Archive of SID

مطالعه توزیع فراوانی آلل‌های یک منطقه کوتاه تکرار شونده STR در ژنوم انسانی بنام HUM.CSF1PO در جمعیت ایرانی

سیما آشوری، کارشناس ارشد بیوتکنولوژی ملکولی - دکتر سیروس زینلی، دکترای ژنتیک انسانی - دکتر نادر مقصودی، دکترای سلولی- ملکولی - بابک عظیمی فر، کارشناس ارشد ژنتیک انسانی - دکتر هادی نمازی، دکترای علوم آزمایشگاهی

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱۲ تاریخ پذیرش:۸۸/۶/۲۵

چکیـده

DNA Typing در حـال حاضر حساسـترین و دقیقترین روش شـناخته شـده جهت تعییـن هویت اشـخاص اسـت. هدف از این تحقیـق، تعیین فراوانی آلل‌هـای جایگاه ژنی[1] HUM.CSF1PO از مناطق کوتاه تکرار شـونده ژنوم انسـانی یا STR[2] در جامعه ایرانی و تعیین قابلیت آنها در تعیین هویت افراد است.

توزیع فراوانی آلل‌های مارکر STR مذکور در ۱۰۰ نفر افراد غیر خویشاوند، از خانواده‌های مختلف ایرانی، مورد بررسی قرار گرفت. پس از تکثیر منطقه حاوی مارکر فوق توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز[3](PCR) محصولات PCR آللهای مختلف برای هر محل توسط الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید جدا شد.

برای جایگاه ژنی HUM.CSF1PO هفت آلل شناسـایی شـد. هتروزیگوسیتی مشاهده

1. locus
2. Short Tondemly Repeat
3. Polymerase Chain Reaction

www.SID.ir

Archive of SID

شـــده آن بـــرای ۰/۶۳۸۳۰، (DP[1]) برابـــر ۰/۸۶۲۴۲ و(PE[2]) برابر ۰/۴۴۷۹۲ بود. مقایســـه فراوانی ژنوتیپ‌های مشـــاهده شـــده و ژنوتیپ‌های مورد انتظار از طریق آزمون اســـتاندارد کای اســـکوئر[3]، دال بر تبعیت پراکندگی ژنوتیپ‌های مشـــاهده شـــده از قانون هاردی‌واینبرگ بود. همچنین برای اولین بار شاخص نردبانی بر اساس آلل‌های یافته شده در دو جایگاه مذکور برای جمعیت بومی ایران تهیه گردید.

از نتایج این تحقیق، می‌توان در تعیین هویت افراد و اجساد مجهول الهویه و تعیین ابوت(TP[4]) استفاده کرد.

کلید واژه‌ها:

توالی تکرارشـــونده موجود در پروتوانکوژن انســـانی(CSF۱PO)، منطقه کوتاه تکرار شونده ژنوم انسانی(STR)، واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR)، آلل، ژنوتیپ، کروموزوم.

نشانی نویسنده مسؤول:

خیابان فردوسی، خیابان نوفل لوشاتو، مرکز تشخیص هویت ناجا - آزمایشگاه بیولوژی تلفن ۰۲۱-۷۳۰۴۶۰۸۰

مقدمـــه

مناطق کوتاه تکرار شونده STR یا میکروستـــلایت‌ها[5]، سکانس‌هایی متشکل از ۶-۲ جفت باز هســـتند که بســـیار پلیمرف هســـتند و به فـــراوانی (تقریباً یک لوکوس در هر ده کیلو باز) در طول ژنوم انســـان یافت می‌شـــوند[۱]. اندازه کوچک این قطعات(۳۰۰bp») امکان بررسی آنها

1. Power of Discrimination
2. Power of Exclusion
3. χ-Square
4. Paternity testing
5. Microsatellites

www.SID.ir

Archive of SID

را از مقادیر بسیار ناچیز DNA و نمونه‌های تخریب شده فراهم می‌نماید. از این رو می‌توان از بررسی مناطق فوق به عنوان یک شیوه انتخابی حساس و دقیق در تعیین هویت اشخاص بهره جست[۲].

