

آنالیز مولکولی ژن فون ویلبرانت در بیماران فون ویلبرانت تیپ یک با استفاده از تکنیک ژل الکتروفورز حساس به ساختار (CSGE): مقایسه دو روش دستی و ماشینی (فلورسانت)

آن گودیو (Ph.D.)**

سید محمدباقر هاشمی سوته (Ph.D.)**

چکیده

سابقه و هدف: بیماری فون ویلبرانت تیپ یک، شایع ترین بیماری ارثی خونریزی دهنده ناشی از نقص در عملکرد ژن فون ویلبرانت با طول 178000 نوکلئوتید می باشد. روش های مختلفی برای تعیین جهش در مطالعات ژنتیکی وجود دارد. در این مطالعه ابتدا روش دستگاهی ژل الکتروفورز حساس به ساختار (CSGE) با کمک رنگ های فلورسانت برای ژن فون ویلبرانت طراحی و سپس قابلیت دو روش مختلف دستی و فلورسانت در تعیین جهش در این دو با هم مقایسه گردید.

مواد و روش ها: 52 آگزون و ناحیه های اتصال آگزون - اینترون و همچنین ناحیه 3 ژن فون ویلبرانت در افراد شاخص از 7 خانواده مبتلا به فون ویلبرانت تیپ یک و یک مورد کنترل نرمال با استفاده از 56 PCR مختلف تکثیر گردید. قطعات PCR حاصل به منظور یافتن جهش با استفاده از هر دو روش دستی و فلورسانت بررسی شده و قطعات حاوی باند اطافه تعیین توالی شدند.

یافته ها: 125 مورد PCR با باندهای اضافه با استفاده از روش الکتروفورز فلورسانت (F-CSGE) در کل مشاهده شد در حالیکه 101 مورد توسط روش الکتروفورز دستی (M-CSGE) مشاهده گردید. 5 جهش نقطه ای توسط هر دو روش شناسایی گردید شامل 3 جهش جدید، گلابسین 19 به آرژنین (G19R) در آگزون 2؛ آرژنین 1315 به هیستیدین (R1315H) در آگزون 28 و سیتوزین 2304 به لیزین (C2304Y) در آگزون 40 و دو جهش شناخته شده پرولین 1266 به لیزین (P1266L) و سرین 1285 به پرولین (S1285P) در آگزون 28 می باشد. علاوه بر این، 45 پلی مورفیسم مختلف توسط روش F-CSGE و 39 پلی مورفیسم به وسیله روش M-CSGE در مجموع شناسایی گردید. 192 قطعه PCR در هر بار آزمایش توسط F-CSGE و حداکثر 40 نمونه در روش دستی بررسی و آنالیز گردید.

استنتاج: ی اگر چه F-CSGE روش وقت گیرتر و گرانتری نسبت به M-CSGE است اما روشی سریع، با حساسیت بیشتر و با ظرفیت بالاتری نسبت به M-CSGE برای تعیین جهش های نا شناخته در ژن VWF است.

واژه های کلیدی: بیماری عروق کرونر، L-سلکتین، پلی مورفیسم ژنی

* دکترای ژنتیک پزشکی، عضو هیات علمی (استاد یار) دانشگاه و مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

+ * ساری: بلوار خزر، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی و ژنتیک

****** دکترای ژنتیک مولکولی، مدیر و عضو هیئت علمی گروه هماتولوژی مولکولی (استاد)، دانشکده پزشکی، دانشگاه شفیلد، انگلستان
E تاریخ دریافت: 84/5/31 تاریخ تصویب: 84/10/28

