

## راه اندازی روش Real-time PCR بر پایه SYBR green جهت تعیین الل‌های HLA-DQ در بیماران مبتلا به سیلیاک

کازم مشایخی<sup>۱</sup> (M.Sc)، محمد رستمی نژاد<sup>۱</sup> (Ph.D)، پدرام عظیم‌زاده<sup>۱</sup> (Ph.D)، داور امانی<sup>۲</sup> (Ph.D)، شب‌نم کاظمیان<sup>۱</sup> (M.Sc)، شقایق درخشانی<sup>۱</sup> (M.Sc)، هادی حسن‌زاده<sup>۴</sup> (Ph.D)، محمدرضا زالی<sup>۱</sup> (M.D)

۱- مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران  
۲- گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران  
۳- مرکز تحقیقات پروتئو میکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران  
۴- مرکز تحقیقات سرطان و دیارتمان فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

### چکیده

سابقه و هدف: از عوامل ژنتیکی مهم در ابتلا به بیماری سیلیاک، حضور الل‌های HLA-DQ2 و HLA-DQ8 در افراد مبتلا می‌باشد. روش‌های مولکولی زیادی جهت تعیین این الل‌ها در دسترس می‌باشد اما این روش‌ها علاوه بر هزینه بالا، دارای مراحل متعددی هستند که استفاده از آن‌ها را دشوار کرده است، لذا هدف از این مطالعه، راه‌اندازی تکنیک ساده و سریع جهت تعیین الل‌های HLA-DQ در بیماران مبتلا به سیلیاک با روش SYBR Green Real-Time PCR بود.

مواد و روش‌ها: به منظور تعیین نوع HLA-DQ و ارزیابی کارایی روش SYBR Green Real-Time PCR، DNA آن دسته از بیماران سیلیاکی که بیماری آن‌ها با استفاده از روش‌های سرولوژی و پاتولوژی تایید شده بود، استخراج شد. در مرحله بعد، از پرایمرهای اختصاصی جهت بررسی الل‌های HLA-DQA1\*05، HLA-DQB1\*02، HLA-DQB1\*0302 استفاده شد و نتایج به دست آمده با کیت‌های تجاری در دسترس مقایسه گردید. یافته‌ها: با استفاده از این روش حضور الل‌های HLA-DQ2 و HLA-DQ8 با حساسیت و اختصاصی ۱۰۰ درصد تعیین شد و نتایج حاصل از این روش در مقایسه با کیت‌های تجاری در دسترس با قدرت تفکیک پایین، کارایی بالاتری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: روش SYBR Green-Real Time PCR به همراه آنالیز منحنی ذوب آن، جهت شناسایی الل‌های HLA-DQ2 و HLA-DQ8 کارایی مناسبی داشته و نسبت به روش‌های معمول HLA تایپینگ در ایران، سریع‌تر و آسان‌تر بوده و برای تشخیص این الل‌ها، درجه حساسیت و اختصاصی بالایی دارد.

واژه‌های کلیدی: بیماری سیلیاک، روش Real-Time PCR، HLA تایپینگ

### مقدمه

بیماری، وجود التهاب‌های مزمن در سطح مخاط روده کوچک است که می‌تواند منجر به هایپرپلازی کریپت‌ها، آتروفی ویلی‌ها، افزایش تیترا آنتی‌بادی‌های علیه ترانس گلوتامیناز شود. از علائم شایع این بیماری می‌توان اسهال مزمن، نفخ،

بیماری سیلیاک، بیماری خودایمن دستگاه گوارش است که در اثر حساسیت به گلوتن، پروتئین موجود در گندم، جو، چاودار و سایر غلات ایجاد می‌شود [۱]. از ویژگی‌های این

، Sequence-Specific Primer [SSP]، Typing [SBT]، Single-Strand Conformation Polymorphism [SSCP]. برای غربالگری الل‌های HLA-DQ در بیماران مبتلا به سیلیاک استفاده می‌شود که این روش‌ها علاوه بر هزینه بالا و داشتن مراحل متعدد، شانس خطا در آزمون را افزایش می‌دهد.

با توجه به این‌که تعیین HLA-DQ در تشخیص بیماری سیلیاک بسیار کمک‌کننده است و از طرفی هزینه بالای روش‌های رایج در کشور مانع غربالگری افراد مشکوک می‌شود، در این مطالعه، ما به منظور تعیین الل‌های وابسته به بیماری سیلیاک، روشی ساده، ارزان و سریع بر پایه Real-Time PCR Using SYBR® Green و آنالیز منحنی ذوب آن را راه‌اندازی کرده و حساسیت و اختصاصیت آن را با استفاده از کیت‌های تجاری در دسترس، مقایسه کردیم.

### مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه. بیماران از افرادی که به گروه تحقیقات بیماری سیلیاک واقع در مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. بیماری توسط پزشک متخصص تایید گردید و پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی، مقدار ۱۰ cc نمونه خون گرفته شده و در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد جمع‌آوری شد. جهت استخراج DNA از نمونه‌ها، از روش متداول حذف نمک [Salting Out] استفاده شد و DNA استخراج شده تا زمان انجام آزمایش در فریزر منهای ۷۰ نگه‌داری شدند.

مرحله واکنش زنجیره پلی‌مرز. جهت تکثیر قطعات DNA مرتبط با الل‌های مورد مطالعه، ۳ زوج پرایمر طراحی شد. قبل از انجام Real-time PCR، جهت تایید کارایی پرایمرهای طراحی شده و محاسبه دمای مناسب، گرادیان دمایی با روش PCR معمولی انجام شد که مقادیر استفاده شده مواد مصرفی در واکنش زنجیره پلی‌مرز در جدول ۱ نشان داده شده است.

