

Instructions for Use:

The basis for interpreting the results of QF-PCR method

دفترچه راهنمای استفاده از:

اساس تفسیر نتایج روش QF-PCR

شرکت زیست فناوری کوثر

فهرست

۲	۱. تفسیر نتایج روش QF-PCR
۲	۱,۱. بررسی یک نمونه نرمال دیزومی (Disomic)
۳	۱,۲. تشخیص تریزومی ۱۳، ۱۸، ۲۱، X و Y
۳	۱,۲,۱. الگوی سه الی
۴	۱,۲,۲. الگوی دو الی
۵	۱,۲,۳. الگوی تک الی
۶	۱,۳. تشخیص افتراقی حالت مونوزومی از هموزیگوت در کروموزوم X
۷	۱,۴. محدوده نسبت ها بین الی های STR
۹	۲. منابع

۱. تفسیر نتایج روش QF-PCR

در این روش مارکرهای STR که در سراسر کروموزوم ۱۳، ۱۸، ۲۱ و کروموزوم های جنسی قرار دارند، به صورت قطعات با برجستگی فلورسنت تکثیر می شوند و مقدار کمی هر قطعه تکثیر شده به صورت یک پیک بر روی نمودار دیده می شود. پیک ها به صورت الکتروفورگرام در نرم افزارهای آنالیز دیده می شوند، که اطلاعاتی شامل مساحت (Area)، ارتفاع (Height)، سایز (Size) و ... را در بر دارند.

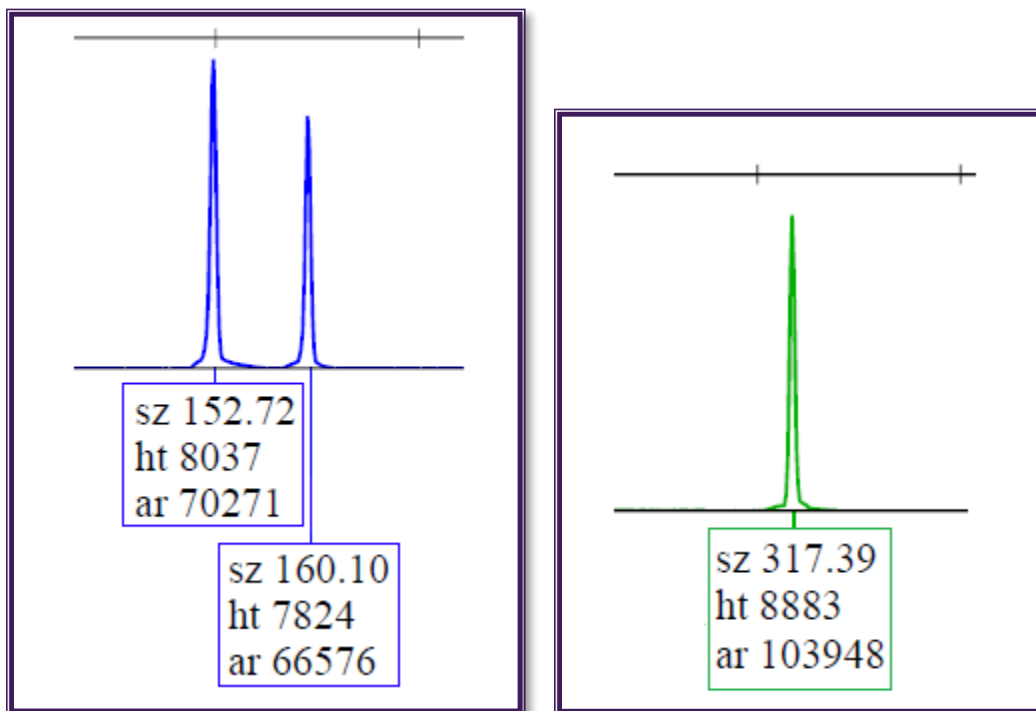
- ◀ مساحت یا محدوده زیر هر پیک در الکتروفورگرام، نشان دهنده مقدار کمی محصول PCR ایی است که تکثیر شده است.
- ◀ ارتفاع هر پیک نشان دهنده میزان فعالیت ماده فلورسنت است که مقدار کمی ماده فلورسنت هر مارکر را نمایش می دهد.
- ◀ سایز هر پیک نشان دهنده طول قطعه است.
- ❖ قابل توجه است که هرچقدر لیزر دستگاه ضعیف شده باشد، ارتفاع پیک ها کم می شود. بنابراین در صورت شک داشتن می توانید یک نمونه تکثیر شده را در دو دستگاه مستقل هم زمان الکتروفورز کرده و نتایج را مقایسه کنید.

