



## التميط الجيني لجين ABO في عينة سكانية عراقية باستخدام تقانة PCR-RFLP

قبس حسين علاوي      لؤي محمد عبدو      سعد محمد الندا

جامعة الأنبار - كلية العلوم

### الخلاصة:

هدفت الدراسة إلى الكشف الجزيئي لجين مجاميع الدم ABO والتعرف على انماط الأليلات ABO في عينة سكانية عراقية. إشتملت الدراسة على 100 شخصاً من الأصحاء, تم الحصول على العينات من مركز بحوث التقنيات الإحيائية في جامعة النهريين بمدينة بغداد, والعينة عبارة عن دم كامل وتم استعمال جزء من الدم الكامل في الكشف عن مجموعة الدم بإستعمال الطريقة السيريرية التي تعتمد على تفاعل الضد والمستضد والجزء الآخر للتميط الجزيئي بإستعمال تقانة PCR-RFLP. ضوعفت قطعتان من جين ABO الواقع على كروموسوم 9, تقع القطعة الأولى في الإكسون 6 وتتضمن النيوكليوتيدة 261 والقطعة الثانية في الإكسون 7 والمتضمنة النيوكليوتيدة 703 ( يتكون جين ABO من 6 إنترونات و 7 إكسونات), نتج من مضاعفة القطعة الأولى 468 زوج قاعدة, في حين نتج من مضاعفة القطعة الثانية 298 زوج قاعدة. رُحلت نواتج تفاعل PCR على 2% هلام الأكاروز. تميز النيوكليوتيدات 261,703 أليلات مجاميع الدم A, B, O بواسطة إنزيمات التقييد, وفي هذه الدراسة استعملت اثنان من إنزيمات التقييد الأول *Kpn1* والذي يحدد الحذف الموجود في قاعدة الكوانين ضمن النيوكليوتيدة 261 ويحدد الإنزيم الثاني *AclI* الإستبدال الموجود في قاعدة الكوانين الى الادنين ضمن النيوكليوتيدة 703. رُحل ناتج عمليات الهضم بهذه الإنزيمات على 2% من هلام الأكاروز لمشاهدة القطع الناتجة, قورنت جميع القطع مع الدليل الحجمي وُحددت أحجامها. أظهرت نتائج تقانة PCR-RFLP أن من بين 28 نموذج ذوو مجموعة الدم A كان (23.9782%) 23 نموذج ذوو طرز وراثية هجينة AO و (4.0218%) 5 نماذج ذوو طرز وراثية متجانسة AA, بينما كان من بين 26 نموذج ذوو مجموعة الدم B (22.6809%) 24 منهم ذوو طرز وراثية هجينة BO و (3.3191%) 2 منهم ذوو طراز وراثي متجانس BB و (38%) 38 ذوو طراز وراثي OO و (8%) 8 ذوو طراز وراثي AB. اظهرت الدراسة وجود أليل  $O^2$ , كما أوضحت الدراسة أنه لا يوجد أي إختلاف عند مقارنة النمط المظهري بالنمط الجيني.

### معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2016/09/29  
تاريخ القبول: 2017/02/06  
تاريخ النشر: 2017 / 12 / 27  
DOI: 10.37652/juaps.2016.134879

### الكلمات المفتاحية:

التميط الجيني ،  
جين ABO ،  
عينة سكانية عراقية ،  
PCR-RFLP

### المقدمة

التشخيص والاستعمال لهذا اكتسب هذا التمايز مقارنة بالانظمة الاخرى واصبح اكثرها تداولاً و شهرة, إذ يقسم هذا النظام خلايا الدم الحمراء (RBCs) Red Blood Cells إلى أربعة مجاميع A و B و AB و O (1). تطورت فحوصات عديدة للتميط الجيني لمجاميع الدم لمعرفة مستضداتها وتضمنت تقنيات جزيئية هي Polymerase Chain Reaction (PCR) و - polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) و polymerase chain reaction - Single Strand

أكتُشِف نظام مجاميع الدم ABO عام 1900 من قبل العالم النمساوي Karl Landsteiner, وحسب توصيف المنظمة الدولية لنقل الدم International Society of Blood Transfusion (ISBT) هناك 29 نظام لتصنيف الدم, الا ان نظام ABO الاسهل في

\* Corresponding author at: University of Anbar - College of Science  
E-mail address:

عولجت عينات الدم المتجمد بهدف إستخلاص المادة الوراثية DNA باستخدام عدة الاستخلاص gSYNC™ DNA Extraction Kit المجهزمن شركة Geneaid. تقدير تركيز ونقاوة الدنا المستخلص:

نُبذت عينات الدنا المستخلص في جهاز النبذ لضمان تجانسها، أُجري التقدير باستخدام وحدة القطرة النانوية Nano drop شركة (BioDrop, UK) إذ أخذ 1 مايكرو لتر ووضع في الحجرة الخاصة في الجهاز وأعطى أمر القياس من جهاز الحاسوب المتصل به (5).

#### تحديد الدنا المستخلص:

مُزجت كمية 5 مايكرو لتر من الدنا المستخلص مع صبغة التحميل Loading Dye، وُحلت النماذج على هلام الأكاروز بتركيز 1% ووثقت النتائج بالتصوير (5).

#### تفاعلات PCR:

تمت مضاعفة الدنا المجيني Genomic DNA باستخدام مجموعتين من البوادىء وكل مجموعة خاصة بموقع معين. حسب (6) تسلسلات النيوكليوتيدات المستخدمة في الدراسة الحالية هي كالتالي، وكما مبينة في جدول (1).