سوء جذب، کاهش وزن، کم‌خونی، یوکی استخوان را نام برد [۱،۲]. شیوع بیماری سیلیاک در اروپا و آمریکا به طور متوسط ۱-۰/۵ درصد گزارش شده است [۳-۵]. در ایران نیز مطالعات زیادی بر روی این بیماری انجام شده است و محققین نشان داده‌اند که شیوع این بیماری در کشور حدود یک درصد است [۶].

بر اساس مطالعات انجام شده، الل HLA-DQB1\*02 که HLA-DQ2 را کد می‌کند و HLA-DQB1\*0302 که کد کننده HLA-DQ8 می‌باشد، بیش‌ترین ارتباط را با بیماری سیلیاک دارند و سبب افزایش ریسک ابتلا به این بیماری می‌شوند به طوری که مطالعات نشان می‌دهند بین ۹۰ تا ۹۵ درصد بیماران مبتلا، حامل HLA-DQ2، ۵ درصد حامل HLA-DQ8 و مابقی بیماران نیز حامل یا فاقد هر دو نوع HLA هستند [۱]. هم‌چنین بر اساس این مطالعات حدود ۶۰-۳۰ درصد جمعیت عمومی نیز حامل این نوع از هاپلوتایپ‌های HLA هستند [۷]. در ایران مطالعه‌ای که توسط رستمی‌نژاد و همکاران، به منظور تعیین HLA در بیماران مبتلا به سیلیاک انجام شد، مانند سایر مطالعات، حضور HLA-DQ2 و HLA-DQ8 در این بیماران تایید گردید و فراوانی HLA-DQ2 و HLA-DQ8 در بیماران، به ترتیب، ۸۳ و ۱۷ درصد گزارش شد. از طرفی نشان داده شد که حدود ۵۷ درصد افراد نرمال نیز حامل این الل‌ها هستند [۸]. هم‌چنین آن دسته از بیمارانی که DQ2 را حمل می‌کنند، در صورت داشتن الل HLA-DQA1\*05 که کدکننده زیرگروه DQ2.5 است، در گروه با خطر بالا قرار می‌گیرند و علائم شدیدتری از بیماری را نشان می‌دهند [۸]. صرف نظر از این‌که این الل‌ها در افزایش شانس ابتلا و پیشرفت بیماری سیلیاک نقش دارند، غربالگری ژنتیکی این الل‌ها در بیماران مشکوک به این بیماری، ارزش زیادی دارد، به طوری که فقدان هر یک از این الل‌های اختصاصی، تا حدود زیادی احتمال ابتلا به بیماری سیلیاک را در بیماران مشکوک رد خواهد کرد [۹]. امروزه روش‌های مولکولی زیادی مانند Sequence-Specific

Sequence-Based, Oligonucleotide Probe [SSOP]

توسط فلورسنت حاصل از رنگ SYBR® Green مشخص می‌گردد، زیرا این رنگ در تمام قطعات DNA دو رشته‌ای حاصل از تکثیر PCR وارد می‌شود. آنالیز منحنی ذوب با حرارت‌دهی تدریجی به محصول PCR در انتهای واکنش آغاز می‌گردد. با ذوب شدن محصول PCR و آزاد شدن رنگ SYBR® Green در محلول، شدت فلورسنت حاصل از رنگ کاهش می‌یابد. در طی این فاصله زمانی، دستگاه به صورت مداوم کاهش فلورسنت را پایش کرده و با ترسیم یک منحنی مشتق اول منفی با استفاده از منحنی شدت فلورسنت در برابر دما، که توسط نرم‌افزار دستگاه رسم می‌شود، تغییرات فلورسنت را به صورت قله‌هایی [پیک‌هایی] نمایش می‌دهد که هر پیک نشان‌دهنده دمای ذوب [Tm] یک قطعه DNA از محصول PCR است که در این دما ۵۰ درصد DNA، دو رشته‌ای و ۵۰ درصد تک رشته‌ای است.

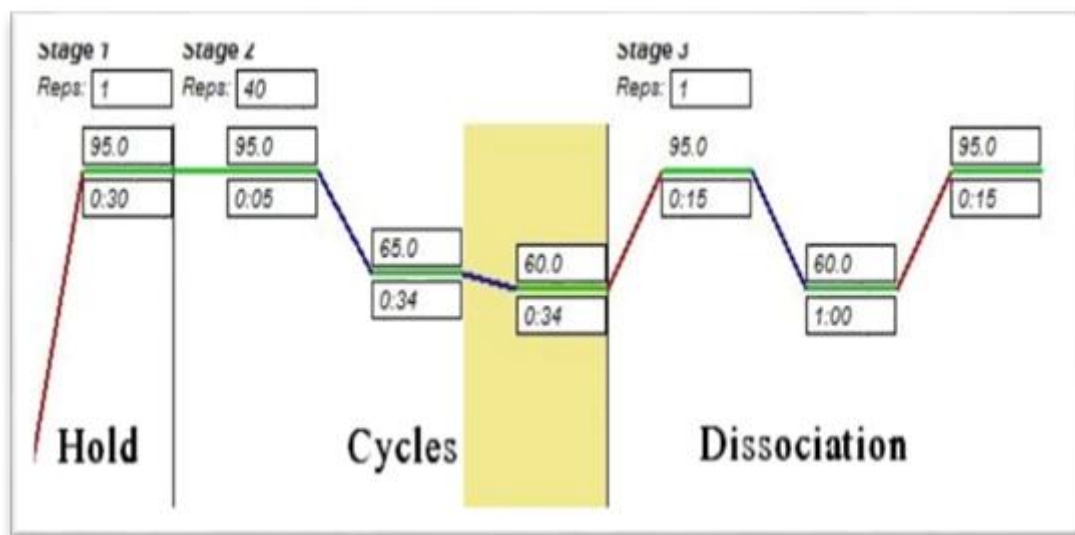
جهت تعیین حساسیت و اختصاصیت روش جدید، با استفاده از کیت‌های تجاری در دسترس [Olerup SSP® HLA Typing kit and Morgan™ HLA SSP ABCDRDQ Typing Kit]، نوع HLA-DQ نمونه‌ها دوباره مشخص گردید.

