بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم پایه و کشا ورزی

مرکز تهران شرق

پایان نامه

برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی(بیوشیمی)

گروه بیوشیمی

جداسازی DNA جنینی از خون مادر جهت تشخیص غیر تهاجمی قبل از تولد تعدادی کروموزومهای جنینی

فریبا روحی مقدم

استاد راهنما : دکتر سید احمد آل یاسین

استاد مشاور: دکتر رضا حاجی حسینی

مهر ماه سال ۱۳۹۱

تاریخ: ...../...../.....
شماره: .....

دانشگاه پیام نور

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

جلسه دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد خانم/ آقای .....دانشجوی رشته .....به شماره دانشجویی .....

تحت عنوان«.....

با حضور هیات داوران در روز.....مورخ...../...../.....ساعت .....

در محل ساختمان ..... برگزار شد و هیات داوران پس از بررسی، پایان نامه مذکور را شایسته نمره به عدد..... به حروف .....با درجه.....تشخیص داد.

ردیف	نام و نام خانوادگی	هیات داوران	مرتبه دانشگاهی	دانشگاه/ موسسه	امضاء
۱		استاد راهنما			
۲		استاد مشاور			
۳		استاد داور			
٤		نماینده تحصیلات تکمیلی			

اینجانب **فریبا روحی مقدم** دانشجوی **ورودی سال ۱۳۸۷** مقطع کارشناسی ارشد رشته **زیست شناسی(بیوشیمی)** گواهی می نمایم چنانچه در پایان نامه خود از فکر، ایده و نوشته دیگری بهره گرفته ام با نقل قول مستقیم یا غیر مستقیم منبع و ماخذ آن را نیز در جای مناسب ذکر کرده ام. بدیهی است مسئولیت تمامی مطالبی که نقل قول دیگران نباشد بر عهده خویش می دانم و جوابگوی آن خواهم بود.

دانشجو تأیید می نماید که مطالب مندرج دراین پایان نامه (رساله) نتیجه تحقیقات خودش می باشد و درصورت استفاده از نتایج دیگران مرجع آن را ذکر نموده است.

فریبا روحی مقدم

تاریخ و امضاء

اینجانب **فریبا روحی مقدم** دانشجوی **ورودی سال ۱۳۸۷** مقطع کارشناسی ارشد رشته **زیست شناسی (بیوشیمی)** گواهی می نمایم چنانچه براساس مطالب پایان نامه خود اقدام به انتشار مقاله، کتاب، و ... نمایم ضمن مطلع نمودن استاد راهنما، با نظر ایشان نسبت به نشر مقاله، کتاب، و ... و به صورت مشترک و با ذکر نام استاد راهنما مبادرت نمایم.

فریبا روحی مقدم

تاریخ و امضاء

کلیه حقوق مادی مترتب از نتایج مطالعات، آزمایشات و نو آوری ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه پیام نور می باشد.

مهر ماه ۱۳۹۱

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم پدر و مادری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه درخت پر بار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم ودانش تلاش نمایم. دو فرشته ای که از نگاهشان صلابت، از رفتارشان محبت و از صبرشان ایستادگی را آموختم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم چرا که این دو وجود پس از پروردگار مایه هستی ام بوده اند دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. آموزگارانی که برایم زندگی؛ بودن و انسان بودن را معنا کردند حال این برگ سبزی است تحفه درویش تقدیم آنان....

تقدیم به همسرم که سایه مهربانیش سایه سار زندگی ام می باشد و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود و تقدیم به دو فرزند عزیز تر از جانم که وجودشان شادی بخش و صفایشان مایه آرامش من است.

سپاس خدای را که سخنوران در ستودن او بمانند و شمارندگان شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان حق او را گزاردن نتوانند. سپاس خدای را که هر چه دارم از اوست و به امید آن که توفیق یابم جز خدمت به خلق او نکوشم.

از استاد گرامی جناب آقای دکتر سید احمد آل یاسین بسیار سپاسگزارم چرا که بدون راهنمایی های ایشان تامین این پایان نامه بسیار مشکل می نمود و از سرکار خانم دکتر فائزه جهانشاد نهایت تشکر را دارم که در فراهم نمودن نمونه های خون با اینجانب همکاری نمودند.