جدول (1): البوادىء المستخدمة في تقانة PCR-RFLP

Primer	Primer Sequences	Synthesis No	Length	Temperature Annealing
O gene	F 5' _ GGGAGGGTT TGTTCCTAT CTC _3	68797637	21	58 °C
	R 5' _ AATGTCCA CAGTCACT CGCC _3	68797638	20	58 °C
B gene	F 5' _ GCAGCTGT CAGTGCCTG GA _3	68797639	19	58 °C

Conformation Polymorphism(SSCP) و PCR Amplification of Specific Alleles(PASA) والتي مكنت في تحديد الأنماط الوراثية لمجاميع الدم على المستوى الجزيئي كذلك أمكن تحديد موقع الجين المسؤول عن تحديد الأنماط الوراثية وما يعبر عنها مظهرها لمجاميع الدم ABO على كروموسوم 9، وبهذا أدخلت هذه التقنيات في المختبرات الطبية بدءاً من تحديد الأنماط الوراثية لمجاميع الدم على المستوى الجزيئي إلى تشخيص الأمراض غير الوراثية على المستوى الجزيئي أيضاً.

مكّن فهم الأساس الجزيئي لمجاميع الدم تصميم تحاليل بسيطة يمكن استعمالها لتوفير دم للمرضى الذين هم بحاجة الى مطابقة مستضد RBCs مع الإعتماد على التتميط المظهري لوحدات خلايا الدم (2) رغم أن تحليل الأنماط الجينية يستغرق وقتاً أكثر، لكن إختبار كل من المريض والواهب على المستوى الجيني يوفر مطابقة دقيقة للدم ويمنع حالات Alloimmunizations إضافية. أُعتمدت تقانة التتميط المصلي أساساً لتتميط مجاميع الدم منذ إكتشاف Landsteiner وزملائه لمجاميع الدم، لكن مع توافر التتميط الجيني للتباين احادي النيوكليوتيدة Single Nucleotide Polymorphism Genotyping محتمل أن يصبح بنك الدم أحد المختبرات الأولية المتخصصة في الإستفادة من ثورة تكنولوجيا PCR (3). كما إن حساب عدد SNPs في المجين البشري المتنوع والقدرة على ربطه بالمرض أو خطره وبتغاير الأفراد في الإستجابة للعلاج يجعل التتميط المعتمد على SNPs تقنية من شأنها أن تشارك في الطب الشخصي Personalized Medicine، كما يجعل طب نقل الدم بمثابة معالجة فردية، أي أن مطابقة الواهب مع المستلم في مواقع عدة على المستوى الجينومي بالإضافة إلى أنظمة ABO, Rh، أسلوب يقلل من حدوث التمنيع الذاتي داخل الجسم (4).

#### المواد وطرائق العمل

##### جمع العينات:

تم جمع عينات الدم من 100 شخص بصورة عشوائية خلال شهر آذار لعام 2015، وذلك بسحب الدم الوريدي وحفظت في انابيب تحتوي EDTA بدرجة حرارة 4°C، وأجري إختبار التلازن الخاص بمجموعات الدم ABO وعامل Rh وتحديد مجموعة دم كل شخص بصورة مباشرة.

#### إستخلاص الحامض النووي المجيني:

DNA template	4µl
Nuclease-Free Water	17µl
Total Reaction volume	50µl

R 5'- GTAGAAAT CGCCCTCG TCCTT-3	6879740	21	58°C
--	---------	----	------

تخفيف البادئات:

جُهزت البودئ من شركة IDT DNA بشكل ناتج مجفف بالتبريد Lyophilized Product وبتراكيز مختلفة. حضرت بإضافة أحجام مختلفة من الماء الخالي من النيوكلييز Nuclease Free Water حسب تركيز البادئ المجهز.

تحديد درجة الإلتحام الملائمة:

بعد تخفيف البودئ تم عمل برنامج مندرج حراري Thermal Gradient في جهاز التدوير الحراري, تضمن البرنامج 12 درجة حرارية مختلفة ° (55-61) م°, وتم إختيار نماذج ناتج التضخيم لست درجات حرارية, وُحدت درجة حرارة الإلتحام Annealing temperature وهي 58.6 م° لكلا البادئين, مكونات خليط التفاعل لهذا الإختبار موضحة في جدول (2).

جدول (2): مكونات خليط تفاعل PCR لتحديد درجة الإلتحام

Component	Volume
Green Master Mix	12.5µl
Forward Primer	1µl
Reverse Primer	1µl
DNA template	1µl
Nuclease-Free Water	8.5µl
Total Reaction volume	25µl

والخليط ذاته بالنسبة للمجموعة الثانية من البودئ-ABO-F2, ABO-R2. وُخذ البرنامج ذاته لكلا البادئين.

تضاعف جين مجاميع الدم:

تضاعفت النماذج كافة بإستخدام المجموعة الاولى من البودئ (ABO-F1, ABO-R1) المبينة آنفا, إذ أستخدمت للكشف عن الأليل O بمضاعفة قطعة حجمها 486 زوج قاعدة التي تحوي النيوكليوتيدة 261 وأُعدت طريقة Single-Round PCR (7), لكل تفاعل PCR الكميات والمزيج مبينة في جدول (3) وحسب البرنامج المبين في جدول (4) انجز التفاعل في جهاز التدوير الحراري (8).

جدول (3): يبين مكونات تفاعل ال PCR

Component	Volume
Green Master Mix	25µl
Forward Primer	2µl
Reverse Primer	2µl

جدول (4): برنامج التضاعف للبودئ المستخدمة

المرحلة	درجة الحرارة °C	الزمن	عدد الدورات
بدء المسخ	95	5 min	1
المسخ	94	0.35 sec	35
الالتحام	58.6	0.35 sec	
الاستطالة	72	0.35 sec	
الاستطالة النهائية	72	10 min	1

أعيد التفاعل ذاته والخطوات ذاتها على جميع النماذج مع فرق تبديل البادئ وهو (ABO-F2, ABO-R2) والمستخدم للكشف عن الأليل B بمضاعفة قطعة حجمها 289 زوج قاعدة التي تحتوي النيوكليوتيدة 703. تحليل نواتج تفاعل البلمرة التسلسلي:

حُدت الأحجام الجزيئية لناتج PCR بالمقارنة مع DNA molecular size marker (100 bp ladder DNA), كمية 6 مايكرو لتر من الناتج و 5 ميكرو لتر من الدليل الحجمي رُحلو على هلام الأكاروز بتركيز 2% وضُبطت الفولتية عند 80 فولت لمدة ساعة, فُحص الهلام المصطبغ وصور بإستخدام وحدة تصوير الهلام Gel Documentation. كان واضحا وجود الحزم 298, 468 زوج قاعدة بالمقارنة مع الدليل الحجمي (5).