مقدمه

بررسی مولکولی و تعیین جهش‌های ناشناخته و جدید خصوصاً در ژن‌هایی که طول آنها زیاد است هم در مطالعات تحقیقاتی و هم در فعالیت‌های تشخیصی و کاربردی از نظر صرف وقت و هزینه موضوع مهم و قابل توجهی می‌باشد. روش استاندارد و ایده آل برای تعیین جهش در حال حاضر، روش تعیین توالی DNA (DNA Sequencing) است. ولی برای ژن بزرگی چون ژن سازنده پروتئین فون ویلیبرانت (VWF) با کمک روش تعیین سکانس DNA در نواحی کدکننده یا سازنده پروتئین (اگزونها) به طور مستقیم و بدون استفاده از روش‌های حد واسطه، هنوز روش معمول و روتینی نیست. مؤثرترین و به صرفه‌ترین حالت برای بررسی یک ژن بزرگ در بیماران جهت یافتن جهش یا جهش‌های مسئول، ابتدا غربالگری توالی‌های کدکننده و به دنبال آن تعیین سکانس DNA در اگزونها خاص می‌باشد این شیوه هزینه‌ها را به مقدار قابل توجهی کاهش خواهد داد (1,2). تیپ یک بیماری فون ویلیبرانت ناشی از کمبود کمی (Partial Quantitative) فاکتور فون ویلیبرانت پلاسمائی و شایع‌ترین فرم بیماری فون ویلیبرانت با 60 تا 80 درصد فراوانی می‌باشد (3,4) که با کاهش سطح و فعالیت VWF در پلاسما بیماران و کاهش نسبی فعالیت فاکتور هشت (FVIII) همراه است (5-7). اساس مولکولی تیپ یک بیماری فون ویلیبرانت هنوز کاملاً شناخته نشده است. ژن VWF با طول 178 هزار نوکلئوتید، دارای 52 اگزون است که بر روی کروموزوم 12 P 13/3 واقع شده است و از جمله ژن‌های بزرگ انسان محسوب می‌گردد (89 برابر ژن بتا-گلوبین عامل بیماری بتا-تالاسمی با طول 2000 نوکلئوتید است). بزرگی این ژن کار بررسی یا غربالگری آن را جهت تعیین جهش در بیماران فون ویلیبرانت مشکل می‌سازد. همچنین یک ژن کاذب فون ویلیبرانت

که حاوی توالی اگزون 23 تا 34 از ژن اصلی است ولی عملکردی برای آن شناسائی نشده است نیز بر روی کروموزوم 22 (22 P12-ter) وجود دارد که کار بررسی ژن اصلی را دشوارتر می‌کند (8,9). در مجموع 209 جهش مختلف و بیش از 130 پلی مورفیسم شناخته شده در ژن فون ویلیبرانت به کمک مطالعات متعدد و مجزا تا به حال معین و گزارش شده است که لیست کامل آنها در سایت انگلیسی مربوط به ژن فون ویلیبرانت به آدرس <http://www.shf.ac.uk/vwf/> موجود می‌باشد (10).

روش‌های گوناگون غربالگری DNA در طی دو دهه گذشته طراحی شده است که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: ژل الکتروفورز گرادیان دناتوره (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis= DGGE) (11) تقسیم شیمیائی بر اساس ناجورشدگی (Chemical Mismatch= CCM) cleavage of (12)، پلی مورفیسم ساختار تک رشته ای (Single strand conformation polymorphism= SSCP) (13)، آنالیز هترو دوپلکس یا (Heteroduplex Analysis= HA) (14)، ژل الکتروفورز حساس به ساختار (Conformation sensitive gel electrophoresis= CSGE) (15) و روش دناتوره کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (Denaturing High Pressure Liquid Chromatography= DHPLC) (16).

به طور خلاصه، این تکنیک‌ها از ژل یا کروماتوگرافی مایع استفاده کرده و قطعات PCR حاصل از تکثیر ژن بیماران را جهت یافتن هر گونه تغییر در مقایسه با حالت نرمال مورد بررسی قرار می‌دهند. اگرچه حساسیت صد درصدی یا مطلق برای اکثر این روش‌ها وجود ندارد، ولی تحقیقات مختلف در گذشته نشان داده است که حساسیت این روش‌ها برای تعیین

مورد استفاده قرار گرفت. نمونه ابتدا در حرارت 97 درجه برای 5 دقیقه دناتوره شد، سپس مراحل تکثیر به صورت 95 درجه، 60 ثانیه، مرحله اتصال پرایمر (annealing) به مدت 60 ثانیه و مرحله تکثیر در 72 درجه به مدت 90 ثانیه صورت گرفت.

روش دستی ژل الکتروفورز حساس به ساختار (M-CSGE) - *Manual conformation Sensitive gel electrophoresis* - روش ویلیامز و همکاران (1998) مورد استفاده قرار گرفت (21). به طور خلاصه 5 میکرو لیتر از محصول PCR از هر بیمار با میزان مشابه آن از کنترل نرمال ترکیب گردید. سپس نمونه در دمای 98 درجه برای 5 دقیقه و در دمای 65 درجه برای 30 دقیقه انکوبه شد تا هترو دوپلکس تشکیل گردد 5 تا 20 میکرو لیتر از نمونه هترو دوپلکس شده سپس در ژل CSGE 10 درصد مورد استفاده قرار گرفت. الکتروفورز به صورت 10 ولت بر سانتیمتر برای 17 ساعت انجام گردید و نهایتاً باندهای DNA با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و مشاهده گردید.