از استاتید محترم دانشگاه پیام نور نهایت تشکر را دارم چرا که موفقیت اینجانب نتیجه زحمات ایشان می باشد.

از دوستان صمیمی و مهربانم خانم ایلناز رشیدی و مرضیه شیرازی که در مراحل انجام این پایان نامه با اینجانب نهایت همکاری را نمودند کمال تشکر را دارم.

در پایان از کلیه کارمندان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و انستیتو ناباروری نوید جهت همکاری های ایشان در پیشبرد این پایان نامه سپاسگزارم.

چکیده

جداسازی DNA جنینی از خون مادر جهت تشخیص غیر تهاجمی قبل از تولد تعدادی کروموزومهای جنینی

هدف: استفاده از DNA جنینی در تشخیص قبل از تولد غیر تهاجمی آنوپلوئیدی های کروموزومی جنین اخیرا مورد توجه قرار گرفته است. از هشت هفتگی سن بارداری DNA جنینی وارد جریان خون مادر می گردد و منبع خوبی برای تشخیص قبل از تولد بدون نیاز به آمنیو سنتز یا نمونه گیری از پرزهای جفتی است که خطری برای مادر و جنین ندارد. هدف این طرح استخراج DNA جنینی از خون مادر و استفاده از آن در تشخیص سریع تعداد کپی کروموزومی از جمله کروموزوم Y و کروموزوم ۲۱ با استفاده از مارکرهای کروموزومی و روش Taqman real time PCR بوده است. تریزومی کروموزوم ۲۱ با عث ایجاد سندروم داون می گردد که رایج ترین ناهنجاری ژنتیکی مادرزادی میباشد و ۱/۷۰۰ تولد زنده مشاهده میگردد.

مواد و روش ها: در این مطالعه نمونه های خون سیاهرگی ۳۰ خانم باردار از هفته هشتم بارداری و ۱۰ نمونه مبتلا به سندرم داون و ۱۰ نمونه فرد سالم استفاده شده است. استخراج DNA آزاد جنینی از پلاسمای خون مادری و افراد کنترل انجام گردید. قسمتی از ژن SRY و مارکر DYS14 واقع بر کروموزوم Y جهت تایید DNA جنینی در پلاسمای خون مادر و از مارکرهای D21S167 و S100B واقع بر روی کروموزوم ۲۱ جهت تشخیص سریع تعدادی کروموزوم ۲۱ در نمونه های DNA جنینی و مقایسه با نمونه های کنترل انجام گرفت. از ژن IGF-1 برروی کروموزوم ۱۲ بعنوان استاندارد در هر واکنش استفاده شد.

نتایج: میزان ازدیاد D21S167 و S100B در مقایسه با IGF-1 بترتیب برابر با ۱,۹ و ۱,٦ برابر نسبت به استاندارد در گروه سندرم داون نسبت به گروه سالم و ۳۰ نمونه DNA جنینی مشاهده گردید. توالی های SRY وDYS14 در ١٤ مورد از ۳۰ نمونه تکثیر شد. نتایج تشخیص جنسیت جنین در این آزمایش با نتایج سونوگرافی تعیین جنسیت پس از ٤ ماهگی بارداری مقایسه گردید که ۱۰۰ درصد با هم مطابقت داشتند.

بحث: این نتایج نشان دادند که روش Taqman Real-time PCR روشی سریع و قابل اطمینان جهت تشخیص جنسیت جنین از هفته ۸ بارداری و همچنین می تواند در تشخیص زود هنگام سندرم داون نیز در کنار روشهای دیگر به کار گرفته شود. نتایج بدست آمده نشان داد که از این روش می توان به همراه روش های دیگر جهت تشخیص آنوپلوییدی های کروموزومی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: DNA جنینی؛ پلاسمای مادری؛ تریزومی ۲۱؛ ژنSRY؛ تشخیص غیر تهاجمی؛ Real-time PCR

