ژن به عنوان یک مارکر داخل ژنی انتخاب شد (منظور انتخاب مارکر در بخش داخل ژن NPHS2 در اینترون شماره ۷ می‌باشد، مارکر مزبور در پایگاه داده dbSNP به عنوان یک مارکر SNP ثبت و معرفی شده است و فراوانی آن در سایر جمعیت‌ها بررسی شده است).

در این تحقیق از روش Tetra-Primer ARMS PCR برای تعیین ژنوتیپ مارکر استفاده شد. این روش به دو پرایمر خارجی و دو پرایمر داخلی و اختصاصی آلل برای تعیین ژنوتیپ چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی نیاز دارد. با توجه به این‌که روش مزبور از ۴ پرایمر در یک واکنش بهره می‌گیرد، بنابراین می‌توان هر دو آلل مارکر را به‌طور همزمان بررسی کرد(۲۳). پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه از طریق پایگاه اینترنت tetra-primer ARMS PCR-Search Frame طراحی شدند(۲۴). توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده برای تعیین ژنوتیپ آلل‌های مارکر rs2274625 توسط روش Tetra-primer ARMS PCR

| نام پرایمر | ترتیب |
|---|---|
| Forward inner primer (C allele) | 5'-ATCCTAATCTTTCAAGGCCAAC -3' |
| Reverse inner primer (T allele) | 5-'GGGGAGTTATTAGCATCGGA-3' |
| Forward outer primer | 5-CTGTGGATCACTGAGGGGAG-3' |
| Reverse outer primer | 5-CAAGCACGGTTAAGCATAGAAC-3' |

محلول واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر به صورت زیر تهیه شد: ۲۵ میکرولیتر از دو پرایمر خارجی(۱۰ pm)، ۱ میکرولیتر از دو پرایمر داخلی(۱۰ pm)، ۰/۲۵ میکرولیتر از Taq DNA Polymerase (5U/µL)، ۱ میکرولیتر از dNTP mix (10 mM)، ۲/۵ میکرولیتر از Taq DNA buffer (10X)، ۲ میکرولیتر از $MgCl_2$ (50 mM) و ۲ میکرولیتر از DNA (80 ng) که با $ddH_2O$ به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانیده شد.

واکنش‌های PCR بر روی نمونه‌های DNA ژنومی توسط دستگاه ترموسایکلر(Eppendorf, Germany) طبق شرایط بهینه شده زیر انجام شد: ۵ دقیقه دمای واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس به دنبال آن ۳۲ چرخه متوالی از دمای واسرشت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد(۴۰ ثانیه)، دمای اتصال پرایمری در ۵۹ درجه سانتی‌گراد(۴۰ ثانیه) و دمای تکثیر قطعات در ۷۲ درجه سانتی‌گراد(۴۰ ثانیه).

در نهایت به منظور تکمیل فرایند تکثیر قطعات دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه اعمال شد.

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-31 ]

محصولات تکثیرشده بر روی ژل آگارز ۲٪ به مدت ۴۵ دقیقه در ولتاژ ۸۰ رانده شدند. ژل به دست‌آمده با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی گردید و باندهای مربوطه با استفاده از دستگاه Gel documentation (Biometra) زیر نور UV مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی‌های آماری: معمول‌ترین معیار اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در یک جمعیت، مقدار هتروزیگوسیتی است. افراد در گونه‌های دیپلویید در یک لوکوس هموزیگوت یا هتروزیگوت هستند. وجود هتروزیگوسیتی نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی است. تخمین فراوانی آللی، درجه هتروزیگوسیتی و فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار فنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت با استفاده از پایگاه GenePop انجام شد(۲۵).

همچنین پس از تخمین فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی داده‌ها، وجود تعادل هاردی واینبرگ(HWE) مورد بررسی قرار گرفت. تعادل هاردی-واینبرگ بیان می‌کند که در جمعیتی با جفت‌گیری تصادفی بدون انتخاب، جهش، یا مهاجرت فراوانی‌های آللی و فراوانی‌های ژنوتیپی از نسلی به نسل دیگر ثابت هستند(۲۶).