روش فلورسانس ژل الکتروفورز حساس به ساختار *Fluorescent Conformation Sensitive gel electrophoresis (F-CSGE)* روش گانگولی و همکاران (1998) مورد استفاده قرار گرفت (22). به طور خلاصه، هر پرایمر رفت (فوروارد) در سمت 5' بوسیله رنگ‌های فلورسانس FAM، HEX، یا TET نشانه گذاری شد. و سپس PCRها بر اساس اندازه و نوع رنگ به 19 گروه سه تایی (به عنوان مثال گروه 8 شامل اگزون 7، 17 و 22) تقسیم بندی شد تا حتی الامکان دواندن هر یک از این گروه ها در یک چاهک از ژل امکانپذیر باشد. هترو دوپلکس همانند روش قبلی (M-CSGE) تهیه شده، سپس 1 تا 15 مرتبه

جهش ها یا تغییرات پلی مورفیسم ژن ها بین 35 تا 100 درصد (بسته به نوع تکنیک) متفاوت می باشد، که این امر به عوامل مختلف از جمله به اندازه و توالی DNA مورد بررسی نیز بستگی دارد. برای مثال، حساسیت روش SSCP از 35 درصد تا 95 درصد و حساسیت روش CSGE از 76 تا 100 درصد در مطالعات مختلف گزارش شده است (2، 17، 18).

در این مطالعه به منظور افزایش حساسیت و یا ظرفیت روش دستی CSGE برای بررسی ژن فون ویلیبرانت، با استفاده از رنگ‌های فلورسانس برای اولین بار در دنیا به صورت ماشینی درآمده است همچنین با انجام دو روش دستی و ماشینی CSGE برای غربالگری ژن فون ویلیبرانت در تعدادی از بیماران، این دو روش با هم مقایسه می شود.

مواد و روش ها

بیماران

7 خانواده اروپایی (یک اسپانیایی، 3 فرانسوی و 3 هلندی) که همگی دارای تاریخچه خانوادگی بیماری تیپ یک فون ویلیبرانت بودند به همراه یک نمونه کنترل نرمال مورد بررسی قرار گرفتند. مقدار 10 سی سی خون محیطی از هر فرد در لوله های حاوی ماده ضد انعقاد سترات تهیه گردید.

استخراج DNA و تکثیر آن:

DNA ژنومی از خون محیطی از هر فرد به کمک کیت Nucleon BACC II استخراج و تمامی ناحیه کد کننده 52 اگزون و نواحی حد فاصل اگزون-اینترون به ژن فون ویلیبرانت با استفاده از 56 PCR مختلف تکثیر گردید. ترکیب پیش آماده برای (PCR Master Mix) با غلظت های 1/5، 2/5 و 4/5 میلی مول از Mgcl2 به همراه 50 نانومولار از پرایمر مربوطه (19، 20)

رقیق گردید (بر اساس کیفیت محصول PCR) و نهایتاً 1 میکرولیتر از هر PCR با دو PCR دیگر در همان گروه

دستی و ماشینی (M-CSGE و F-CSGE) مورد بررسی و غربالگری قرار گرفت.

ترکیب شد. در انتها 1/5 میکرولیتر از این محلول بر روی ژل 10 درصد پلی اکریل آمید حاوی نسبت 99:1 اکریل آمید: باپ (Acrylamide:BAP)، 15 درصد فرامید دیونیزه شده در محلول TBE دوانده شد. ژل F-CSGE با ابعاد 420 میلی متر در 250 میلیمتر و ضخامت 0/2 میلی متر تهیه شده و از شانه های نوک تیز (shark tooth) 64 تایی استفاده گردید. الکتروفورز تحت شرایط دنا توره ناکامل یا ملایم در 2000 ولت برای مدت 4/5 ساعت با بافر TBE و در 30 درجه توسط دستگاه DNA Sequencer مدل ABI 377 انجام گردید.