۱.۱. بررسی یک نمونه نرمال دیزومی (Disomic)

در افراد نرمال هتروزیگوت، مارکرهای STR دارای ارتفاع و محدوده زیر پیک تقریباً یکسان با نسبت ۱:۱ برای هر دو آلل می باشند. در افراد هموزیگوت چون فقط یک آلل وجود دارد، بررسی دو آلل امکانپذیر نمی باشد و نمیتوان وجود دو کروموزوم را تایید کرد. در واقع نمی توان به اینکه این آلل بیانگر دو آلل در یک فرد هموزیگوت است یا یک فرد مونوزومی است، پی برد.

بر همین اساس چگونگی بررسی تعداد کروموزوم ها به مارکرهای هتروزیگوت بستگی دارد. چنانچه همه مارکرهای روی یک کروموزوم هموزیگوت باشند، نمیتوان نرمال یا غیر نرمال بودن آن کروموزوم را تشخیص داد.

جنین های مبتلا به مونوزومی کروموزوم های ۱۳، ۱۸ و ۲۱ غیرممکن است تا هفته ۱۰ بارداری زنده بمانند. بنابراین در موارد دیگر که جنین می تواند زنده بماند، به طور مثال برای تشخیص افتراقی بین مونوزومی کروموزوم (X یا Y) و افراد سالم هموزیگوت در صورتی که تمامی مارکرها هموزیگوت باشد، تنها راه تشخیص استفاده از کیت STR اختصاصی می باشد. از آنجایی که برای بررسی دقیق یک کروموزوم لازم است که حداقل دو مارکر گویا (هتروزیگوت) در فرد وجود داشته باشد و چنانچه بقیه مارکرها الگوی مشکوک داشته باشند روش های تکمیلی مورد نیاز خواهد بود.



شکل شماره ۲: هتروزیگوت با نسبت ۱:۱

شکل شماره ۱: هموزیگوت غیر گویا

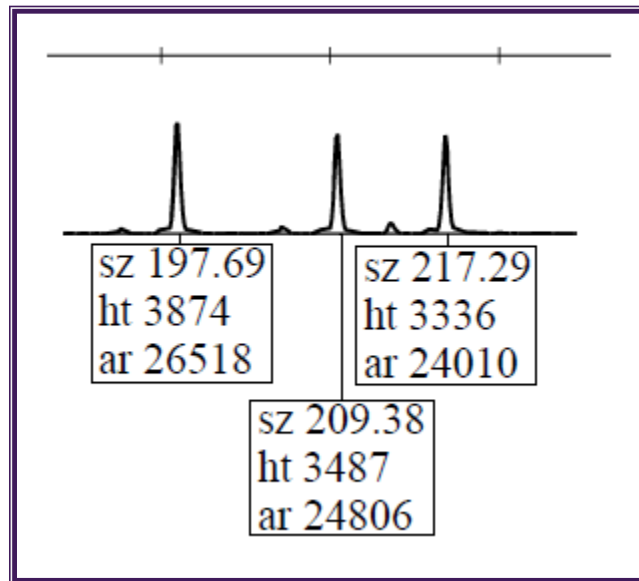
۱.۲. تشخیص تریزومی ۱۳، ۱۸، ۲۱، X و Y

نمونه های تریزومی می توانند الگوی سه اللی، دو اللی و تک اللی برای یک کروموزوم خاص را داشته باشند.

