گزارش جهش نقطه ای جدید در ژن فاکتور انعقادی شماره ۸ انسانی در فردی با هموفیلی A شدید

محمد علی حسین پور فیضی [۱]، حبیب عنصری [۲*]، سمیه اکرمی [۳]، مهدی حقی [٤]، عباسعلی حسین پور فیضی [٥]

چکیده

سابقه و هدف: هموفیلی A یک بیماری خونریزی دهنده با الگوی وراثتی مغلوب و وابسته به کرومزوم X می‌باشد. شیوع آن در جهان ۱ در ۱۰ هزار نفر در بین مردان می باشد. این بیماری یک نقص وراثتی فاکتور انعقادی شماره ۸ می باشد. ژن فاکتور ۸ در نزدیکی انتهای بازوی بلند کروموزوم X (Xq28) واقع شده و در حدود ۱۸۰ کیلو باز طول دارد. این ژن دارای ۲٦ اگزون بوده و یک زنجیره پلی پپتیدی با ۲۳۵۱ اسید آمینه را کدگذاری می‌کند. در این مقاله به معرفی یک جهش جدید در ژن فاکتور ۸ بیمار مبتلا به هموفیلیA مراجعه کننده به بیمارستان کودکان تبریز در سال ۸۵ پرداخته می‌شود.

معرفی بیمار: بیمار پسر ٦ ساله‌ای بود (HA10) که به علت خونریزی‌های مکرر لثه در سال ۱۳۸۵ به بیمارستان کودکان تبریز آورده شده بود. وجود خونریزی شدید در بیمار، پایین بودن میزان فاکتور۸ و معاینات پزشکی احتمال ابتلا به هموفیلی شدید را نشان می‌داد. بنابراین برای بررسی نوع جهش عامل بیماری با استفاده از تکنیک PCR-SSCP اقدام شد.

بحث و نتیجه‌گیری: یک جهش جدید شناسایی شد که در لیست داده های بین المللی هموفیلی A گزارش نشده بود. این جهش جدید، جهش انتقالی T→C در اگزون ٤ می باشد که در موقعیت کدون ۱۵۳ رخ داده بود و باعث تغییر اسید آمینه سیستئین به آرژینین می‌شود. این جهش جدید در بانک ژنی NCBI به شماره EF581382 ثبت شده است. این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از تکنیک PCR-SSCP روش خوبی برای آشکار سازی انواع جهش های عامل هموفیلی A می باشد.

واژگان کلیدی: هموفیلی A، فاکتور VIII، جهش نقطه‌ای، PCR-SSCP

۱- استاد دانشکده علوم دانشگاه تبریز

۲- استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند

۳- کارشناس ارشد گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند

٤- کارشناس ارشد گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه تبریز

۵- دانشیار گروه خون و انکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

* نویسنده مسوول: حبیب عنصری

آدرس: مرند، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند، گروه زیست شناسی

پست الکترونیک: onsori1356@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱٤ ٤۹۱ ٦۳۳۷

