BRIEF REPORT

Evaluation of Loop Mediated Isothermal Amplification Assay for Fetal Sex Determination in Human

Mohammad Amin Almasi[1],
Alireza Babazadeh-Bedostani[2]

[1] Young Researchers and Elites Club, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
[2] Lecturer, Department of Biotechnology, Research Institute of Physiology and Biotechnology, University of Zanjan, Zanjan, Iran

(Received July 16, 2016, Accepted October 10, 2016)

Abstract

Background and purpose: In humans, *SRY* (sex-determining region of the Y chromosome) is the major gene for the sex determination which is found in normal XY males and rarely in XX males, and it is absent from normal XX females and from many XY females. There are several methods which can indicate a male genotype by amplification of *SRY* gene. The aim of this study was identification of the *SRY* gene for fetal sex determination in human during pregnancy using loop mediated isothermal amplification (LAMP) method.

Materials and methods: A total of 18 blood samples were collected from pregnant women at 8 weeks of pregnancy and plasma DNA was extracted. For detection of *SRY* gene LAMP assay was performed using the DNA.

Results: LAMP results revealed the positive reaction was highly specific only to samples containing XY chromosomes; while no amplification was found in samples containing XX chromosomes. Finally, it was proved that from samples collected 9 were male embryos (50%) and 9 were female embryos (50%). All visual components used in colorimetric assay could successfully make a clear distinction between positive and negative reactions.

Conclusion: The LAMP assay is a valuable tool for detection of *SRY* gene for fetal sex determination.

Keywords: colorimetric assay, LAMP assay, sex determination, *SRY* gene

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(144): 352-356 (Persian).

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۴ دی سال ۱۳۹۵ (۳۵۶-۳۵۲)

ارزیابی آزمون تکثیر هم دمای وابسته به حلقه جهت تعیین جنسیت جنین در انسان

محمد امین الماسی[۱]
علیرضا بابازاده بدوستانی[۲]

چکیده

سابقه و هدف: در انسان، *SRY* (ناحیه تعیین جنسیت کروموزوم Y) ژن اصلی برای تعیین جنسیت است که در نرهای نرمال XY و ماده‌های نادر XX مشاهده می‌شود و در ماده‌های نرمال XX و بعضی از ماده‌های نادر XY وجود ندارد. چندین روش وجود دارند که می‌توانند یک ژنوتیپ نر را به وسیله تکثیر ژن *SRY* شناسایی کنند. هدف از این پژوهش شناسایی ژن *SRY* به منظور تعیین جنسیت جنین در انسان در خلال دوره حاملگی با استفاده از آزمون تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه (LAMP) بود.

مواد و روش‌ها: در کل ۱۸ نمونه خونی از زنان حامله در ۸ هفته اول دوره حاملگی جمع‌آوری و DNA پلاسما استخراج شد. آزمون LAMP با استفاده از DNA به‌دست آمده به منظور تشخیص ژن *SRY* انجام شد.

یافته‌ها: نتایج آزمون LAMP نشان داد واکنش مثبت تنها برای نمونه‌های حاوی کروموزوم XY بسیار اختصاصی بود در حالی که هیچ تکثیری در نمونه‌های حاوی کروموزوم XX مشخص نشد. در نهایت ثابت شد که از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، ۹ جنین نر (۵۰ درصد) و ۹ جنین ماده (۵۰ درصد) بودند. تمامی ترکیبات تشخیص مشاهده‌ای استفاده شده در آزمون رنگ‌سنجی توانستند به طور موفقیت‌آمیزی تفاوت بین واکنش‌های مثبت و منفی را مشخص نمایند.

استنتاج: آزمون LAMP به کارگرفته شده در این پژوهش یک ابزار ارزشمند برای تشخیص ژن *SRY* به منظور تعیین جنسیت جنین است.

واژه های کلیدی: آزمون رنگ سنجی، آزمون LAMP، تعیین جنسیت، ژن SRY

مقدمه

در حال حاضر در اکثر کشورها تشخیص جنسیت جنین در چند ماه اول بارداری به منظور پیشگیری از بروز اختلالات ژنتیکی، در آزمایشگاه‌های ژنتیک پزشکی مورد توجه می‌باشد(۱). در سال ۱۹۹۷ حضور DNA آزاد جنینی در سرم و پلاسمای زنان باردار شناسایی شد(۲). منشاء این DNA به طور غالب از جفت می‌باشد ولی سلول‌های هماتوپویتیک جنین نیز منشاء بخش اندکی از آن می‌باشند(۳). مکانیزم‌هایی مانند نکروز یا آپوپتوز سلول‌های جنینی/جفتی و یا ترشح فعال DNA جنینی سبب رها شدنDNA جنینی به گردش خون مادر می‌شوند(۴).