نتایج حاصل از دو روش (M-CSGE) و (F-CSGE) در مجموع، 448 قطعه PCR (8 × 56) با استفاده از هر دو تکنیک (M-CSGE) و (F-CSGE) بررسی یا غربالگری شد. در بررسی با روش M-CSGE، 101 قطعه PCR از خود باندهای غیر نرمال نشان دادند در حالیکه در روش F-CSGE، 125 قطعه دارای باندهای غیر نرمال بودند. در حالیکه در 24 قطعه از PCR که با استفاده از روش M-CSGE باند اضافه قابل تشخیص نبود، یا به صورت مبهم بود در روش F-CSGE این باندها تشخیص داده شدند. در روش F-CSGE به طور متوسط در هر فرد در 16 PCR (از 12 تا 19 عدد) باندهای اضافه غیر نرمال شناسائی شدند در حالیکه با تکنیک M-CSGE، به طور متوسط در هر فرد 13 PCR (از 10 تا 16 عدد) باند اضافه غیر نرمال تشخیص داده شد. 5 جهش نقطه‌ای از نوع تغییر معنی (Missense) شامل تغییر جدید و ناشناخته گلايسين 19 به آرژنین در اگزون 2 (G19R)؛ آرژنین 1315 به هیستیدین در اگزون 28

روش تعیین سکانس DNA (DNA Sequencing)

محصول PCR با باندهای اضافه و غیر نرمال در طی آزمایش CSGE مجدداً با استفاده از پرایمرهای معمولی فاقد فلورسانت نشان دار تکثیر شد. سپس توسط دستگاه DNA Sequencer مدل ABI 377 به کمک ماده Big Dye Terminator از شرکت اپلاید بیوسیستم آمریکا بر اساس دستورالعمل کمپانی تعیین توالی گردیدند. هر قطعه از PCR به کمک پرایمرهای رفت و برگشت (فوروارد و ریورس) از دو جهت تعیین توالی شدند.

یافته‌ها

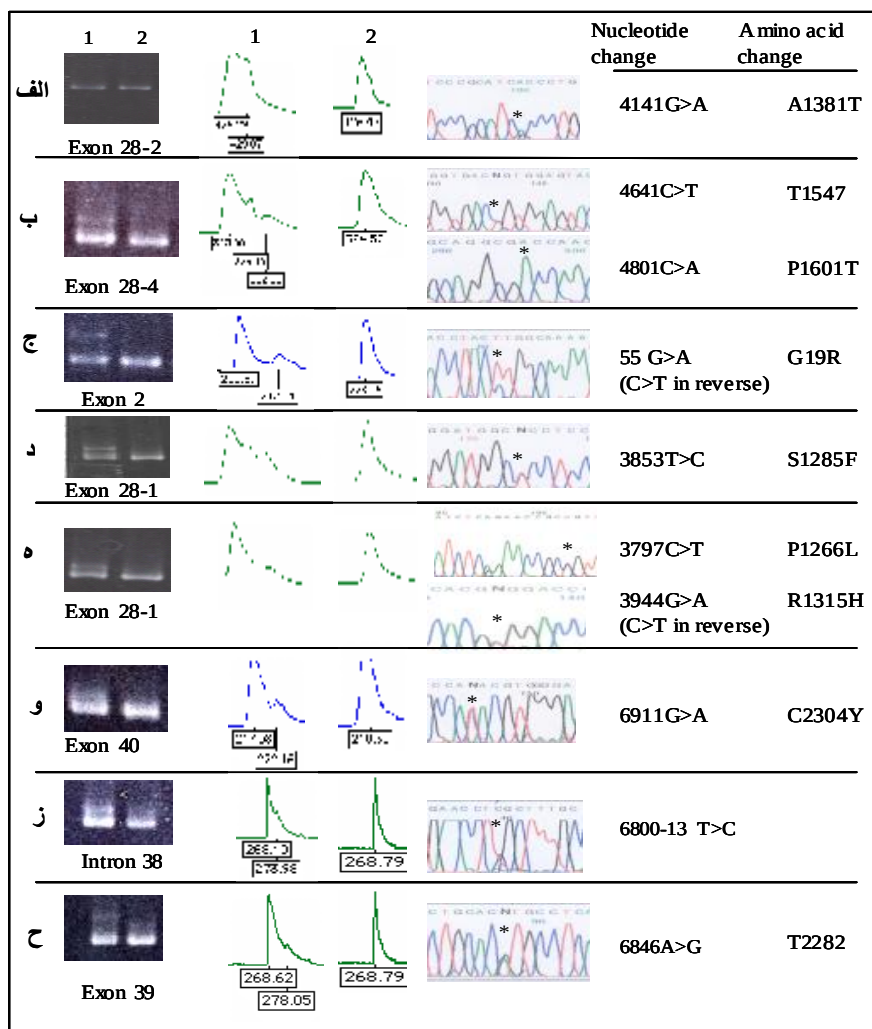
افراد شاخص یا پروباند از 7 خانواده اروپایی با بیماری تیپ یک فون ویلبرانت که هر یک دارای تاریخچه شخصی و خانوادگی بیماری بوده اند به همراه یک فرد نرمال برای این مطالعه انتخاب شدند. ناحیه کد کننده ژن به همراه حد فاصل اینترون - اگزون و ناحیه 3' ژن VWF از هر یک از 7 بیمار (56 PCR برای هر فرد) با استفاده از تشکیل هترو دوپلکس و روش های