الهضم الإنزيمي

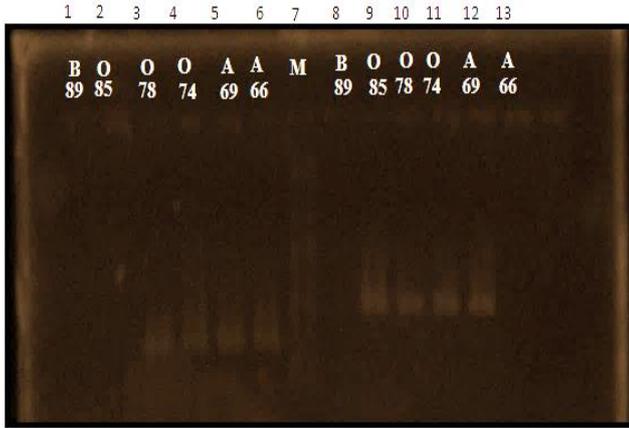
إختبار الإنزيمات المقيدة:

تم إختبار تركيزين مختلفين لكلا الإنزيمين وهما 2.5 و 5 مايكرو لتر للإنزيم المقيد الأول *Kpn1*, و 0.8 و 0.5 مايكرو لتر للإنزيم المقيد الثاني *ALU1* ورجل ناتج التقطيع مع نماذج من الحامض النووي DNA والدليل الحجمي DNA Ladder.

هضم ناتج تضخيم PCR بواسطة الإنزيمات المقيدة:

أخذ مقدار 5 مايكرو لتر من ناتج تضخيم PCR والذي تم تضخيمه بإستعمال البادئ الأول (ABO-F1, ABO-R1) وقُطع بالإنزيم القاطع *Kpn1* بإضافة 2.5 مايكرو لتر منه و 5 مايكرو لتر من البفر الخاص به. بعد إتمام جميع الإضافات حُصنت النماذج بدرجة 37 °C طول الليل overnight ورُحلت على هلام الأكاروز بتركيز 2% وصُغ الهلام بصبغة بروميد الإثيديوم وصور بوحدة تصوير الهلام.

يمكن إعتقادها كدرجات إلتحام ملائمة لهذا البادىء حيث لم يظهر ناتج عند هاتين الدرجتين, في حين كانت الدرجات الحرارية (57.3, 60.6, 60.0, 58.6 ملائمة كدرجات إلتحام للبادىء الثاني (ABO-F2, ABO-R2) بينما لا يمكن إعتقاد درجتي الحرارة 55, (56.4) كدرجات إلتحام ملائمة لهذا البادىء, شكل (2).



شكل (2): الترحيل الكهربائي لناتج PCR على هلام الأكاروز والمستحصل عليه بإستخدام الزوجين من البادئات ودرجات إلتحام مختلفة للبادىء. تمثل الدليل الحجمي (M) بالعمود السابع, ويمثل العمودان الثامن والثالث عشر درجتي الإلتحام 55 و 60.6 م° واللتان لم تُظهرا ناتج للبادىء الأول, في حين تمثل الأعمدة التاسع والعاشر والحادي عشر والثاني عشر درجات الإلتحام 56.4 م° و 57.3 م° و 58.6 م° و 60.0 م° والتي أظهرت ناتج لهذا البادىء. ويمثل العمودان الأول والثاني درجتي الإلتحام 55 م° و 56.4 م° للبادىء الثاني والتي لم تُظهرا ناتج لهذا البادىء, أما درجات الألتحام 57.3 م° و 58.6 م° و 60.0 م° و 60.6 م° والتي أظهرت ناتج لهذا البادىء فتتمثلت بالأعمدة الثالث والرابع والخامس والسادس.

تعتبر فكرة ايجاد درجة التحام ملائمة لكلا البادئين فكرة من شأنها اختصار الوقت والجهد وتجنب الخطأ قبل البدء بتفاعلات PCR, اعتمدت الكثير من الدراسات ان تكون درجة التحام واحدة ملائمة لكل بادىء ومختلفة عن الاخر في حالة استخدام اكثر من بادىء في الدراسة, اما في الدراسة الحالية فوجد ان ثلاث درجات حرارية من اصل ست درجات حرارية تم ترحيل نتائجها لكل بادىء ملائمة كدرجات التحام لكلا البادئين, أختيرت درجة الإلتحام 58.6 م° كدرجة إلتحام ملائمة لكليهما.

#### تضاعف جين مجاميع الدم:

تمت مضاعفة النماذج بإستخدام مجموعتين من البادئات, فالمجموعة الأولى (ABO-F1, ABO-R1) ضاعفت قطعة حجمها

أجريت نفس الخطوات السابقة مع الإنزيم القاطع **ALUI**, لكن الفرق أن ناتج التضخيم كان بإستعمال البادىء الثاني (ABO-F2, ABO-R2), والمقدار المضاف لهذا الإنزيم وهو 0.8 µl لأن الفعالية لهذا الإنزيم مختلفة عن الإنزيم الأول (7).

جدول (5) : تفسير الانماط الجينية لمجاميع الدم ABO بتقانة Gel

#### (9) Documentation Unit

Blood Genotyping	295 pb	173 pb	201 bp	88 bp
OO	+	+	-	-
AB	-	-	+	+
AO	+	+	-	-
AA	-	-	-	-
BO	+	+	+	+
BB	-	-	+	+

#### النتائج والمناقشة

#### نوعية DNA المستخلص:

بالإستناد إلى طريقة الإستخلاص الموضحة انفا, فإن نوعية وكمية DNA المستخلص كانت ملائمة لتفاعلات PCR, كما إن إستخدام طريقة Spin Column Method له دور في ذلك, فهذه الطريقة تحسن كل من الناتج العائد والنقاوة (10), شكل (1).



