

بررسی ژن *cfr* در مبتلایان به فیبروز کیستیک از شمال غرب کشور

سمیه آزمون: دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

امید عمرانی: مربی ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

دکتر مرتضی جبارپور بنیادی: استادیار ژنتیک دانشکده علوم طبیعی، قطب علمی سیتومولکولی تنوع زیستی، دانشگاه تبریز: نویسنده رابط

E-mail: jabbapour@tabrizu.ac.ir

دکتر ماندانا رفیعی: دانشیار بیماریهای کودکان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماریهای کبد و گوارش، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دکتر نعمت بیلان: استاد بیماریهای کودکان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سل و ریه دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دکتر خلیل انصارین: دانشیار بیماریهای ریه، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سل و ریه دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۵/۱۱/۱۶، پذیرش: ۸۶/۸/۵

چکیده

زمینه و اهداف: فیبروز کیستیک شایع ترین اختلال کشنده ژنتیکی اتوزوم مغلوب در جمعیت های سفیدپوست می باشد که در اثر انتقال غیرطبیعی الکترولیت ها از غشاهای رآسی سلول های اپی تلیال به صورت افزایش سطح یون سدیم و کلرید عرق و اختلال در ریه، پانکراس، روده، دستگاه کبدی — صفراوی و دستگاه تناسلی تظاهر می کند. میزان شیوع این بیماری در بین جمعیت های سفیدپوست ۱ در ۲۵۰۰ تولد زنده گزارش شده است. در این بیماری، ژن *cfr* بر روی بازوی بلند کروموزوم ۷ (۲۰.۷q۳۱)، متحمل جهش می شود. این ژن دارای ۲۷ اگزون است. پس از مطالعه اگزون ۱۰ و نامشخص بودن ژنوتیپ در بسیاری از خانواده های مبتلا، نیاز به بررسی اگزون های دیگر در این منطقه احساس می شد. بررسی مولکولی این بیماری، تعیین فرکانس جهش های شایع در منطقه، برآوردی از میزان بروز جهش در اگزون های مورد بررسی، امکان تشخیص ناقلین و تشخیص پیش از تولد را به خصوص در خانواده های با ریسک بالا فراهم می سازد.

روش بررسی: از ۴۸ خانواده مشکوک به بیماری فیبروز کیستیک که بر اساس علائم بالینی و پاراکلینیکی توسط پزشکان متخصص به آزمایشگاه ژنتیک معرفی شده بودند، با کسب رضایت کتبی، خونگیری به عمل آمد و پس از استخراج DNA و انجام PCR، ژن مذکور برای اگزون های ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۷b، ۱۹ و ۲۱ با روش SSCP/Hd بر روی ژل پلی آکریل آمید مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در اگزون ۷ متعلق به یکی از خانواده ها، تفاوت در الگوی (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) مشاهده گردید. در ۹ تا از خانواده ها الگوی SSCP قطعه تکثیری شامل اگزون ۱۱ تفاوت نشان داد. تفاوت در الگوی SSCP در اگزون های ۱۳، ۱۹ و ۲۱ به ترتیب در ۲، ۲ و ۱ خانواده مشاهده گردید. اگزون ۱۷b در هیچ کدام از خانواده های مبتلا تفاوت در الگوی SSCP نشان نداد.

نتیجه گیری: در جمعیت مورد مطالعه هتروژنیتی بالایی برای جهش های ژن (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, cfr*) مشاهده شد و با توجه به نتایج موجود، اگزون ۱۱ بیشترین میزان تغییر الگوی باندی را در بین اگزون های مورد بررسی نشان داده است.

کلید واژه ها: فیبروز کیستیک، ژن تنظیم کننده هدایت بین غشایی فیبروز کیستیک، اختلال ژنتیکی

مقدمه

فیبروز کیستیک به عنوان یکی از معمول ترین اختلالات توارثی تهدیدکننده جمعیت های سفیدپوست شناخته شده است. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده که فرکانس این بیماری در بیشتر جمعیت های اروپایی و جمعیت های منشاء گرفته از آنها بین ۱ در ۲۰۰۰ تا ۳۰۰۰ تولد زنده می باشد. فرکانس ناقلین در این جمعیت ها حدود ۱ در ۲۵ برآورد شده است (۱). شیوع بالای فیروز-کیستیک در گروه های جمعیتی خاصی نظیر سیلت های (Celts) که در بریتانیا و فرانسه زندگی می کنند (۱) در ۳۷۷ تولد زنده،

فیبروز کیستیک به عنوان یکی از معمول ترین اختلالات توارثی تهدیدکننده جمعیت های سفیدپوست شناخته شده است. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده که فرکانس این بیماری در بیشتر جمعیت های اروپایی و جمعیت های منشاء گرفته از آنها بین ۱ در

افریقایی‌های ساکن در افریقای جنوب غربی (۱ در ۶۲۲) و کانادایی‌های فرانسوی تبار منطقه‌ای از کانادا (۱ در ۸۹۵) گزارش شده است. احتمالاً فاکتورهای نظیر رانش ژنتیکی و یا اثر بنیانگذار برای این شیوع بالا مطرح می‌باشند (۴-۲).