در تکثیر میکروستلایت‌ها با تکرارهای سه، چهار و پنج نوکلئوتیدی در مقایسه با انواع تکرارهای دو نوکلئوتیدی پدیده slipageو ایجاد باندهای stutter کمتر رخ می‌دهد، در نتیجه این میکروستلایت‌ها برای تعیین هویت مناسبتر هستند[۳].

طبق مطالعات انجام شده فراوانی آلل‌های STR، در نژادهای مختلف و حتی در مناطق جغرافیایی خاص، تفاوت‌هایی را نشان داده است، بنابراین بررسی هریک از لوکوس‌های STR در هر نژاد یا جمعیت خاص برای تفسیر صحت نتایج حاصل از انجام آزمایش‌های تعیین هویت به کمک STRو انجام محاسبات آماری مربوطه امری ضروری است. برای بهره گیری از فواید این فناوری نوپا در زمینه تشخیص افراد، ضروری است تا فراوانی آللی لوکوس‌های STR مختلف در جمعیت بومی کشور مورد بررسی قرار گیرند و باید تمامی این لوکوس‌ها برای انجام آزمایش‌های تعیین هویت استاندارد شوند.

در این تحقیق بر آن شدیم تا با یک مطالعه جامع علاوه بر راه اندازی و استاندارد کردن روش‌های مولکولی استفاده از لوکوس HUM.CSF۱PO، (توالی تکرارشونده ۴ نوکلئوتیدی ساده با واحد تکرار شونده STR، متشکل از نوکلئوتیدهای AGAT که برروی بازوی بلند کروموزوم ۵ و در پروتوانکوژن C-fms انسانی قرار دارد [۴]، فراوانی آللی و میزان کارایی این مارکر را در تشخیص هویت افراد نیز مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها

نمونه گیری به صورت تصادفی از ۱۰۰ نفر ایرانی غیر خویشاوند، انجام پذیرفت. تخلیص DNA به روش فنل کلروفرم انجام شد و سپس کیفیت DNA حاصل توسط ژل آگارز ۱٪ بررسی گردید. سپس محل یاد شده(HUM.CSF۱PO) در حجم ۲۵ میکرولیتر PCR شد. واکنشPCR متشکل از PCR Mix شامل ۱۰X PCR Buffer(شرکت TAPO-

www.SID.ir

Archive of SID

TILI روسیه)، primers(۱۰ pmol) و (Tag –Polymerase (۲u بود. PCR به وسیله ترموسایکلر Eppendorf در ۲۸ سیکل(Ċ° = ۶۴ Tanneling) و با پرایمرهای اختصاصی آن محل انجام شد. سکانس پرایمرها به قرار زیر بود:

CSF1PO Forward : 5'CCTGAGTCTGCCAAGGAGTAGC3'(AGAT Strand),

CSF1PO Reverse : 5'TTCTCAGATACTATCTCCTGGTGC3' (TCTA Strand**).**

پس از ارزیابی مقدماتی، کیفیت محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪، به مدت یک شبانه روز بـر روی ژل پلی‌آکریـل آمیـد ۸٪ (AcryAmid:BisAcryAmid ۲۹:۱)با ضخامت ۰/۵ میلیمتر، الکتروفورز شـد. سـپس ژل‌ها با نیترات نقره رنگ آمیزی شـد و آلل‌ها، تک به تک در مقایسـه با شـاخص نردبانی[1] آن(Allelic Ladderشرکت TAPOTILI روسیه)، شماره گذاری گردید.

تعیین ترادف[2] آلل‌های یافت شـده در جمعیـت مورد مطالعه ایرانی توسـط شـرکت Primm (کشور کره) صورت گرفت.

نتایج Sequence نمونه‌ها توسـط دو نرم افزار chromos (http://www.Technely-sium.com.au) و GeneRunner بررسی شد.

