



# طراحی، انتخاب و بهینه‌سازی توالی‌های تکراری کوتاه به منظور تشخیص بیماری‌های تک ژنی قبل از لانه‌گزینی

اصغر شایان‌نیا<sup>۱</sup>، سعید امانپور<sup>۲</sup>، سعیدرضا غفاری<sup>۳\*</sup>

۱- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود - دانشکده پزشکی - استادیار.

۲- دانشگاه علوم پزشکی تهران - دانشکده پزشکی - استادیار.

۳- مرکز جامع ژنتیک - مؤسسه پزشکی نسل امید.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۱۸

## چکیده

**مقدمه:** تکرارهای پشت سر هم کوتاه یا STR (Short tandem repeats) نشانگرهای پلی‌مورفیکی هستند که در سرتاسر ژنوم پراکنده شده‌اند و امروزه کاربردهای فراوانی در ژنتیک دارند. به‌عنوان مثال این نشانگرها در تهیه نقشه‌های ژنی، ترسیم درخت فیلو ژنی، پزشکی قانونی و تشخیص غیرمستقیم بیماری‌ها از طریق آنالیز پیوستگی مطرح هستند. یکی دیگر از کاربردهای مهم این نشانگرها در تشخیص قبل از لانه‌گزینی یا PGD (Preimplantation genetic diagnosis) می‌باشد. لذا با توجه به گستردگی کاربردهای STR و با توجه به تعداد زیاد این نشانگرها در سطح ژنوم، بایستی از بین هزاران STR موجود، چند STR مناسب را با توجه به نوع کاربرد انتخاب نمود.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش بیماری اتروفی عضلانی نخاعی به‌عنوان الگویی از یک بیماری تک ژنی انتخاب گردید، سپس نشانگرهای اطراف ژن آن جستجو گردید، از بین صدها نشانگر، ۵ نشانگر انتخاب گردید، طیف اندازه‌اللی برای ۵ نشانگر تعیین گردید، سپس انطباق چند تایی انجام شد و پرایمرهای موردنیاز طراحی گردید. در ادامه واکنش‌های PCR بهینه‌سازی شدند و بر روی محصولات PCR به دست آمده الکتروفورز موئنه انجام شد. **نتایج:** به‌منظور تسریع در امر بهینه‌سازی یک مجموعه نشانگر STR برای کاربردهای مختلف، در این مطالعه یک استراتژی کلی ارائه گردید تا در کمترین زمان ممکن بتوان از وجود یک مجموعه STR مناسب استفاده نمود. به‌عنوان یک الگو، در این مطالعه کلیه مراحل طراحی و توسعه یک مجموعه نشانگر STR برای کاربرد در تشخیص قبل از لانه‌گزینی بیماری اتروفی عضلانی نخاعی یا SMA (Spinal muscular atrophy) آورده شده است.

**نتیجه‌گیری:** از استراتژی ارائه شده در این پژوهش می‌توان ظرف مدت زمان نسبتاً کوتاه و با هزینه کم، یک مجموعه نشانگر STR برای کاربردهای مشابه طراحی نمود.

**واژه‌های کلیدی:** تکرارهای پشت سر هم کوتاه، تشخیص قبل از لانه‌گزینی، اتروفی عضلانی نخاعی.

\*نویسنده مسئول: تهران - مؤسسه نسل امید - مرکز جامع ژنتیک، تلفن: ۰۲۱-۸۸۷۷۹۰۰۷، Email: saeed@ghaffari.org

**ارجاع:** شایان‌نیا اصغر، امانپور سعید، غفاری سعیدرضا. طراحی، انتخاب و بهینه‌سازی توالی‌های تکراری کوتاه به منظور تشخیص بیماری‌های تک ژنی قبل از لانه‌گزینی. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۴؛ ۱۰(۱): ۳۱-۳۶.