۱.۲.۱. الگوی سه اللی

حالتی است که در آن سه پیک از هر کروموزوم قابل تشخیص می باشد، به این صورت که STR هایی که برای هر کروموزوم اختصاصی هستند به صورت سه پیک با شدت فلورسنت یکسان دیده می شوند و نسبت هر سه محل به صورت ۱:۱:۱ خواهد بود که به آن تریزومی سه اللی (Triallelic Trisomy) می گویند. در این صورت می توان نتیجه گرفت که عدم جدایی کروموزوم ها در تقسیم اول میوز^۱ اتفاق افتاده است (البته اکثر عدم جدایی ها در تقسیم اول اتفاق می افتند). در ضمن اگر نتایج حاصل از بررسی STR های پدری و مادری وجود داشته باشد، می توان مشخص کرد که کروموزوم اضافی از کدام والد گرفته شده است.

¹ Nondisjunction

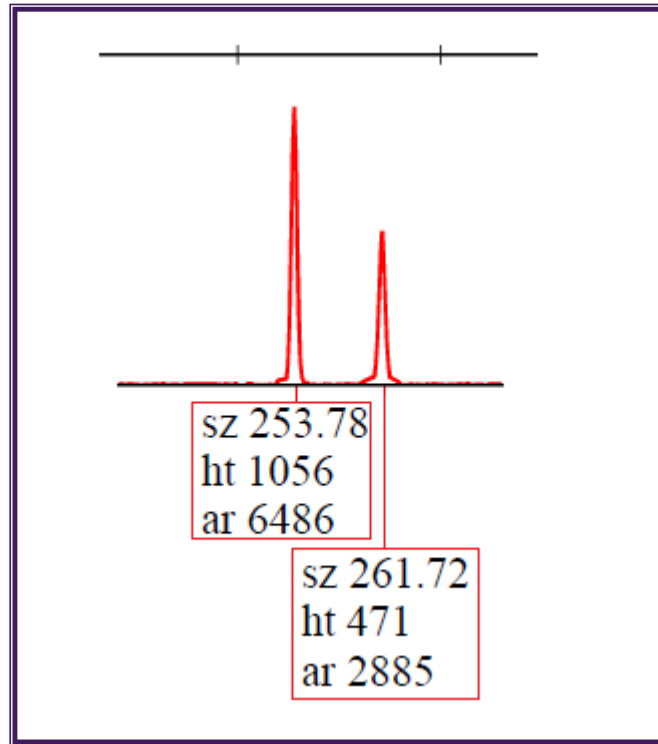


شکل شماره ۳: تریزومی سه اللی با نسبت ۱:۱:۱

❖ عدم وجود چنین الگویی نشان دهنده این است که Nondisjunction در میوز رخ نداده است، به خصوص زمانی که عدم وجود این الگو در مارکرهای متعددی مشاهده شده اند. در مواردی که چنین نتیجه ای در نمونه CVS مشاهده میشود، امکان Placental mosaicism وجود دارد و چنین موردی باید حتماً در نتیجه آورده شود، نمونه باید به همراه DNA مادری تست تعیین هویت شده و یا آزمایش دوباره تکرار گردد.

۱.۲.۲. الگوی دو اللی

اگر دو عدد از کروموزوم ها تکراری یکسان (سایزهای یکسان) داشته باشند و یکی از کروموزوم ها سایز متفاوتی داشته باشد، در نتایج دو پیک مشاهده خواهد شد که نسبت محدوده زیر پیک ها به صورت حدوداً ۲:۱ خواهد بود که به آن تریزومی دو اللی (Diallelic Trisomy) می گویند. چنین اتفاقی اگر برای همه محل های یک کروموزوم اتفاق افتاده باشد نشانه وقوع عدم جدایی کروموزومی در تقسیم دوم میوز می باشد.



شکل شماره ۴: تریزومی دو اللی با نسبت ۲:۱

۱،۲،۳. الگوی تک اللی

در نمونه های تک اللی امکان تشخیص تریزومی وجود ندارد. چنانچه همه مارکرهای یک کروموزوم، هموزیگوت باشند، می بایست برای تشخیص از سایر دلایل استفاده کرد.

البته اگر در کروموزوم X چنین اتفاقی افتاده باشد و فرد فاقد کروموزوم Y باشد، می تواند نشانه مونوزومی کروموزوم X یا سندرم ترنر (XO) باشد. در یک جنین پسر نیز فرد برای کروموزوم X حالت مونوزومی را نشان می دهد ولی این در صورتی است که سایر محل ها وجود کروموزوم Y را ثابت می کنند.