از جمله علائم کلینیکی این بیماری می‌توان به ناراحتی‌های دستگاه تنفسی مانند سرفه و عفونت‌های حاد آن، دستگاه گوارشی مثل ناکارآمدی پانکراس، دستگاه تناسلی مانند عقیم بودن ناشی از غیاب دوطرفه مجاری وایران ارثی^۱ در مردان و از علائم پاراکلینیکی آن می‌توان به افزایش غلظت کلرید عرق به بیش از ۶۰ mEq/L، جذب‌های ناقص مانند جذب ناقص چربی مدفوع و ناهنجاری‌های اختلاط پتاسیل الکتریکی بین غشایی بینی اشاره کرد (۵ و ۶).

در دسترس بودن تعداد زیادی از خانواده‌ها با دو یا تعداد اعضای مبتلای بیشتر امکان استفاده از آنالیز پیوستگی ژنی را برای تعیین موقعیت ژن فراهم ساخت (۱). ژن *cftr* (تنظیم کننده هدایت بین غشایی فیروزکیستیک) بر روی بازوی بلند کروموزوم ۷ (۷q۳۱.۲) قرار گرفته و ۲۵۰ کیلوباز از طول DNA را در بر می‌گیرد. این ژن ۲۷ اگزون داشته و به یک RNA بالغ به طول ۶/۵ کیلوباز رونویسی می‌شود. پروتئین کد شده شامل ۱۴۸۰ آمینو اسید و وزن مولکولی ۱۶۸ کیلو دالتون می‌باشد. این پروتئین به صورت یک کانال کلریدی تنظیم شونده cAMP در غشاء سلول‌های پوششی عمل می‌کند (۷ و ۸). جهش‌های مختلف در ژن *cftr* می‌توانند منجر به اختلال در تنظیم ستر پروتئین، عدم ایجاد پروتئین، تولید پروتئین فاقد عملکرد، و یا کاهش پایداری پروتئین شوند. تاکنون حدود ۱۲۰۰ نوع جهش مختلف در ژن *cftr* شناسایی و گزارش شده است (۹). شیوع فیروزکیستیک یک تنوع قومی و جغرافیایی بالایی را در سراسر جهان نشان می‌دهد (۱۰).

اگزون ۷ بخشی از دمین اول طی کننده غشاء را در پروتئین CFTR کد می‌کند. از جهش‌های این اگزون می‌توان R347H، G330X را نام برد (۱۱).

اگزون ۱۱ به همراه اگزون ۱۰ دمین اول اتصال نوکلئوتیدی را در پروتئین CFTR کد می‌کند، این اگزون نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و جهش‌های شایعی نظیر G551D، R553X، R560T را در بین جمعیت‌های مختلف نشان داده است. از پلی-مورفیسم‌های اگزون و ایترون ۱۱ می‌توان به ۱۷۶۴ T/G، ۱۷۳۸ A/T در منطقه اگزونی و ۱۸۱۱+۱۶۵۰ T>A، ۵۹ T/G، ۱۸۱۲-۱۳۶ T/C، ۱۸۱۲ T/C-۱۰۸ در ایترون آن اشاره کرد.

اگزون ۱۳ نیز جزء مهمی از ژن *cftr* بوده و به تنهایی دمین تنظیمی پروتئین CFTR را کد می‌کند، از جمله جهش‌های آن 2183+5G>A+2184insA، E822X، 2043delG می‌باشند.

اگزون ۱۷b بخشی از دمین دوم طی کننده غشایی را کد می‌کند. از جهش‌های آن می‌توان به W1۰۹۸X، R1۰۶۶L و از پلی-مورفیسم‌های آن می‌توان به L1۰۵۹L، C/T ۳۳۳۲، ۳۴۹۹+۴۵۰T/C اشاره نمود.

اگزون ۱۹ بخشی از دمین دوم طی کننده غشایی و بخشی از دمین دوم اتصال نوکلئوتیدی را در پروتئین CFTR کد می‌کند. از جهش‌های آن می‌توان R1158X، R1162X را نام برد.