## مقدمه

تکرارهای پشت سر هم کوتاه یا STR توالی‌های DNA هستند که به صورت یکنواخت در سر تا سر ژنوم انسان پراکنده شده‌اند و به راحتی قابل PCR شدن هستند. لوکس‌های STR نشانگرهای بسیار پلی مورفیکی هستند، زیرا موتیف واحد تکرار شونده می‌تواند بین ۲-۷bp متغیر باشد (۱-۳). به همین دلیل امروزه کاربردهای متعددی در ژنتیک پیدا کرده‌اند. به عنوان مثال این نشانگرها به دلیل پلی مورفیسم و هتروزیگوسیتی بالایشان به عنوان ابزاری نیرومند در تهیه نقشه‌های ژنی، پزشکی قانونی، تشخیص غیرمستقیم بیماری‌ها از طریق آنالیز پیوستگی مطرح هستند (۴-۷). از دیگر کاربردهای مهم نشانگرهای STR در تشخیص قبل از لانه‌گزینی یا PGD می‌باشد. PGD در اصل به عنوان روش جایگزین برای تشخیص قبل از تولد یا PND (Prenatal diagnosis) مطرح می‌باشد و روشی است که امکان بررسی ژنتیکی جنین‌ها را قبل ورود به رحم و شروع حاملگی فراهم می‌سازد. بدین منظور از جنین‌های به دست آمده به روش لقاح آزمایشگاهی یا IVF (In vitro fertilization) یک یا دو سلول بیوپسی می‌شود و از نظر بیماری ژنتیکی خاصی مورد بررسی قرار می‌گیرد. اگر سلول بیوپسی شده مبتلا نباشد، آنگاه می‌توان نتیجه‌گیری نمود که جنین مربوطه نیز عاری از بیماری ژنتیکی است. لذا جنین سالم به رحم مادر منتقل می‌گردد و حاملگی آغاز می‌شود. PGD همواره با IVF همراه است و برای زوجین بارور و نابارور به کار می‌رود (۷-۱۲).

در PGD به روش ملکولی به دلیل محدود بودن مقدار DNA موجود در سلول‌های دیپلوئید ممکن است مشکلاتی ایجاد شود که اصولاً در تشخیص به صورت معمول ممکن است، مطرح نباشند. از جمله مشکلات PCR تک سلول می‌توان به افزایش آلودگی PCR، عدم تکثیر و تکثیر نشدن یکی از آل‌ها در یک سلول دیپلوئید را نام برد. برای غلبه بر این مشکلات از نشانگرهای STR استفاده می‌شود (۱۳).

در هر یک از موارد کاربرد، نیاز به یک یا تعداد بیشتری نشانگر STR وجود دارد که قبل از استفاده، بایستی نشانگرهای مورد نیاز را از میان صدها نشانگر STR انتخاب و بهینه‌سازی نمود. به منظور دسترسی به یک مجموعه نشانگر خوب جهت کاربردهای مختلف، بایستی از یک استراتژی جهت این امر استفاده گردد تا به راحتی و در کمترین زمان ممکن بتوان یک مجموعه نشانگر STR مناسب را متناسب با کاربرد مورد نظر طراحی و بهینه‌سازی نمود.

هدف این مطالعه معرفی یک استراتژی کلی جهت طراحی، توسعه و ایجاد یک مجموعه نشانگر برای کاربردهای مختلف به صورت جزء به جزء می‌باشد. برای این منظور و به عنوان نمونه، کلیه مراحل انجام کار به صورت مرحله به مرحله از انتخاب نشانگرها، طراحی پرایمرها و رنگ‌های فلورسنت، الکتروفورز موئینه، نرم‌افزارها و وب سایت‌های

مورد نیاز برای انجام PGD بیماری SMA با استفاده از یک مجموعه ۵ تایی از نشانگرهای قرار گرفته در اطراف ژن SMN1 آورده شده است.

## مواد و روش‌ها

به منظور انتخاب چند STR مناسب از بین تعداد بسیار زیادی STR، از وب سایت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. معیارهای گزینش نشانگرهای STR برای انجام یک پروژه PGD در ذیل آورده شده است: STRهای انتخاب شده بایستی در طرفین ژن مورد نظر قرار گرفته باشند، تک لوکوسی بوده، چند لوکوسی نباشند، فاصله آنها تا ژن مورد نظر زیاد نباشد تا امکان ردیابی ژن بیماری از طریق آنالیز پیوستگی امکان‌پذیر باشد و براساس بررسی متون انجام شده، از هتروزیگوسیتی بالایی برخوردار باشند.

پس از انتخاب نشانگرها، توالی نوکلئوتیدی لوکوس‌های STR دانلود شدند. توالی‌های به دست آمده قبل از طراحی پرایمرها، با استفاده از یک نرم‌افزار ویژه، انطباق چند تایی شدند (۱۴). تعداد آل‌ها و طیف اندازه آنها با بررسی متون مربوطه برآورد گردید و مارکرهای همپوشان به منظور عدم تداخل سیگنال‌های به دست آمده، با استفاده از رنگ‌های فلورسنت متفاوت نشان‌دار شدند. در ادامه، پرایمرهای مورد نیاز طراحی شدند (۱۵). قبل از سفارش ساخت، پرایمرهای طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار بلاست پرایمر آنالیز شدند.

برای راه‌اندازی و بهینه‌سازی واکنش‌های PCR از مجموعه بافرهای بهینه‌سازی ساخت شرکت Roch (Roche, Mannheim, Germany) استفاده گردید. استفاده از این مجموعه بافری امکان بهینه‌سازی غلظت از قبیل DMSO، ژلاتین و گلیسرول، شرایط PCR کاملاً بهینه‌سازی گردید. برای راه‌اندازی و استقرار شرایط دمایی واکنش‌های PCR از روش PCR گرادیان استفاده گردید. واکنش‌های PCR که باروش گرادیان بهینه نشدند، با استفاده از روش Touchdown (TD-PCR) PCR بهینه سازی شدند (۱۶).