شكل (1): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز للحمض النووي

لاشخاص مختلفي مجاميع الدم و بإستخدام طريقة Spin Column

Method. اذ تمثل الحروف الانماط المظهرية لمجاميع الدم, في حين تمثل الارقام الواقعة تحت الانماط المظهرية ارقام العينات.

#### التميط الوراثي لمجاميع الدم:

تحديد درجة الإلتحام الملائمة للبادئات المستخدمة:

بينت نتائج الترحيل الكهربائي أن أربع درجات حرارية وهي (56.4, 57.3, 58.6, 60.0) ملائمة كدرجات التحام للبادىء الأول (ABO-F1, ABO-R1), بينما درجتي الحرارة (55, 60.6) لا

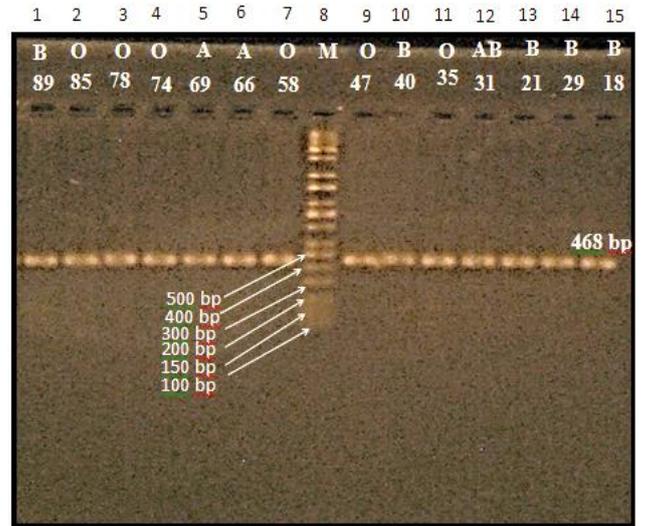
وجد أن المتغيرات التالية (25µl master mix, 17µl deionized water, 2µl of each allele specific primer and 4µl DNA template) مثالية للتضخيم في مزيج تعادل بحجم 50 مايكرو لتر , فالتغير في المتغيرات المذكورة قد يكون له تأثير ضئيل -أو ليس له تأثير- ولكن ابعده من هذا المدى يؤدي الى إختفاء الحزم أو بهوتها أو حتى تلاشيها وعدم ظهورها, وعلى العكس ممكن أن تظهر حزم قوية جدا وهذا مرتبط بزيادة أو تقليل التراكيز المستخدمة ودورات التفاعل الحرارية, وجد Tun واخرون (1996) أن فشل التضاعف متعلق بإنخفاض تركيز DNA لأقل من 1µl وتركيز  $MgCl_2$  لأقل من 1.5µM. بخصوص درجة حرارة الإلتحام Annealing Temperature فتحديدها كان مختلفا عن الطرق السابقة التي تستخدم درجة حرارة إلتحام خاصة لكل مجموعة من البادئات. بتوافر الظروف المثلى لجين ABO وباستخدام الزوج الاول من البادئات (ABO-F1, ABO-R1) تم تضخيم قطع ال DNA ونتاجت قطعة بحجم 468 زوج قاعدة عند مقارنتها بالدليل الحجمي DNA marker(M) , في حين نتج من تضخيم ال DNA قطعة بحجم 289 زوج قاعدة عند استخدام الزوج الثاني من البادئات (ABO-F2, ABO-R2) ولم تظهر حزم غير متوقعة وموجودة في مناطق فوق الحجم المطلوب حيث استخدمت طريقة Monoplex PCR ففي البحوث التي تستخدم طريقة Multiplex PCR ويتم استعمال 4 بادئات أو أكثر في نفس خليط التفاعل غالبا ما تظهر حزم غير متوقعة وأحجامها فوق 600bp إذا ما قورنت بالدليل الحجمي (8).

#### الهضم الإنزيمي

إختبار الإنزيمات المقيدة: تبين من ملاحظة القطع الناتجة من الترحيل الكهربائي أن كلا التركيزين ملائمين للتقطيع, وتم إختيار التركيز 2.5µl للإنزيم القاطع الأول *Kpn I* والتركيز 0.5µl للإنزيم القاطع الثاني *Alu I*, شكل (5).

تحديد التعدد الشكلي لجين مجاميع الدم بتقنية تباين اطوال قطع الدنا المقيدة: تم تقييد ناتج تفاعل PCR والمستحصل عليه بإستخدام الزوج الأول من البادئات (ABO-F1, ABO-R1) بإستخدام الإنزيم المقيد *Kpn I*, شكل (6) يمكن فهم وتفسير الأنماط الجينية الناتجة من خلال جدول (6) و (7) والمقارنة مع القطع الناتجة والتي تتم رؤيتها بعد الترحيل الكهربائي, بهذه الطريقة يمكن لأي باحث أن يحدد الأنماط الجينية بسهولة.

468 زوج قاعدة من DNA والحاوية على النيوكليوتيدة 261, شكل (3) في حين أستخدمت المجموعة الثانية من البادئات لتضخيم قطعة من ال DNA ذات الحجم 289 زوج قاعدة والحاوية على النيوكليوتيدة 703, شكل (4).



شكل (3): ناتج الترحيل الكهربائي لنتائج PCR على هلام الأكاروز والمستحصل عليه بإستخدام الزوج الأول من البادئات. إذ يمثل العمود الثامن الدليل الحجمي (M), أما الأعمدة الأول, العاشر, الثالث عشر, الرابع عشر والخامس عشر فتمثل النمط الظاهري B, وتمثل الأعمدة الثاني, الثالث, الرابع, السابع, التاسع والحادي عشر النمط الظاهري O, في حين يتمثل النمط الظاهري A في العمودين الخامس والسادس, ويتمثل النمط الظاهري AB في العمود الثاني عشر.