تعیین ال‌های HLA-DQ. در این مطالعه جهت تعیین ال HLA-DQB1\*02 و HLA-DQB1\*0302 که به ترتیب کدکننده DQ2 و DQ8 هستند، از پرایمرهای اختصاصی هر ژنوتایپ استفاده شد. جهت کنترل داخلی و تایید انجام واکنش نیز از پرایمر اختصاصی ژن بتادو میکروگلوبولین [β2MG] استفاده گردید. هم‌چنین جهت تعیین گروه خطر در بین بیماران DQ2 مثبت، از ال HLA-DQA1\*05 استفاده شد که کدکننده زیرگروه HLA-DQ2.5 می‌باشد.

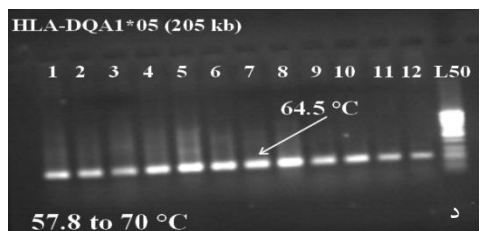
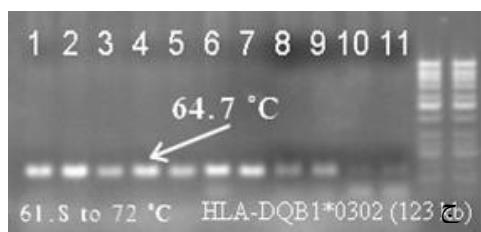
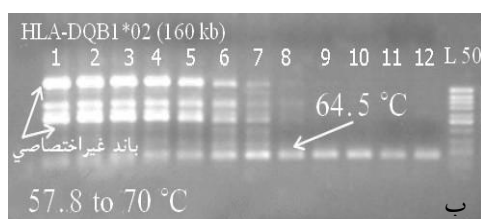
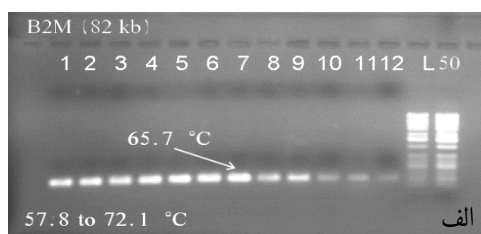
برای تعیین نوع HLA-DQ، سه واکنش PCR جداگانه برای هر نمونه انجام گرفت به طوری که در واکنش اول ال مرتبط با DQ2، در واکنش دوم ال مرتبط با DQ8 و در واکنش سوم نیز زیرگروه DQ2.5 در میان افراد DQ2 مثبت، جهت تهیه میکس واکنش نیز از مقادیر ذکر شده در جدول ۱ استفاده و در پایان میکس تهیه شده به پلیت ۹۶ تایی دستگاه Real-Time PCR مدل ABI7500 [ساخت کشور آمریکا] اضافه شد. سپس ۱ ماکرولیتر از DNA هر فرد به چاهک‌ها اضافه گردید و بر اساس شکل ۱، چرخه واکنش برای دستگاه تعریف شد. در روش آنالیز منحنی ذوب Real-Time PCR، میزان تکثیر قطعه اختصاصی از DNA،

جدول ۱. میزان مواد مصرفی برای هر واکنش در PCR معمولی و Real-time PCR

مواد مصرفی در واکنش Real-time PCR		مواد مصرفی در واکنش PCR معمولی	
مواد مصرفی [غلظت]	مقدار مورد استفاده [μl]	مواد مصرفی [غلظت]	مقدار مورد استفاده [μl]
SYBR® Green Master Mix	10	PCR buffers	2.5
Forward Primer DQB1 [100 pmol/μl]	1	Forward Primer [100 pmol/μl]	1
Reverse Primer DQB1 [100 pmol/μl]	1	Reverse Primer [100 pmol/μl]	1
Forward Primer B2M [100 pmol/μl]	1	Mgcl <sub>2</sub>	0.5
Reverse Primer B2M [100 pmol/μl]	1	dNTP	0.5
Deionised Water	5	Taq Polymerase	0.3
Sample DNA [100 ng/μl]	1	Deionised Water	18/2
		Sample DNA [100 ng/μl]	1
Total	20	Total	25



شکل ۱. شرایط سیکل: این شرایط بصورت سه مرحله ایی برای دستگاه Real-time مدل ABI 7500 تعریف شده است.

