پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۲۹، شماره ۳، پاییز ۸۴، صفحات ۲۵۳ تا ۲۶۱

Original Article

مونتاژ ژنها، روش جدیدی برای شناسایی جهشهایی ژنتیکی، کاربردی اساسی برای بررسی مولکولی ژنهای پیچیده مرتبط با سرطان ارثی پستان

دکتر وحید رضا یاسایی×، **دکتر Ann Dalton** ××

× گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
×× آزمایشگاه ژنتیک مولکولی، بیمارستان کودکان شفیلد، انگلستان

چکیده

سابقه و هدف: *بسیاری از ژنهای مستعدکننده بیماریهای ژنتیکی، بزرگ، پیچیده و شامل قطعات متعدد کدکننده پروتئین (اگزون) می‌باشند. مونتاژ ژنها، روشی جدید برای تولید یک قطعه به هم پیوسته از مولکول بزرگ DNA است که این قطعه جدید می‌تواند توسط روشهای بسیارحساس مورد بررسی نهایی قرار گیرد.*

روش بررسی: *در مطالعه حاضر، چهار قطعه کدکننده پروتئین به شماره‌های ۲،۲۰،۲۳،۲۴ از ژن BRCA1 (ژن مستعد کننده سرطان ارثی پستان) به هم متصل شد و سپس توسط روش توالی یابی DNA مورد آنالیز قرار گرفت. دو قطعه ۲ و ۲۰ از اهمیت بسیار زیادی در عملکرد ژنBRCA1 برخوردار بوده و شامل نقاط شایعی برای داشتن جهشهای ژنتیکی بیماریزا می‌باشند، لذا به منظور جلوگیری از عدم شناسایی جهشهای ژنتیکی مربوطه، چهار قطعه فوق الذکر به ترتیب ۲۴-۲-۲۰-۲۳ به هم چسبانده شد.*

یافته‌ها: *برای تایید صحت نحوه چسبیدن قطعات مذکور، ابتدا مولکول نرمال (Wild type) به هم پیوسته DNA با روش توالی‌یابی مورد آنالیز قرار گرفته و صحت آن تایید شد. سپس به منظور نشان دادن کاربردی بودن این روش در شناسایی جهش ژنتیکی، سه نمونه DNA جهش یافته از قبل تشخیص داده شده، با استفاده از این چسب مورد آنالیز توالی یابی DNA قرار گرفت. در هر ۳ مورد (۱۰۰٪) جهش ژنتیکی مربوطه در مولکول جدید DNA شناسایی شد.*

نتیجه‌گیری: *مطالعه نشان داد استفاده از روش مونتاژ ژنها می‌تواند در شناسایی جهشهای ژنتیکی در ژنهای پیچیده نظیر BRCA1/2 مفید بوده و با هزینه‌ای کمتر و نیز سریعتر در آزمایشگاههای تشخیص ژنتیکی و یا غربالگری در سطوح ملی مورد استفاده قرار گیرد. شناسایی جهشهای ژنتیکی یکی از کاربردهای این روش می‌باشد لکن این تکنیک، یک ایده جدید است که می‌تواند کاربردهای بالقوه دیگری نیز داشته باشد.*

واژگان کلیدی: *مونتاژ ژنها، سرطان پستان ارثی، ژن BRCA1.*

مقدمه

روشهای مرسوم در تشخیص جهشهای ژنتیکی بر استفاده از دو نوع ماده ژنتیکی استوار است. در بعضی روشها از cDNA (Complementary DNA) و در برخی از DNA کامل (genomic DNA) و قطعات کوچک کدکننده پروتئین (اگزون) به طور مجزا برای شناسایی جهشها استفاده می‌شود. تولید و بررسی cDNA از ژنهایی که از چندین اگزون با فاصله‌های زیاد از یکدیگر (اینترون‌ها) تشکیل شده‌اند کاری دشوار است. همچنین در بعضی موارد بافت (نمونه) اصلی جهت تهیه cDNA در دسترس نمی‌باشد، لذا DNA کامل به عنوان ماده ژنتیکی، تنها منبع مناسب برای بیشتر آزمایشگاهها به خصوص از نظر تهیه و نگهداری طولانی آن

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، دکتر وحیدرضا یاسایی (email: vahid_ryassaee@hotmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۸/۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸٤/٥/۱۰

می‌باشد. از طرف دیگر انجام آزمایش بر روی DNA کامل ، یک اگزون را به عنوان واحد مورد بررسی مولکولی برای شناسایی جهش ژنتیکی مطرح می‌کند.

بسیاری از ژنهای مستعدکننده بیماریها (سرطانها)، بزرگ بوده و از اگزون‌های متعدد تشکیل و جهشهای ژنتیکی تقریباً به صورت تصادفی در سرتاسر این ژنها پراکنده شده‌اند و این در حالی است که اندازه متوسط هر اگزون در یوکاریوتیکها حدود ۱۴۰ نوکلئوتید می‌باشد (۱). لذا بررسی کامل یک ژن جهت شناسایی جهشهای نقطه‌ای ناشناخته (Unknown point mutations) نیازمند آزمایشات متعدد و در نتیجه کاهش سرعت در انجام آزمایشات غربالگری می‌شود. امروزه روشهای غربالگری متعددی ابداع شده‌اند که انتخاب یکی از آنها مستلزم رعایت چند فاکتور رقابت کننده و مهم می‌باشد از جمله: ۱- میزان دقت آزمایش،۲- پیچیدگی روش انجام آن، و ۳- هزینه انجام آزمایش.

انجام بعضی از روشهای شناسایی جهشها که به طور شایع استفاده می‌شود مانند SSCP/HA از نظر تکنیکی آسان است ولی این روشها فقط قادر به بررسی قطعات کوچکی از DNA و نیز دارای میزان دقت متغیری می‌باشند (۳،۲). بعضی دیگر مانند Protein Truncation Test (PTT) قادر به تعیین محل جهش در قطعات بزرگ DNA می‌باشند (۵،۴). امروزه تقاضا برای استفاده از روشهای تشخیصی سریع و در عین حال دقیق جهت آزمایشات غربالگری ژنتیکی به خصوص در ژنهای بزرگ و چند اگزونی افزایش یافته است. روش ارایه شده در این مطالعه شاید بتواند به عنوان یک روش کاربردی و دقیق تا حدودی این مشکلات را حل کند. با استفاده از این روش می‌توان قطعات کوچک اگزونهای مورد نظر را به هم چسباند و سپس با استفاده از یک روش دقیق مانند روش توالی‌یابی DNA در طی فقط یک واکنش، مولکول بزرگ و جدید را بررسی شود.