اگزون ۲۱ بخشی از دمین دوم اتصال نوکلئوتیدی را در پروتئین CFTR کد می‌کند. جهش N1303K از مهمترین جهش‌های این اگزون می‌باشد. N1303H، ۴۰۴۰delA، Q1313X، W1316X از جمله جهش‌ها و ۴۰۲۹A/G، ۴۰۵۰C/T (P1۳۰۶P)، ۴۰۹۵+۴۲ T/C و ۲۸۳ T/C-۴۰۹۶ از جمله پلی مورفیسم‌های این اگزون هستند (۱۱). در این مطالعه اگزون‌های ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۷b، ۱۹ و ۲۱ و به طور خاص جهش N1303K در این اگزون مورد بررسی قرار گرفتند. این اگزون‌ها بعد از اگزون ۱۰ جهش‌های شایع بیشتری را به خود اختصاص می‌دهند و مانند آن در بخش‌های حساس پروتئین کد می‌شوند. با توجه به اینکه در مطالعه انجام گرفته توسط جلالی‌راد و همکاران (۱۲) در منطقه‌ای از کشور ایران و بررسی‌های مشابه در کشورهای مجاور نظیر ترکیه بعد از اگزون ۱۰، اگزون‌های مذکور فرکانس جهشی بالایی نشان داده‌اند (۱۳)، بررسی این اگزون‌ها در این مطالعه مد نظر قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

افراد مطالعه شده در این تحقیق، مبتلایان مراجعه کننده به متخصصین ریه و گوارش بودند. پس از مراجعه خانواده‌های مبتلای مشکوک به فیروزکیستیک، مشاوره ژنتیک و رسم شجره-نامه صورت گرفته و پروباند مشخص شد. پس از تکمیل فرم رضایت، از کودک و والدین توسط پرستار همکار خونگیری به-عمل آمد. از هر فرد مقدار ۵ سی سی خون اخذ و در فالتکون‌های حاوی اتیلن دی آمین تتراسیتیک اسید، به عنوان ماده ضد انعقادی ریخته و سپس فالتکون‌ها به آرامی تکان داده می‌شد تا مخلوط شوند و از تشکیل لخته‌های خونی جلوگیری شود. نهایتاً نمونه‌ها در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری می‌شدند.

استخراج DNA از نمونه‌های خونی با روش نمک اشباع - صورت پذیرفت (۱۴). بطور خلاصه در این روش، بر روی ۲ سی سی خون، ۶ سی سی بافر لیزکننده (NH₄Cl+NaHCO₃+EDTA) افزوده و پس از لیز شدن گلبول‌های قرمز، محلول حاصله سانتریفوژ شده و این مراحل تا زمانی تکرار گردید که رسوب سفیدرنگ مایل به صورتی حاصل گردد. بر روی رسوب حاصله، مقدار ۲ سی سی بافر SE و ۲۰۰ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد و ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه و جهت هضم پروتئینی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز قرار داده شد. جهت به-دست آوردن کلاف DNA، از محلول نمک اشباع به همراه کلروفرم و اتانول مطلق سرد استفاده شد.

جهت تکثیر اگزون‌های ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۷b و ۲۱ از روش PCR استفاده گردید. یک جفت پرایمر مستقیم و معکوس که قبلاً در مقالات دیگر گزارش شده بود برای تکثیر قطعات مربوطه به

۰۱ نیز الگوی متفاوت از فرد نرمال را به صورت هموزیگوت نشان داد (شکل ۱-ج). نمونه ۸۲۷ هم الگوی متفاوت از نرمال و به صورت هموزیگوت نشان داد (شکل ۱-ج).

برای آگزون ۱۳ دو نوع الگوی بانندی SSCP متفاوت از الگوی بانندی SSCP فرد نرمال مشاهده شد، در یک خانواده برادر و خواهری دارای الگوی نوع I به صورت هموزیگوت بودند. در خانواده دیگر کودک الگوی نوع II را به صورت هموزیگوت و در خانواده سوم کودک این الگو را به صورت هتروزیگوت نشان داد (شکل ۲).

در آگزون ۱۷b در هیچ یک از خانواده‌های مورد بررسی تغییر قابل ملاحظه‌ای در الگوی SSCP مشاهده نشد. در آگزون ۱۹ نیز دو الگوی متفاوت از الگوی نرمال مشاهده شد، در یک خانواده کودک و پدر الگوی هتروزیگوت نوع I و در خانواده دیگر کودک و پدر الگوی نوع II را به صورت هتروزیگوت نشان دادند (شکل ۳).