R1315H) و سیتوزین 2304 به لیزین در اگزون 40 (C2304Y) و همچنین دو تغییر قبلاً شناخته شده شامل پرولین 1266 به لیزین در اگزون 28 (P1266L) و پرولین 1285 به سرین (S1285P) در افراد شاخص از 4 خانواده با استفاده از هر دو روش CSGE دستی و فلورسانت مورد شناسایی قرار گرفت (تصویر شماره 1 بخش C تا F). در 3 خانواده دیگر این مطالعه جهشی تشخیص داده نشد.

تعیین توالی DNA در قطعاتی که توسط F-CSGE باند اضافه را از خود نشان داده اند، 49 تغییر مختلف از نوع پلی مورفیسم را شناسایی نموده است در حالیکه با

روش M-CSGE شناسایی نشد (تصویر شماره 1، قسمت الف) یا به صورت مبهم بود (قسمت ب) به عنوان مثال آورده شده است که شامل یک پلی مورفیسم شناخته شده (4141 G>A) در قسمت الف، و دو تغییر مختلف شناخته شده در شکل یک (قسمت ب) شامل 4641 C > T و 4841 C > A در قطعه 4 اگزون 28 (4-28) می باشد.

استفاده از روش M-CSGE در کل 39 تغییر پلی-مورفیسم در همان قطعات PCR مورد شناسایی واقع گردید. شکل یک نمونه هایی از قطعات PCR را نشان می دهد که در آنها با استفاده از روش F-CSGE به طور مؤثرتری از روش M-CSGE باندهای اضافه غیر نرمال PCR را تشخیص می دهد. در این نمونه ها، هر باند اضافه که توسط روش F-CSGE شناسایی شد ولی توسط



تصویر شماره 1: مثالهایی از نتایج حاصل از روش های CSGE دستی و فلورسانت در ردیف های الف تا ح نشان داده شده است. تغییرات نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای مربوط به هر قطعه PCR در ستون های سمت راست تصویر دیده می شود. علامت * محل تغییر نوکلئوتیدی را بر روی دیاگرام حاصل از تعیین توالی نشان می دهد.

مواردی که نتایج در روش M-CSGE باند اضافه را نشان نداده یا غیر مشخص بوده است (ردیف الف و ب)، در روش F-CSGE یک باند اضافه در مقایسه با کنترل نرمال (ستون 3 و 4) نشان داده شده است. در ردیف‌های "ج تا و"، پنج تغییر یا جهش تعیین شده در ژن VWF در این مطالعه نشان داده شده‌اند (برای جزئیات بیشتر لطفاً به متن مراجعه گردد). ردیف‌های "ز" و "ح"، مثال‌هایی است که حساسیت F-CSGE را نشان می‌دهند دو جایگاهی تک - نوکلئوتیدی در یک PCR با طول 267 نوکلئوتید را نشان می‌دهد که تعیین توالی DNA دو تغییر مختلف نوکلئوتیدی را نشان داده است.

سبب کاهش قدرت تفکیک (Resolution) بعضی از باندهای هترو دوپلکس می‌شود (29,15). همچنین ثابت شده است که اندازه محصول PCR و ترتیب توالی DNA که یک هترو دوپلکس با Mismatch در آن واقع شده است در حساسیت ژل اهمیت دارد (31,30). در مطالعات گذشته همچنین نشان داده شد که طول مفید یا اپتیموم قطعه PCR برای حداکثر حساسیت CSGE بین 250 تا 500 جفت باز است (2).