سرطان پستان ارثی توسط جهشهای متفاوتی در ژنهای مختلف نظیر BRCA1/BRCA2 ایجاد می‌شود. این جهشها می‌تواند در هر نقطه‌ای در طول این دو ژن اتفاق بیافتند. بررسی اگزونهای متعدد این ژنها (به ترتیب ۲۲ و ۲۶ عدد) به طور جداگانه کاری دشوار، پرهزینه و وقت‌گیر می‌باشد. با استفاده از این روش می‌توان اگزونهای متعددی از این دو ژن را بدلخواه انتخاب و به هم چسباند و سپس با استفاده از یک روش حساس مانند توالی‌یابی DNA مولکول جدید DNA را مورد بررسی قرار داد. این روش به طور اختصاصی می‌تواند برای بیماریهایی نظیر سرطان پستان ارثی که هتروژنوس بوده (بیش از یک ژن در بروز آن دخالت داشته) و نقاط خاصی از ژنها احتمال بیشتری برای داشتن جهش را دارند، کاربرد زیادی داشته باشد.

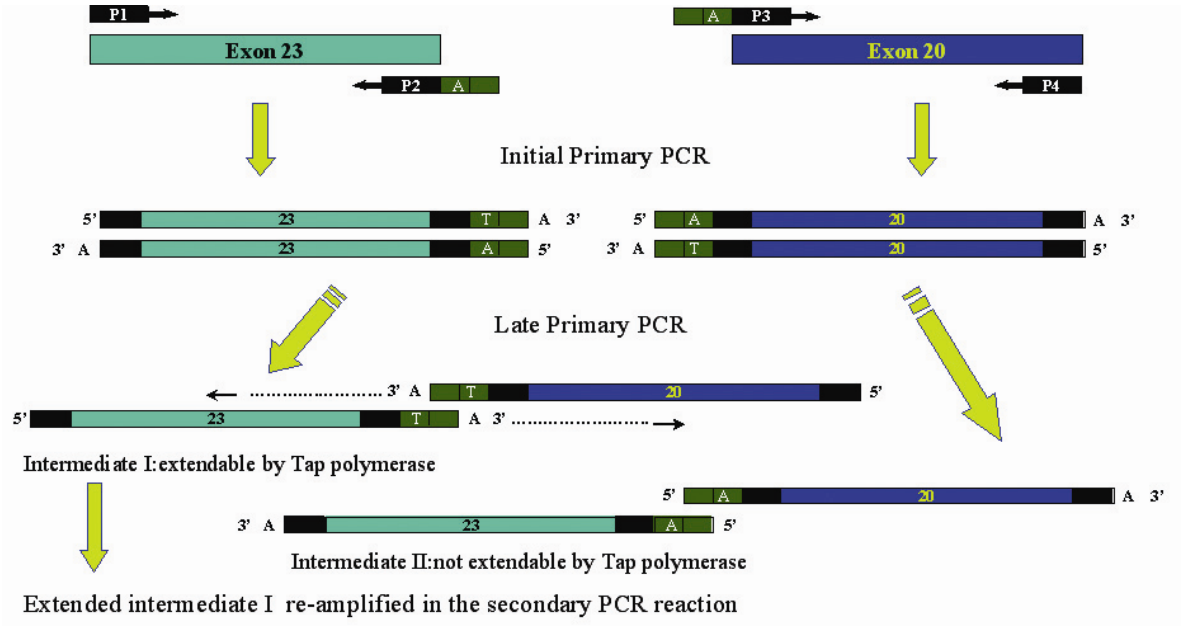
مواد و روشها

مونتاژ ژنها یک نوع روش PCR تغییر یافته است که طی مراحل آن قطعات تولید شده (محصول PCR) بر اساس اصول بیوفیزیک بهم می‌چسبند. این روش در طی دو مرحله انجام می‌شود. در مرحله اول همانطور که در شکلهای شماره ۱و ۲ نشان داده شده، DNA کامل با استفاده از روش PCR و مقادیر کم پرایمرهای اختصاصی تکثیر می‌شود. در طی انجام مرحله اول PCR با افزایش غلظت DNA تکثیر شده غلظت پرایمرها کاهش می‌یابد و لذا مقادیر موجود پرایمرها در واکنش PCR برای طویل نمودن قطعه در حال تکثیر کافی نخواهد بود. این موضوع به پیوستن قطعات متصل کننده به یگدیگر کمک می‌کند و باعث پدید آمدن دو نوع مولکول DNA می‌شود که فقط یکی از آنها بعلت داشتن نوکلئوتید A در انتهای '3 خود قادر به طویل شدن توسط آنزیم Taq polymerase می‌باشد و نوع دیگر از ادامه روند طویل شدن باز مانده و از فرآیند واکنش PCR خارج می‌شود (شکل ۱). همانطور که فرآیند PCR به پیش می‌رود قطعات بزرگتری از مولکول DNA بوجود می‌آید که در نهایت منجر به تولید قطعه طویل شده DNA مورد نظر می‌شود.