برای آگزون ۲۱ نیز در این مطالعه نمونه‌های DNA استخراج شده از خون بیمار و والدین مورد بررسی قرار گرفت که هیچ‌یک از نمونه‌ها تغییر الگوی بانندی را نشان ندادند. جهت بررسی دقیق‌تر این آگزون به‌خصوص برای جهش N1303K پرایمر جدیدی برای تکثیر قطعه‌ای کوچک‌تر به طول ۲۸۶ جفت باز که شامل این نقطه می‌شود، استفاده گردید. یک نمونه تغییر الگو را به صورت هموزیگوت نشان داد (شکل ۴). ازدواج والدین نمونه موردنظر فامیلی بوده، و علائمی از قبیل تست عرق مثبت، مشکل ریوی و کاهش رشد داشته است.

بحث

بیماری فیبروزکیستیک یک بیماری اتوزوم مغلوب شایع در جمعیت‌های سفیدپوست می‌باشد. فراوانی این بیماری و پراکنش جهش‌های مختلف آن در قسمت‌های مختلف جهان متفاوت می‌باشد. در ایران به علت عدم وجود داده‌های ثبت شده در مورد نوزادان زنده متولد شده و همچنین فقدان تست‌های تشخیصی برای بیماری فیبروزکیستیک در بدو تولد تخمین فراوانی این بیماری هم‌اکنون امکان پذیر نمی‌باشد. همچنین در مناطقی از کشور به علت مطلوب نبودن شرایط اقتصادی و اجتماعی بیماری فیبروزکیستیک در بیماران تشخیص داده نمی‌شود. تاکنون حدود ۱۲۰۰ نوع جهش مختلف در ژن *cfr* گزارش شده است (۹). جهش‌ها و چندشکلی‌های ژن *cfr* در سراسر این ژن از قبیل آگزون‌ها، ایترون‌ها و ناحیه پرموتری آن وجود دارند. مطالعه ۳۰ جهش شایع در سراسر جهان نشان داده است که فراوانی این جهش‌ها در قوم‌ها و مناطق مختلف جهان بسیار متفاوت است (۱۳).

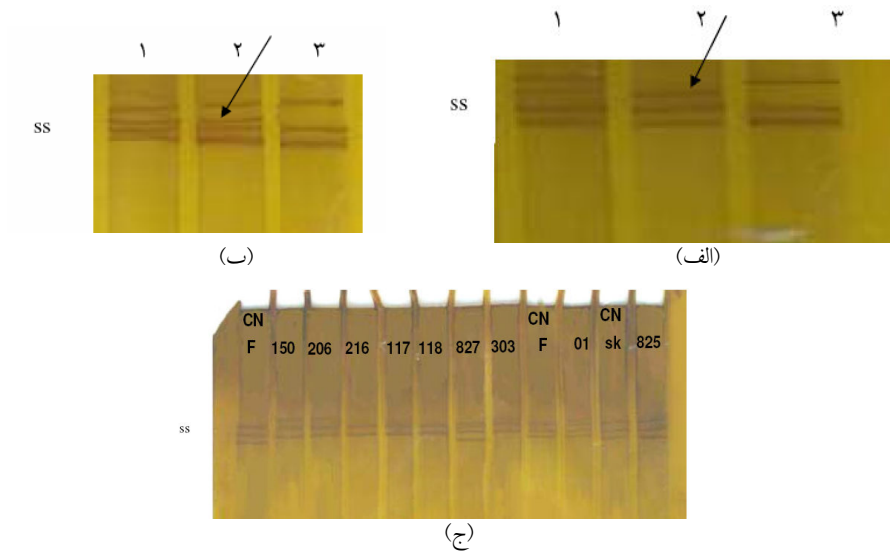
کار برده شد (۱۵). از قطعات ایترونی قبل و بعد از آگزون مربوطه برای طراحی پرایمرها استفاده شده و قطعات تکثیر شده نواحی ایترونی را نیز در بر می‌گرفتند. برای بررسی جهش N1303K در آگزون ۲۱ از یک جفت پرایمر که قطعه کوچکتري را تکثیر می‌نمود، استفاده شد. برای انجام PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از کلرید منیزیم ($MgCl_2$) با غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مولار، بافر PCR با غلظت نهایی ۱ برابر (IX)، آنزیم تک پلیمراز ۱ واحد، دزوکسی‌نوکلئوتید تری فسفات (dNTP) با غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مولار و آب دو بار تقطیر استفاده شد. تکثیر همه قطعات با یک برنامه مشابه و با دمای اتصال متفاوت مطابق گزارشات قبلی انجام گرفت (۱۵). و جهت مشاهده نتیجه واکنش PCR محصولات PCR برای هر شش آگزون، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیده و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. پس از تکثیر اختصاصی، قطعات فاقد باندهای اضافی بر روی ژل آکرل آمید با روش SSCP بررسی شد (۱۵). برای مشاهده الگوی بانندی حاصل، از روش رنگ‌آمیزی نیترا ت نقره استفاده شد (۱۶).