نرم‌افزار GenePop بر اساس آزمون دقیق فیشر به بررسی تعادل هاردی-واینبرگ می‌پردازد. در نهایت با استفاده از نرم‌افزار Power Marker، PIC مطالعه قرار گرفت. فاکتور PIC شاخص ظرفیت اطلاعاتی چندشکلی است. این فاکتور برای مارکرهایی که دارای تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت می‌باشند تعریف می‌شود که به تعداد و فراوانی آلل‌ها و درجه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت وابسته است(۲۷). لازم به ذکر است که این مطالعه توسط کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان مورد تائید قرار گرفته است.

## نتایج

مارکر ژنتیکی rs2274625 در ژن NPHS2 در یک گروه از افراد سالم در جمعیت اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. این مارکر یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی(SNP) است که در ناحیه اینترونی ژن NPHS2 قرار دارد و دارای دو آلل غالب C و آلل مغلوب T می‌باشد. بنابراین ژنوتیپ‌های CC، CT و TT در جمعیت قابل شناسایی می‌باشند.

نمونه‌های DNA افراد سالم و غیر خویشاوند با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش Tetra-primer ARMS PCR و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪ تعیین ژنوتیپ شدند. سه باند با طول‌های متفاوت ۱۷۴، ۲۸۳، ۴۱۶ جفت باز بر روی ژل آگارز تفکیک شدند. قطعه بزرگ ۴۱۶ جفت بازی که دربردارنده چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی است نشان‌دهنده باند کنترل می‌باشد و دو قطعه کوچک ۲۸۳ و ۱۷۴ جفت بازی هر یک به ترتیب نشان‌دهنده باندهای اختصاصی برای آلل مغلوب T و آلل غالب C هستند. نتایج حاصل نشان داد که افراد هتروزیگوت دارای هر سه باند در موقعیت‌های ۴۱۶، ۲۸۳، ۱۷۴ جفت باز هستند. درحالی‌که افراد هموزیگوت غالب و مغلوب تنها دارای باند کنترل و یکی از دو باند اختصاصی آلل بودند(شکل ۱).

شکل ۱: تعیین ژنوتیپ مارکر rs2274625 با استفاده از روش Tetra-primer ARMS PCR

برای هر فرد دو ستون در نظر گرفته شده است. در هر دو ستون باند ۴۱۶ جفت بازی نشان دهنده کنترل داخلی است. باندهای اختصاصی ۲۸۳ و ۱۷۴ جفت بازی هر یک به ترتیب نشان دهنده آلل های T و C می‌باشند. الگوی باندها بر روی ژل آگارز دو نوع ژنوتیپ را نشان می‌دهد. ستون دوم و سوم مربوط به فرد هموزیگوت C/C و ستون چهارم و پنجم و ششم و هفتم مربوط به فرد هتروزیگوت C/T می‌باشد.

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-31 ]

تعیین ژنوتیپ افراد تحت مطالعه نشان داد که ۱۱۳ نفر دارای ژنوتیپ CC، ۷ نفر دارای ژنوتیپ CT بودند. فراوانی مربوط به این ژنوتیپ‌ها در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. پس از تعیین ژنوتیپ افراد، فراوانی آللی و همچنین درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جمعیت اصفهان محاسبه شد. همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است فراوانی مشاهده شده برای آلل‌های غالب و مغلوب به ترتیب ۹۷٪ و ۳٪ بود.