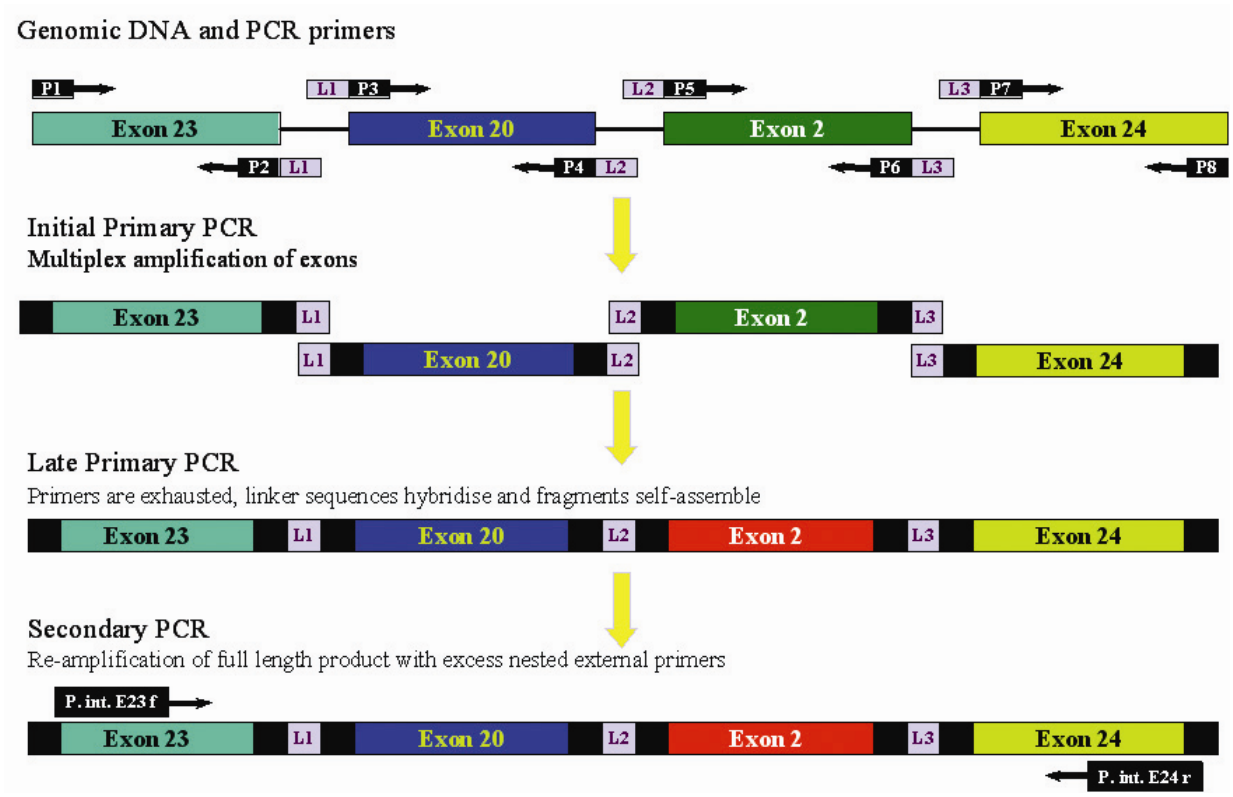
با انجام مرحله دوم واکنش PCR (مانند یک واکنش معمولی PCR) با استفاده از مقادیر کم از محصول PCR مرحله اول و نیز پرایمرهای داخلی(Internal nested primers) قطعات بزرگ DNA در غلظت بالا تولید شده که متعاقبا بعنوان ماده برای روشهای تشخیصی بعدی نظیر توالی یابی DNA مورد استفاده قرار می‌گیرد (شکل ۲).

طراحی پرایمرها (نکات اساسی در طراحی پرایمرها):

طراحی دقیق پرایمرها و قطعات متصل کننده اختصاصی (Linkers) از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است. قطعات اختصاصی از DNA کامل که تقریبا دارای مقدار Tm مشابهی هستند برای طراحی پرایمرها انتخاب می‌شوند. میزان GC قطعات متصل‌کننده‌ها (Linker segments) باید در حدود ۵۰٪ باشد. مقدار Tm قطعات متصل‌کننده‌ها می‌بایست بیشتر از مقدار Tm پرایمرهای طراحی شده برای DNA کامل باشد. طراحی پرایمرها باید به گونه‌ای باشد که از تولید ساختمانهای ثانویه داخلی (Internal secondary structure)



شکل ۱- مرحله اول PCR در فرایند مونتاژ ژنها



شکل ۲- مرحله دوم PCR در فرایند مونتاژ ژنها

در محصول PCR جلوگیری نماید. همچنین بهنگام طراحی پرایمرها می‌بایست یک نوکلئوتید (A) بین قطعه متصل‌کننده و DNA کامل اضافه نمود. اضافه نمودن این نوکلئوتید در sense sequence باعث اضافه شدن (T) درانتهای '3 قطعات antisense sequence در محصول نهایی PCR می‌شود.

همه پرایمرها شامل قطعات متصل‌کننده اختصاصی(Linkers) باید از نظر هومولوژی Alu repeat sequences در نمونه DNA مورد نظر بررسی شوند. استفاده از وب سایت زیر برای این منظور کاملا مفید است.

http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast

قطعات متصل‌کننده اختصاصی متشکل از ۱۳ نوکلئوتید به همراه پرایمرهای اختصاصی برای چسباندن چهار اگزون مهم ژن BRCA1 به نامهای اگزونهای ۲۰،۲، ۲۳ و ۲۴ برای استفاده در مرحله اول PCR و نیز دو پرایمراختصاصی داخلی(specific internal primer) برای استفاده در مرحله دوم PCR طراحی شد. محل طراحی این پرایمرها چند نوکلئوتید بالاتر و پایینتر از پرایمرهای خارجی specific (external primer) قرار دارد (جدول ۱).

پس از چسباندن چهار اگزون فوق الذکر، محصول جدید (chimeric DNA molecule) طی یک واکنش توسط توالی‌یابی DNA مورد آنالیز نهایی قرار گرفت.

اگزونهای ۲۰ و ۲ شامل نقاط شایعی برای داشتن جهشهای ژنتیکی بیماریزا است که می‌تواند منجر به تولید سرطان پستان ارثی شود. لذا به منظور جلوگیری از عدم شناسایی جهشهای ژنتیکی مربوطه در این نقاط مهم، چهار قطعه فوق‌الذکر به ترتیب ۲۴-۲-۲۰-۲۳ به هم چسبانده شد به طوری که دو اگزون فوق در وسط مولکول DNA جدید قرار گرفت. نحوه قرار گرفتن اگزونها را می‌توان با طراحی‌های اختصاصی پرایمرها از قبل و به دلخواه تعیین نمود.