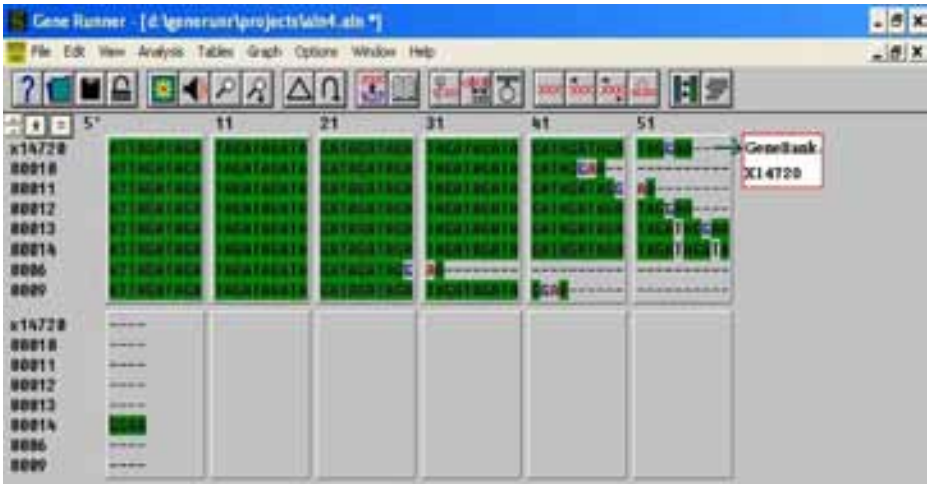
نتایج عینی

برای مارکر CSF۱PO با بررسی ۱۸۸ کروموزوم، تعداد ۷ آلل مختلف مشاهده شد(جدول ۱). پس از انجامSequence، توالی ۷ آلل یافت شده تعیین و با سکانس gi:X۱۴۷۲ازGenban مقایسه شد (تصویرشماره ۱).

1. Allelic Ladde
2. Sequencing

www.SID.ir

Archive of SID



تصویرشماره ۱ (مقایسه سکانس۷ آلل لوکوس CSF۱POدر سایت NCBI

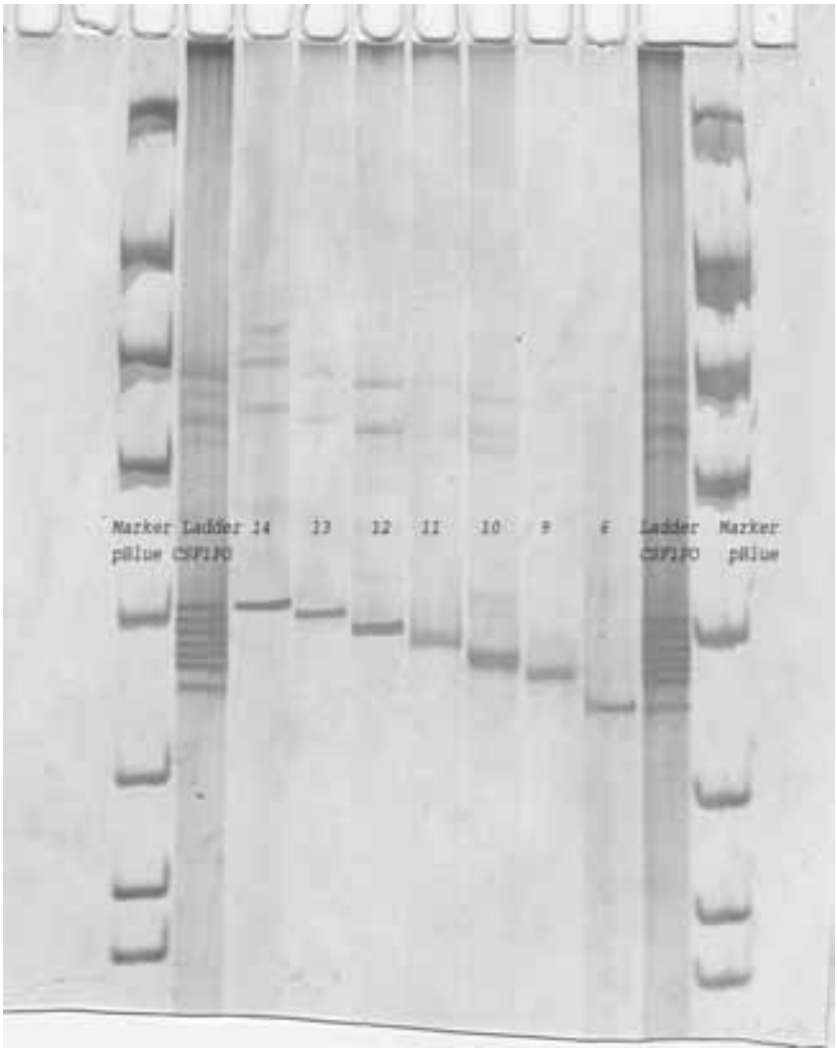
آلل‌ها بر حسب تعداد واحدهای تکرارشونده[1] شماره گذاری شدند. هیچ گونه آلل حد واسطی یافت نشد.