جدول ۲: تعداد افراد و فراوانی‌های مشاهده شده برای انواع ژنو تیپ‌ها

| ژنوتیپ | C/C | C/T | T/T |
|---|---|---|---|
| تعداد افراد | ۱۱۳ | ۷ | ۰ |
| فراوانی | ۰/۹۵ | ۰/۵ | ۰ |

جدول ۳: فراوانی آللی و هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای مارکر rs2274625

| آلل | فراوانی | هتروزیگوسیتی | | هموزیگوسیتی | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | مشاهده شده | مورد انتظار | مشاهده شده | مورد انتظار |
| C | ۰/۹۷ | ۷ | ۶/۸۲ | ۱۱۳ | ۱۱۳/۱۸ |
| T | ۰/۰۳ | | | | |

سپس وجود تعادل هاردی- واینبرگ از طریق محاسبه P بر اساس آزمون دقیق فیشر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از آزمون دقیق فیشر نشان داد که مقدار P برای جمعیت ذکر شده ۱ است. این مقدار P، بزرگتر از ۰/۰۵ است که بیانگر وجود تعادل هاردی واینبرگ برای این مارکر در نمونه‌ای از جمعیت اصفهان است.

در نهایت با توجه به وجود تعادل هاردی واینبرگ مقدار PIC برای مارکر ژنتیکی rs2274625 بررسی شد. با این‌حال بررسی‌ها نشان می‌دهد که PIC>۰/۲۵ می‌تواند به عنوان یک شاخص مناسب برای گویا بودن یک مارکر تک نوکلئوتیدی در نظر گرفته شود(۲۸). نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان داد که مقدار PIC برای مارکر rs2274625 در جمعیت اصفهان ۰/۵ می‌باشد.

## بحث و نتیجه‌گیری

امروزه اصلی‌ترین چالش در تشخیص مولکولی بیماری‌های چند ژنی شناسایی صحیح ژن عامل بیماری می‌باشد. سندرم نفروتیک یکی از این بیماری‌های چند ژنی است که تا به امروز حداقل ۲۴ ژن مختلف در ارتباط با این بیماری شناسایی شده است(۶). با توجه به ماهیت چند ژنی بیماری شناسایی مستقیم جهش‌ها با استفاده از روش‌های تعیین توالی بسیار پر هزینه و زمان‌بر خواهد بود. از این رو با توجه به تعداد زیاد ژن‌ها و همچنین وجود جهش‌های شناخته نشده راهبرد اساسی برای تشخیص ژنتیکی بیماری بر پایه بررسی‌های غیرمستقیم با استفاده از مارکرهای چندشکلی پیوسته با ژن می‌باشد. استفاده از SNPs برای بررسی‌های غیرمستقیم به علت پایداری و همچنین پیوستگی شدید با ژن بسیار قابل‌اعتمادتر است.

بررسی‌های غیرمستقیم با استفاده از مارکرهای چندشکلی موجود در ژن NPHS2 می‌تواند منجر به شناسایی آلل‌های جهش‌یافته این ژن از بین دیگر ژن‌های مرتبط با بیماری شده و همچنین در تعیین افراد ناقل(هتروزیگوت) و تشخیص پیش از تولد در خانواده‌های دارای فرزند مبتلا به سندرم نفروتیک وابسته به NPHS2 مورد استفاده قرار گیرد. از بین مارکرهای موجود در ژن NPHS2، مارکر rs2274625 با توجه به جایگاه آن در اینترون ژن موقعیت مناسب‌تری دارد که برای این مطالعه انتخاب شد.

در این مطالعه فراوانی آللی و همچنین درجه هتروزیگوسیتی این مارکر در جمعیت اصفهان به عنوان نمونه‌ای از جمعیت ایران مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل با اطلاعات مربوط به دیگر جمعیت‌ها مقایسه شد.

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-31 ]

نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر بر روی مارکر rs2274625 نشان می‌دهد که آلل C با فراوانی ۹۷٪ و آلل T با فراوانی ۳٪ به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را در نمونه‌ای از جمعیت اصفهان دارند. فراوانی آللی مارکرهای چندشکلی این ناحیه ژنی به صورت اختصاصی برای جمعیت‌های مختلف توسط پایگاه داده International HapMap Project از طریق نرم‌افزار Haploview ارائه شده است(۲۹).