فهرست مطالب

فصل اول- کلیات و بررسی منابع..... ۱

مقدمه ۲

۱-۱ مروری بر میوز..... ٤

۱-۱-۱ ریسک فاکتور های آنوپلوییدی جنین..... ٤

۱-۱-۲ نقش خطای میوزی در آنوپلوییدی جنین..... ٤

۱-۱-۳ جدا نشدن کروموزوم ها طی میوز I ٥

۱-۱-۳-۱ جدا شدن زود هنگام در میوز I ٦

۱-۱-٤ جدا نشدن کروموزوم ها طی میوز II مادر..... ٦

۱-۱-٥ تاثیر سن مادر در آنوپلوییدی..... ۷

۱-۱-٦ منشا پدری جدانشدن کروموزوم ها..... ۸

۱-۱-۷ تریزومی ۲۱ و نقص های مادرزادی هنگام تولد..... ۸

۱-۲ روش های رایج تشخیص پیش از تولد..... ۹

۱-۲-۱ روش های تهاجمی تشخیص پیش از تولد..... ۹

۱-۲-۲ روش های غیر تهاجمی تشخیص پیش از تولد..... ۱۰

۱-۲-۲-۱ اندازه گیری شفا فیت گردن جنین..... ۱۰

۱-۲-۲-۲ غربالگری سرم مادر..... ۱۱

۱-۲-۲-۳ آزمایشات غیر تهاجمی ترکیبی..... ۱۱

۱-۳ سلول های جنینی..... ۱۳

۱-۳-۱ ارتباط تکامل با جفت..... ۱٤

۱-۳-۲ سلول های جنین دربدن و خون مادر..... ۱٥

۱-٤ اسیدهای نوکلئیک آزاد جنینی درخون مادر..... ۱٦

۱-٤-۱ RNA آزاد جنینی در گردش خون مادر..... ۱۷

۱-٤-۲ مارکر های RNA آزاد جنینی بر روی کروموزوم ۲۱ ..... ۱۹

۱-۵ وجود DNA آزاد جنینی در جریان خون مادر..... ۲۰
۱-۵-۱ منشا DNA آزاد جنینی در خون مادر ۲۲
۱-۵-۲ منشأ DNA آزاد مادری ۲٤
۱-۵-۳ پایداری و توزیع سایز DNA آزاد جنینی در جریان خون مادر..... ۲٤
۱-۵-۳-۱ تأثیر نحوه جمع آوری نمونه ها بر میزان DNA آزاد جنینی ۲۷
۱-۵-٤ انتقال DNA آزاد جنینی به خون مادر..... ۲۸
۱-۵-٤-۱ حذف DNA آزاد جنینی از خون مادر..... ۲۹
۱-۵-٤-۲ روش های افزایش نسبتDNA آزاد جنینی به DNA آزاد مادری..... ۳۰
۱-٦ افزایش DNA پلاسما و ارتباط آن با تریزومی ۲۱..... ۳۱
۱-۷ کاربرد نشانگر های اقماری بسیار ریزدر تشخیص پیش از تولد تریزومی..... ۳۲
-۸ کاربرد Real-time PCR کمی در تشخیص پیش از تولد تریزومی ۲۱..... ۳۵
فصل دوم- مواد وروش ها..... ۳٦
۲-۱ وسایل استفاده شده در این پروژه ۳۷
۲-۲ مواد مورد نیاز ۳۸
۲-۳ استخراج DNA جنینی از پلاسمای خون مادری..... ۳۹
۲-۳-۱ مواد و وسایل مورد نیاز جهت استخراج DNA جنینی..... ۳۹
۲-۳-۲ روش کار..... ۳۹
۲-٤ واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ٤۱
۲-٤-۱ مراحل واکنش PCR ٤۱
۲-٤-۲ Real-time PCR..... ٤۲
۲-٤-۲-۱ روش های مرسوم در Real-time PCR ٤۳
۲-۵ تهیه آغازگرها..... ٤٤
۲-۵-۱ آغازگرSRY..... ٤٤
۲-۵-۲ آغازگر DYS14..... ٤٦