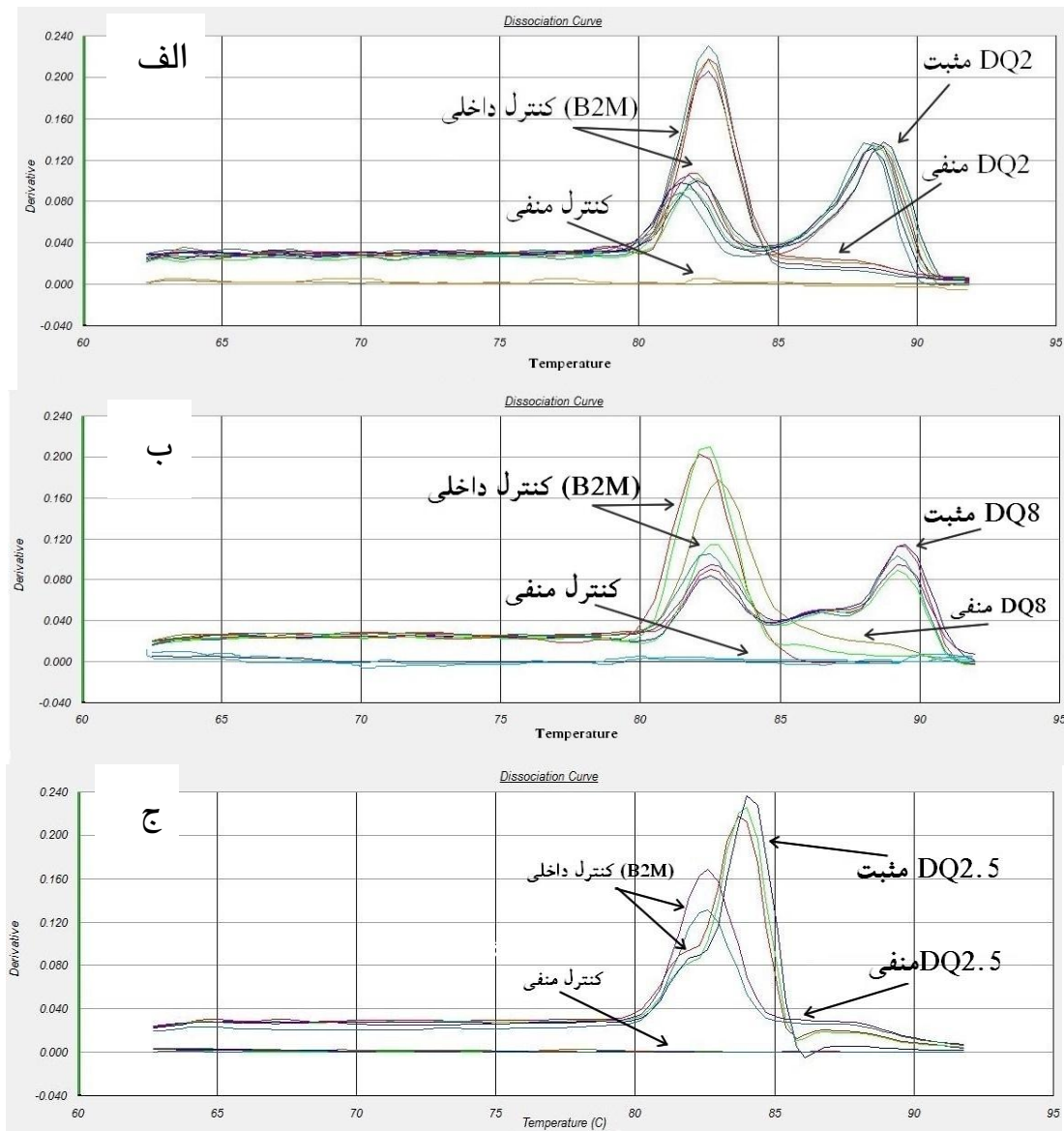


شکل ۲. نتایج حاصل از گرادیان دمایی برای هر پرایمر: گستره دمایی هر واکنش و طول قطعه اختصاصی هر پرایمر نشان داده شده است و تمام پرایمرها در دمایی ۶۵ درجه سانتی گراد تکثیر داشتند. الف: B2M ژن بتادومیکروگلوبولین. ب: HLA-DQB1\*02 این پرایمر در دماهای پایین تکثیر غیراختصاصی داشته اما با افزایش دما، این باندها حذف شدند. ج: HLA-DQB1\*0302 کد کننده DQ8. د: HLA-DQA1\*05 کد کننده زنجیره α در زیرگروه DQ2.5.

## نتایج

نتایج حاصل از گرادیان دمایی پرایمرها نشان داد که تمام آن‌ها در دمایی ۶۵ درجه سانتی گراد تکثیر دارند که این نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است. در این روش، پرایمرهای HLA-DQA1\*05، HLA-DQB1\*02 و HLA-DQB1\*0302 دارای منحنی ذوب اختصاصی بوده و به منظور تایید انجام واکنش، از پرایمر بتادومیکروگلوبولین استفاده شد که منحنی ذوب آن از این پرایمرها قابل تفکیک بوده و واکنش به صورت مولتی پلکس انجام شد. آن دسته از نمونه‌هایی که دارای پیک ذوب برای ال HLA-DQB1\*02 بود، DQ2 مثبت، آن‌هایی که پیک ال HLA-DQB1\*0302 را نشان دادند، DQ8 مثبت و گروهی که پیک ال HLA-DQA1\*05 را نشان دادند، DQ2.5 در نظر گرفته شد. که نتایج در شکل ۳ نشان داده شده‌اند.

پس از تایید ال‌های HLA-DQ با استفاده از تکنیک معرفی شده، ۲۰ نمونه با استفاده از کیت‌های تجاری در دسترس [Olerup SSP® HLA typing kit and Morgan™ HLA SSP ABCDRDQ Typing Kit] نیز تعیین ژنوتایپ شدند. نتایج به دست آمده نشان داد، اطلاعات حاصل از روش حاضر با کیت‌های تجاری ۱۰۰ درصد همخوانی دارد.