بر اساس گزارش‌های پایگاه داده International HapMap Project، فراوانی آلل T در جمعیت‌های ژاپنی، چینی، هندی، مکزیکی، ایتالیایی، آفریقایی، کنیایی ونیجریایی به ترتیب ۳۶/۷٪ ، ۲۹/۹٪ ، ۲۵/۷٪ ، ۰/۷٪ ، ۲۳/۳٪ ، ۱۸/۱٪، ۵/۳٪، ۰/۳ ٪ و ۰٪ می‌باشد(۳۰). بر اساس گزارش‌های این پایگاه مشخص شده است که بیشترین فراوانی آلل T برای مارکر rs2274625 مربوط به جمعیت ژاپنی می‌باشد. این در حالی است که جمعیت نیجریایی در مقایسه با سایر جمعیت‌ها دارای فراوانی آلل مغلوب کمتری می‌باشد(۳۰). مقایسه نتایج به دست آمده از این مطالعه با اطلاعات موجود در پایگاه داده International HapMap Project نشان می‌دهد که فراوانی آلل T مارکر rs2274625 در نمونه‌ای از جمعیت ایران(جمعیت اصفهان) نسبت به جمعیت‌های چینی، آفریقایی، هندی، ایتالیایی، مکزیکی و ژاپنی کمتر است. در حالی که فراوانی آللی این مارکر در نمونه‌ای از جمعیت ایرانی (جمعیت اصفهان) بیشتر از جمعیت‌های کنیایی و نیجریایی است(جدول ۴).

جدول ۴: مقایسه فراوانی آللی مارکر rs22746254 در نمونه‌ای از جمعیت ایران(نمونه‌ای جمعیت اصفهان) با تعدادی از جمعیت‌های دیگر جهان(۲۵)

| جمعیت | فراوانی آلل T(MAF) |
|---|---|
| ژاپنی | ۰/۳۶۷ |
| چینی | ۰/۲۹۹ |
| هندی | ۰/۲۵۷ |
| مکزیکی | ۰/۲۳۳ |
| ایتالیایی | ۰/۱۸۱ |
| آفریقایی | ۰/۰۵۳ |
| مطالعه حاضر | ۰/۰۳۰ |
| کنیایی | ۰/۰۰۳ |
| نیجریایی | ۰ |

مشخص شده است که انحراف از تعادل هاردی واینبرگ می‌تواند صحت بررسی‌های آماری را تحت تأثیر قرار دهد. از این رو پس از تعیین فراوانی آللی و ژنوتیپی افراد، در مرحله بعد، وجود تعادل هاردی واینبرگ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که تعادل هاردی-واینبرگ برای مارکر rs2274625 در جمعیت اصفهان وجود دارد.

درمجموع نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مارکر rs2274625 با فراوانی آللی ۳٪ (MAF>۰/۲) و هم‌چنین مقدار PIC=۰/۰۵ می‌تواند به عنوان یک مارکر تک نوکلئوتیدی اطلاع‌دهنده در تشخیص غیر مستقیم آلل‌های جهش یافته ژن NPHS2 جهت آنالیز پیوستگی و تشخیص مولکولی آن در جمعیت اصفهان به عنوان نمونه‌ای از جمعیت ایران مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعات بعدی بررسی فراوانی مارکر مزبور در سایر جمعیت های ایران حائز اهمیت می‌باشد.

## سپاسگزاری

بر خود لازم می‌دانیم از معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان جهت تأمین بودجه مطالعه مزبور در غالب پژوهانه و هم‌چنین از کلیه افرادی که در تهیه نمونه ما را یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی کنیم.

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-31 ]

## *References:*


*1-* Weber S, Gribouval O, Esquivel EL, Morinière V, Tête M-J, Legendre C, et al. ***NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence.*** Kidney Inter 2004; 66(2): 571-79.