۲-۵-۳ آغازگر S100B ٤٦
۲-۵-٤ آغازگر D21S167 ..... ٤٦
۲-٦ روش های پیشگیری از آلودگی درPCR ٤٧
۲-۷ واکنش Real-time PCR نمونه های کنترل ٤٨
۲-۷-۱ Real-time PCR آغازگرها ٤٩
۲-۷-۱-۱ Real-time PCR آغازگر SRY ٤٩
۲-۷-۱-۲ multiplex Real-time PCR آغازگرهایDYS14 و IGF-1 ..... ٥٠
۲-۷-۱-۳ multiplex Real-time PCR آغازگرهای S100B و D21S167 با آغازگرIGF1 ..... ٥١
۲-۸ محاسبه $\Delta\Delta C_T$ در واکنش های Multiplex Real-time PCR ٥٣
۲-۹ الکتروفورز محصولات Real-time PCR ٥٤
۲-۹-۱ مواد و محلول های مورد نیازدر الکتروفورز ٥٤
۲-۹-۲ روش کار ٥٤
فصل سوم- نتایج ٥٦
۳-۱ تشخیص جنسیت پیش از تولد جنین ٥٧
۳- ۱-۱ نتایج حاصل از Real-time PCR با ژن SRY ٥٧
۳-۱-۲ نتایج Real-time PCR با مارکر DYS14 ..... ٥٩
۳-۲ نتایج Multiplex Real-time PCR توسط ژن های S100B و D21S167 جهت تشخیص سریع تریزومی ۲۱ در جنین ٦١
فصل چهارم- بحث و نتیجه گیری ٧٢
٤-۱ جمع آوری نمونه های خون و تاثیر آن بر میزان DNA آزاد جنینی ٧٣
٤-۲ جداسازی پلاسما ٧٤
٤-۳ استخراج DNA جنینی ٧٤
٤-٤ Taqman Real-time PCR ٧٤
نوآوری و پیشنهادات ٧٦

پیوست..... ۷۷
پیوست۱ نتایج Real-time PCR با ژن SRY جهت تشخیص جنسیت جنین ۷۸
پیوست۲ نتایج Real-time PCR با مارکرDYS14 و IGF-1 جهت تشخیص جنسیت جنین..... ۸٤
پیوست۳ نتایج Real-time PCR با مارکرD21S167 و S100B و ژن IGF1 جهت تشخیص تریزومی ۲۱..... ۹٦
فهرست منابع..... ۱۰۲

فهرست جداول

جدول ۲-۱ مواد و محلول های مورد نیاز برای استفاده در واکنش Taqman Real-time PCR..... ٤٥
جدول ۲-۲ مشخصات آغازگرها و پروب ها..... ٤٥
جدول ۲-۳ مقدار مواد مورد استفاده در واکنش Taqman Real-time PCR..... ٤٨
جدول ۲-٤ مقدار مواد مورد استفاده در واکنشReal-time PCR با استفاده از آغازگر وپروب SRY..... ٤٩
جدول۲-۵ شرایط دمایی و زمانی واکنش Real-time PCR برای آغازگر SRY..... ۵۰
جدول ۲-٦ مقدار مواد مورد استفاده در Multiplex Real-time PCR با آغازگرهای DYS14 و IGF-1 ..... ۵۰
جدول ۲-۷ شرایط دمایی و زمانی واکنش Multiplex Real-time PCR آغازگرهای DYS14 و IGF-1..... ۵۱
جدول ۲-۸ شرایط دمایی و زمانی واکنش Multiplex Real-time PCR آغازگرهای IGF1 وS100B و همچنین آغازگرهای D21S167 وIGF1 ..... ۵۱
جدول ۲-۹ مقدار مواد مورد استفاده در Multiplex Real-time PCR آغازگرهای IGF1 وS100B..... ۵۲
جدول ۲-۱۰ مقدار مواد مورد استفاده در Multiplex Real-time PCR آغازگرهای IGF1 و D21S167..... ۵۲
جدول ۲-۱۱ طریقه ساخت TAE 50X..... ٥٤

جدول شماره ۳-۱ نتایج آزمون آماری دانکن توسط نرم افزار SPSS.....۶۲
جدول ۳-۲ مشخصات کامل نمونه ها به همراه نتایج Real-time PCR.....۷۰