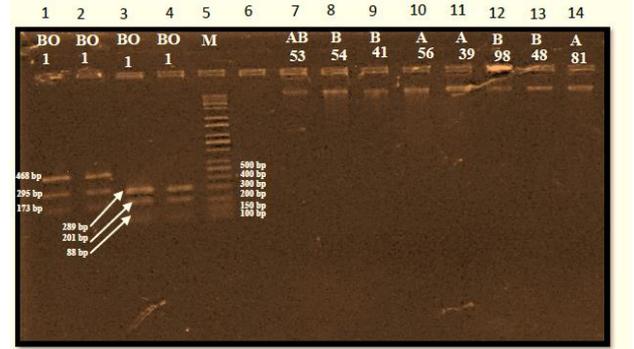


شكل (4): ناتج الترحيل الكهربائي لنتائج pcr على هلام الأكاروز, والمستحصل عليه بإستخدام الزوج الثاني من البادئات, إذ يمثل العمود الأول الدليل الحجمي (M), أما الأعمدة الثاني, السادس والعاشر فتمثل النمط الظاهري A وتمثل الأعمدة السابع, التاسع والحادي عشر النمط الظاهري B, في حين يتمثل النمط الظاهري AB في العمود الرابع.

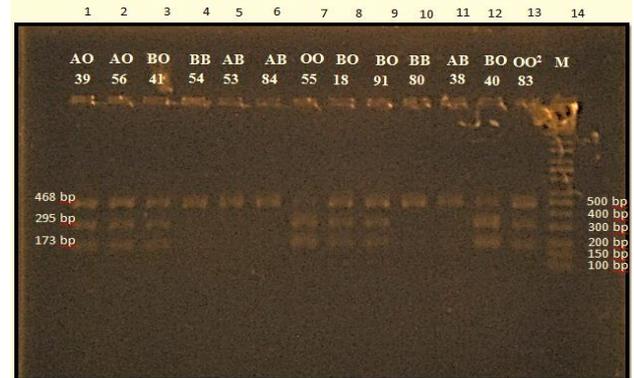
جدول (7): أحجام القطع التي ظهرت بعد هضم ناتج PCR

<i>AluI</i>	<i>KpnI</i>	الأنماط الجينية Genotypes
289	295, 173	OO
289	468	AA
289	468, 295, 173	AO
201, 88	468	BB
289, 201, 88	468, 295, 173	BO
289, 201, 88	468	AB
289	468, 295, 173	OO <sup>2</sup>

يمكن تفسير ما ورد في الجداول أعلاه، أنه في حالة الهضم الكامل Complete Digestion للقطعة الأصلية ذات الحجم 468bp ينتج قطعتين بأحجام 295, 173 زوج قاعدة والتي تعد مؤشر لوجود الأليل O في الحالة المتماثلة Homozygous Alleles OO وهذه القطع بالتالي كمعلم لهذا الأليل، بينما تنتج القطع ذات الأحجام 468, 295, 173 زوج قاعدة والتي تمثل الأنماط الوراثية AO و BO بتراكيب أليلية متباينة Heterozygous Alleles في حالة الهضم الجزئي Partial Digestion، أما في حالة إنعدام الهضم للقطعة الأصلية وبقاؤها كما هي فهذا دليل وجود الأنماط الوراثية AA و AB و BB فضلا عن تأكيد إنعدام الأليل O في ناتج التقطيع. فإذا لم تكن النيوكليوتيدة 261 موجودة فإن ناتج ال PCR يجب أن يكون 467 Allele-Specific Fragment زوج قاعدة والذي يخلق موقع شطر للإنزيم القاطع *KpnI* على التسلسل الخاص بأليل O، لكن إذا كانت النيوكليوتيدة 261 موجودة فإن القطعة الناتجة يجب أن تكون 468 زوج قاعدة ولا يوجد موقع قطع خاص للإنزيم، لذلك إذا هُضمت هذه القطعة بشكل كامل فالقطع الناتجة هي 173 و 295 زوج قاعدة ويُميز الأليل O في الحالة المتجانسة OO وتكون القطعة 295 زوج قاعدة كمؤشر له. بعدها تم تقييد ناتج تفاعل PCR والمستحصل عليه باستخدام الزوج الثاني من البادئات (ABO-F2, ABO-R2) باستخدام الإنزيم المقيد *AluI*، شكل (7).



شكل (5): ناتج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز لنماذج قطع PCR مقيدة بالإنزيمين المقيدين *KpnI* و *AluI* وبتراكيب مختلفين لملاحظة نماذج التقطيع. إذ يمثل العمود الخامس الدليل الحجمي (M) ويمثل العمود الأول النمط الوراثي BO مقيد بالإنزيم *KpnI* بتركيز 2.5 مايكرو لتر ويمثل العمود الثاني النمط الوراثي BO مقيد بالإنزيم المذكور بتركيز 5 مايكرو لتر، في حين يمثل العمودين الثالث والرابع النمط الوراثي BO مقيد بالإنزيم *AluI* بتركيزين 0.5 مايكرو لتر و 0.8 مايكرو لتر. تمثل الأعمدة الباقية من العمود السابع إلى العمود الرابع عشر نماذج من الحامض النووي.