❖ برای تفسیر درست نتایج وجود حداقل دو مارکر گویا که نشان دهنده وجود دو ال باشند، در صورتی که بقیه ال ها هموزیگوت باشند، ضروری است. در غیر این صورت امکان دارد نتیجه نادرست تفسیر شده و منجر به تشخیص اشتباه شود. بنابراین در صورت نبودن حداقل دو ال گویا، بهتر است که از تست های تکمیلی QF استفاده نمود تا مارکرهای بیشتری بررسی گردند و یا اینکه توسط روش های دیگری نظیر تعیین کاریوتایپ یا FISH نتیجه تأیید گردد.

❖ هنگامی که تنها یک مارکر الگوی تریزومی و سایر مارکرها الگوی طبیعی داشته باشند باید نمونه DNA والدین نیز بررسی شوند تا مشخص شود که آیا این پلی مورفیسم از والدین به ارث رسیده یا جهش جدید است که ممکن است به علت Partial chromosome

imbalance اتفاق افتاده است. در صورت جدید بودن جهش، لازم است تا مطالعات سیتوژنتیکی بر روی آن انجام شود و بسیار مهم است که ثابت شود پلی مورفیسم مشاهده شده اهمیت بالینی ندارد، زیرا گاهی Duplication ها با اختلال یادگیری یا فیزیکی همراه هستند.

❖ حضور هر دو الگوی نرمال و غیر نرمال برای یک کروموزوم می تواند به علت عدم تعادل کروموزومی از جمله CNV^۲، SMM^۳ و PSP^۴ باشد. بهتر است در تفسیر نتایج به این مساله دقت شود هر چند در طی طراحی و بهبود کیت سعی شده که این مشکلات برطرف شوند.

۱.۳. تشخیص افتراقی حالت مونوزومی از هموزیگوت در کروموزوم X

همانطور که اشاره شد بررسی مارکرهای STR توانایی تفکیک حالت مونوزومی X با افراد نرمالی که دارای دو یا سه کروموزوم X هموزیگوت هستند را ندارد. چون در هر دو صورت فقط الگوی مشابهی به صورت یک پیک هموزیگوت در مارکرهای کروموزوم X مشاهده خواهد شد. برای حل این مشکل در کیت AneuQuick ورژن ۳،۲ و دیگر ورژن ها از مارکری استفاده شده که از نمونه های Segmental duplication در ژنوم انسانی می باشد. این ناحیه بر روی کروموزوم Y و X به صورت مشابهی وجود دارد، البته محصول PCR این ناحیه بر روی کروموزوم های Y و X سایزهای متفاوتی را ارائه می کند که به دلیل تفاوت های جزئی این ناحیه بر روی این دو کروموزوم است.

در بررسی نتایج حاصل از این محل حالت های زیر ممکن است دیده شوند:

- ارتفاع پیک مربوط به کروموزوم Y و کروموزوم X با هم برابر باشد: در این صورت نمونه مربوط به خانم با دو عدد کروموزوم X است.
- ارتفاع پیک مربوط به کروموزوم Y دو برابر پیک مربوط به کروموزوم X باشد:
- ◀ چنانچه فرد مذکر باشد: این الگو طبیعی است. چون هر مرد نرمال یک عدد کروموزوم X و دو عدد کروموزوم Y دارد.
- ◀ چنانچه فرد مونث باشد: نشان دهنده الگوی مونوزومی X می باشد و فرد غیر نرمال خواهد بود.
- ❖ مارکرهای کروموزوم X نباید به تنهایی برای تعیین جنسیت مورد استفاده قرار گیرد و استفاده از مارکرهای مقایسه ای بین کروموزوم X و Y نیز الزامی است.