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱ : ایدیوگرام کروموزوم 21q و موقعیت جدانشدن میوزی.....۷
شکل ۱-۲: نمایش شماتیک روش سه مرحله ای مشروط.....۱۲
شکل ۱-۳ : تهاجم جفت در سطح مشترک جنین- مادری در حدود هفته دهم بارداری.....۱۴
شکل۱-٤: تاثیر زمان استخراج از خون ذخیره شده در EDTA بر روی غلظت RNA در پلاسما.....۱۸
شکل۱-۵: محدوده زمانی زدوده شدن RNA آزاد خارجی از پلاسما.....۱۸
شکل۱-٦: نمایش شماتیک نسبت اللی به منظور تشخیص تریزومی ۲۱ بوسیله RNA.....۲۰
شکل۱-۷: لگاریتم توزیع DNA آزاد جنینی (cff DNA) در بارداری های نرمال و پوچ طی دوران بارداری.....۲۳
شکل۱-۸: درصد DNA کروموزوم Y موجود در پلاسمای بیماران پیوند مغز استخوان.....۲۵
شکل ۱-۹: غلظت نسبی DNA جنینی و مادری در پلاسمای مادر.....۲۶
شکل ۱-۱۰: غلظت DNA آزاد جنینی طی بارداری با اندازه گیری ژن SRY.....۲۸
شکل۱-۱۱: انواع پیک های مشاهده شده در آنالیز مارکر هایSTR ۳٤
شکل۱-۱۲:آنالیز مارکر های بسیار پلی مورفیک در پلاسمای مادر باردار با جنین مبتلا به تریزومی ۲۱.....۳٤
شکل۳-۱ : نتایج PCR ژن SRY در نمونه های جنینی F8 الی F13.....۵۸
شکل ۳-۲ : نتایج PCR ژن SRY در نمونه های جنینیF14 الی F16.....۵۹
شکل۳-۳ : نتایج Multiplex Real-time PCR نمونه های جنینی شماره ۷ الی ۱۳ با ژن های DYS14 و IGF-1.....٦۱
شکل۳-٤ : نتایج Multiplex Real-time PCR نمونه های جنینی(F) شماره۱۱ الی ۲۰ با مارکر S100B و IGF1 و نمونه های نرمال (N) شماره ۳ الی ٦.....٦۳
شکل۳-۵ : نتایج Multiplex Real-time PCR نمونه های سندرم داون شماره۱ الی۱۰و نمونه های

نرمال (N) شماره ۷ الی ۹ با مارکر های S100B و IGF1..... ٦٥
شکل ۳-٦ ژل الکتروفورز محصولات Multiplex Real-time PCR مارکر های S100B و IGF1..... ٦٥
شکل ۳-۷ : ژل الکتروفورز محصولات Multiplex Real-time PCR مارکر های D21S167 و IGF1..... ٦٦
شکل۳-۸ : نتایج Multiplex Real-time PCR نمونه های جنینی شماره۱ الی ۱۵ و نمونه های نرمال شماره ۱ الی ۳ با مارکر های D21S167 و IGF1..... ٦٧
شکل۳-۹ : نتایج Multiplex Real-time PCR نمونه های سندرم داون شماره۱ الی۷ و نمونه های نرمال ۷ الی ۹ با مارکر های D21S167 و IGF1..... ٦٩
شکل ۳-۱۰ نمودار میله ای نشان دهنده نسبت ژن های واقع بر کروموزوم ۲۱ به ژن IGF1 ..... ٦٩
شکل ۳-۱۱ نتایج Real-time PCR نمونه های غیر باردار با ژن SRY ۷۰