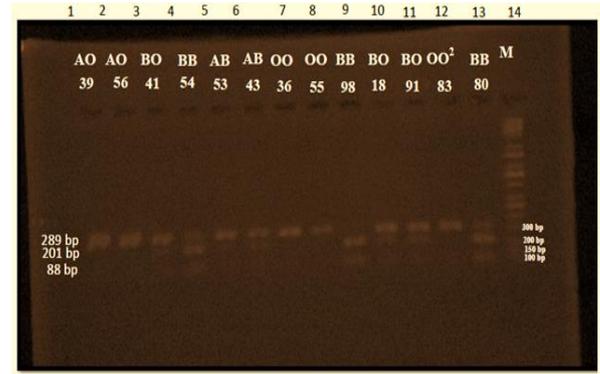


شكل (6): ناتج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز لنماذج قطع PCR مقيدة بالإنزيم *KpnI* لتعطي الأنماط الوراثية لمجموعات الدم ABO. إذ يمثل العمود الرابع عشر الدليل الحجمي (M)، يتمثل النمط الوراثي AO بالعمودين الأول والثاني، وتمثل الأعمدة الثالث، الثامن، التاسع والثاني عشر النمط الوراثي BO، في حين يمثل العمودين الرابع والعاشر النمط الوراثي BB وتمثل الأعمدة الخامس، السادس والحادي عشر النمط الوراثي AB، أما النمط الوراثي OO فيتمثل بالعمود السابع ويمثل العمود الثالث عشر النمط الوراثي OO<sup>2</sup>. \*\*ناتج التقطيع الكامل للقطعة الأصلية هو قطعتين وناتج التقطيع الجزئي ثلاث قطع بينما يعطي عدم التقطيع قطعة واحدة فقط.

جدول (6): تفسير الأنماط الجينية الناتجة من الهضم بالإنزيمات المقيدة لنواتج PCR.

الأنماط الجينية المحتملة <i>ALU I</i> <i>KpnI</i>		هضم الإنزيم القاطع Restriction Enzyme Digestion
OO	BB	الهضم الكامل digestion
AO, BO	AB, BO	الهضم الجزئي digestion
AA, AB, BB	AA, AO, OO	عدم حدوث هضم digestion

تم تحديد الأنماط الجينية لمجاميع الدم باستخدام الأساليب الجزيئية الحديثة والتي أنجزت باستخدام كمية قليلة من الحمض النووي DNA (11) لأن طرق التتميط المصلي ليست قادرة على تحديد ما يحتويه الجين المسؤول عن مجاميع الدم من تباينات وتغايرات في تتابعاته، لذلك أعتُمدت طرق التتميط الوراثي لهذا الجين ومنها تقنية PCR-RFLP (12) باستخدام هذه التقنية بحثت الدراسة عن التعدد الشكلي لهذا الجين ووجد إن من بين 38 نموذج ذوي النمط الظاهري O ظهر 27 فرد حاملين للنمط الوراثي  $OO^1$  و 11 نموذج حاملين للنمط الوراثي  $OO^2$ ، يتألف الأخير من أليلين أحدهما هو الأليل O وفيه تتضمن النيوكليوتيدة 261 طفرة الحذف المتمثلة بقاعدة الكوانين G والمعروف بالأليل  $O^1$  والاخر هو احد اليلات O الذي لا يحتوي على الحذف الحاصل بالنيوكليوتيدة 261، ولم يُسجل مثل هذا النمط في دراسة التتميط الجيني التي قام بها Al-meri وآخرون (2012) (13) و Nader وآخرون (2012) (14) في العراق وسجلت الباحثة رشا في دراستها لمجتمع صلاح الدين عام 2013 أنه من بين 34 نموذج حاملين للنمط الظاهري O ظهر 29 فرد حاملين للنمط الوراثي  $OO^1$  و 5 نماذج حاملين للنمط الوراثي  $OO^2$ ، وسجل هذا النمط بنسب واطئة في مجتمع الأردن بعد دراسة أجراها Hanania وآخرون (2007) (6) ولم يظهر في الدراسات السابقة في الصين وكوريا واليابان (15) و (16) و (17)، تفسير ذلك، أن الأليل  $O^2$  هو أليل نادر أو إنه لم يكن موجود في اصول تلك المجتمعات وسُجل في الأوربيين البيض بتكرار 1.02% (18)، وبقي ما سجلته الدراسة الحالية من تكرار لهذا الأليل أعلى مما تم تسجيله في الدراسات السابقة وماهذا إلا دليل التنوع السكاني العالي المستوى في أقاليم العراق. كما ظهر من بين 28 فرد ذوي مجموعة الدم A، 23 فرد حاملين للنمط الجيني AO و 5 أفراد حاملين للنمط الجيني AA، في حين ظهر من بين 26 فرد ذوي مجموعة الدم B، 24 فرد حاملين للنمط الجيني BO وفردين فقط حاملين للنمط الجيني BB، واخيرا 8 أفراد حاملين للمستضدين A و B بنسب قد تكون غير متجانسة ضمن مجموعة الدم AB وهذا يعتمد على كمية المستضد الذي يتم التعبير عنه على سطوح كريات دمهم. إتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما سجل في العديد من الدراسات السابقة الهادفة لتحديد الأنماط الجينية في المجتمعات السكانية والتي سجلت انخفاض تكرارات الأنماط الجينية متماثلة العوامل وبالمقابل إرتفاع تكرارات الأنماط الجينية متباينة العوامل (14) و (19) و (20) و



شكل (7): ناتج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز لنماذج قطع PCR مقيدة بالإنزيم *AluI* لتعطي الأنماط الوراثية لمجاميع الدم ABO. اذ يمثل العمود الرابع عشر الدليل الحجمي DNA marker (M) 100 bp، يمثل النمط الوراثي AO بالعمودين الأول والثاني، وتمثل الأعمدة الثالث، العاشر والحادي عشر النمط الوراثي BO، في حين يمثل الأعمدة الرابع، التاسع والثالث عشر النمط الوراثي BB ويمثل العمود الخامس والسادس النمط الوراثي AB، أما النمط الوراثي OO فيتمثل بالعمود السابع والثامن ويمثل العمود الثاني عشر النمط الوراثي  $OO^2$ . \*\*ناتج التقطيع الكامل للقطعة الأصلية هو قطعتين وناتج التقطيع الجزئي ثلاث قطع بينما يعطي عدم التقطيع قطعة واحدة فقط.