دستگاه DNA Sequencer نوع ABI 377 قادر است 4 رنگ مختلف فلورسانس را شناسایی کند. استفاده از این تکنولوژی در F-CSGE این امکان را فراهم کرد که بتوان حداقل سه قطعه مختلف PCR را در یک چاهک (Lane) از ژل مورد بررسی قرار داد. همچنین به جای تکنیک PCR چندتایی (Multiple PCR) جهت افزایش تعداد PCR مورد بررسی در هر چاهک روش ساده دیگری استفاده شد (32,22). روش دیگری که در این مطالعه ابداع شد روش ساده‌ای بود که محصولات PCR را به 21 گروه 3 تایی تقسیم نموده و هر 3 PCR با اندازه‌های مختلف را که دارای مارک‌های فلورسانسی متفاوتی بودند در یک چاهک از ژل دوانده شد. با این روش 192 نمونه در یک زمان با یک ژل F-CSGE که حاوی 64 چاهک بود مطالعه و آنالیز شد، در حالی که با روش M-CSGE حداکثر 40 نمونه در هر بار قابل آنالیز و بررسی می‌باشد.

نرم افزارهای ژن اسکن (GeneScan) و ژنوتیپر (Genotyper) از شرکت اپلاید بیوسیستم در این روش به کار رفته است که با کمک قطعات استاندارد DNA که در هر چاهک ژل الکتروفورز به کار رفته است می‌توانند هر گونه تغییر کوچکی از حالت نرمال را مورد شناسائی قرار دهند. استفاده از قطعات استاندارد

حساسیت هر روش غربالگری در تعیین جهش با توجه به توانایی آن در تشخیص و تمایز بین جایگاهی‌های تک نوکلئوتیدی (Single-base substitution) مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در شکل یک قسمت‌های "ز" و "ح" نتایج به دست آمده از جایگاهی نوکلئوتیدی‌های مختلف در یک قطعه PCR نشان داده شده است که سبب ایجاد منحنی‌های متفاوتی با استفاده از روش F-CSGE شده است. که بیانگر میزان حساسیت این روش می‌باشد. همچنین تعداد کمی از نتایج «مثبت کاذب» توسط روش F-CSGE نیز در این مطالعه گزارش شده است (5/125، 4 درصد). در موارد فوق تعیین توالی DNA هیچ گونه تغییری را در قطعات PCR مورد بررسی که توسط F-CSGE دارای باند غیر نرمال بودند نشان نداده است.

بحث

CSGE دستی (M-CSGE) در آزمایشگاه هماتولوژی مولکولی دانشگاه شفیله از سال‌های خیلی قبل برای بررسی ژنهای مختلفی از جمله ژن فاکتور 8 (F8) (21) ژن VWF (24,23) ژن فاکتور IX (F9) (25) ژن C-Kit (KIT) (26)، ژن FLT3 (27) و ژن فاکتور XI (F11) (28) پایه گذاری شد و نتایج قابل قبولی را ارائه کرد. به عنوان مثال 85 تا 100 درصد جهش‌های ژن فاکتور هشت (F8) و ژن فاکتور نه (F9) به کمک این روش در این مطالعات شناسایی گردید

یکی از محدودیت‌های اصلی سیستم CSGE اولیه، طبیعت شکننده ژل پلی اکریل آمید 6 درصد آن بود. تغییر غلظت ژل اکریل آمید از 6 درصد به 10 درصد قدرت ژل را افزایش داد اما به هر حال افزایش غلظت

محلول ها و زمان مورد نیاز بررسی داده ها روشی گران و پر هزینه برای تعیین جهش به حساب می آید (1، 18). در روش DHPLC، حساسیت ممکن است بالا و بین 96 تا 100 درصد باشد (34) اما روش DHPLC نیازمند دماهای متفاوت برای تعیین تمامی تغییرات نوکلئوتیدی در یک قطعه DNA می باشد. اما بهر حال برای دواندن نمونه ها در F-CSGE شرایط یکسانی به کار گرفته شد. برای آنالیز ژن VWF، ضرورت داشت تا حدود 19 کیلو باز از توالی DNA در هر فرد بررسی گردد. در گذشته این مطلب ثابت شده بود که غربالگری (screening) جهش و بعد از آن استفاده از روش «DNA Sequencing» برای ژن های بزرگ روش اقتصادی تر و مؤثرتری است (1). استفاده از روش CSGE به عنوان روش غربالگری در این مطالعه، و تعیین توالی 3 تا 5 کیلو باز از PCR های انتخاب شده (10 تا 15 قطعه PCR از 56 قطعه در کل از هر فرد) بعد از آن، یک روش سریع با هزینه مناسب در مقایسه با روش مستقیم DNA Sequencing به شمار می آید. ارتقاء معنی دار تعداد نمونه ها با استفاده از روش دستگاهی (F-CSGE) نسبت به روش دستی (M-CSGE)، حاصلش افزایش ظرفیت، سرعت بالاتر و تکرار پذیری آن همراه با افزایش قدرت تفکیک برای یافتن تغییرات توالی DNA در یک ژن بزرگ همچون VWF است.

