مهرشاد فکری
دکتر طاهره ناجی

بررسی نقش روش آزمایشگاهی LAMP در تعیین جنسیت جنین در انسان

در انسان SRY (ناحیه تعیین جنسیت کروموزوم Y) ژن اصلی برای تعیین جنسیت است که در نرهای نرمال XY و ماده های نادر XX مشاهده می شود و در ماده های نرمال XX و بعضی از ماده های نادر XY وجود ندارد(۱). چندین روش وجود دارد که می تواند یک ژنوتیپ نر را به وسیله تکثیر ژن SRY شناسایی کند. هدف از این پژوهش شناسایی ژن SRY به منظور تعیین جنسیت در انسان در میان دوره حاملگی با استفاده از آزمون تکثیر هم وابسته به حلقه (LAMP) است. دراین بررسی، کل ۱۸ نمونه خونی از زنان آبستن در ۸ هفته اول دوره بارداری جمع آوری و DNA پلاسما استخراج شد. آزمون LAMP با استفاده از DNA به دست آمده برای تشخیص ژن SRY انجام شد. نتایج آزمون LAMP نشان داد واکنش مثبت تنها برای نمونه های دارای کروموزوم XY بسیار اختصاصی بود. در حالی که هیچ تکثیری در نمونه های دارای کروموزومXX مشخص نشد. سرانجام روشن شد که از بین نمونه های جمع آوری شده، ۹جنین نر(۵۰درصد) و ۹ جنین ماده (۵۰ درصد) بودند. همه ی ترکیب های مورد استفاده در آزمون رنگ سنجی توانستند به طور موفقیت آمیزی تفاوت بین واکنش های مثبت و منفی را مشخص نمایند. آزمون LAMP به کار گرفته شده در این پژوهش یک ابزار ارزشمند برای تشخیص ژن SRT به منظور تعیین جنسیت جنین است.(۱)

امروزه در بیشتر کشورها، تشخیص جنسیت جنین در چند ماه اول بارداری، برای پیشگیری از بروز نارسایی های ژنتیکی، در آزمایشگاه های ژنتیک پزشکی انجام می شود(۲). در سال ۱۹۹۷ به DNA آزاد جنینی در سرم و پلاسمای زنان بادار پی برده شد(۳). خواستگاه این DNA همواره از جفت است، ولی سلول های هماتوپتیک جنین نیز منشاء بخش اندکی از آن می باشد(٤). مکانیزم هایی مانند نکروز یا آپوپتوز سلول های جنینی/جفتی و با ترشح فعال DNA جنینی سبب رها شدن DNA جنینی به گردش خون مادر می شوند(۵). DNA جنینی در ماه های آغازین وپایانی بارداری، به ترتیب ٤/۳ درصد و ۲/٦ درصد از کل DNA آزاد سلولی موجود در پلاسمای مادر راتشکیل می دهد(٦).

مطالعات دیگر، نشان داد که غلظت DNA جنینی با افزایش سن بارداری افزایش می یابد و DNA جنینی پس از زایمان به سرعت از پلاسمای مادر حذف می گردد(۷) ژن SRY، ژن تعیین جنسیت بر روی کروموزوم Y است. این ژن بدون اینترون، نوعی فاکتور رونویسی را کد می کند که پروتئین SRY نامیده می شود و باعث تعیین جنسیت به سمت جنس مذکر می شود(۵). ژن SRY با فعال نمودن فاکتورهای رونویسی مختص جنس مذکر، تمایز بیضه را آغاز می نماید و تمایز بیضه باعث می شود که سلول های اولیه غده جنسی تمایز یافته و تکثیر شوند(٦-۲). در طی ۱۰ سال گذشته، روش تکثیر هم دمای وابسته به حلقه (Loop-Mediated isothermal Amplification) که به اختصار به آن LAMP می گویند به علت سادگی، سرعت، کارایی بالا و اختصاصیت منحصر به فرد، به طور گسترده ای در آنالیز اسیدنوکلئیک به کار گرفته شده است. متدولوژی این روش بر پایه استفاده از چهار آغازگر مختلف است که به طور اختصاصی شش ناحیه از ژن هدف را شناسایی می کنند و پیشروی فرآیند واکنش در یک دمای ثابت و پیوسته با استفاده از واکنش جایگزینی رشته صورت می گیرد(۷،۸). تاکنون روش های زیادی برای تشخیص جنسیت جنین به کار گرفته شده اند. روش LAMP اولین بار در سال ۲۰۱۳ توسط Kanchanaphum و همکارانش جهت تعیین جنسیت در انسان بر روی نمونه های خونی گرفته شده از زنان و مردان انجام شد(۹). اما از آنجایی که تاکنون روش تکثیر هم دما برای تعیین جنسیت جنین در زنان باردار در دوران حاملگی به کار گرفته نشده است، در این پژوهش برای اولین بار کارایی روش LAMP جهت تعیین جنسیت ارزیابی شد.(۱)

مواد و روش ها

۵میلی لیتر خون کامل همراه با ماده ضد انعقاد EDTA از ۱۸زن باردار در سنین بارداری ۸هفته ای و یک مرد (به عنوان شاهد مثبت) با اطلاع و کسب رضایت آنها جمع آوری شد. خون هر فرد بلافاصله در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و پلاسما به میزان ۵۰۰ میکرولیتر درون میکروتیوب های استریل تقسیم شد. استخراج DNA به روش فنلی انجام و جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد.