مولف مسئول: محمد امین الماسی– تهران: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال E-mail:aminalmasi63@gmail.com
۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران
۲. مربی، گروه بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات فیزیولوژی و بیوتکنولوژی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۴/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۴/۲۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۷/۱۹

DNA جنینی در اوایل و اواخر بارداری به ترتیب ۳/۴ درصد و ۶/۲ درصد از کل DNA آزاد سلولی موجود در پلاسمای مادر را تشکیل می‌دهد(۵). مطالعات دیگر، نشان دادکه غلظت DNA جنینی با افزایش سن بارداری افزایش می‌یابد و DNA جنینی پس از زایمان به سرعت از پلاسمای مادر حذف می‌گردد(۶). ژن SRY، ژن تعیین جنسیت بر روی کروموزوم Y است. این ژن بدون اینترون، نوعی فاکتور رونویسی را کد می‌کند که پروتئین SRY نامیده می‌شود و باعث تعیین جنسیت به سمت جنس مذکر می‌گردد(۴).

ژن *SRY* با فعال نمودن فاکتورهای رونویسی مختص جنس مذکر تمایز بیضه را آغاز می‌نماید و تمایز بیضه باعث می‌شود که سلول‌های اولیه غده جنسی تمایز یافته و تکثیر شوند(۶- ۲).

در طی ۱۰ سال گذشته، روش تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه (Loop-Mediated Isothermal Amplification) که به اختصار به آن LAMP می‌گویند به علت سادگی، سرعت، کارآیی بالا و اختصاصیت منحصربه‌فرد، به‌طور گسترده‌ای در آنالیز اسیدنوکلئیک به کار گرفته شده است. متدولوژی این روش بر پایه استفاده از چهار آغازگر مختلف است که به‌طور اختصاصی شش ناحیه از ژن هدف را شناسایی می‌کنند و پیشروی فرآیند واکنش در یک دمای ثابت و پیوسته با استفاده از واکنش جایگزینی رشته صورت می‌گیرد(۷،۸). تاکنون روش‌های زیادی برای تشخیص جنسیت جنین به کار گرفته شده‌اند. روش LAMP اولین بار در سال ۲۰۱۳ توسط Kanchanaphum و همکارانش جهت تعیین جنسیت در انسان بر روی نمونه‌های خونی گرفته شده از زنان و مردان انجام شد(۹). اما از آنجایی که تاکنون روش تکثیر هم‌دما 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.

مواد و روش ها

۵ میلی‌لیتر خون کامل همراه با ماده ضد انعقاد EDTA از ۱۸ زن باردار در سنین بارداری ۸ هفته‌ای و یک مرد (به عنوان شاهد مثبت) با اطلاع و کسب رضایت آن‌ها جمع‌آوری گردید. خون هر فرد بلافاصله در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و پلاسما به میزان ۵۰۰ میکرولیتر درون میکروتیوب‌های استریل تقسیم گردید. استخراج DNA به روش فنلی انجام و جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری 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 نرم‌افزار PrimerExplorer V3 (نرم افزار online ویژه جهت طراحی آغازگرهای LAMP) صورت گرفت (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: آغازگرهای طرحی شده جهت تشخصی ژن *SRY* به روش LAMP

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

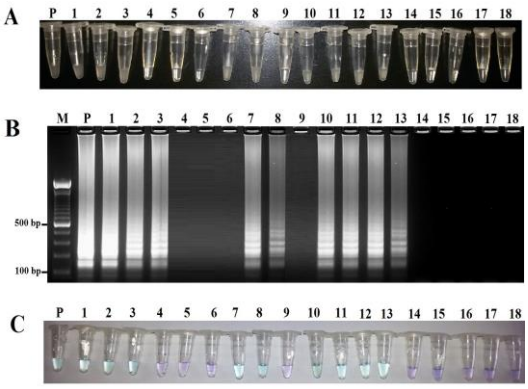
واکنش LAMP در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۰/۱ میلی‌مولار dNTP، ۰/۰۶ میلی‌مولار آغازگر FIP، ۰/۰۶ میلی‌مولار آغازگر BIP، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر F3، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر B3، ۰/۰۴ میلی‌مولار آغازگر LF، ۰/۰۴ میلی‌مولار آغازگر LB، ۰/۰۸ میلی‌مولار بتایین، ۰/۰۴ میلی‌مولار $MgSO_4$، ۰/۱ میلی‌مولار Buffer Bst (10X) و ۰/۰۴ میلی‌مولار آنزیم Bst DNA پلیمراز (New England Biolabs, UK) و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۶۰ دقیقه در یک حمام آبگرم ادامه یافت. به محض اتمام واکنش لوله‌ها خارج گشت و کدورت حاصل از واکنش مثبت

مشاهده شد. هم‌چنین ۵ میکرولیتر از محصول در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با دستگاه Gel documentation بررسی شد. علاوه بر این جهت تأیید انجام واکنش LAMP، مقدار ۰/۱ میلی‌مولار 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 لوله‌ها همراه بود، با چشم غیر مسلح انجام شد.