و نرم افزار مذکور امکان دقت بالا و تکرارپذیری تعیین اندازه قطعات DNA نمونه مورد مطالعه را در این روش فراهم کرده است. این مسئله به این معنی است که اگر هر باند اضافه با اندازه یکسان از یک قطعه DNA در افراد مختلف، واجد تغییر نوکلئوتیدی یکسانی باشد قابل شناسایی است و این مطلب با کمک روش F-CSGE می تواند حتی قبل از انجام DNA Sequencing پیش بینی شود که در روش دستی این امکان فراهم نیست. حساسیت هر روش غربالگری بسته به توانایی آن در تعیین و تمایز بین تغییرات نوکلئوتیدی مختلف خواهد بود. طول ژل M-CSGE، 41 سانتیمتر و طول مسیر حرکت نمونه ها معمولاً بسته به اندازه آنها 25 تا 35 سانتیمتر بعد از 17 ساعت می باشد. در روش F-CSGE همه قطعات طول کامل ژل (36 سانتیمتر) را طی می کنند و در انتهای ژل توسط دستگاه بررسی می شوند. در این روش افزایش طول حرکت، قدرت تفکیک (Resolution) ژل را افزایش می دهد. همچنین روش F-CSGE در این مطالعه توانسته است دخول و حذف های نوکلئوتیدی را علاوه بر تغییرات تک - نوکلئوتیدی همانند مطالعات گذشته شناسایی نماید (22، 32، 33). روش DNA Sequencing به عنوان یک روش استاندارد و ایده آل برای تعیین جهش شناخته می شود ولی در این روش به خاطر بالا بودن هزینه برای خرید هر ماشین تعیین توالی (DNA Sequencing)، قیمت

فهرست منابع

1. Ganguly A, Williams C. Detection of mutations in multi-exon genes: comparison of conformation sensitive gel electrophoresis and sequencing strategies with respect to cost and time for finding mutations. *Hum Mutat*, 1997; 9: 339.
2. Korkko J, Annunen S, Pihlajamaa T, Prockop D.J, Ala-Kokko L. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: comparison with denaturing gradient gel

- electrophoresis and nucleotide sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; 95: 1681.
3. Sadler J.E, Mannucci P.M, Berntorp E, Bochkov N, Boulyjenkov V, Ginsburg D, Meyer D. *et al.* Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost*, 2000; 84: 160.
 4. Castaman G, Federici A.B, Rodeghiero F, Mannucci P.M. von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. *Haematologica*, 2003; 88: 94.
 5. Miller C.H, Graham J.B, Goldin L.R, Elston R.C. Genetics of classic von Willebrand's disease. I. Phenotypic variation within families. *Blood*, 1979; 54: 117.
 6. Hoyer L.W, Rizza C.R, Tuddenham E.G, Carta C.A, Armitage H, Rotblat F. Von Willebrand factor multimer patterns in von Willebrand's disease. *Br J Haematol*, 1983; 55: 493.
 7. Nilsson, I. M.: In memory of Erik Jorpes. von Willebrand's disease from 1926-1983. *Scand J Haematol Suppl*, 1984; 40: 21.
 8. Mancuso, D. J., Tuley, E. A., Westfield, L. A., Worrall, N. K., Shelton-Inloes, B. B., Sorace, J. M., Alevy, Y. G. *et al.*: Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 1989; 264: 19514.
 9. Mancuso, D. J., Tuley, E. A., Westfield, L. A., Lester-Mancuso, T. L., Le Beau, M. M., Sorace, J. M., Sadler, J. E.: Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry*, 1991; 30: 253.
 10. Laffan, M., Brown, S. A., Collins, P. W., Cumming, A. M., Hill, F. G., Keeling, D., Peake, I. R. *et al.*: The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia*, 2004; 10:199.
 11. Meyer, D., Fressinaud, E., Sakariassen, K. S., Baumgartner, H. R., Girma, J. P.: Role of von Willebrand factor in platelet vessel-wall interactions. *Ann N Y Acad Sci*, 1987; 509: 118.
 12. Cotton, R. G., Rodrigues, N. R., Campbell, R. D.: Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988; 85: 4397.
 13. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989; 86: 2766.
 14. White, M. B., Carvalho, M., Derse, D., O'Brien, S. J., Dean, M.: Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics*, 1992; 12:301.

