الفحص الرابط المتعدد الباحث للفحص التحليلي الكامل عن الطفرات المحذوفة في جين النمو العضلي الشاذ دوشان

رؤى محمد صالح بكري

تحت إشراف
د. جلال الدين أولياء
د. عديل جلزار شودري

المستخلص العربي

الضمور العضلي الشاذ دوشان (DMD) هو اضطراب متنحي مميت ناجم عن طريق حذف / الازدواجية للطفرات الجينية المسببة للمرض أو طفرات نقطية في جين الدوشان. يعتبر جين الدوشان أكبر جين معروف حتى الآن و يتألف من 79 اكسون مكونا للجين. في هذه الدراسة ، قمنا بتحليل مجموعه من 35 عينة تضم 11 من ذكور مرضى الدوشان المشخصون سريريا و 25 أفراد العائلة. وقد تمت طريقة الكشف بواسطة تحليلين للجين، التحليل الأول أجري بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد ويستند الى الكشف عن الحذف عن 26 اكسون في المناطق "الساخنة" وهي منطقتين تعرف باكثر مناطق الجين انتشارا في حذف الاكسونات في جين الدوشان. نتج عن الكشف بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد حذف للطفرات الجينية المسببة للمرض اكسونات محذوفة في عدد ستة من المرضى (6 / 11)(54.54 ٪) ، 17.14 ٪ (6 / 35) من العدد الكلي للمرضى وأفراد العائلة، حيث تمركزت جميع الاكسونات المحذوفة في منطقة الحذف الساخنة الكبرى للجين. نظرا للحدود المترتبة عن تفاعل البلمرة المتعددة لعدم قدرته عن الكشف عن الاكسونات المحذوفة لدى الإناث الحاملين للمرض او الاكسونات المضاعفة (الازدواجية) في المرضى أو الحذف / الازدواجية الطفرات الجينية المسببة للمرض لدى الإناث الحاملين للمرض وذلك يعتبر سببا إلى الحد من هذا الاختبار. أدى ذلك إلى اللجوء إلى الفحص الرابط المتعدد الباحث للفحص التحليلي الكامل عن الطفرات المحذوفة في جين النمو العضلي الشاذ دوشان. يعتبر الفحص سريعا بقرائته للجين قرائة كاملة للسبعة والتسعون اكسون كاملة بواسطة أساس مزيج فريد من بوادء للقرائة وبروب فلورسنتي مخصص ترتبط لانتاج قرائات مخصصة. نتج عن ذلك الفحص الكشف عن 68.57 ٪ (35/24) حالة من حذف الطفرات الجينية. اثبتنا بواسطة الفحص الرابط المتعدد الباحث قدرته على الكشف عن الوضع في الإناث الحاملين للمرض جينيا حيث يكون كروموسوم ا كس X الحامل الناقل للمرض المحتوي على للحذف / الازدواجية الطفرات الجينية المسببة للمرض محجوبا عن طريق الكروموسوم X - الطبيعي. وأسفر معدل حذف (35/22 62 ٪) ومعدل التكرار في (12 / 35 ، 34.2 ٪) من الجين DMD في هذه الدراسة. تقدم هذه القيم ميزة كبيرة إلى الفحص الرابط المتعدد الباحث لاستخدامه في الاختبارات التأكيدي الوراثية للحذف / الازدواجية الطفرات في مرضى النمو العضلي الشاذ دوشان وكذلك الكشف عن ناقلين المرض الإناث كأمهات أو بنات وكذلك فتح الأبواب لفحوصات ما قبل الولادة والاستشارات الأسرية.

Multiple Ligation Probe Assay for Complete analysis of deletion mutation in the Duchenne Muscular Dystrophy

By: Rua Mohammad Saleh Bakri
Supervised By
Prof Jalal-Aldin Azam Awlia
Dr. Adeel Gulzar Choudhary

Abstract

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is an X-linked recessive fatal disorder caused mainly by deletions and to a lesser extent duplications and point mutations in the DMD gene. It is the largest gene known to date comprising of 79 exons. In this study, we analyzed a total of 35 subjects comprising of 11 clinically diagnosed DMD patients including 9 probands and 24 immediate family members. A multiplex PCR (mPCR) based assay was initially utilized to screen for 26 exonic deletions in the two 'hot spot' regions of the DMD gene. Multiplex-PCR method detected deletions in 6/11 patients (54.54%), 17.14 % (6/35) patients and family members they were all clustered in the major 'hotspot'of the DMD gene. However, due to the limitation of this qualitative assay an alternative Multiple Ligation dependent Probe Amplification (MLPA) assay was established. A rapid, screening method based upon a unique combination of exon specific primers and subsequent ligation of fluorescent probes that ligate to produce a fragment specific peak. MLPA detected deletions in 68.57% (24/35) of the samples.We showed that MLPA was not only reproducible but due to its robustness, it was able to detect carrier status in phenotypically normal females where the abnormal X-chromosome is veiled by normal X amplification. A deletion rate of (22/35. 62%) and a duplications rate of (12/35, 34.2%) of the DMD gene resulted in this study. This feature provided a major advantage to MLPA to be utilized as a confirmatory genetic test for deletion/ duplication mutations in DMD patients as well as detect carrier mothers and daughters opening doors for prenatal testing and family counseling.