اختصارات

AFP: α-Fetoprotein
AML: Acute myeloid leukaemia
APC: Anaphase promoting complex
βhCG: Beta-subunit of human chorionic gonadotropin
cf DNA: cell-free DNA
cf RNA: cell-free RNA
cff DNA:cell-free fetal DNA
cff RNA: cell-free fetal RNA
cfm DNA: cell-free maternal DNA
cfp DNA: cell-free plasma DNA
C_T: Cycle threshold
CVS: Chorionic villus sampling
DNA: Deoxyribonucleic acid
DS: Down syndrome
EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid
FISH: Fluorescent in situ hybridisation
GE: Genomic equivalent
hCG: Human chorionic gonadotropin
hPL: Human placental lactoge
M I: Mneiosis I
M II: Meiosis II
mRNA: Messenger RNA
ml: millilitre
ND: Nondisjunction
NT: Nuchal translucency
PAPP-A: Pregnancy-associated plasma protein A
PCR: polymerase chain reaction
PLAC4: Placenta specific 4
RFLP: Restriction fragment length polymorphism
RNA: ribonucleic acid
SC: Synaptonemal complex
SNP: Single nucleotide polymorphism
STR: Short tandem repeats
TAE: Tris-acetate EDTA
TUNEL: Terminal UdTP nuclear end labelling
uE3: unconjugated estriol
VNTR: Variable number of tandem repeat
µm: Micrometer

فصل اول

کلیات و بررسی منابع

مقدمه

در حال حاضر، تشخیص پیش از تولد در چند ماه اول بارداری به منظور پیشگیری از بروز اختلالات ژنتیکی در بسیاری از آزمایشگاه های ژنتیک مورد توجه می باشد. به هر حال، روش های معمول تهیه ی سلول های جنینی برای بررسی های ژنتیکی از جمله آمنیوسنتز و نمونه گیری از پرز های کوریونی، از روش های تهاجمی محسوب شده و خطر سقط و آسیب به جنین وجود خواهد داشت(لی[۱]،۲۰۰٤ ؛ سیمپسون[۲]،۱۹۹۳).

وجود سلول های کامل جنینی در خون مادری امروزه مورد پذیرش واقع شده، اما مقدارشان ناچیز و نیازمند روش های غنی سازی پیچیده و روش های تشخیصی راهبردی است. ۱ تا ٦ سلول جنینی در هر میلی لیتر از خون یک زن باردار سالم وجود دارد. گرچه بهبود روش های غنی سازی و پروتوکل های جداسازی DNA جنین از خون مادر موجب پیشرفت های زیادی در این رابطه شده است، اما ناچیز بودن سلول های جنینی و عدم مارکر های اختصاصی جنین، مانع از پیشرفت های بعدی شده است (هامادا[۳]،۱۹۹۳؛کرابچی[٤]،۲۰۰۱). با شناسایی DNA آزاد جنینی در سرم و پلاسمای مادری، علاوه بر اینکه رویای تعیین جنسیت جنین در هفته های نخستین بارداری به حقیقت پیوست، همچنین، بررسی های تشخیصی پیش از تولد اختلالات ژنتیکی در جنین به روش غیر تهاجمی نیز میسر گشت (لو[۵]،۱۹۹۷؛سیمپسون،۱۹۹۳). این DNA آزاد جنینی با پیشرفت آبستنی افزایش یافته (بطور میانگین از ۳/٤ درصد تا ٦/۲ درصد از کل DNA پلاسمای مادری) (لو،b ۱۹۹۸) و پس از زایمان، به سرعت از پلاسمای خون مادر حذف می شود(لو،c۱۹۹۹).

با توجه به وجود DNA آزاد جنینی در میان انبوه DNA آزاد مادری موجود در پلاسما، یک مانع بزرگ در راه کسب اطلاعات از این منبع، فقدان مارکرهای اختصاصی در تمایز این دو نوع DNA از نظر منشاء می باشد. با توجه به تمایز واقعی توالی DNA کروموزوم Y از DNA پلاسمایی مادر، بررسی های زیادی بر پایه ی چنین توالی هایی بعنوان مارکرهای اختصاصی DNA جنینی انجام شده است. سرانجام این پژوهش های تجقیقاتی یک روش تعیین جنسیت با صحت بالا را فراهم ساخت(دوالیوا[٦]،۲۰۰٦؛هوندا[۷]،۲۰۰۲؛سکیزاوا[۸]،۲۰۰۱). علاوه بر تعیین جنسیت جنین، این DNA آزاد

۱-Li ۲-Simpson ۳-Hamada ٤-Krabchi ۵-Lo ٦- Davalieva ۷-Honda ۸-Sekizawa

پلاسمایی برای تعیین غیر تهاجمی وضعیت گروه خونی RhD جنین در زنان بـاردار RhD منفـی نیـز مفید می باشد. اخیرا بررسی DNA آزاد جنینی موجود در پلاسمای مادری بمنظور تشخیص پـیش از تولد غیر تهاجمی بتاتالاسمی ماژور، سیستیک فیبروزیس، بیماری هانتینگتون و بسـیاری از اخـتلالات دیگر جنینی در دست بررسی است (آمیکوچی[1]،۲۰۰۰؛ لو،۱۹۹۹c؛ لو،۱۹۹۸a؛ لو،۱۹۹۸b).