طراحی آغازگرها جهت انجام آزمون مولکولی LAMP بر اساس ژن SRY مورد نظر با شماره شناسایی GenBank accession JQ811934.1 و با استفاده از نرم افزار PrimerExplorer V3 (نرم افزار online ویژه جهت طراحی آغازگرهای LAMP) صورت گرفت (جدول شماره۱).

توالی آغازگر	نام آغازگر
AACGTCCAGGATAGAGTG	F3
AGCATCTTCGCCTTCCGA	B3
ATCTCTGAGTTTCGCATTCTTTTTAAC GCATTCATCGTGTGGTC	FIB (F1c+F2)
TGGGATACCAGTGGAAAATGTTTTTC TCTCTGTGCATGGCCTGT	BIP (B1c+B2)
TCTAGAGCCATCTTGCGCCTCT	LF
CCGAAAAATGGCCATTCTTCCA	LB

جدول۱) آغازگرهای طراحی شده جهت تشخیص ژن SRY به روش LAMP

واکنش LAMP در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر دارای ۱/۰میلی مولار آغازگر dNTP، ۰/۰۶ میلی مولار آغازگر FIP، ۰/۰۶ میلی مولار آغازگر BIP، ۰/۰۲ میلی مولار آغازگر B۳، ۰/۰۴ میلی مولار آغازگز LF، ۰/۰۴ میلی مولار آغازگر LB، ۰/۰۸ میلی مولار بتایین، ۰/۰۴ میلی مولار MgSO4، ۰/۱ میلی مولار Buffer Bst (10X) و ۰/۴۰ میلی مولار آنزیم Bst DNA پلیمراز (New England biolabs, UK) و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد، به مدت ۶۰دقیقه در یک حمام آبگرم ادامه یافت. به محض اتمام واکنش لوله ها خارج گشت و کدورت حاصل از واکنش مثبت مشاهده شد. هم چنین ۵میکرومتر از محصول در ژل آگارز ۱درصد الکتروفورز پس از رنگ آمیزی با دستگاه Gel documentation بررسی شد.

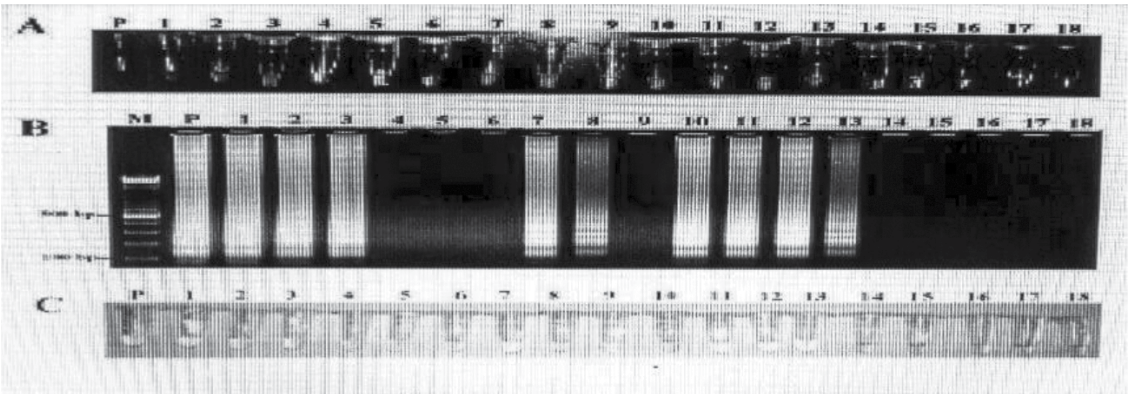
علاوه بر این جهت تایید انجام واکنش LAMP، مقدار ۰/۱ میلی مولار از رنگ هیدروکسی نفتول بلو (HNB) (Lemongreen, China) قبل از شروع واکنش به مخلوط اضافه شد. بعد از اتمام واکنش، بررسی نتایج که با تغییر رنگ در لوله ها همراه بود، با چشم غیرمسلح انجام شد.

بحث و نتیجه

با شناسایی DNA آزاد جنینی در سرم و پلاسمای مادری، نه تنها رویای تعیین جنسیت جنین در هفته های نخستین بارداری به حقیقت پیوست، بلکه بررسی های تشخیصی پیش از تولد اختلالات ژنتیکی در جنین به روش غیرتهاجمی نیز میسر شد(۶). DNA آزاد جنینی با پیشرفت بارداری افزایش یافته و پس از زایمان به سرعت از پلاسمای خون مادر حذف می شود(۷). تاکنون روش های زیادی جهت تعیین جنسیت در انسان انجام شده، که می توان به روش های برپایه ی PCR اشاره کرد(۵-۲). روش LAMP در سال ۲۰۱۳ به طور موفقیت آمیزی توسط Kanchanaphum و همکارانش برای تشخیص جنسیت در انسان به کار گرفته شد(۱۰).