شکل ۳. منحنی ذوب اختصاصی هر آلل: برای تعیین هر آلل، دو واکنش جداگانه اما با شرایط یکسان و بصورت همزمان انجام شد. الف: نمونه های DQ2 مثبت، دارای دو پیک مربوط به محصول HLA-DQB1\*02 و B2M هستند اما نمونه های DQ2 منفی تنها پیک مربوط به کنترل داخلی را دارند. ب: چنین وضعیتی برای نمونه های DQ8 مثبت که آلل HLA-DQB1\*0302 را دارند، مشاهده می شود. ج: از میان نمونه های DQ2 مثبت، آنهایی که پیک مربوط به محصول HLA-DQA1\*05 را داشتند، در زیرگروه DQ2.5 قرار گرفتند. همانطور که در شکل دیده می شود، متوسط دمای ذوب B2M حدود ۸۱/۸ درجه سانتی گراد می باشد و این مقدار برای محصولات HLA-DQB1\*02، HLA-DQB1\*0302، به ترتیب ۸۴/۵، ۸۸/۱ و ۸۹/۲ درجه سانتی گراد می باشد.

## بحث و نتیجه گیری

امروزه بیماری سیلیاک از بیماری های نسبتاً شایع در جامعه است [۱۱،۱۰]. به علت گستردگی علائم بالینی، تشخیص بیماری سیلیاک می تواند تحت تاثیر قرار گیرد، به طوری که بیماری با تاخیر تشخیص داده شده و یا گاهی تشخیص داده نمی شود [۱۲-۱۴] و این مسئله می تواند تأثیرات منفی بر زندگی بیمار بگذارد [۱۵،۱۶]. در این بیماران

تماس طولانی مدت با گلوتن، سرانجام می تواند منجر به عوارض شدیدی چون سرطان شود [۱۷].

اگرچه آزمون های سرولوژیک خصوصاً IgA Anti Transglutaminase Antibody [anti-tTGA] و IgA Anti Endomyosum Antibody [anti-EMA]، اغلب به خاطر حساسیت بالای آنها برای تشخیص بیماری استفاده می شوند [۱۸]، ولی تفسیر این آزمایش ها در بیمارانی که دچار نقص

بیش تر مطالعات HLA تایپینگ را جهت تشخیص بهتر بیماری سیلیاک به خصوص در موارد مشکوک پیشنهاد می‌کنند. برای این منظور از تکنیک‌های مولکولی مختلفی استفاده می‌شود که از این میان می‌توان به تکنیک‌های SBT، Reference Strand-mediated Conformation Analysis [RSCA]، SSP، SSOP، TaqMan SNP اشاره کرد. این روش‌ها، ابزارهای قوی برای تعیین آل‌های HLA هستند و دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی می‌باشند، اما دارای محدودیت‌هایی مانند، گران بودن روش مانند RSCA و TaqMan SNP، پرهزمت بودن روش مانند SSOP و SSP و نامناسب بودن برای کارهایی با مقیاس بزرگ مانند SSP و SBT هستند [۳۱-۳۳].

راه دیگر تعیین آل‌های HLA استفاده از کیت‌های تجاری مانند Delfia HLA hybridization, Olerup SSP DQ Typing kit, assay Dynal RELI SSO HLA Typing kit, MorganTM HLA SSPABCDRDQ Typing Kit می‌باشد. این کیت‌ها نیز علاوه بر کارایی بالا، حساسیت و اختصاصیت بالایی دارند ولی علاوه بر گران بودن، دارای چندین مرحله واکنشی برای تشخیص هستند که این امر کار با این کیت‌ها را تا حدودی دشوار کرده است [۳۴]. از طرفی این روش‌ها به آزمایشگاهی مجهز نیازمند بوده و به مراحل post-PCR نیز وابسته‌اند.

در این مطالعه به منظور ساده کردن تعیین نوع HLA-DQ2/8 از روش SYBR Green Real-Time PCR استفاده شد که نسبت به روش‌های متداول معرفی شده، روشی ساده، سریع، مقرون به صرفه و دارای حساسیت و اختصاصیت بالا با استفاده از ۳ جفت پرایمر می‌باشد [۳۵]. از آنجایی که مطالعات نشان داده‌اند که حضور آل DQ2.5 در بیماران مبتلا به سیلیاک نشان‌دهنده افزایش خطر ابتلا به بیماری سیلیاک است [۳۶]، ما در مقایسه با کیت‌های تجاری در دسترس که تنها حضور DQ2/8 را در ایران تعیین می‌کنند، در این روش، با بررسی آل اختصاصی زنجیره  $\alpha$  در DQ2 افراد حامل DQ2.5 را نیز

انتخابی IgA هستند، ممکن است با مشکل روبه رو شود [۱۹]. در این میان، افرادی نیز هستند که از نظر anti-tTG مثبت ولی در سطوح مخاط گوارشی خود دارای پاتولوژی نرمال هستند. این گروه افرادی هستند که مستعد بیماری سیلیاک می‌باشند و در آینده ممکن است عوارض خود را نشان دهند [۲۰، ۲۱]. به همین دلیل یکی از راه‌های غربالگری این افراد جهت پیش‌بینی بیماری و شروع رژیم غذایی بدون گلوتن، استفاده از آزمون‌های سرولوژیک و HLA-DQ تایپینگ به صورت هم‌زمان است که در صورت منفی بودن HLA-DQ تایپینگ، شک ابتلا به آن‌ها به بیماری را می‌توان رد کرد [۲۲-۲۴].