یافته ها و بحث

با شناسایی DNA آزاد جنینی در سرم و پلاسمای مادری، نه تنها رویای تعیین جنسیت جنین در هفته‌های نخستین بارداری به حقیقت پیوست، بلکه بررسی‌های تشخیصی پیش از تولد اختلالات ژنتیکی در جنین به روش غیرتهاجمی نیز میسر گشت(۵). DNA آزاد جنینی با پیشرفت آبستنی افزایش یافته و پس از زایمان به سرعت از پلاسمای خون مادر حذف می‌شود(۶). تاکنون روش‌های زیادی جهت تعیین جنسیت در انسان به کار گرفته شده‌اند که می‌توان به روش‌های مبتنی بر PCR اشاره کرد(۵-۲). روش LAMP در سال ۲۰۱۳ به طور موفقیت‌آمیزی توسط Kanchanaphum و همکارانش برای تشخیص جنسیت در انسان به کار گرفته شد(۹). در پژوهش حاضر 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 می‌شود، شناسایی گردد. روی پلاسمای ۱۸ زن باردار در هفته هشتم بارداری و یک مرد (شاهد مثبت) به طور مجزا استخراج DNA انجام شد. متوسط غلظت DNA استخراج شده از حجم یکسان پلاسماها 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 لوله‌ها و دیدن کدورت حاصل شده تأیید شد (تصویر شماره 1a).

هم‌چنین با بردن محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد و الکتروفورز آن، الگوی نردبانی شکل دیده شد که ناشی از تولید قطعات با اندازه‌های مختلف است (تصویر شماره 1b). علاوه 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 1c). صحت نتایج بوسیله پیگیری افراد پس از زایمان انجام شد و در نهایت مشخص گردید که تشخیص جنسیت در پلاسمای ۱۸ زن باردار به روش LAMP، ۱۰۰ درصد بوده است. از میان ۱۸ زن باردار، ۹ مورد حامل جنین مونث با کروموزوم XX و ۹ مورد حامل جنین مذکر با کروموزوم XY بودند. نتایج این پژوهش با نتایج Kanchanaphum و همکارانش مشابه می‌باشد که توانستند تمایز بین زنان و مردان مورد آزمایش را با استفاده از روش LAMP و بدون بکارگیری رنگ HNB تشخیص دهند(۹). در کل می‌توان گفت روش LAMP به علت ویژگی‌هایی که دارد در سطح مزرعه‌ای و آزمایشات صحرایی قابل استفاده است. این روش کم‌تر تحت تأثیر مواد مهارکننده موجود در نمونه قرار می‌گیرد، به گونه‌ای که می‌توان مراحل انجام واکنش را کاهش داد.



تصویر شماره ۱: (A) تشخیص مشاهده ای واکنش LAMP با استفاده از کدورت ناشی از تشکیل رسوب پیروفسفات منیزیم. (B) الکتروفورز محصولات واکنش LAMP بر روی ژل آگارز ۱ درصد. (C) تشخیص مشاهده ای واکنش LAMP با استفاده از رنگ هیدروکسی نفتول بلو (HNB). M: DNA سایز مارکر ۱۰۰bp، P: نمونه مرد (شاهد مثبت)، لاین ۱۸-۱ نمونه زنان باردار

References

1. Li 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.
2. Leo LMP, Dennis YML. Circulating fetal DNA in maternal plasma. Clin Chim Acta 2001; 313(1-2): 151-155.
3. Wagner AJ, Mitchell ME, Tomitamitchell A. Use of cellfree fetal DNA in maternal plasma for noninvasive prenatal screening. Clin Perinatol 2014; 41(4): 957-966.
4. Maron J, Bianchi D. Prenatal diagnosis using cellfree nucleic acids in maternal body fluids adecade of progress. Am J Med Genet Semin Med Genet 2007; 145 C(1): 5-17.
5. Sikora A, Zimmermann BG, Rusterholz C, Birri D, Kolla V, Lapaire O. Detection of increased amounts of cell-free fetal DNA with short PCR amplicons. Clin Chem 2010; 56(1): 136-138.
6. 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.
7. 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.
8. 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).
9. Kanchanaphum P, Sarataphan T, Thirasan W, Anatasomboon G. Development of Loop mediated isothermal amplification (LAMP) of SRY gene in human blood samples for sex determination. Rangsit Journal of Arts and Sciences 2013; 3(2): 129-135.