دورنویس: ۰٤۹۱۲۲٦۰۵٦٦

تاریخ دریافت: ۸٦/۱۱/۱۲

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۸/۱/۲٤

مقدمه

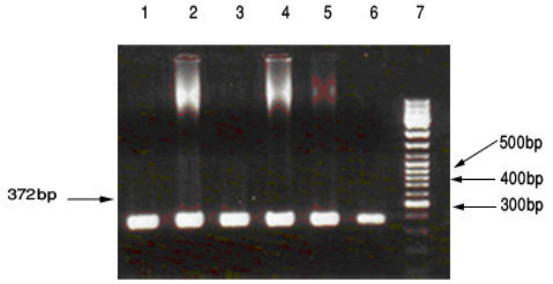
هموفیلی A یک بیماری خونریزی دهنده با الگوی وراثتی مغلوب و وابسته به X می‌باشد که با شیوع تقریبی ۱/۱۰۰۰۰ مورد در بین مردان در تمامی جمعیت‌ها دیده می شود [۱]. این بیماری به وسیله جهش‌هایی در ژن فاکتور انعقادی ۸، که بر روی کروموزوم X در موقعیت Xq28 قرار دارد، حاصل می‌شود [۲]. فاکتور ۸ یک گلیکو پروتئین پلاسمایی است که به عنوان کوفاکتور برای فعالیت سرین پروتئازی فاکتور ۹ فعال و در جهت تبدیل فاکتور ۱۰ غیر فعال به فاکتور ۱۰ فعال عمل می‌کند [۵،٤،۳]. بیش از ۹۰۰ جهش مختلف شامل جهش‌های نقطه‌ای، الحاق‌ها، حذف‌ها و وارونگی‌ها در ژن فاکتور ۸ شناخته شده اند که باعث هموفیلی A می‌شوند [٦]. جهش‌های نقطه‌ای، فراوان ترین نوع آسیب می‌باشند که در مبتلایان هموفیلی A دیده می‌شوند و شامل جهش‌های missense و nonsense می‌باشند [۷]. چندین روش غربال گری جهش برای آشکارسازی جهش‌ها از جمله SSCP (single strand conformational olymorphism) CSGE (conformatinal sensitive gel electrophoresis) وجود دارند که بیش از ۹۰ درصد جهش‌ها را می‌توان با این

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-20]

تکنیک‌ها آشکار کرد. روش SSCP که معمولا برای قطعات با طول کمتر از ٤٠٠ جفت باز استفاده می شود، یک روش تقریبا ساده و ارزان می‌باشد [٨]. در این مطالعه با استفاده از تکنیک PCR-SSCP و تعیین توالی مستقیم، جهش عامل بیماری در فرد مبتلا به هموفیلی A مورد شناسایی قرار گرفت.

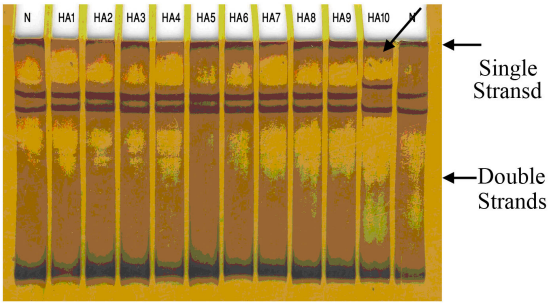
معرفی بیمار

بیمار پسر ٦ ساله ای بود که به علت خونریزی های لثه در سال ١٣٨٥ به بیمارستان کودکان تبریز آورده شده بود. وجود خونریزی شدید در بیمار، پایین بودن فاکتور٨ و معاینات پزشکی احتمال ابتلا به هموفیلی شدید را نشان می داد. نمونه گیری خونی از بیمار صورت گرفت. نمونه ها تا زمان استخراج DNA از گلبول های سفید خون در یخچال نگه داری شدند. استخراج و تخلیص DNA ژنومی از نمونه های خون به روش SDS-Proteinase K انجام شد [٩]. پس از استخراج DNA ژنومی از افراد مبتلا و شاهد، با استفاده از روش PCR و بکار گیری پرایمرهای 5-CATGTTTCTTTGAGTGTACAGTGG F8EX4 و 5-TTCAGGTGAAGGAACACAAATG: F8EX4R، اگزون ٤ تکثیر شد. توالی پرایمرها از سایت اختصاصی مربوط به هموفیلی گرفته شد [٦]. قطعه مورد انتظار از PCR اگزون ٤ ژن فاکتور ٨ به طول ٣٧٢ جفت باز با استفاده از پرایمرهای F8EX4F و F8EX4F به دست آمد (شکل ١).

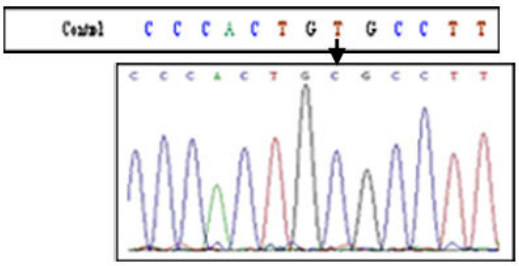


شکل١- ژل آگارز ١/٥ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، نشان دهنده محصولات PCR اگزون ٤ به طول ٣٧٢ جفت باز: چاهک (١) محصول PCR فرد نرمال، چاهک های ٢ الی ٦ محصولات PCR افراد مبتلا، چاهک (٧) DNA Ladder (Fermentas SM0333)

پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز، محصولات PCR با تکنیک SSCP و رنگ آمیزی با نیترات نقره آنالیز شدند [١٠]. هنگامی‌که محصولات PCR به وسیله تکنیک SSCP آنالیز شدند، تغییر در الگوی باندی فرد شماره ١٠ با فرد نرمال و سایر افراد مبتلا مشاهده شد (شکل٢). پس از واکنش PCR و آنالیز SSCP، تعیین توالی قطعه مورد نظر، یک جهش نقطه‌ای را در محل کدون شماره ١٥٣ (TGC) نشان داد. این جهش نقطه ای به صورت انتقال T به C در این موقعیت می باشد که باعث تغییر اسید آمینه سیتئین به آرژنین می‌شود (Cysteine→ Argenine) (شکل٣).



شکل٢-آنالیز PCR-SSCP اگزون ٤ ژن فاکتور٨ در ١٠ بیمار مبتلا به هموفیلی A . در فرد شماره ١٠ تغییر در مهاجرت تک رشته ها به وسیله پیکان نشان داده شده است. N: فرد نرمال.



شکل٣- تعیین توالی محصول PCR اگزون ٤ فرد شماره ١٠ (HA10). مقایسه توالی فرد بیمار با توالی فرد نرمال، تغییر نوکلئوتیدی T به C (TGC→CGC) را نشان می دهد.

بحث

جهش انتقالی T→C که موجب تغییر اسید آمینه سیستئین به آرژنین می‌شود باعث نقص در عملکرد دومین A1 در فاکتور ٨ و در نتیجه موجب بروز هموفیلی A شدید می شود. در بین داده های هموفیلی A یک نوع جهش دیگر در کدون ١٥٣ در دو بیمار گزارش شده است که در هر دو مورد آنها تغییر اسید آمینه سیستئین به تریپتوفان باعث هموفیلی شدید شده است [٣].

نتیجه گیری

با توجه به اینکه هموفیلی A یک بیماری خطرناک و کشنده می‌باشد، لذا به نظر می رسد که تکنیک PCR-SSCP روش خوبی برای بررسی جهش‌های عامل بیماری می‌باشد.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-20]

References:

[1] Miyoko H, Stylianos E, Laura K, Johannes O. Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: Detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. ***ProcNati Acad Sci USA*** 1991;88:8307-11.
[2] Habart D. Molecular diagnosis of hemophilia A in clinical practice. ***Cas Lek Ces*** 2005;144:795-800.
[3] Geoffrey KC, Edward GDT, Adam IW. The factor VIII Structure and mutation resource site: HAMSTERS Version 4***. Nucleic Acids Res*** 1998;26(1):216-9.
[4] Barry LS. Optimization of factor VIII replacement therapy: Can structural studies help in evading antibody inhibitors***? Br J Haematol*** 2002;119:310–22.
[5] Leyte A, Verbeet MP, Brodniewicz-Proba T, van Mourik JA, Mertens K. The interaction between human blood coagulation factor VIII and von Willebrand factor***. Biochem J*** 1989; 257:679-84.
[6] Berber E, Fidanci ID, EL-Maarrid C, Aktuglu G, Gurgey A, Celkan T. Sequencing of the factor 8 (F8) coding regions in 10 Turkish hemophilia A patients reveals three novel pathological mutations, and one rediagnosis of von Willebrand's disease type 2N. ***Haemophilia*** 2006;12:398–400.
[7] Bhopale GM, Nanda RK. Blood coagulation factor VIII: An overview. ***J Biosci*** 2003;28:783–9.
[8] Dalal L, Pradhan M, Agarwal S. Genetics of Bleeding Disorders. ***Int J Hum Genet*** 2006;6(1):27-32.
[9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989; PP: 914-923.
[10] Chinchang W, Viprakasit V, Pung-Amritt P, Tanphaichitr VS, Yenchitsomanus P. Molecular analysis of unknown β-globin gene mutations using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) technique and its application in Thai families with β-thalassemias and β-globin variants. ***Clin Biochem*** 2005;38:987–96.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-20]