پس از انجام PCR فلورسنت لوکوس‌های STR، از الکتروفورز موئینه برای شناسایی و تعیین ژنوتیپ نشانگرهای STR استفاده شد. پرایمرها با رنگ‌های فلورسنت نشان‌دار شدند. برای آنالیز نتایج از نرم‌افزارهای Genemapper ID v4.0 software و Peak scanner v1 software استفاده گردید.

## نتایج

در این مطالعه بیماری SMA به عنوان نمونه انتخاب گردید. این بیماری الگوی وراثت تک ژنی دارد و ژن مربوطه آن روی بازوی بلند کروموزوم ۵ قرار دارد. پس از انتخاب بیماری مراحل زیر برای طراحی، انتخاب و بهینه‌سازی نشانگرهای STR اطراف ژن آن انجام شد.

اطلاعات در دسترس نبود، اندازه پرایمرها در زمان طراحی و براساس محل قرارگیری پرایمرها تخمین زده شد و ترجیحاً برای اجتناب از همپوشانی با ال‌های سایر نشانگرهای STR از رنگ فلورسانت متفاوتی استفاده گردید.

در این مطالعه نشانگرهای D5S610 و D5S629 با رنگ فلورسانت FAM، D5S1417 و D5S1408 با HEX، و نشانگر D5S637 با FAM نشان‌دار شدند. شکل ۳ چیدمان و موقعیت آمپلیکون‌های ۵ نشانگر مورد استفاده در این مطالعه را نشان می‌دهد. نام نشانگرها در داخل مستطیل‌های که به رنگ ماده فلورسنت مورد استفاده هستند آورده شده است. طیف الی و اندازه ال‌ها در این شکل نشان داده شده است. نشانگرهایی که با هم همپوشانی دارند با رنگ‌های فلورسانت متفاوتی نشان‌دار شده‌اند.

برای طراحی پرایمرها از نرم‌افزار primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) استفاده گردید. برای طراحی هر یک از پرایمرها اندازه یک ال متوسط در نظر گرفته شد و برای نرم‌افزار تعریف گردید. مثلاً برای مارکر D5S1417 براساس بررسی متون انجام شده اندازه بزرگترین ال و کوچکترین ال گزارش شده باهم جمع شد، سپس بر عدد ۲ تقسیم گردید و این عدد به‌عنوان طول یک ال متوسط در نظر گرفته شد.

قبل از سفارش ساخت، پرایمرهای طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار بلاست پرایمر آنالیز شدند تا از عدم وجود جایگاه‌های آلترناتیو اتصال پرایمر، غیر از جایگاه اختصاصی موردنظر اطمینان حاصل شود. جهت تسریع در روند راه‌اندازی و بهینه کردن شرایط PCR بافرهای راه‌اندازی و استقرار تجاری استفاده گردید. در این مطالعه PCR نشانگرهای STR با استفاده از بافرهای بهینه‌سازی PCR شرکت Roche بهینه‌سازی شدند. این مجموعه ۱۶ بافری (از A تا P)، غلظت‌های  $MgCl_2$  و PH متفاوت داشتند. علاوه بر این از تعدادی مواد افزاینده PCR نیز به‌منظور راه‌اندازی و استقرار بیشتر استفاده گردید. در مرحله اول برای هر نشانگر STR ابتدا واکنش PCR انجام شد که تفاوت این ۱۶ واکنش PCR در نوع بافر مورد استفاده بود. از بین این ۱۶ واکنش هر کدام که باند قوی‌تر و اختصاصی‌تری ایجاد می‌نمود، انتخاب گردید و سپس در فاز دوم راه‌اندازی و استقرار از افزاینده‌های PCR مانند گلیسرول، ژلاتین، DMSO،  $NH_4SO_4$  استفاده گردید. شرایط PCR بهینه‌سازی شده برای هر یک از ۵ STR در جدول ۱ و شرایط دمایی آنها در جدول ۲ آورده شده است. به‌عنوان نمونه روند بهینه‌سازی نشانگر D5S1408 در شکل ۴ نشان داده شده است. از بین بافرهای مورد استفاده بافر M قوی‌ترین باند و کمترین اسمیر را ایجاد نموده است و به این ترتیب این بافر برای انجام PCR این نشانگر انتخاب شد در ادامه

پس از انتخاب بیماری نقشه ژنتیکی ناحیه 5q13 ژنوم که ژن بیماری در آنجا قرار گرفته است، تهیه شد و سپس با استفاده از آن موقعیت ژن موردنظر و STRهای اطراف ژن مشخص گردید.