یافته‌ها

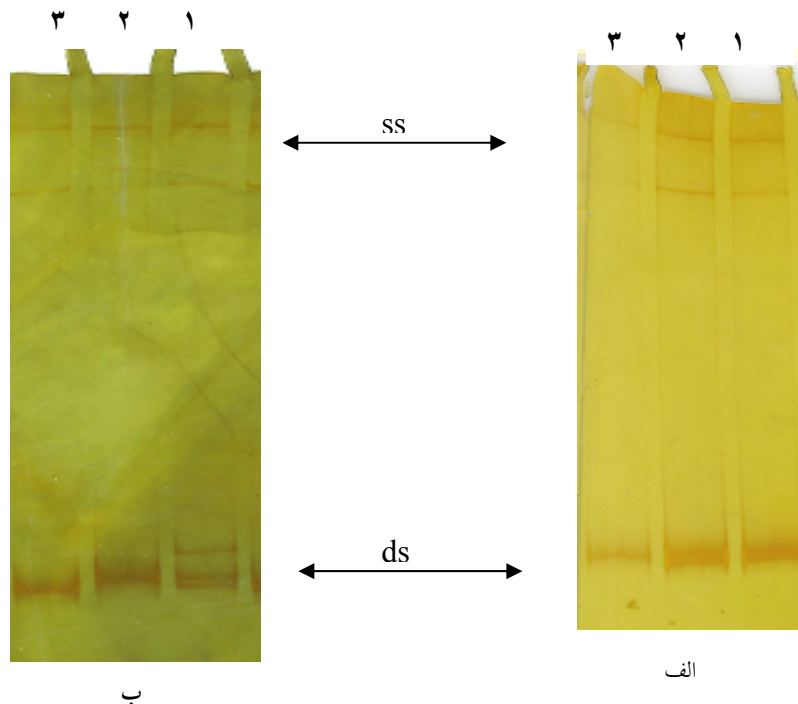
در این بررسی شش آگزون ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۷b، ۱۹ و ۲۱ ژن *cfr* در ۹۶ کروموزوم مربوط به ۴۸ خانواده مشکوک به بیماری فیبروزکیستیک با استفاده از روش SSCP مورد بررسی قرار گرفت. در صورت مشاهده تفاوت در الگوی هر یک از نمونه‌ها، نمونه موردنظر بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید با محصول PCR جدید مورد بررسی مجدد قرار گرفت تا وجود تفاوت در الگو به طور قطعی اثبات شود. یکی از نمونه‌ها در آگزون ۷ تغییر الگوی بانندی را به صورت هتروزیگوت نشان داد. در ۹ خانواده تغییرات شاخصی در الگوی SSCP مربوط به آگزون ۱۱ مشاهده شد، که این تغییرات بیانگر جهش یا پلی مورفیسم در قطعه تکثیرشده حاوی آگزون ۱۱ آنها می‌باشد (شکل ۱).

در یکی از این خانواده‌ها الگوی خاصی از SSCP مشاهده شد که بر اساس گزارشات قبلی، این الگو متعلق به جهش G542X به صورت هموزیگوت می‌باشد (شکل ۱-الف). ازدواج والدین در این خانواده فامیلی بوده است و کودک علائمی از قبیل تست عرق مثبت و عفونت ریه و وجود چربی در مدفوع را نشان داده بود. در یک خانواده دیگر تغییر مشخصی به صورت هتروزیگوت در الگوی SSCP مشاهده گردید که بیانگر وجود جهش یا پلی-مورفیسم در این آگزون می‌باشد (شکل ۱-ب). ازدواج والدین در این خانواده، غیرفامیلی بوده علائمی از قبیل رشد کم و مشکلات ریوی در بیمار مورد نظر مشاهده شده بود.

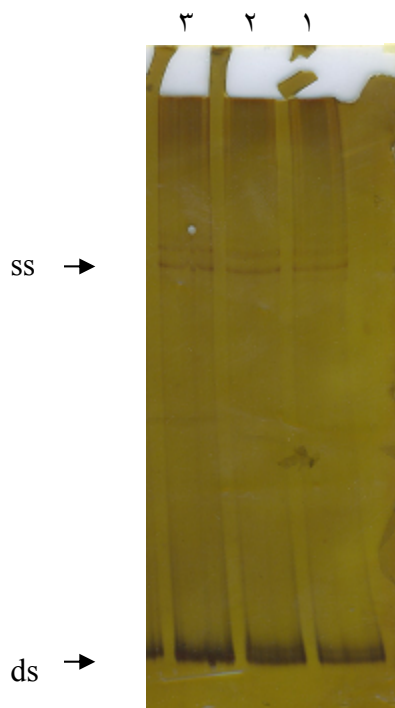
سه تا از نمونه‌های متعلق به خانواده‌های بررسی شده با شماره‌های ۱۵۰، ۲۰۶ و ۳۰۳ الگوی SSCP مشابه را به صورت هموزیگوت نشان دادند (شکل ۱-ج)، و دو نمونه دیگر با شماره-های ۱۱۷ (همچنین ۱۱۸ که مادر فرد مبتلاست) و ۲۱۶ نیز الگوی SSCP مشابه به صورت هتروزیگوت نشان دادند. همچنین نمونه