۷ آلل مختلف با توجه به تعداد توالی واحد تکرار شـونده از کوچکترین آلل(آلل ۶) به طول ۲۰۴ bp تا بزرگترین آلل(آلل۱۴) به طول bp۲۴۱ نامگذاری شد. نردبان آللی[2] جایگاه CS-F۱PO جمعیت ایرانی با ترکیب محصول PCR ۷ آلل یافت شده تهیه شد (تصویرشماره ۲).

1. repeating units
2. Allelic Ladder

www.SID.ir

Archive of SID



تصویرشماره ۲) انواع آلل‌های HUM.CSF۱PO به دست آمده در جمعیت ایران

آلل با ۶ و ۱۴ واحد تکرار شـونده (۰،۵۳٪ یا ۱/۱۸۸ آلل‌های بررسـی شده)، کمترین و آلل با ۱۱ واحد تکرار شـونده (۳۴،۰۴٪ یا ۶۴/۱۸۸ آلل‌های بررسـی شـده)، بیشـترین فراوانی را داشتند(جدول شماره ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

در بررسی فراوانی ژنوتیپ‌ها در جمعیت کشور، ژنوتیپ ۱۱-۱۰ با فراوانی ۲۰,۲۱٪ (۱۹/۹۴ ژنوتیپ‌های بررسی شده)، بیشترین درصد فراوانی و ژنوتیپ‌های ۱۱-۱۱،۶-۱۲،۹-۱۳،۹-۱۳و۱۱-۱۴ با فراوانی ۱,۰۶٪ (۱/۹۴ ژنوتیپ‌های بررسی شده)، کمترین درصد فراوانی را داشتند(جدول شماره ۱) .

هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این لوکوس ۰/۶۳۸۳۰، قدرت تفکیک سیستم(DP) ۰/۸۶۲۴۲ و قدرت سیستم در رد کردن(PE) ۰/۴۴۷۹۲ بود.

فراوانی ژنوتیپ‌های مشاهده شده و ژنوتیپ‌های مورد انتظار با فرض قانون هاردی واینبرگ، ($2pq+q^2+p^2=1$)، از طریق آزمون استاندارد کای اسکوئر مقایسه شد و تبعیت پراکندگی ژنوتیپ‌های مشاهده شده از قانون هاردی واینبرگ تأیید شد (χ^2=۱۲,۹۸, df=۱۵, P=۰,۹۹۰).