^۲ Copy number variants

^۳ Stepwise mutation model

^۴ Primer Site Polymorphisms

۱.۴. محدوده نسبت ها بین الل های STR

نسبت ها از تقسیم محدوده زیر پیک یا Area الل کوچکتر به الل بزرگتر حاصل می شود. در مورد STR هایی که دو الل با فاصله بیشتر از ۲۰ جفت باز تفاوت دارند، ممکن است گاهی نسبت ها خارج از حد نرمال باشد که این حالت به دلیل تکثیر قطعه کوچکتر اتفاق می افتد که هر چه تکثیر بیشتر می شود از الل بزرگتر بیشتر فاصله می گیرد. در واقع هرچقدر فاصله الل کوچکتر یک محل با الل دیگر همان محل تفاوت سایزی داشته باشد تفاوت در Height و Area یک پیک بیشتر مشاهده خواهد شد.

چنانچه در تفسیر نهایی حداقل دو الل گویا وجود نداشته باشد باید از مارکرهای دیگری علاوه بر مارکرهای قبلی استفاده کرد (در مورد کیت های اختصاصی موجود برای هر کروموزوم به وب سایت شرکت زیست فناوری کوثر مراجعه نمایید).

در جدول زیر اگر نسبت الل کوچک به الل بزرگ بین ۰,۸ تا ۱,۴ باشد، نسبت را ۱:۱ و فرد را نرمال در نظر گرفته ولی اگر این نسبت ۱,۶ یا بیشتر باشد، باید آن را ۱:۲ و فرد را مبتلا به تریزومی Diallelic در نظر گرفت. در زمان هایی که فاصله الل کوچکتر از الل بزرگتر بیشتر از ۲۰ جفت باز باشد، به دلیل شدت تکثیر که در ارتفاع و مساحت پیک تاثیرگذار است، نسبت ۱,۶ نرمال در نظر گرفته می شود. لازم به ذکر است که اگر فاصله الل کوچکتر از الل بزرگتر بیشتر از ۲۰ جفت باز باشد ولی نسبت الل کوچک به الل بزرگ ۰,۸ باشد، با توجه به اینکه انتظار می رود تحت تاثیر شدت تکثیر این نسبت هم تغییر کند ولی چنین اتفاقی نیافتاده است، بنابراین می توان نتیجه گرفت که به احتمال زیاد فرد مبتلا به تریزومی Diallelic می باشد (توجه: باید با بررسی همه محل های یک کروموزوم نتایج را تفسیر کرد).

جدول شماره ۱: تفسیر نسبت پیک های STR

STR Peak Ratio	Interpretation
۱,۴ - ۰,۸	نرمال
$\leq 0,6 - \geq 1,8$	غیر نرمال
۱,۶ با اختلاف بیشتر از ۲۰ جفت باز	نرمال

❖ در صورتی که محدوده ذکر شده مشاهده نگردید، بررسی دوباره و تکرار آزمایش بر روی همان نمونه الزامی است. البته لازم به ذکر است چنین نتایجی ممکن است با تکرار آزمایش قبلی مجدداً دیده شود و این می تواند ناشی از PSPs باشد.

❖ محدوده غیر نرمال ذکر شده برای کروموزوم های اتوزوم می باشد و در مورد کروموزوم های جنسی صدق نمی کند و ممکن است نشان دهنده Mosaicism و یا مونوزومی X باشد. در صورتی که در کروموزوم های جنسی، نسبت $>0,45$ یا $<0,4$ باشد، نشان دهنده حضور بیش از ۳ نسخه از توالی است که این امکان وجود دارد به نوع خاصی از آنیپلوئیدی کروموزوم های جنسی، مرتبط باشد. نتایج موارد مشکوک به موزایسیسم باید با نتایج سیتوژنتیک تأیید شوند (زیرا پروفایل های STR مشابه می توانند با بیماری های کروموزومی مختلف سازگاری داشته باشند).

1. Sex Chromosomes Mosaicism Detection by Quantit

اطلاعات تماس

تهران، خیابان ولیعصر، بالاتر از فاطمی، خیابان مجلسی، پلاک ۴۱، طبقه ۳، شرکت زیست فناوری کوثر



۱۵۹۵۶۴۵۵۱۳



۰۲۱۸۸۹۳۹۱۵۰ - ۵-۸۸۹۳۰۱۴۳



۰۲۱۸۸۹۳۹۱۳۹



kbc@kawsar.ir



kawsar_biotech@yahoo.com