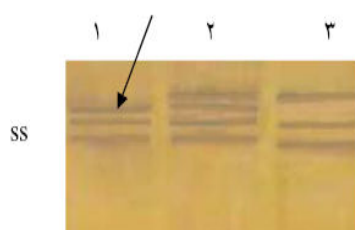
شکل شماره ۱: الف) الگوی SSCP جهش G542X، Line 1 مادر، Line 2 بیمار، Line 3 فرد نرمال را نشان می‌دهد. ب) الگوی SSCP اگزون ۱۱ در یک خانواده با تغییر مشخص الگوی باندی. Line 1 بیمار، Line 2 مادر و Line 3 فرد نرمال را نشان می‌دهد. ج) الگوی SSCP اگزون ۱۱ در چند خانواده. Lines 1, 9, 11 کنترل‌های نرمال، Lines 2, 3, 8 نمونه‌های بیمار با الگوی SSCP مشابه، Lines 4-6 نمونه‌هایی با الگوی مشابه (۱۱۷ فرزند، ۱۱۸ مادر، Line 7)، Line 10 نمونه‌ای بیمار، Line 12 بیمار بدون تغییر در این اگزون. ss: DNA تک رشته‌ای.



شکل شماره ۲: الگوی باندی مربوط به اگزون ۱۳: الف) الگوی نوع I؛ لاین ۱ و ۲: خواهر و برادر مبتلا که الگوی باندی را بصورت هموزیگوت نشان داده‌اند، لاین شماره ۳ مربوط به فرد سالم می‌باشد. ب) الگوی نوع II؛ لاین ۱ مربوط به مخلوط PCR فرد بیمار و سالم می‌باشد، لاین ۲ الگوی فرد بیمار و لاین ۳ الگوی فرد سالم را نشان می‌دهند. ds: DNA دو رشته‌ای، ss: DNA تک رشته‌ای.



شکل شماره ۳: الگوی باندی مربوط به اگزون ۱۹؛ الگوی نوع II؛ لاین ۱ و ۲: به ترتیب کودک مبتلا و پدر می‌باشد، لاین شماره ۳ مربوط به فرد سالم است. ds: DNA دو رشته‌ای، ss: DNA تک رشته‌ای.



شکل شماره ۴: الگوی SSCP در نمونه‌ای که در بررسی جهش N1303K تفاوت نشان داده است. Line1 فرد بیمار، Line2 مخلوط فرد نرمال با بیمار، Line3 فرد نرمال را نشان می‌دهد، ss: DNA تک رشته‌ای.

شناخته شده و خاصی به کار برده می‌شوند اما روش‌هایی مثل تعیین توالی، CCM^۵ و SSCP وجود دارند که برای بررسی ژن از نظر وجود جهش‌ها یا پلی مورفیسم‌های ژنی ناشناخته درون یک جمعیت به کار می‌روند. در این بین تکنیک SSCP روشی دقیق، ارزان، با حساسیت بالا و بدون نیاز به مواد رادیواکتیو است که قادر به شناسایی حدود ۹۷ درصد از تغییرات (جهش و پلی مورفیسم) موجود در ژن *cfr* می‌باشد (۱۷). این روش بر این اساس استوار است که حرکت الکتروفوریتیک DNA تک رشته‌ای بر روی ژل پلی آکریل آمید، نه فقط به اندازه آنها بلکه به شکل سه بعدی و ساختار پیچ خورده وابسته به توالی آنها هم بستگی دارد. یک تغییر تک بازی می‌تواند این ساختار ثانویه را تغییر داده و باعث تغییر الگوی باندهای ایجاد شده بر روی ژل شود (۱۸).