روش تکثیر مولکول جدید DNA توسط PCR با استفاده از روش مونتاژ کردن ژنها

DNA کامل بعنوان نمونه برای تکثیر مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای طراحی شده در مقیاس غلظتی ۰/۲ میکرومول ساخته و با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) تخلیص شد تا وجود ماده ساخته شده از هرگونه انواع سنتز شده پرایمرهای نامطلوب حذف گردد و فقط پرایمرهایی با اندازه مورد نظر در فرآیند تکثیر مولکول جدید DNA شرکت نمایند. مولکول جدید با استفاده از این روش طی دو مرحله و با استفاده از روش PCR تولید شد.

در مرحله اول واکنش PCR، مخلوطی از ۱۰۰ نانوگرم DNA کامل، یک میکرولیتر از هر پرایمر (جدول ۱) با غلظت ۴۰ نانومول در لیتر، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTPs با غلظت ۵ میلی‌مولار از هر dNTP ، ۲ میکرولیتر بافر B با غلظت ۱۰ برابر (شامل Tris-Hcl ۲۰ میلی‌مولار PH=۸، KCl ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، DTT یک میلی‌مولار، گلیسرول ۵۰ درصد، Tween® 20 ۰/۵ درصد و Nonidet®-P40 ۰/۵ درصد)، ۳ میکرولیتر منیزیم ۲۵ میلی‌مولار، یک میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase بر اساس دستورات شرکت سازنده (شرکت پرومگا و شماره کاتولوگ M1665) و باقیمانده حجم، آب استریل تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر آماده شد.

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسیکلر مدل ۹۷۰۰ شرکت ABI بشرح زیر انجام شد: مخلوط PCR بمدت ۳ دقیقه و بطور اولیه در دمای $94^{\circ}C$ قرار داده شد و سپس بلافاصله برای ۳۰ بار بصورت یک دقیقه در دمای $94^{\circ}C$، یک دقیقه در دمای $60^{\circ}C$ و ۲ دقیقه در دمای $72^{\circ}C$ و در نهایت بمدت ۱۰ دقیقه در دمای $72^{\circ}C$ قرار گرفت.

در مرحله دوم واکنش PCR، مقدار ۵ میکرولیتر از محصول واکنش مرحله اول PCR به اضافه ۲ میکرولیتر از پرایمرهای اینترنال (با غلظت ۵ میکرومول در لیتر)، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTPs با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر بافر B شامل محتویات مشابه در واکنش اول PCR ، ۲ میکرولیتر منیزیم ۲۵ میلی‌مولار، یک میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase براساس دستورات شرکت سازنده (شرکت پرومگا و شماره کاتولوگ M1665) و باقیمانده حجم، آب استریل تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در یک تیوب میکروسانتریفوژ تهیه شد. برنامه انجام مرحله دوم واکنش PCR کاملا مشابه مرحله اول واکنش PCR و با شرایط یکسان انجام شد. پس از اتمام مرحله دوم، مقدار ۳ میکرولیتر از محصول آن جهت تایید عملکرد این روش و سنتز مولکول جدید DNA بر روی آگاروز ۱٪ مورد آنالیز قرار گرفت.

بازیافت محصول مرحله دوم واکنش PCR از ژل آگاروز

مولکول جدید DNA از روی ژل آگاروز جدا و توسط کیت JetsorbTM از شرکت Genome Inc. و بر اساس دستورات شرکت سازنده آن تخلیص شد. مقدار ۶۰ نانوگرم از آن مورد توالی‌یابی DNA در هر دو جهت Forward sequence و Reverse sequence با استفاده از کیت اختصاصی توالی‌یاب BigDye و دستگاه توالی‌یاب (DNA Sequencer) مدل ۳۷۷ از شرکت ABI مورد آنالیز قرار گرفت.

نوکلئوتید، ستون چهارم اگزون ۲۳ با سایز ۱۸۷ نوکلئوتید و ستون پنجم اگزون ۲ با سایز ۱۶۹ نوکلئوتید می‌باشند).

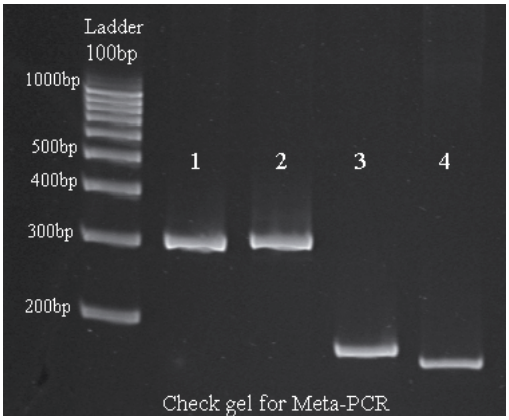
→

جدول ۱- قطعات متصلکننده و پرایمرهای اختصاصی برای DNA کامل برای اتصال اگزون‌های ۲، ۲۰، ۲۳ و ۲۴ ژن BRCA1

شماره	نام	طول	Sequence 5' 3'	*Tm* genomic segment (°C)	*Tm* Linker (°C)
01	Ex 23F (ext.)	25	atgatgaagtgacagttccagtagt	59.9	—
02	Ex 23R-L1F	35	***ctgcgcggcggct*A**caaaaggaccccatatagcac	59.8	65
03	Ex 20F-L1R	35	***agccgccgcgcag*A**gtgtctgctccacttccattg	59.3	65
04	Ex20R-L2F	38	***tcgggcccgcgga*A**cctgtgtgaaagtatctagcactg	59.7	64
05	Ex2F-L2R	38	***tccgcgggcccga*A**tgtgttaaagttcattggaacaga	60.3	64
06	Ex 2R-L3F	37	***aggccgggccgct*A**cccaaattaatacactcttgtgc	59.6	65
07	Ex 24F-L3R	36	***agcggcccggcct*A**cgattgattagagcctagtcca	59.9	65
08	Ex 24R (ext.)	23	agtagccaggacagtagaaggac	59.7	—
09	Ex 23F (int.)	24	TCCTACTTTGACACTTTGAATGCT	61.1	—
10	Ex 24R (int.)	21	GTCCTGTGGCTCTGTACC TGT	59.8	—