هم‌چنین مطالعات نشان داده‌اند که نوع HLA می‌تواند بر روی پیشرفت بیماری، علائم بالینی و حتی سطح آنتی‌بادی‌ها نیز تاثیرگذار باشد، به‌طور مثال، افرادی که از نظر DQ2 هموزیگوت هستند، علائم بالینی شدیدتری مانند اسهال و کم‌خونی دارند. در مطالعه F.Biagi و همکاران نشان داده شد، فراوانی آل DQB1\*0302 در افراد مستعد سیلیاک، نسبت به گروه کنترل بیشتر است [۲۵-۲۸]. حتی نشان داده شده که هم‌خوانی تست‌های سرولوژی و HLA-DQ typing در تشخیص بیماری به اندازه‌ای کارایی دارد که می‌تواند از پرداخت هزینه‌های اضافی توسط بیمار که صرف انجام اندوسکوپی و نمونه‌برداری از روده می‌شود، جلوگیری کند، ولی هم‌چنان تشخیص قطعی بیماری با انجام اندوسکوپی و اخذ بیوپسی جهت بررسی پاتولوژی روده کوچک، می‌باشد [۲۹].

از طرفی به دلیل وراثتی بودن بیماری، درخواست تعیین HLA-DQ از سوی پزشک جهت مشخص کردن خطر ابتلا به سیلیاک در اعضاء خانواده بیمار که علائمی ندارند، بسیار با ارزش است [۳۰]. بر اساس معیارهای انجمن کودکان گوارش، کبد و تغذیه بریتانیا [BSPGHAN] تعیین حضور یا عدم حضور HLA DQ-2/8 در افراد بدون علامت، می‌تواند شک به بیماری سیلیاک را بدون نیاز به بیوپسی روده، رد یا تایید کند [۹].

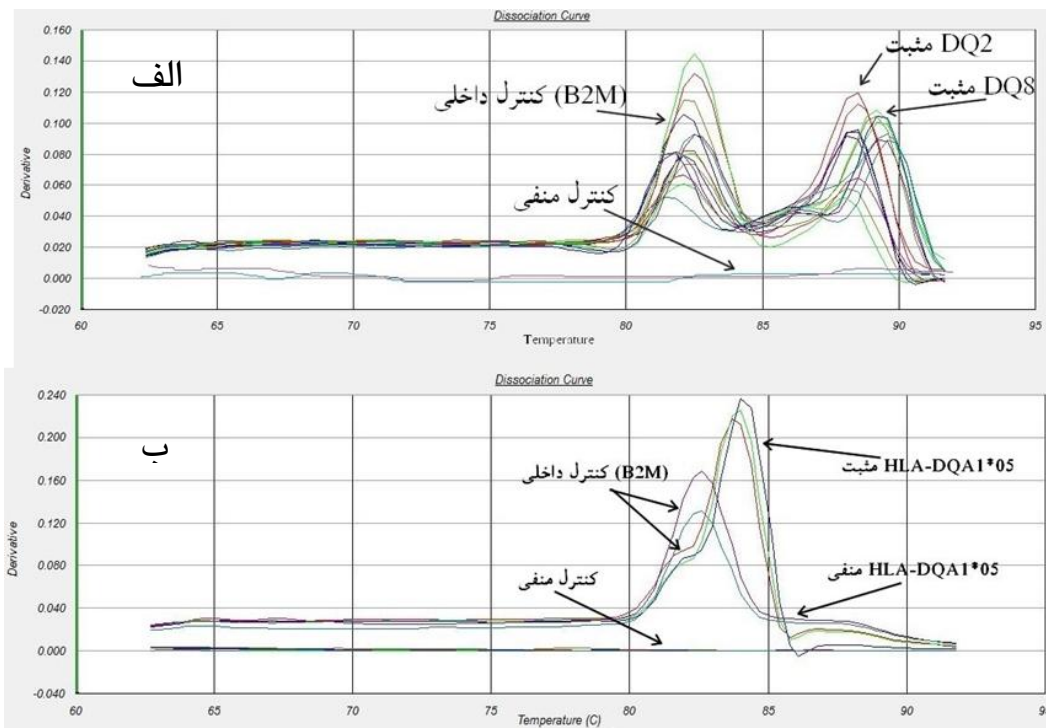
مثبت به عنوان کنترل مثبت استفاده شد که نتایج در شکل ۴ نشان داده شده است. از سوی دیگر، منحنی ذوب ال HLA-DQA1\*05 نیز تا حدود زیادی با منحنی ذوب کنترل داخلی تداخل داشته اما همان طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، با آنالیز منحنی ذوب، این تداخل قابل تشخیص است. اما مهم ترین نقطه ضعف این روش، عدم توانایی تعیین دیگر ساب ال های HLA-DQ در نتیجه عدم توانایی پیش بینی میزان خطر ابتلا به بیماری با توجه به پرایمرهای طراحی شده است [۳۷]. همچنین برای انجام این تکنیک، به تجهیزات قابل توجه از جمله دستگاه Real-Time PCR نیاز است که در کلیه آزمایشگاه ها و مراکز تحقیقاتی موجود نمی باشد.

با توجه به مطالب فوق، از آنجایی که تکنیک راه اندازی شده در مقایسه با دیگر روش ها از کارایی بالایی برخوردار است و هزینه کمتری به بیمار وارد می کند، لذا استفاده از آن در پروژه های غربالگری بزرگ و افراد در معرض خطر مانند خویشاوندان درجه اول بیمار، پیشنهاد می شود.