جدول شماره ۱

CSF 1PO				
Allelic Type	**Observed Fre. (%)**	**Genotype**	**Observed Fre. (٪)**	**Expect Fre٪**
۶	۱)٪۰,۵۳)	۱۰ / ۱۱	۱۹ (٪۲۰,۲۱)	٪۱۸,۴۷
۹	۴) ٪۲,۱۳)	۱۱ / ۱۲	۱۶ (٪۱۷,۰۲)	٪۲۱,۰۰
۱۰	۵۱) ٪۲۷,۱۳)	۱۲ / ۱۲	۱۳ (٪۱۳,۸۳)	٪۹,۵۲
۱۱	۶۴)٪۳۴,۰۴)	۱۰ / ۱۲	۱۲ (٪۱۲,۷۷)	٪۱۶,۷۴
۱۲	۵۸)٪۳۰,۸۵)	۱۱ / ۱۱	۱۲ (٪۱۲,۷۷)	٪۱۱,۵۹
۱۳	۹)٪۴,۷۹)	۱۰ / ۱۰	۸ (٪۸,۵۱)	٪۷,۳۶
۱۴	۱)٪۰,۵۳)	۱۲ / ۱۳	۳ (٪۳,۱۹)	٪۲,۹۵
جمع کل	۱۸۸)٪۱۰۰)	غیره*	۱۱ (٪۱۱,۶۹)	٪۱۲,۷۳
		جمع کل	۹۴ (٪۱۰۰)	٪۱۰۰

در جمعیت ایرانی (HUMCSF1PO) فراوانی آللی و ژنوتایپی لوکوس جدول شماره ۱ دارای آلل ۱۱ و نادرترین آلل‌ها دارای۶ و۱۴واحد تکرار شونده بود. CSF1PO شایعترین آلل داری نشان نداد. با مقادیر مورد انتظار قانون هاردی واینبرگ اختلاف معنی CSF1PO

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه فراوانی ژنوتایپی

*در سایت CSF۱PO ژنوتایپ‌های ۹,۱۱،۱۲,۱۱,۱۴،۱۳,۱۳،۹,۱۱و۶,۱۱دارای فراوانی ۱ و ژنوتایپ‌های ۹,۱۰،۱۰,۱۳و ۱۱,۱۳ دارای فراوانی ۲ هستند.

نتیجه گیری

از آنجا که لازمه به‌کارگیری یک مارکر ژنتیکی در بررسی‌های جنایی و تشخیص هویت، بررسی میزان انحراف نحوه توارث آن سیستم از رابطه تعادلی هاردی واینبرگ است، آزمون استاندارد کای اسکوئر در این سیستم برای جمعیت مورد بررسی انجام پذیرفت (جدول شماره۱).

در این سیستم اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین ژنوتیپ‌های مورد انتظار با فرض تعادل هاردی واینبرگ و ژنوتیپ‌های مشاهده شده وجود نداشت و این نشان دهنده قابل استفاده بودن مارکر فوق در بررسی‌های تعیین هویت است(χ^2=۱۲,۹۸, df=۱۵, P=۰,۹۹۰).

همچنین برای نمایش توان بالقوه این لوکوس در تشخیص هویت افراد، قدرت تفکیک سیستم(DP) و قدرت سیستم در رد کردن (PE)و هتروزیگوسیتی این منطقه محاسبه گردید. هتروزیگوسیتی به دست آمده برای این سیستم، نشان دهنده درصد بالای ژنوتیپ‌های هتروزیگوت در جامعه مورد مطالعه است که حاکی از ارزش کاربردی سیستم مورد نظر برای بررسی‌های تعیین هویت خواهد بود (جدول شماره۱).

Reference

[1]. Suzuki A., Maruno, A., Tahira T., Hayashi K. Polar altration of short tandem repeats (STRs) in mammalian cells Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis(2001). Mutation Research. 474,159-168.

[2]. Cynthia j.sprecher, Christoph puers. et al. General Apporoachto Analysis of Polymorphic Short Tandem Repeat Loci(1996). Biotech-

www.SID.ir

Archive of SID

niques. Mar-apri. 84-92.

[3]. Haug XY., Litt M. A study of the origin of shadow bands seen when typing dinucleotide repeat polymorphism by the PCR(1993). Hum Mol Genet. 2:411- 415.

[4]. Amorism A., GUSMAO L., Prata M.J. Population & formal genetics of the STRs HUMTPOX, HUMTHO1 & CSF1PO in forensic haemogenetics(1996). 486-488

www.SID.ir