به منظور وضوح بخشهای مختلف پرایمر، هر یک از آنها از سه نوع حروف تشکیل شده‌اند، قسمت متصلکننده بصورت حروف کوچک ایتالیک در ابتدای پرایمر، باز آلی ادنین (A) بصورت حرف بزرگ ضخیم زیرخط کشیده در وسط پرایمر و قسمت ژنومیک پرایمر بصورت حروف کوچک معمولی در بخش انتهایی پرایمر. پرایمرهای شماره ۲ تا ۷ همگی پرایمرهای داخلی بوده و شامل سه جفت قطعه متصل کننده (linker=L1-L3) می‌باشند. پرایمرهای شماره ۱ و ۸ پرایمرهای خارجی می‌باشند. پرایمرهای شماره ۹

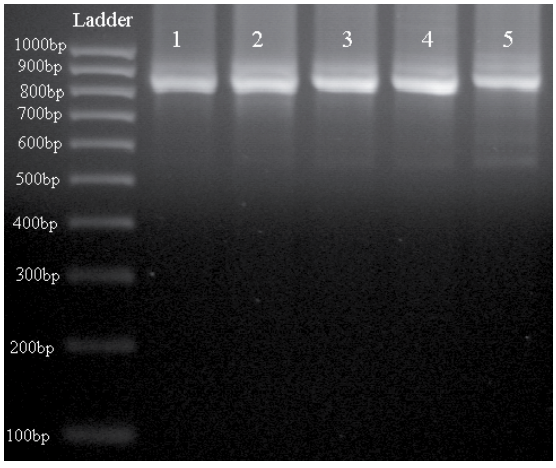
از آنجایی‌که همه واکنشهای PCR با یک Annealing temperature مشابه انجام می‌شود، ضروری است عملکرد پرایمرها قبل از انجام PCR مربوط به اتصال اگزون‌ها، مورد تایید قرار گیرد. این کار با انجام PCR قطعات (اگزون‌ها) بطور جداگانه انجام می‌گیرد. همانطور که در شکل زیر نشان داده شده است، محصول PCR و کارکرد خوب پرایمرها خوب می‌باشد. هیچگونه محصول غیراختصاصی مشاهده نمی‌شود و غلظت محصول در حد قابل قبول و اندازه قطعات صحیح می‌باشد.



شکل ۳- بررسی محصول PCR چهار اگزون ۲، ۲۰، ۲۳ و ۲۴ ژن BRCA1 بطور مجزا (نمونه‌ها بر روی ژل آکریل آمید ۱۵٪ بررسی شده‌اند. اولین ستون سمت چپ DNA marker، ستون دوم اگزون ۲۴ با سایز ۳۲۲ نوکلئوتید، ستون سوم اگزون ۲۰ با سایز ۳۲۰

تایید صحت عملکرد پرایمرها بعد از اتصال قطعات (اگزون‌ها):

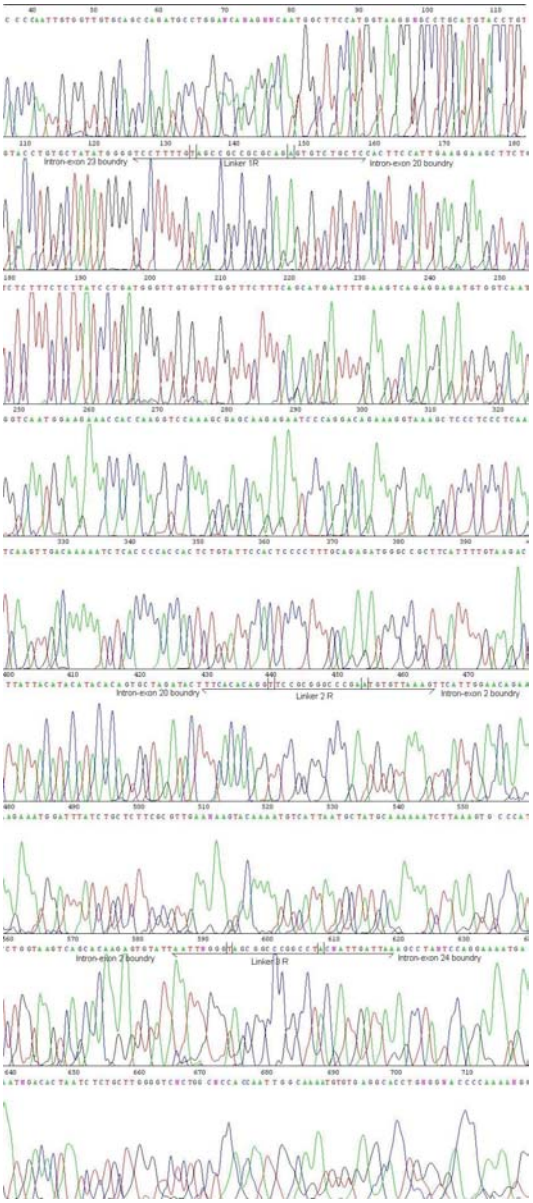
محصول نهایی (Chimeric DNA Molecule) روی آگاروز ۱/۲٪ بررسی شد. همانطور که در شکل شماره ۴ مشهود است، اندازه مولکول DNA جدید بدست آمده از نمونه‌های مختلف (ستونهای ۱ تا ۵) مطابق انتظار بوده (۸۵۰ نوکلئوتید) و غلظت محصول مربوطه برای استفاده در روش توالی‌یابی DNA به نظر کافی می‌باشد.