با توجه به وجود تعداد قابل توجهی از خانواده‌های مبتلا در منطقه شمال غرب کشور، نیاز به بررسی جهش‌ها و اقدامات در جهت غربالگری این بیماری احساس شده و لذا این مطالعه برای اولین بار در این منطقه با استفاده از تکنیک حساس SSCP که روش بهتری جهت غربالگری اولیه جمعیت برای پیدا کردن موتاسیون‌ها و پلی مورفیسم‌های ژنی می‌باشد، صورت گرفت. روش‌های مولکولی متفاوتی برای شناسایی جهش‌های ناشناخته و شناخته شده در ژن *cfr وجود دارند. تست‌های ژنتیکی می‌توانند بر روی DNA نمونه‌های مختلف از قبیل نمونه‌های خون محیطی و سلول‌های موکوسی دهان انجام بگیرند. از تست‌های مولکولی برای بررسی ژنتیکی فیبروز کیستیک می‌توان به ARMS^۱، ASO^۲، OLA^۳، RFLP^۴ اشاره کرد که به منظور بررسی جهش‌های*

1. Amplification Refractory Mutation System, ARMS
2. Allel Specific Oligonucleotide Hybridization, ASO
3. Oligonucleotide Ligation Assay, OLA

4. Restriction Fragments Length Polymorphism, RFLP
5. Chemical Cleavage Mismatch, CCM

در آگزون ۲۱ می‌شود. این جهش را از یک منشأ منفرد و مرتبط با جمعیت‌های مدیترانه‌ای باستان دانسته‌اند. میانگین ۱/۲۵ درصد در آمریکا و ۱/۶۴ درصد در اروپا دارد (۱). در لبنان در فرکانس نسبتاً بالای ۱۰ درصد گزارش شده است (۱۳). آگزون ۲۱، ۲/۰۸ درصد از تغییرات را در این مطالعه نشان داده است.

به طور کلی در این مطالعه آگزون ۱۱ در بین آگزون‌های مورد بررسی، تغییرات الگوی باندی بیشتری را به خود اختصاص داده است. با این وجود نسبت بیشتری از آل‌های CF به صورت ناشناخته باقی ماندند و این امر مطالعات وسیع‌تر را می‌طلبد. بنابراین به نظر می‌رسد که جمعیت شمال غرب کشور مانند جمعیت ترکیه از نظر تعداد و فراوانی جهش‌های CF ناهمگن می‌باشد. به این معنی که جهش‌های مؤثر متنوعی در بروز بیماری نقش دارند.

نتیجه‌گیری

در جمعیت مورد مطالعه ناهمگنی بالایی برای جهش‌های ژن *cfr* مشاهده شد و با توجه به نتایج موجود آگزون ۱۱ بعد از آگزون ۱۰ بیشترین سهم را در بین تغییرات الگوی باندی ژن *cfr* دارد. بنابراین بنظر می‌رسد، بررسی آگزون ۱۱ در بین خانواده‌های مبتلا می‌تواند در جهت تشخیص بیماری و تشخیص پیش از تولد در خانواده‌های با ریسک بالا کمک شایانی نماید.

تقدیر و تشکر

مؤلفین از همکاران دانشکده علوم طبیعی دانشکده تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و مرکز تحقیقات سل و ریه کمال تشکر را دارند. این پروژه مصوب مرکز تحقیقاتی سل و ریه می‌باشد. همچنین از کلیه خانواده‌های مبتلا که کمال همکاری را در طول این پروژه داشته و از پرستار همکار، سرکار خانم رقیه ابراهیمی سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. Welsh M, Ramsey B, Accurso F, Cutting G. *Cystic Fibrosis*. Scriver. Beaudet. Valle. Sly. Childs. Kinzler. Vogelstein. *The Metabolic and Molecular bases of inherited disease*. Vol.3. McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2001; pp: 5121-5188.
2. Bois E, Feingold J, Demenais F, Runavot y, Jehanne M, Toudic, L. cluster of cystic fibrosis cases in a limited area of Brittany(France). *Clin Genet* 1978; **14**: 73.
3. Rozen R, Schwartz R, Hilman B, Stanislovitis B, Horn G, Klinger K, et al. cystic fibrosis mutations in North American populations of French ancestry: Analysis of Quebec French-canadian and Louisiana Acadian families. *Am J Hum Genet* 1990; **47**: 606.
4. Super, M. cystic fibrosis in the South west African Afrikaner. *S Afr Med J* 1975; **49**: 818.
5. Lissens W, Zaki Mahmoud K, El-Gindi E, Abdel-Sattar A, Seneca S, Van Steirteghem A, and Liebaers I. Molecular analysis of the cystic fibrosis gene reveals a high frequency of the intron 8 splice variant 5T in Egyptian males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Rep* 1999; **5**(1): pp:10-13.
6. Hodson M, Geddes D. *Cystic Fibrosis*. 1st Edition, London Chapman & Hall Medical. 1997; p: 192.
7. Riordan J, Rommens J, Kerem B. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterisation of complementary DNA. *Science* 1989; **245**:1066-1073.