15. Ganguly A, Rock M.J, Prockop D.J. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993; 90: 10325.
16. Liu W.O, Oefner P.J, Qian C, Odom R.S, Francke U. Denaturing HPLC-identified novel FBN1 mutations, polymorphisms, and sequence variants in Marfan syndrome and related connective tissue disorders. *Genet Test*, 1997;1:237.
17. Markoff A, Sormbroen H, Bogdanova N, Preisler-Adams S, Ganev V, Dworniczak B, Horst J. Comparison of conformation-sensitive gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphism analysis for detection of mutations in the BRCA1 gene using optimized conformation analysis protocols. *Eur J Hum Genet*, 1998; 6: 145.
18. Eng C, Brody L.C, Wagner T.M, Devilee P, Vijg J, Szabo C, Tavtigian S.V. *et al.* Interpreting epidemiological research: blinded comparison of methods used to estimate the prevalence of inherited mutations in BRCA1. *J Med Genet*, 2001; 38: 824.
19. Zhang Z.P, Lindstedt M, Falk G, Blomback M, Egberg N, Anvret M. Nonsense mutations of the von Willebrand factor gene in patients with von Willebrand disease type III and type I. *Am J Hum Genet*, 1992; 51: 850.
20. Zhang Z.P, Blomback M, Nyman D, Anvret M. Mutations of von Willebrand factor gene in families with von Willebrand disease in the Aland Islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993; 90: 7937.
21. Williams I.J, Abuzenadah A, Winship P.R, Preston F.E, Dolan G, Wright J, Peake, I.R. *et al.* Precise carrier diagnosis in families with haemophilia A: use of conformation sensitive gel electrophoresis for mutation screening and polymorphism analysis. *Thromb Haemost*, 1998; 79: 723.
22. Ganguly T, Dhulipala R, Godmilow L, Ganguly A. High throughput fluorescence-based conformation-sensitive gel electrophoresis (F-CSGE) identifies six unique BRCA2 mutations and an overall low incidence of BRCA2 mutations in high-risk BRCA1-negative breast cancer families. *Hum Genet*, 1998; 102: 549.
23. Abuzenadeh A.M. *Characterisation of the molecular basis of Von Willebrand's disease*. Ph.D Thesis, University of Sheffield., 1998;
24. Allen S, Abuzenadah A.M, Hinks J, Blagg J.L, Gursel T, Ingerslev J, Goodeve A.C. *et al.* A novel von Willebrand disease-causing mutation (Arg273Trp) in the von Willebrand factor propeptide that results in defective multimerization and secretion. *Blood*, 2000; 96: 560.

25. Hinks J.L, Winship P.R, Makris M, Preston F.E, Peake I.R, Goodeve A.C. A rapid method for haemophilia B mutation detection using conformation sensitive gel electrophoresis. *Br J Haematol*, 1999; 104: 915.
26. Gari M, Goodeve A, Wilson G, Winship P, Langabeer S, Lynch D, Vandenberghe E. *et al.* c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 1999; 105: 894.
27. Abu-Duhier F.M, Goodeve A.C, Wilson G.A, Care R.S, Peake I.R, Reilly J.T. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 2001;113:983.
28. Van Veen J,Pereira M,Goodeve A,Bowyer A, Kitchen S, Makris M. Gene defects in patients with factor XI deficiency. *British Journal of Haematology*, 2004; 125.
29. Ganguly, A.: An update on conformation sensitive gel electrophoresis. *Hum Mutat*, 2002; 19: 334.
30. Cotton, R. G.: Detection of single base changes in nucleic acids. *Biochem J*, 1989; 263: 1.
31. Ganguly A,Prockop D.J. Detection of mismatched bases in double stranded DNA by gel electrophoresis.*Electrophoresis*, 1995; 16: 1830.
32. Spitzer E, Abbaszadegan M.R, Schmidt F, Hauser A, Buwitt U, Lauter F.R, Potschick K. *et al.* Detection of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families by a comprehensive two-stage screening procedure. *Int J Cancer*, 2000; 85: 474
33. Blesa J.R, Hernandez-Yago J. Adaptation of conformation-sensitive gel electrophoresis to an ALFexpress DNA sequencer to screen BRCA1 mutations. *Biotechniques*, 2000; 28: 1019.
34. Xiao, W., Oefner, P. J.: Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat*, 2001; 17: 439.