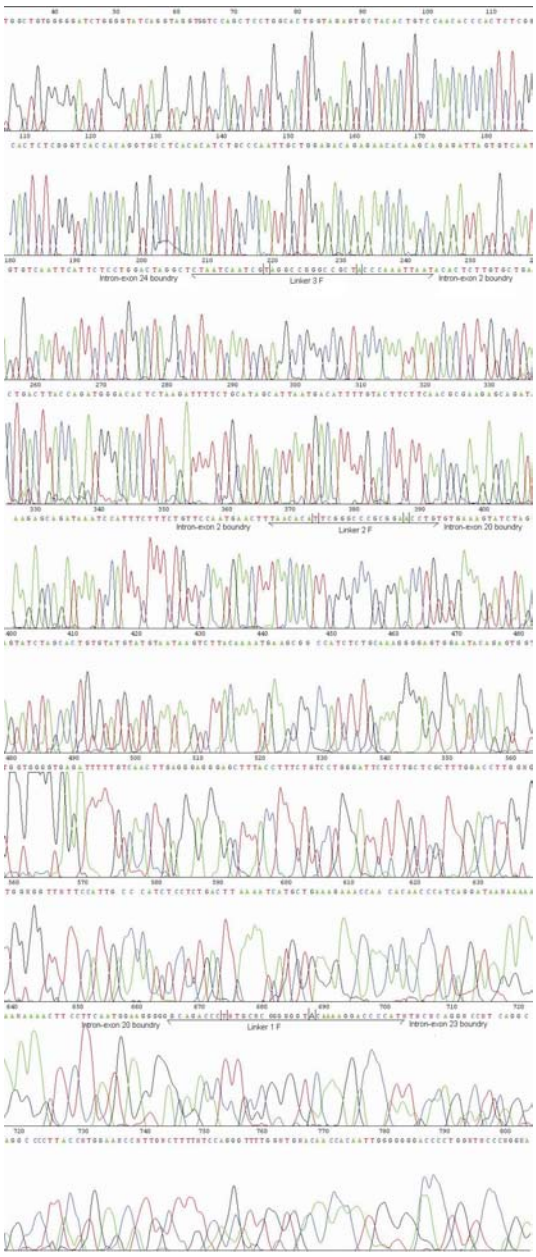
شکل ۴- مولکول بزرگ DNA (محصول چسبیده شده چهار اگزون ۲، ۲۰، ۲۳ و ۲۴ ژن BRCA1)

تعیین توالی نوکلئوتیدهای مولکول DNA جدید و بزرگ با استفاده از روش مونتاژ کردن ژنها:

به منظور تایید اتصال صحیح قطعات اگزون‌های بهم چسبیده شده، محصول PCR مرحله دوم مورد توالی‌یابی DNA قرار گرفته و صحت عملکرد این روش مورد تایید قرار گرفت.
اشکال ۵ و ۶ توالی کامل نوکلئوتیدهای قطعات اگزونهای ۲۴، ۲۰، ۲ و ۲۳ بهم چسبیده را در هر دو جهت جلورو و عقب‌رو نشان می‌دهد. همانطور که اشکال فوق‌الذکر نشان می‌دهند هیچگونه خطا و یا تخریبی در پیوستگی و یا محتویات نوکلئوتیدهای بهم چسبیده مشاهده نشد و قطعات مورد نظر یکی پس از دیگری و طبق طراحی قبلی بدرستی بهم متصل شده‌اند.



شکل ۵- الکتروفوروگرام جلوبرنده (Forward Sequence) شامل توالی کامل تمامی قطعات متصل شده (اگزونهای ۲۴، ۲۰، ۲، ۲۳)



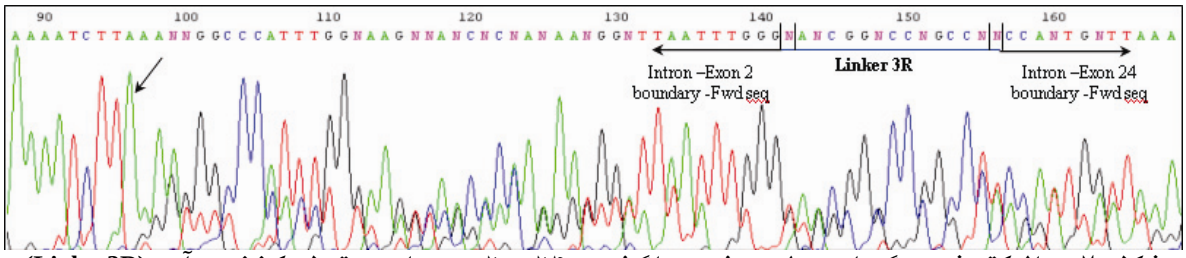
شکل ۶- الکتروفوروگرام عقب برنده (Reverse Sequence) شامل توالی کامل تمامی قطعات متصل شده (اگزونهای ۲۴، ۲۰، ۲، ۲۳)

شناسایی ۳ جهش ژنتیکی از قبل مشخص شده با استفاده از روش مونتاژ کردن ژنها و توالی‌یابی DNA:

برای تایید کاربردی بودن این چسب در تشخیص جهش در نمونه‌های جهش یافته (mutant samples) سه نمونه جهش

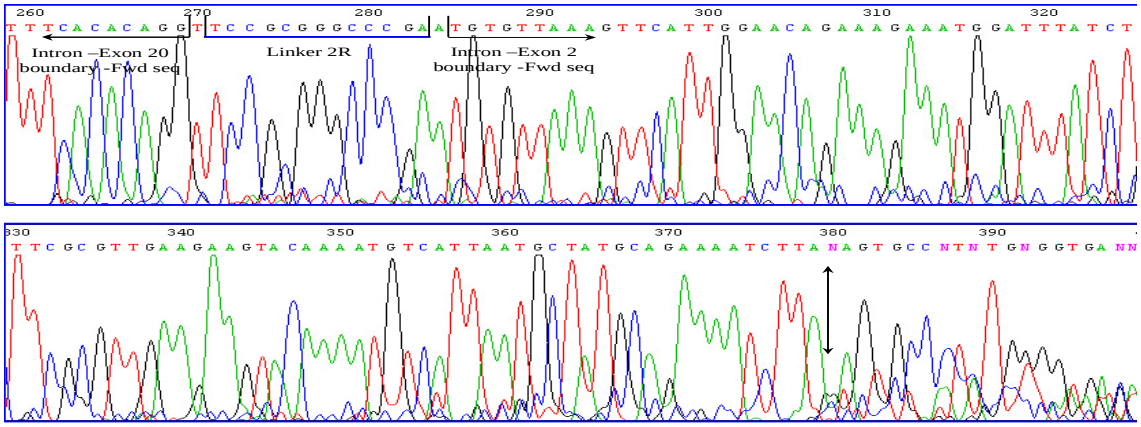
یافته هتروزیگوت از قبل شناسایی شده در اگزونهای ۲۰ و ۲ ژن BRCA1 مورد بررسی توسط روش توالی‌یابی DNA قرار گرفت (۶).