*2-* Ruf RG, Schultheiss M, Lichtenberger A, Karle SM, Zalewski I, Mucha B, et al. ***Prevalence of WT1 mutations in a large cohort of patients with steroid-resistant and steroid-sensitive nephrotic syndrome.*** Kidney Inter 2004; 66(2): 564-70.

*3-* Benoit G, Machuca E, Antignac C. ***Hereditary nephrotic syndrome: a systematic approach for genetic testing and a review of associated podocyte gene mutations.*** Pediatric Nephrology 2010; 25(9): 1621-32.

*4-* Tory K, Menyhárd DK, Woerner S, Nevo F, Gribouval O, Kerti A, et al. ***Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid- resistant nephrotic syndrome.*** Nature Genetics 2014; 46(3): 299-304.

*5-* McCarthy HJ, Bierzynska A, Wherlock M, Ognjanovic M, Kerecuk L, Hegde S, et al. ***Simultaneous sequencing of 24 genes associated with steroid-resistant nephrotic syndrome.*** Clinic J American Soci Nephrology 2013; 8(4): 637-48.

*6-* Karle SM, Uetz B, Ronner V, Glaeser L, Hildebrandt F, Fuchshuber A. ***Novel mutations in NPHS2 detected in both familial and sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome.*** J American Soci Nephrology 2002; 13(2): 388-93.

*7-* Mahdavi-Mazdeh M. ***Gene mutations and steroid-resistant nephrotic syndrome.*** Iranian J Kidney Diseases 2013; 7(5): 335-36.

*8-* Caridi G, Perfumo F, Ghiggeri GM. ***NPHS2 (Podocin) mutations in nephrotic syndrome. Clinical spectrum and fine mechanisms.*** Pediatric Res 2005; 57: 54R-61R.

*9-* Vats AN. ***Genetics of idiopathic nephrotic syndrome.*** Indian J Pediatrics 2005; 72(9): 777-83.

*10-* Franceschini N, North KE, Kopp JB, Mckenzie L, Winkler C. ***NPHS2 gene, nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis: a HuGE review.*** Genetics in Med 2006; 8(2): 63-75.

*11-* McKenzie LM, Hendrickson SL, Briggs WA, Dart RA, Korbet SM, Mokrzycki MH, et al. ***NPHS2 variation in sporadic focal segmental glomerulosclerosis.*** J American Soci Nephrology 2007; 18(11): 2987-95.

*12-* Ruf RG, Schultheiss M, Lichtenberger A, Karle SM, Zalewski I, Mucha B, et al. ***Prevalence of WT1 mutations in a large cohort of patients with steroid-resistant and steroid-sensitive nephrotic syndrome.*** Kidney Inter 2004; 66(2): 564-70.

*13-* Gbadegesin R, Hinkes B, Vlangos C, Mucha B, Liu J, Hopcian J, et al. ***Mutational analysis of NPHS2 and WT1 in frequently relapsing and steroid-dependent nephrotic syndrome.*** Pediatric Nephrology 2007; 22(4): 509-13.


[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-31 ]

*14-* Dong L, Pietsch S, Tan Z, Perner B, Sierig R, Kruspe D, et al. ***Integration of cistromic and transcriptomic analyses identifies Nphs2, Mafb, and Magi2 as Wilms' Tumor 1 target genes in podocyte differentiation and maintenance.*** J American Soci Nephrology: JASN 2015; 26(9): 2118-28.

*15-* Greka A, Mundel P. ***Cell biology and pathology of podocytes.*** Annual rev physiology 2012; 74: 299.

*16-* Kerjaschki D. ***Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis.*** J Clinical Invest 2001; 108(11): 1583.

*17-* Rezaei H, Vallian S. ***BanI/D13S141/D13S175 Represents a Novel Informative Haplotype at the GJB2 Gene Region in the Iranian Population.*** Cellular and molecular neurobiology 2011; 31(5): 749-54.

*18-* Kruglyak L, Nickerson DA. ***Variation is the spice of life.*** Nature genetics 2001; 27(3): 234-35.