همچنین پس از مدت کوتـاهی کـه از کشـف DNA آزاد جنینـی در پلاسـمای مـادری گروهـی از پژوهشگران متوجه شدند که در آسیب ها و ناهنجاری های جنینی، DNA جنینی موجود در پلاسمای مادری متحمل تغییرات کمی می گردد. این تغییرات کمی DNA جنینی نخستین بار در زنان بـارداری که از مسمومیت بارداری رنج می بردند، مشاهده شد که یک افزایش پنج برابری سطوح DNA جنینی را نشان دادند. همچنین میزان DNA جنینی در پلاسمای مادران در بارداری هـای ناشـی از تریزومـی ۲۱ افزایش می یابد. بنابر این امکان استفاده ازغلظت DNA جنینی موجود درپلاسما یا سرم مـادر در آینده ای نزدیک پیش بینی خطرات بارداری را نوید می دهد(لو،۱۹۹۹c). در سـال ۲۰۰۵ در تحقیقـی با استخراج DNA جنینی موجود در مایع آمنیوتیک و استفاده از واکنش Real-time PCR کمی، موفق به تشخیص پیش از تولد تریزومی ۲۱ شدند(یانگ[2]،۲۰۰۵).

تحقیق حاضرنیز، به هدف توسعه روشی بی خطر در جداسـازی DNA آزاد جنینـی از خـون مـادر و استفاده از آن جهت تعیین حساسیت این تست در تشخیص تعدادی کروموزوم های جنینی بخصوص تریزومی ۲۱ که رایج ترین آنوپلوئیدی است می باشد.

۱-Amicucci ۲-Young

۱–۱ مروری بر میوز

۱–۱–۱ ریسک فاکتورهای آنوپلوییدی جنین

جهت شناسایی ریسک فاکتورهای آنوپلوییدی جنین باید به چندین پرسش مهم پاسخ داده شود: ۱) مکانیسم ها ی جدا نشدن که منجر به آنوپلوییدی جنین می شوند، چیست؟ ۲) منشا والدی کپی اضافی کروموزوم یا کمبود یک کروموزوم چیست؟ ۳) تکرارآنوپلوییدی و اهمیت بالینی آن چقدر می باشد (هاسولد[۱]، ۲۰۰۷)؟ حداقل ۵ درصد تمام بارداری ها،آنوپلویید می باشند؛ اکثر تریزومی ها و مونوزومی های یک کروموزوم خاص می میرند و منجر به سقط جنین می گردند(هاسولد،۲۰۰۱).

به هر حال بعضی آنوپلوییدی ها به قدری آسیب رسان نمی باشند که سبب از بین رفتن جنین شوند و ممکن است تا پایان بارداری زنده بمانند. تریزومی ۲۱ یکی از انواع این چنین آنوپلوییدی ها می باشد و سبب نقایص مادرزادی هنگام تولد جنین می گردد(هاسولد ، ۲۰۰۷). و حدود ۲–۱ کودک در هر ۱۰۰۰ کودک متولد شده ، مبتلا به سندرم داون می باشند(هوک وکراس[۲]،۱۹۸۳). به همین دلیل توجه اصلی این پایان نامه بر روی تریزومی کروموزوم ۲۱ می باشد.