شناسایی هر سه نمونه جهش یافته با استفاده از چسب ژنتیکی نیز تایید شد. بعبارت دیگر در ۱۰۰ درصد موارد استفاده از این روش در تشخیص جهشهای متفاوت در نمونه‌های جهش یافته مفید واقع شد. مشخصات این جهشها عبارتند از؛ در اگزون دو ژن BRCA1 شامل: 185 delAG، 185-186 insA و در اگزون بیست ژن BRCA1 شامل: 12bp duplication [IVS20+48]. الکتروفوروگرام‌های مربوطه در اشکال ۹-۷ مشخصات جهشها را نشان داده‌اند.



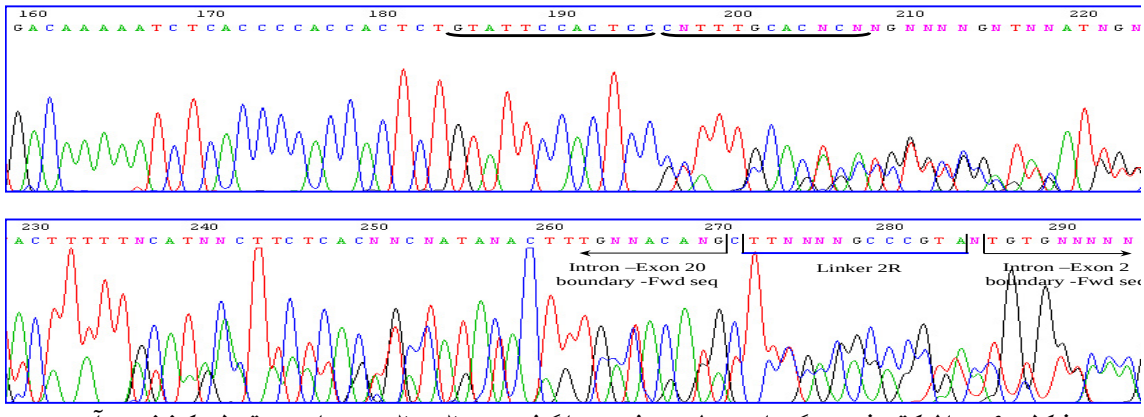
شکل ۷- الکتروفوروگرام جلوبرنده اگزون ۲۴ و۲ بهمراه متصل کننده آن (Linker3R)

(همانطور که در شکل فوق نشان داده شده است اضافه شدن نوکلئوتید [A] که با پیکان نمایش داده شده است باعث حرکت یک آلل به جلو شده و توالی یکسان دو آلل را بر هم زده است (Frameshift mutation) لذا وضوح قطعه متصل کننده Linker 3R کامل نیست. اگر چه محدوده قطعه مربوطه و انتهای اگزون ۲ و نیز شروع اگزون ۲۴ بر روی سکانس مشخص شده است.)



شکل ۸- الکتروفوروگرام جلوبرنده اگزون ۲۰ و۲ بهمراه متصل کننده آن (Linker2R)

پیکان محل حذف دو نوکلئوتید [AG] را در یکی از آللها که باعث حرکت یک آلل به جلو شده و توالی یکسان دو آلل را بر هم زده، را نشان می دهد. محدوده قطعه متصل



شکل ۹- الکتروفوروگرام جلوبرنده اگزون ۲۰ و۲ بهمراه متصل کننده آن (Linker2R)

بحث

بعضی از بیماریها و سرطانها مانند سرطان پستان و استئوژنزیس ایمپرفکتا، هتروژنوس (بیش از یک ژن در بروز بیماری نقش دارد)، می‌باشند. بسیاری از ژنهای مستعدکننده بیماریها و سرطانهای بزرگ، شامل اگزون‌های متعدد و دارای پراکنش جهشهای نقطه‌ای در سراسر طول خود می‌باشند. ژنهای مستعدکننده سرطان پستان ارثی (BRCA) از این دسته هستند. این خصوصیات باعث پیچیدگی در بررسیهای مولکولی، کاهش سرعت و افزایش هزینه‌های آزمایشات غربالگری می‌شود.

شاید بتوان با استفاده از روش مونتاژ ژنها و استفاده توام از یک روش بسیار حساس مانند توالی‌یابی DNA تا حدودی مشکلات فوق‌الذکر را برطرف نموده و آنرا بطور اختصاصی در غربالگری‌های جمعیتی برای بیماریهایی که جهشهای بیماریزا در بیش از یک ژن (مانند ژنهای BRCA) باعث بروز آنها می‌شود، به کار گرفت.

اگرچه در این مطالعه ما توانستیم با استفاده از این روش تا شش قطعه مختلف را بطور دلخواه بهم بچسبانیم (اطلاعات مربوطه در این مقاله ارایه نشده است) لکن انجام مطالعات بیشتری جهت تعمیم آن در سایر ژن‌ها ضروری است.

نتایج این مطالعه مزایای استفاده همراه از این روش را در آزمایشگاههای تشخیصی که قبلا از تکنیکهای شناسایی جهشها نظیر DGGE, CSGE, DHPLC و PTT استفاده می‌کرده‌اند را نشان می‌دهد. جدیدترین تکنیک، DHPLC است که بعنوان یک وسیله قابل اعتماد در شناسایی تغییرات ژنتیکی بکار می‌رود و اخیرا توجه بسیاری از آزمایشگاهها را بخود جلب کرده است (۷). لکن استفاده از این تکنیک، نیازمند طراحی و آماده‌سازی اولیه بسیار زیاد ماشین مربوطه برای بررسی هر قطعه (اگزون) در محصول PCR می‌باشد و سرمایه‌گذاری زیاد برای خرید ماشین آلات مربوطه را طلب می‌کند.

از مزایای استفاده از این ماشین، اتوماتیک بودن آن و سرعت آنالیز بالای نمونه‌ها، پایین بودن هزینه آنالیز هر نمونه، عدم نیاز به پرایمرهای اختصاصی و یا متصل شده به مواد اختصاصی نظیر مواد رادیواکتیو، حساسیت زیاد (حدود ۱۰۰٪) نتایج و قابلیت شناسایی انواع جهشها را می‌توان نام برد. روش مونتاژ ژنها می‌تواند بهمراه این تکنیک مورد استفاده قرار گیرد. پیشرفتهای اخیر در تکنولوژی توالی‌یابی DNA که توانایی خواندن ۱۰۰۰ نوکلئوتید را در یک واکنش فراهم نموده، سبب شده که همراه کردن این دو روش (مونتاژ ژنها و DNA Sequencing) با کسب بهترین نتایج با حساسیت بالا و هزینه بسیار پایین، بهترین انتخاب باشد. انتخاب روش توالی‌یابی DNA بعنوان تکنیک نهایی تشخیص تغییرات DNA همراه با روش مونتاژ ژنها امکان استفاده از پرایمرهای اختصاصی (linker) کوچکتر و با مقدار GC بیشتر را فراهم نموده و این بنوبه خود منجر به بهتر شدن محصول نهایی PCR می‌شود.