*19-* Fazeli Z, Vallian S. ***Molecular phylogenetic study of the Iranians based on polymorphic markers.*** Gene 2013; 512(1): 123-26.

*20-* Charan J, Biswas T. ***How to calculate sample size for different study designs in medical research?*** Indian J Psychological Med 2013; 35(2): 121.

*21-* Miller SA, Dykes DD, Polesky HFRN. ***A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.*** Nucleic Acids Res 1988; 16(3): 1215.

*22-* Karolchik D, Hinrichs AS, Kent WJ. ***The UCSC Genome Browser. Current protocols in bioinformatics.*** Andreas D Baxevanis 2009; 1-4

*23-* 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.

*24-* Collins A, Ke X. ***Primer1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR.*** The Open Bioinformatics J 2012; 6: 55-8.

*25-* Raymond M, Rousset F. ***GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism.*** J heredity 1995; 86(3): 248-49.

*26-* Guo SW, Thompson EA. ***Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles.*** Biometrics 1992; 361-72.

*27-* Elahi E, Kumm J, Ronaghi M. ***Global genetic analysis.*** BMB Reports 2004; 37(1): 11-27.

*28-* Chen H, He H, Zou Y, Chen W, Yu R, Liu X. et al. ***Development and application of a set of breeder-friendly SNP markers for genetic analyses and molecular breeding of rice (Oryza sativa L.)*** Theoretical and applied genetics 2011; 123(6): 869-79.

*29-* Smith AV. ***Manipulating HapMap data using HaploView.*** Cold Spring Harbor Protocols 2008; prot5023.

*30-* Richard AG, John WB, Paul H,Thomas DW, Fuli Y. ***The Inter HapMap Project.*** Available from: http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en. Nature 2003; 426: 789-96.

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-31 ]

# *Genotyping Rs2274625 Marker in NPHS2 Gene Associated with Nephrotic Syndrome in Isfahan Population*

***Esmaili Chamgordani L(MSc) [1], Jazayeri A(MSc) [2], Vallian Borujeni S(PhD) [*3]***

*[1,2]Department of Genetics, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran*
*[3.]Department of Genetics, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran*

***Received:***14 Jun 2015 ***Accepted:***15 Oct 2015

## *Abstract*

***Introduction:*** Nephrotic syndrome (NS) is a genetic disease belonging to a heterogeneous group of glomerular disorders, which mainly occurs within the children. Linkage analysis using single nucleotide polymorphisms (SNP) is used as an indirect method in molecular diagnosis of the disease. A large number of SNP markers have been introduced in NPHS2gene in the available electronic databases.

***Method:*** In the present study, the genotype and informative status of rs2274625 marker in NPHS2 genewas investigated in 120 unrelated healthy individuals using Tetra-primer ARMS PCR technique and newly designed primers. Allelic frequency and presence of Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) was estimated using GenePop website. Furthermore, PowerMarker software was utilized in order to compute the index of polymorphism information content (PIC).

***Results:*** The study results indicated allele frequency of 97% and 3% for C and T alleles, respectively, in regard with rs2274625 marker within Isfahan population. Moreover, the PIC for the rs2274625 marker was 0.5%, and HWE revealed the equilibruim of the study population in regard with the related marker.

***Conclusion:*** As the study findings indicated, rs2274625 could be introduced as an SNP marker in the linkage analysis in order to molecularly trace NPHS2 gene mutations in molecular NS diagnosis in Isfahan population as a representative sample of the Iranian population.

***Keywords:*** Isfahan population; Linkage analysis; NPHS2; Single nucleotide polymorphism

***This paper should be cited as:***
Esmaili Chamgordani L, Jazayeri A, Vallian Borujeni S. ***Genotyping Rs2274625 marker in NPHS2 gene associated with nephrotic syndrome in isfahan population.*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 23(9): 870-78.

***Corresponding author: Tel: 031-37932456 , Email: svallian@sci.ui.ac.ir***

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-07-31 ]