بالعودة إلى جدول (2-3) و (3-3) يمكن تفسير ناتج الهضم بأنه في حالة الهضم الكامل للقطعة الأصلية ذات الحجم 289 زوج قاعدة تنتج قطعتين بحجم 201، 88 زوج قاعدة والتي تعد مؤشر لوجود الأليل B في الحالة المتماثلة BB وهي بذلك كمعلم لأليل B، أما في حالة التقطيع الجزئي للقطعة الأصلية فينتج ثلاث قطع بأحجام 289، 201، 88 زوج قاعدة والتي تمثل الأنماط الوراثية AB و BO بتراكيب أليلية متباينة، وأخيرا في حالة إنعدام الهضم للقطعة الأصلية فتبقى كما هي دالة على وجود الأنماط الوراثية AA و AO و OO ومؤكدة إنعدام الأليل B في ناتج التقطيع. مع الإنتباه إلى قطعة ال DNA التي لا تهضم بكلا الإنزيمين والتي هي مؤشر لوجود الأليل A بشكل مضاعف ويكون النمط الجيني في هذه الحالة AA. أي إنه إذا كان الأدينين A بدلا عن الكوانين G التبدل الحاصل في قاعدة الكوانين إلى الأدينين (G→A) ضمن النيوكليوتيدة 703 فالقطعة الناتجة من التضخيم يجب أن تكون Allele-Specific Fragment B ويكون بذلك موقع شطر للإنزيم *AluI*، لذلك إذا هضمت هذه القطعة بصورة كاملة بالإنزيم المذكور فالقطع الناتجة هي 201، 88 زوج قاعدة وتكون القطعة 88 زوج قاعدة كمؤشر لأليل B.

- Rujirojindakul, P., Flegel, W. A. (2014). Applying molecular immunohaematology to regularly transfused thalassaemic patients in Thailand. *Blood Transfus.*, 12:28-35.
- Connie, M. Westhoff, S. and Steven, R. (2008). Molecular Genotyping in Transfusion Medicine. *Clinical Chemistry*, 54: 1948–1950.
- Hashmi, G., Shariff, T., Seul, M., Vissavajhala, P., Hue-Roye, K. and Charles-Pierre, D. (2005). A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion*, 45: 680-8.
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook. (2001). In vitro applications of DNA by the polymerase chain reaction , in molecular cloning : A laboratory manual .2nd ed ., Cold Spring Harbor lab.
- Hanania, S. S.; Hassawi, D. S. and Irshad, N. M. (2007). Allele frequency and molecular genotypes of ABO blood group system in a Jordanian population. *J. Med. Sci.* 7(1): 51-58.
- Hamza , Z.; Petmiter, S.; Mungthin, M.; Leelayoova, S. and Chavalitsh-Winkoon, P. (2006). Differential detection of *E. histolytica* , *E. dispar* and *E. moshkovskii* by single – round PCR assay . *J. Clin. Microbiol.* 4: 3196 -3200.
- Stroncek, D. F.; Konz, R.; Clay, M. E.; Houchins, J. P. and McCullough, J. (1995). Determination of ABO glycosyltransferase genotypes by use of polymerase chain reaction and restriction enzymes. *Transfusion*, 35: 231-40.
- Tun, Z., Honda, K., Nakatome, M., Islam, M., Bai, H., Ogura, Y., Kuroki, H., Yamaz, M., Terade, M., and Wakasugi, C. (1996). Rapid and Clear Detection of ABO Genotyping by Simultaneous PCR-RFLP Method. *Forensic Sci*, 41: 1027-1030.
- Dauphin, L.A., Stephens, K.W., Eufinger, S.C. and Bowen, M.D. (2009). Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Yersinia pestis* DNA from bacterial suspensions and spiked environmental samples. *J. Appl. Microbiol.* 108(1):163-172.
- Gassner, C., Schmarada, A., Nussbaumer, W., Schonitzer, D. (1996). ABO Glycosyltransferase Genotyping by Polymerase Chain Reaction Using Sequences Specific Primers. *Blood*, 88: 1852-1859.
- Robinson, M.T., Wilson, T. and Nicholson, G.A. (2004). AGT and RH blood group polymorphisms affect blood pressure and lipids in Afro-Caribbeans, *J. Hum. Hypertens*, 18: 351- 363.

(21) و (22) و (23) أظهرت جميع الأنماط المظهرية A و B أليلا وظيفيا خاليا من الحذف الحاصل في النيوكليوتيدة 261 والليل غير وظيفي متمثل بالأليل O, وأظهرت النماذج ذوات النمط AB كلا الأليلين A و B وإحتوت جميع النماذج ذوات النمط الظاهري O على موقع التمييز الخاص بالإنزيم *KpnI* والموجود بالأليل O والنماذج ذوات الأنماط B و AB على موقع التمييز الموجود بالأليل B والخاص بالإنزيم *AluI* والذي يقطع ال DNA عنده. ما وجدناه من أنماط جينية في أفراد مجاميع الدم A, B and O يتفق إتقافا تماما مع النموذج الوراثي الجزيئي المقترح للتعدد الشكلي لمجاميع الدم إذ وجدت الأنماط الجينية الست AA, AO, BB, BO, AB, OO<sup>2</sup> , تم الإستدلال على إلى إنه في حالة الأنماط المتجانسة AA, BB فإن ذلك يعني عدم وجود الأليل O<sup>1</sup> وفي حالة الأنماط المتغايرة AO, BO فذلك دليل على وجود نسخة من الأليل O<sup>1</sup> وفيما يخص النمط OO<sup>2</sup> فيدل ذلك على أن أحد الأليلين لا يحتوي على الحذف المعتاد لقاعدة الكوانين, تبقى المتغيرات ذات التكرار المنخفض مهمة في تحليل الحامض النووي في الطب الشرعي.