۱–۱–۲ نقش خطای میوزی در آنوپلوییدی جنین

خطای میوزی مسئول آنوپلوییدی بوده و سبب کسب یک کروموزوم اضافی در بعضی گامت ها و ایجاد تریزومی می شود. میوز فرایند تقسیم سلولی خاصی است که از طریق آن، سلول های دیپلویید رده ی زاینده به سلول های دختری تقسیم می شوند. تفاوت میوز با میتوز در دوبار تقسیم سلولی پس از یک واقعه ی همانند سازی DNA است. طی میوز I، کروموزوم های هومولوگ به دو سلول دختری تقسیم می شوند. این سلول ها بدون اینکه دوباره همانند سازی کنند، وارد مرحله ی میوز II می شوند. طی میوز II کروماتید ها ی خواهری به دو سلول دختری تقسیم شده، چهار گامت هاپلویید در مردان و یک گامت منفرد هاپلویید در زنان ایجاد می گردد(در میوز I نیمی از مواد کروموزومی، درون یک ساختار سلولی بنام جسم قطبی جمع می شود. فرایند مشابهی در میوز II رخ داده و بازاء هر اووسیت دو جسم قطبی ایجاد میگردد) (مورلی و کوهن[۳]، ۲۰۰۵). میوز I به چهار مرحله تقسیم می گردد: پروفاز، متافاز، آنافاز و تلوفاز.

۱-Hassold ۲- Hook and cross ۳- Morelli and cohen

اکثر رویدادهای میوز طی پروفازI رخ می دهند. در پروفاز I ساختار پروتئینی ویژه ای بنام کمپلکس سیناپتونمی[1](SC) تشکیل می شود. این کمپلکس از دو عنصر جانبی در طول هر کروماتید خواهری و یک عنصر مرکزی تشکیل شده که عنصر مرکزی به دو عنصر جانبی ملحق شده و آنها را به دو کروموزوم هومولوگ متصل می نماید(مورلی وکوهن،۲۰۰۵). کمپلکس سیناپتونمی موجبات نوترکیبی وایجاد کیاسما را میان کروماتید های هومولوگ فراهم می سازد. تشکیل کیاسما در پروفاز I ازاین جهت دارای اهمیت میباشد که با نوترکیبی سبب افزایش تنوع ژنتیکی شده و همچنین کششی را میان کروموزوم های هومولوگ ایجاد نموده که در طی میوزI برای یک تقسیم سلولی موفق ضروری است(این یک فاکتور مهم در پیشگیری از ایجاد گامت های آنوپلوییید می باشد) (کارپنتر[2]،۱۹۹٤).

۱-۱-۳ جدا نشدن کروموزوم ها طی میوز I

جدا نشدن کروموزوم ۲۱، در ۹۰ درصد تمام موارد به دلیل خطای میوزی است که اکثرا طی میوز I رخ می دهد(الیور[3]،۲۰۰۸). جدا نشدن[4](ND) خطایی در تقسیم سلولی بوده که کروموزوم ها از یکدیگر جدا نمی شوند. میوز در حدود هفته ی ۱۲-۱۱ بارداری آغاز می شود و پس از روند جفت شدن، سیناپس و نوترکیبی، تقسیم سلولی تا قبل از تخمک گذاری متوقف می شود. بدین معنا که کروموزوم ها ی هومولوگ تقریباً به مدت ۵۰-۱۰ سال در مرحله پروفاز می مانند(الیور، ۲۰۰۸). تشکیل کیاسما طی پروفاز I (علاوه بر نقش آن درنوترکیبی) سبب پایدار ماندن زوج کروموزوم های هومولوگ شده وجهت گیری صحیح این کروموزوم ها را در دوک میوزی فراهم می سازد(الیور،۲۰۰۸).

یکی از دلایل جدا نشدن در میوز I عدم تشکیل کیاسما میان کروموزوم های هومولوگ یا همتا است. بدون تشکیل کیاسما جهت ایجاد کشش و اطمینان از جهت گیری صحیح کروموزوم ها در دوک میوزی، ممکن است کروموزوم ها طی آنافاز I بطور نادرست از هم جدا شوند. دلیل دیگر جدا نشدن در میوز I زمانی است که کیاسما در پروفاز I تشکیل شود که اصطلاحاً جدا نشدن کیاسمایی نامیده می شود. علت اصلی جدا شدن نادرست در مورد جدا نشدن کیاسمایی مشخص نشده است اما به نظر می رسد که هم خطای دوک میوزی و هم موقعیت کراسینگ اور دارای اهمیت

۱-Synaptonemal complex ۲-Carpenter ۳-Oliver ٤-Nondisjunction