با توجه به اینکه در مطالعه‌ای که بر روی آگزون ۱۰ در این منطقه صورت گرفته، بسیاری از آل‌های CF ناشناخته مانده و همچنین اهمیت آگزون‌های مورد بررسی و اینکه جهش‌های شایعی را در نقاط مختلف شامل می‌شدند نیاز به بررسی بیشتر ژن *cfr* به‌خصوص در این آگزون‌ها احساس می‌شد.

جهش‌های آگزون ۷، ۱۳ درصد از جهش‌های مطالعه جلالی - راد و همکاران، ۶ درصد از جهش‌های جمعیت ترکیه را تشکیل می‌دهند (۱۲ و ۱۳) که در مطالعه ما ۱/۰۴ درصد از تغییرات را شامل می‌شوند.

جهش‌های آگزون ۱۱، ۴/۱ درصد از جهش‌های جمعیت ترکیه (۱۳)، ۲/۷ درصد از بیماران مورد مطالعه جلالی راد و همکاران در تهران، را تشکیل می‌دهند. در مطالعه ما ۱۴/۵ درصد از تغییرات مربوط به این آگزون بوده، که می‌تواند شامل جهش‌ها و چندشکلی‌ها باشد. *G542X* یک جهش نقطه‌ای بی‌معنی در آگزون ۱۱ و در ناحیه کدکننده دوم اتصال نوکلئوتیدی است که باعث می‌شود اسید آمینه گلیسین در جایگاه ۵۴۲ به کدون خاتمه تبدیل شود و یک *mRNA* نامطلوب CFTR ایجاد کند. میانگین این جهش در آمریکا ۲/۴۳ درصد، در اروپا ۲/۶۴ درصد و در ترکیه ۲/۶ درصد می‌باشد (۱۳ و ۱۴). در کشور ما در مطالعه‌ای که توسط جلالی راد و همکاران صورت گرفته ۲/۷ درصد از بیماران، این جهش را نشان داده‌اند (۱۲). فراوانی جهش مذکور در این مطالعه ۲/۱ درصد است.

جهش‌های آگزون ۱۳، ۵/۳ درصد و جهش‌های آگزون ۱۷b، ۱/۲ درصد از جهش‌های جمعیت ترکیه را تشکیل می‌دهند در مطالعه جلالی راد و همکاران هیچ نوع جهشی در آگزون‌های ۱۳، ۱۷b و ۱۹ گزارش نشده است. در مطالعه حاضر ۵/۲ درصد از تغییرات را آگزون ۱۳ و ۲/۰۸ درصد را آگزون ۱۹ تشکیل می‌دهند. جهش‌های آگزون ۲۱، ۱/۸ درصد از جهش‌های جمعیت ترکیه را تشکیل می‌دهند (۱۳)، جهش N1303K باعث تبدیل اسید آمینه آسپاراژین (ASN) به لیزین (LYS) در موقعیت ۱۳۰۳

8. Rommens J, Iannuzzi M, Kerem B, Drumm M, Melmer G, Dean M, et al. Identification of cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 1989, **245**:1059.
9. Eshaque B, Dixon B. Technology platforms for molecular diagnosis of cystic fibrosis. *Biotechnology advances*. 2006; **24**(1): pp: 86-93.
10. Schwartz M, Sørensen N, Brandt N, Høgdall E, Holm T. High incidence of cystic fibrosis on the Faroe Islands: a molecular and genealogical study. *Hum Genet* 1995; **95**: 703-706.
11. Cystic Fibrosis mutation atabase, 2006. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>.
12. Jalalirad M., Houshmand M, Mirfakhraie R, Goharbari M, Mirzajani F. First study of CF mutations in the CFTR gene of Iranian Patients: detection of $\Delta F508$, G542X, W1282X, A120T, R117H, and R347H Mutations. *J Trop pediatr* 2005; **50**(6): 359-361.
13. Bobadilla JL, Macek MJ, Fine JP, Farrel PM. Cystic Fibrosis: A worldwide Analysis of CFTR mutations-correlation with incidence data and Application to screening. *Hum Mut*, 2002; **19**: 575-606.
14. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1998; **16**:1215
15. Sanz J, Steiner B, and Gallatti S. Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis of DNA and RNA: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis. *Division of Human Genetics* 2003; pp: 1-9.
16. Bassam B, Anolles G, Gresshoff P. fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 1991; **196**: 800-830.
17. Liechti-Gallati S, Schneider V, Neeser D and Kraemer R. Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and any other human genetic disease. *Eur. J. Hum. Genet* 1999; **7**: 590-598.
18. Cooper DN, Czak M. *Human Gene mutation*. Bios scientific publishers 1993; pp: 73-75.