به هر حال، توام نمودن بیش از یک روش تشخیصی ممکن است برای آنالیز کامل یک ژن مورد نیاز باشد. در این ارتباط ساختمان ژن مورد نظر، توالی نوکلئوتیدهای مجاور ناحیه splice site، نوع موتاسیون، وجود اگزون‌های کوچک و بزرگ در یک ژن و AT rich بودن برخی نواحی ژنها فاکتورهایی هستند که می‌تواند در انتخاب یک روش تشخیصی همراه با روش مونتاژ کردن ژنها موثر باشد.

در این مطالعه چهار قطعه با روشهای آنالیز نهایی توالی‌یابی DNA و سه و شش قطعه با روش PTT (نتایج در این مقاله ارایه نشده است) با استفاده از روش مونتاژ ژنها بهم چسبانده شد. تاکنون محققان توانسته‌اند پنج قطعه را بهم بچسبانند (۸)، موفقیت در چسباندن تعداد قطعات بیشتر یک مزیت برای این روش محسوب می‌شود. در این مطالعه شش قطعه شامل اگزون‌های ۲، ۲۰ ژن BRCA1 و قطعات انتهایی ′۵ و ′۳ اگزون ۱۱ ژنهای BRCA1, BRCA2 (انتخاب این قطعات بعلت وجود جهشهای بیماریزا در این مناطق و عدم شناسایی قطعی آنها توسط روش PTT می‌باشد) بهم چسبانده و توسط روش PTT مورد آنالیز قرار گرفت، چرا که طول مولکول جدید DNA حدود ۲۸۰۰ نوکلئوتید بوده و بزرگتر از آن است که بتوان توسط روش توالی‌یابی DNA و یا سایر تکنیکها آنرا بررسی نمود.

بهر حال هر چه تعداد قطعات بیشتر باشد نیاز به بهینه سازی بیشتر واکنش PCR می‌باشد. همچنین تخلیص مولکول DNA جدید چنانچه با روش DHPLC در مقایسه با تخلیص آن از ژل آگاروز انجام شود، نتایج بهتری در آنالیز نهایی بدنبال خواهد داشت.

موفقیت در چسباندن قطعات به طور محسوسی به فاکتورهای زیر بستگی دارد:

- طراحی Linker های اختصاصی با محتوای GC حدود ۵۰٪
- انتخاب محل مناسب برای پرایمرهای اصلی و طراحی صحیح آنها از نظر عدم وجود ساختمانهای ثانویه
- افزودن نوکلئوتید A (آدنین) بین پرایمر اصلی و Linkerهای اختصاصی
- طراحی و محاسبه مقادیر بسیار مشابه Tm برای پرایمر اصلی و Linker های اختصاصی
- عدم وجود هومولوژی بین Linker های اختصاصی و سکانس ژنومی موجود مورد بررسی
- خالص بودن پرایمرها بهنگام ساخت از نظر وجود انحصاری پرایمرها با سایز مورد نظر

بهر حال بر اساس مطالعات موجود، اثرات اندازه و تعدد قطعات در موفقیت عملکرد چسب ژنتیکی سوالی است که همچنان بی پاسخ مانده و نیازمند تحقیقات بیشتر می‌باشد.

بطور خلاصه روش مونتاژ ژنها می‌تواند با اهداف گوناگون از جمله ساختن ژنهای جدید و بدنبال آن پروتئینهای مورد نظر برای بررسی عملکرد آنان، طراحی و ایجاد محلهای قابل شکسته شدن برای آنزیمهای هضم‌کننده (Restriction enzymes) که قبلا در سکانس ژنی مورد نظر (وکتورها) وجود نداشته است و کاربردهای دیگر، مورد استفاده قرار گیرد. لذا شناسایی جهش ها (Mutation Detection) یکی از کاربرد های آن می باشد.

از مزایای مهم این روش صرفه‌جویی در هزینه، وقت و ارتقا کیفیت نتایج می‌باشد چرا که تعدد قطعات اگزونها، کوچک بودن آنها و پراکنش تصادفی جهشها در سراسر ژنها و هتروژنوس بودن بعضی بیماریها بررسی مولکولی آنها را زمان‌بر و پرهزینه می‌کند. شاید این مطالعه آزمایشگاههای تشخیصی مرجع را که نمونه‌های متعددی را در فرصت کوتاهی می‌بایست بررسی و پاسخ دهند به استفاده از این روش ترغیب کند.

امید است این مطالعه راهگشای محققین در استفاده از روشها وتکنیکهای جدید در آزمایشات مولکولی تشخیصی بشود.

REFERENCES

1. Naora H, Deacon NJ. Relationship between the total size of exons and introns in protein-coding genes of higher eukaryotes. Proc Natl Acad Sci USA 1982;79: 6169-200.
2. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 1989;5:874-9.
3. White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien SJ, Dean M. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. Genomics 1992;12:301-6.
4. Roest P, Roberts R, Sugino S, Van Ommen GJB, den Dunnen JT. Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. Hum Mol Genet 1993;2:1719-21.
5. Powell SM, Petersen GM, Krush AAJ, Booker S, Jen J, Giardello FM, et al. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 1993;329:1982–7.
6. Yassaee VR, Zeinali S, Harirchi I, Jarvandi S, Mohagheghi MA, Hornby DP, et al. Novel mutations in the BRCA1 and BRCA2 gene in Iranian women with early-onset breast cancer. Breast Cancer Research Journal 2002;4(4).
7. Oefner PJ, Underhill PA. Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). Am J Hum Genet 1995;57(Suppl):A266.
8. Wallace AJ, Wu CL, Elles RG. Meta-PCR: a novel method for creating chimaeric DNA molecules and increasing the productivity of mutation scanning techniques. Genet Test 1999;3(2):173-83.