تعیین کردیم. برخی محققین حاملین این زیرگروه را جزء گروه با خطر بالا می دانند [۸].

از نقطه نظر عملی نیز می توان میکس واکنش را از قبل تهیه کرده و در فریزر نگهداری کرد و در موقع نیاز، تنها DNA نمونه به آن اضافه شود که این عمل باعث افزایش سهولت و راحتی کار می شود. همچنین در این روش با حذف مراحل post-PCR مانند ژل الکتروفورز، شانس آلودگی نمونه ها کاهش یافته و تماس با رنگ های سرطانزا نیز حذف شده است. در چنین شرایطی، این روش به تشخیص سریع تر و راحت تر بیماری سیلیاک در مراکزی که به طور مکرر با این گروه از بیماران سروکار دارند و روزانه با حجم نمونه زیادی مواجه هستند، کمک می کند.

همچنین نتایج ما نشان داد که پرایمر مربوط به ال HLA-DQB1\*0302، در نمونه هایی که DQ2 مثبت هستند، توانایی تکثیر قطعه ای غیر اختصاصی را دارد که این قطعه با آنالیز منحنی ذوب، از قطعه اختصاصی DQ8 قابل افتراق است و برای این منظور در هر واکنش، از نمونه DQ2 مثبت و DQ8



شکل ۴: آنالیز منحنی ذوب: الف] آن دسته از نمونه هایی که DQ2 مثبت بودند، توسط پرایمر DQB1\*0302 محصولی غیر اختصاصی را تکثیر می دادند که از نظر طول قطعه بهم نزدیک بوده بطوریکه این محصولات روی ژل الکتروفورز قابل تفکیک نمی باشند اما با توجه به متوسط دمای ذوب هر محصول، این قطعات از طریق آنالیز منحنی ذوب قابل تفکیک هستند و به منظور تسهیل در تشخیص این دو محصول از یکدیگر، در هر واکنش از نمونه های DQ2 مثبت و DQ8 مثبت برای این پرایمر استفاده شد. ب] تداخل منحنی ذوب محصول پرایمر HLA-DQA1\*05 با محصول کنترل داخلی که با آنالیز منحنی ذوب هر محصول، قابل افتراق از یکدیگر هستند.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کلیه پرسنل آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و هم‌چنین بیمارانی که در این پروژه با گروه تحقیق همکاری کردند، نهایت سپاس‌گزاری و تشکر را دارند. این مقاله حاصل از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ایمونولوژی آقای کاظم مشایخی می‌باشد.

## منابع

- [14] Bingley PJ, Williams AJ, Norcross AJ, Unsworth DJ, Lock RJ, Ness AR, et al. Undiagnosed coeliac disease at age seven: population based prospective birth cohort study. *BMJ* 2004; 328: 322-323.
- [15] Roma E, Panayiotou J, Karantana H, Constantinidou C, Siakavellas SI, Krini M, et al. Changing pattern in the clinical presentation of pediatric celiac disease: a 30-year study. *Digestion* 2009; 80: 185-191.
- [16] Norstrom F, Lindholm L, Sandstrom O, Nordyke K, Ivarsson A. Delay to celiac disease diagnosis and its implications for health-related quality of life. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 118.
- [17] Green PH, Fleischauer AT, Bhagat G, Goyal R, Jabri B, Neugut AI. Risk of malignancy in patients with celiac disease. *Am J Med* 2003; 115: 191-195.
- [18] Rostom A, Dube C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garrity C, et al. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology* 2005; 128: S38-46.
- [19] Collin P, Maki M, Keyrilainen O, Hallstrom O, Reunala T, Pasternack A. Selective IgA deficiency and coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 367-371.
- [20] Koskinen O, Collin P, Korponay-Szabo I, Salmi T, Iltanen S, Haimila K, et al. Gluten-dependent small bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in overt and mild enteropathy coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 47: 436-442.
- [21] Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* 2013; 62: 43-52.
- [22] Clouzeau-Girard H, Rebouissoux L, Taupin JL, Le Bail B, Kalach N, Michaud L, et al. HLA-DQ genotyping combined with serological markers for the diagnosis of celiac disease: is intestinal biopsy still mandatory? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 52: 729-733.
- [23] Collin P. New diagnostic findings in coeliac disease. *Ann Med* 1999; 31: 399-405.
- [24] Csizmadia CG, Mearin ML, Oren A, Kromhout A, Crusius JB, von Blomberg BM, et al. Accuracy and cost-effectiveness of a new strategy to screen for celiac disease in children with Down syndrome. *J Pediatr* 2000; 137: 756-761.
- [25] Biagi F, Bianchi PI, Vattiato C, Marchese A, Trotta L, Badulli C, et al. Influence of HLA-DQ2 and DQ8 on severity in celiac Disease. *J Clin Gastroenterol* 2012; 46: 46-50.
- [26] Jores RD, Frau F, Cucca F, Grazia Clemente M, Orru S, Rais M, et al. HLA-DQB1\*0201 homozygosity predisposes to severe intestinal damage in celiac disease. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 48-53.
- [27] Karinen H, Karkkainen P, Pihlajamaki J, Janatuinen E, Heikkinen M, Julkunen R, et al. Gene dose effect of the DQB1\*0201 allele contributes to severity of coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 191-199.
- [28] Ploski R, Ek J, Thorsby E, Sollid LM. On the HLA-DQ [alpha 1\*0501, beta 1\*0201] -associated susceptibility in celiac disease: a possible gene dosage effect of DQB1\*0201. *Tissue Antigens* 1993; 41: 173-177.
- [29] Kaukinen K, Partanen J, Maki M, Collin P. HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 695-699.
- [30] Ellis A. Celiac disease: previous family studies, in the genetics of coeliac disease. 1981, Springer. p. 197-200.
- [31] Arguello JR, Little AM, Pay AL, Gallardo D, Rojas I, Marsh SG, et al. Mutation detection and typing of polymorphic loci through double-strand conformation analysis. *Nat Genet* 1998; 18: 192-194.
- [1] Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 647-655.
- [2] Fasano A, Shea-Donohue T. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 416-422.
- [3] Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, et al. Prevalence of Celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med* 2003; 348: 2517-2524.
- [4] Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, et al. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med* 2003; 163: 286-292.
- [5] Dube C, Rostom A, Sy R, Cranney A, Saloojee N, Garrity C, et al. The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology* 2005; 128: S57-67.
- [6] Rostami Nejad M, Rostami K, Emami M, Zali M, Malekzadeh R. Epidemiology of celiac disease in Iran: a review. *Middle East J Dig Dis* 2011; 3: 5-12.
- [7] Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med* 1989; 169: 345-350.
- [8] Rostami-Nejad M, Romanos J, Rostami K, Ganji A, Ehsani-Ardakani MJ, Bakhshipour AR, et al. Allele and haplotype frequencies for HLA-DQ in Iranian celiac disease patients. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 6302-6308.
- [9] Murch S, Joint BSPGHAN and Coeliac UK guidelines for the diagnosis and management of coeliac disease in children. *Arch Dis Child* 2013; 98: 806-811.
- [10] White LE, Bannerman E, McGrogan P, Kastner-Cole D, Carnegie E, Gillett PM Childhood coeliac disease diagnoses in Scotland 2009-2010: the SPSU project. *Arch Dis Child* 2013; 98: 52-56.
- [11] Ivarsson A, Persson LA, Nystrom L, Ascher H, Cavell B, Danielsson L, et al. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatr* 2000; 89: 165-171.
- [12] Myleus A, Ivarsson A, Webb C, Danielsson L, Hernell O, Hogberg L, et al. Celiac disease revealed in 3% of Swedish 12-year-olds born during an epidemic. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49: 170-176.
- [13] Katz KD, Rashtak S, Lahr BD, Melton LJ, 3rd, Krause PK, Maggi K, et al. Screening for celiac disease in a North American population: sequential serology and gastrointestinal symptoms. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 1333-1339.