در این پژوهش سعی شد با استفاده از روش بسیار حساس LAMP و استخراج DNA به روش فنلی، مقادیر جزئی DNA جنینی که از هفته هشتم وارد جریان خون مادر می شود، شناسایی شود. روی پلاسمای ۱۸زن باردار در هفته هشتم بارداری و یک مرد (شاهد مثبت) به طور جدا استخراج DNA انجام شد. میانگین غلظت DNA استخراج شده از حجم یکسان پلاسما معادل ۱/۸۵ میکروگرم DNA در یک میکرولیتر محلول بود. واکنش LAMP با استفاده از DNA استخراجی به عنوان الگو انجام شد و واکنش مثبت با خارج کردن لوله ها و دیدن کدورت حاصل شده تایید شد(تصویر شماره۱a).همچنین با بردن محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱درصد و الکتروفورز آن، الگوی نردبانی شکل دیده شد که ناشی از تولید قطعات با اندازه های مختلف است (تصویر شماره ۱b). افزون بر این، نتایج مثبت واکنش LAMP با استفاده از رنگ هیدروکسی نفتول بلو (HNB) که با تغییر رنگ از بنفش به آبی آسمانی همراه بود مشاهده شد (تصویر شماره ۱c).

درستی نتایج به وسیله پیگیری افراد پس از زایمان انجام شد و در نهایت مشخص شد که تشخیص جنسیت در پلاسمای ۱۸ زن باردار به روش LAMP، ۱۰۰درصد بوده است. از میان ۱۸زن باردار، ۹ مورد حامل جنین مونث با کروموزوم XX و ۹ مورد حامل جنین مونث با کروموزوم XY بودند. نتایج این پژوهش با نتایج kanchanaphum



تصویر۱: A) تشخیص مشاهده ای واکنش LAMP با استفاده از کدورت ناشی از تشکیل رسوب پروفسفات منیزیم. الکتروفورز محصولات واکنش LAMPبرروی ژل آگارز۱ درصد.

C) تشخیص مشاهده ای واکنش LAMP با استفاده از رنگ هیدروکسی نفتول بلو (BHN).

M: DNAسایز مارکر p ۱۰۰bp :نمونه مرد (شاهد مثبت)، لاین ۱۸ ۱نمونه زنان باردار

و همکارانش مشابه است که توانستند تمایز بین زنان و مردان مورد آزمایش را با استفاده از روش LAMP و بدون به کارگیری رنگ HNB تشخیص دهند(۱۰).

در کل می توان گفت روش LAMP به علت ویژگی هایی که دارد، در مزارع و یا به گونه ی آزمایش صحرایی قابل انجام است. این روش، کم تر تحت تاثیر مواد مهار کننده موجود در نمونه قرار می گیرد، به گونه ای که می توان مراحل انجام واکنش را کاهش داد.

منابع:

1. Almasi, M, and Babazadeh, A. Evaluation of Loop Mediated isothermal Amplification Assay for fetal sex determination in human. J Mazandaran Univ MED Sci 2016; 26(144): 352-356 (Persian).
2. Ly Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgrere W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. Clin chem 2004; 50(6): 1002-10011.
3. Leo LMP, Dennis YML. Circulating fetal DNA in maternal plasma. Clin Chim Acta 2001;313(1-2): 151-155.
4. Wagner AJ, Mitchell ME, Tomitamitchell A. Use of cellfree fetal DNA in maternal plasma for noninvasive prental screening. Clin Perinatol 2014; 41(4): 957-966.
5. Maron J, Bianchi D. prenatal diagnosis using callfree nucleic acids in maternal body fluids adecade of progress. Am J Med Genet Semin Med Genet 2007; 145 C(1): 5-17.
6. Sikora A, Zimmermann BG, Rusterholz C, Birri D, Kolla V, Lapaire O, Detection of increase amounts of cell-free fetal DNA with short PCR amplicons. Clin Chem 2010; 56(1): 136-138.
7. Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem 2004; 50(1): 88-92.
8. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 2000; 28(12): e63.
9. Hosseini SF, Almasi MA, kardi MT, Moghim s, karbasizade V. Molecular Detection of Clostridium Difficile in patients with Diarrhea via LAMP technique. J mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(115): 36-42 (Persian).
10. Kanchanaphum P, Sarataphan T, Thirasan W, Anatasomboon G. Development of Loop Mediated isothermal amplification (LAMP) of SRY gene in human blood samples for sex determinarion. Rangsit Journal of Arts and Sciences 2013; 3(2): 129-135.