ما قمنا بتوظيفه في هذه الدراسة من طريقة جزيئية سريعة لتحديد التتميط الجيني أستُخدمت سابقا من قبل Yamamoto وآخرون (1993), (1990) (24) و (25) إذ استعملوا ثمان أنواع مختلفة من إنزيمات التقبيد Endonucleases في مواقع النيوكليوتيدات 261, 796 and 703 , طبقت هذه الطريقة من قبل Grunnet وآخرون (1994) (26) ومن قبل Stroneck وآخرون (1995) (8) أووضحت هذه الدراسة أن إستخدام التقنيات الوراثية الجزيئية Molecular Genetic Techniques لتحديد التتميط الجيني لمجاميع الدم في مواقع النيوكليوتيدات 261, 703 يجعل من الممكن التمييز بين أليلات A, B, O , تطابقت نتائج هذه التقنية مع التقنيات الأخرى المستخدمة لتتميط نفس الجين (1) و (27) تمثل الطريقة المستخدمة في هذه الدراسة بالإضافة إلى الأساليب الجزيئية الأخرى التي تسمح بتحديد أنماط جينية نادرة أداة مفيدة لتتميط مجاميع الدم في الحالات الصعبة و حالة تحديد المستضدات المعبر عنها بصورة ضعيفة عندما تقشل الطرق المصلية في تحديدها.

#### المصادر:

- Hosni, E. (1997). Genetic analyses of the ABO bloodgroups and application of the clinical laboratories. *J. Clin. Pathol.* 45: 148-156.

- of ABO and Rh(D) Blood Group Alleles in a Healthy Infant Population in Ibadan ,Nigeria. West. Afr. J. Med. 18: 294-297.
22. Varsahr, A. M.; Spitsyn, V. A.; Bychcovscaya, L. S.; Kravchuk, O. I (2001).To the Research of The Gene Pool of The Gagauz Population of Moldavia. Anthropol. Anz. 59: 11-17.
23. AL-Bustan, S. M.; El-Zawahri, D.; Al-Azmi, A. A. and Al-Bashir (2002). Allele frequencies and molecular genotyping of the ABO blood group system in a Kuwait population. Intl. J. Hem.75:174-153.
24. Yamamoto, F. and Hakomori, S. (1990). Sugar – nucleotide donor specificity of histo - blood group A and B transferases is based on amino acid substitution. J. Biol. Chem. 265(31): 19257-19262.
25. Yamamoto, F.; McNeill, P. D.; Kominato, Y.; Yamamoto, M.; Hakomori, S.; Ishimoto, S.; Nishida, S.; Shima, M. and Fujimura, Y. (1993). Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 2. cis-AB alleles. Vox Sang. 64: 120-123.
26. Grunnet, N.; Steffensen, R.; Bennet, E. P. and Clausen, H. (1994). Evaluation of histo-blood group ABO genotyping in a Danish population: frequency of a novel O allele defined as O2. Vox Sang. 67: 210-5.
27. Aki, K., Izumi, A. and Hosoi, E. (2012). The evaluation of histo-blood group ABO typing by flow cytometric and PCR-amplification of specific alleles analyses and their application in clinical laboratories. Med. Invest. 59: 263-297.
13. Al-AMeri , Q. M. A.; Zaidan, H. K.; Al-Saadi , A. H. and Ewadh, M. J.(2012).Genotyping of forensic DNA sample, determining ABO blood group. I.J.A.B.R., 2(1): 72-76.
14. Nader, M. I.; AL-Thwani, A. N.; Mohammed, A. K. and Omar, A. J. (2012). genotyping of the ABO blood group system in iraq population using PCR-RFLP. Iraqi J. Biotech. 11(2): 464-474.
15. Fukmori, Y.; Ohnoki, S.; Shibata, H. and Nishimukai, H. (1996). Suballeles of the ABO blood group system in a Japanese population. Hum. Hered. 46: 85.
16. Watanabe, G.; Umetsu, K.; Yuasa, I. and Suzuki, T. (1997). Amplified product length polymorphism (APLP): a novel strategy for genotyping the ABO blood group. Hum. Genet. 99: 34.
17. Kang, S. H.; Fukmori, Y. and Ohnoki, S. ( 1997). Distribution of ABO genotypes and allele frequencies in a Korean population. J. Hum. Genet. 42: 331.
18. Yip, S. P. (2000). Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles. J. Blood. 95: 1487-1492.
19. Bandyopadhyay, A. (1994).A Study on blood group and serum proteins in bengalee population of Calcutta, India. Anthropol Anz. 52:215-219.
20. Yip, S. P.; Yow, M. C and Lewis, W. H (1995). DNA Polymorphism at The ABO Locus in The Chinese Population of Hong Kong. Hum. Hered. 45: 266-271.
21. Omotade, O. O.; Adeyemo, A. A.; Kayode, C. M.; Falade, S. L.; Ikpeme, S(1999). Gene Frequencies

## Genotyping Of ABO gene In Iraqi Population Sample By Using PCR-RFLP Technique

Qabas H. Alawee, Louay M. Abdou, Saad M. AL-Nida

E.mail:

### Abstract

The aim of this study was the molecular detection of ABO gene and identify the patterns of alleles in Iraqi population sample. The study consisted of 100 unrelated individuals who appear to be healthy. The blood samples were used for detecting of blood groups and genotyping of ABO gene allele by using PCR-RFLP technique. The DNA was extracted by using extraction kit which gave relatively high yield concentration (40- 110 ng/ $\mu$ l), And purity within the optimal range. DNA concentration was adjusted to the proper concentration of PCR reaction. ABO gene was amplified by using two sets of specific primers for ABO locus with required alleles. Two separate segments of the glycosyltransferase gene containing nucleotide 261 in exon 6 and nucleotide 703 in exon 7 of ABO gene were amplified. The first set was used for the amplification of 468bp DNA fragment, Which contain the nucleotide 261. The second set was used to amplify 298bp DNA fragment, Which contain the nucleotide 703. Digestion products were run on 2% agarose gel, All fragments were compared with DNA ladder and there sizes were determined. The electrophoresis patterns of 100 samples showed that ABO genotypes were 5(4.0218%) AA, 23(23.9782%) AO, 2(3.3191%) BB, 24(22.6809%) BO, 8(8%) AB and 38(38%) OO. The O<sup>2</sup> allele was encountered in this study. The study also showed that there is no difference when comparing the Phenotype with the Genotype.