[34] Lavant EH, Carlson JA. A new automated human leukocyte antigen genotyping strategy to identify DR-DQ risk alleles for celiac disease and type 1 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 1489-1495.

[35] Profaizer T, Eckels D, Delgado JC. Celiac disease and HLA typing using real-time PCR with melting curve analysis. *Tissue Antigens* 2011; 78: 31-37.

[36] Zamani M, Modares-sadegi M, Shirvani F, Zamani H, Emami M. The involvement of the HLA-DQB1 alleles in the risk and the severity of Iranian coeliac disease patients. *Int J Immunogenet* 2014; 41: 312-317.

[32] Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers [PCR-SSP]. *Tissue Antigens* 1995; 46: 355-367.

[33] Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986; 324: 163-166.

## Setup of SYBR green real-time PCR method to detect the HLA-DQ alleles in patients with celiac disease

Kazem Mashayekhi (M.Sc)<sup>1,2</sup>, Mohammad Rostami-Nejad (Ph.D)<sup>1</sup>, Pedram Azimzadeh (Ph.D)<sup>1</sup>, Davar Amani (Ph.D)<sup>\*2</sup>, Shabnam Kazemian (M.Sc)<sup>1</sup>, Shaghayegh Derakhshani (M.Sc)<sup>3,1</sup>, Hadi Hasanzadeh (Ph.D)<sup>4</sup>, Mohammad Reza Zali (M.D)<sup>1</sup>

1 - Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 - Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 - Proteomics Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 - Cancer Research Center and Department of Medical Physics, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(Received: 28 Jan 2015; Accepted: 16 Mar 2015)

**Introduction:** HLA-DQ2 and HLA-DQ8 alleles are important genetic factors in development of celiac disease. There are many molecular techniques available to determine these alleles, but they are very complicated to perform and also cost highly. Therefore, the aim of this study was to set up a simple and quick real-time PCR based SYBR® Green method to determine HLA-DQ alleles in patients with celiac disease.

**Materials and Methods:** To determine HLA-DQ alleles and evaluate Real-time PCR using SYBR® Green method for our aim, first, DNA extraction was performed for patients with celiac disease, whose diagnosis was confirmed by using serology and pathology tests. Later, the specific primers for detecting HLA-DQA1\*05, HLA-DQB1\*02 and HLA-DQB1\*0302 alleles were used. Finally the results were compared with commercially available kits.

**Results:** Presence of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 alleles were determined by using this method with 100% sensitivity and specificity. Also, in comparison with low resolution commercially available kits, the results of this method were more efficient.

**Conclusion:** Real-time PCR using SYBR® Green method with melting curve analysis is a well efficient method to identify the HLA-DQ2 and HLA-DQ8 alleles. Also, in comparison with conventional HLA-typing techniques in Iran, this method was faster and easier to perform and displayed higher sensitivity and specificity in distinguishing the alleles.

**Keywords:** Celiacdisease, Real-Time PCR Technique, HLA-Typing

---

\* Corresponding author. Tel: +98 21 22439970  
amanid@sbmu.ac.ir