در این مطالعه از وب سایت UCSC (<http://genome.ucsc.edu>) برای تعیین نقشه ژنتیکی ژن موردنظر و نشانگرهای STR آن استفاده گردید. برای این منظور ابتدا در قسمت جستجوی مرورگر ژنوم UCSC، نام ژن موردنظر کاوش شد و سپس در قسمت تنظیمات گزینه نمایش STRها علامت‌دار گردید. نتیجه جستجو به‌صورت شکل شماتیکی از یک کروموزوم نمایش داده شد که موقعیت ژن موردنظر روی کروموزوم مشخص شده و شماره نوکلئوتیدها هم نمایش داده شده است. نتیجه جستجو تعداد زیادی STR می‌باشد که در دو طرف ژن SMN پراکنده شده‌اند. لازم به ذکر است، در این مرورگر از نام‌های آلترناتیو برای برخی از STRها استفاده شده است. مثلاً AF265WF5 نام دیگر مارکر D5S629 و AFM281YH9 نام دیگر مارکر D5S637 می‌باشد. از بین نشانگرهای STR نمایش داده شده بر اساس معیارهای ذکر شده در قسمت مواد و روش‌ها، ۵ مارکر D5S1417، D5S637، D5S629، D5S610 و D5S1408 از بین صدها مارکر موجود انتخاب شدند. شکل ۱ ترتیب و فاصله نسبی نشانگرها از ژن SMN1 نشان می‌دهد. از این پنج مارکر دوتای آن در پایین دست و سه تای دیگر در بالا دست ناحیه SMN قرار داشتند.

توالی نوکلئوتیدی لوکوس‌های STR از طریق سایت Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) به‌دست آمد. در این وب سایت توالی‌های نوکلئوتیدی مختلفی برای هر STR وجود داشت که یکی از این توالی‌ها، توالی رفرنس بود. علاوه بر توالی رفرنس سایر توالی‌ها نیز دانلود شدند. توالی‌ها به‌دست آمده قبل از طراحی پرایمرها، با استفاده از یک نرم‌افزار تحت وب انطباق چندتایی شدند. به این ترتیب نواحی دارای چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی یا SNP (Single nucleotide polymorphism) مشخص گردید. با استفاده از نتایج حاصله از انطباق چندتایی، از طراحی پرایمرها در قسمت‌هایی که SNP وجود دارد، اجتناب گردید.

نتایج انطباق چندتایی در شکل ۲ برای یکی از نشانگرهای STR طراحی شده در پروژه PGD برای SMA نشان داده شده است. در این شکل، ۶ توالی مختلف با هم انطباق چندتایی شده‌اند. همان‌طوری که در شکل مشخص است، در محل قرارگیری پرایمرها، تمام توالی‌های نوکلئوتیدی یکسان بوده و SNP وجود ندارد، بنابراین پرایمرهای طراحی شده قادرند تمام ال‌های نشان داده شده را تکثیر نمایند.

تعداد ال‌ها و طیف اندازه آنها (تعیین بزرگترین و کوچکترین ال هر STR) با بررسی متون مربوطه برآورد گردید. در مورد نشانگرهایی که این

همچنین در این مطالعه تنها از نشانگرهای STR واقع در ناحیه 5q13 استفاده گردید. بهتر است برای انجام PGD از سایر نشانگرهایی که روی کروموزومهای دیگر قرار دارند، نیز استفاده شود. استفاده از این نشانگرها می‌تواند در تعیین پلوییدی کروموزومهای مربوطه و تعیین آلودگی و در نتیجه در افزایش میزان موفقیت PGD مؤثر باشند.

در این مطالعه ۵ نشانگر STR که براساس مطالعات قبلی از هتروزیگوسیتی نسبتاً بالایی برخوردار بودند استفاده گردید. ولی با وجود این هتروزیگوسیتی نسبتاً بالایی همچنان تضمین‌کننده گویا بودن و کاربردی بودن نشانگرها در تمام خانواده‌ها نمی‌باشند. بنابراین توصیه می‌شود که تعداد نشانگرهای بیشتری برای هر بیماری قبل از انجام PGD مورد بررسی قرار گیرند تا در صورت گویا نبودن برخی از نشانگرهای STR بتوان از موارد جایگزین استفاده نمود.

از نشانگرهای STR این مطالعه می‌توان علاوه بر استفاده در تشخیص قبل از لانه‌گزینی، در تشخیص قبل از تولد هم استفاده نمود. یکی از مشکلات روش‌های تشخیصی قبل از تولد احتمال آلودگی نمونه گرفته شده از جنین با بافت مادر می‌باشد. لذا با استفاده از این نشانگرها می‌توان منشاء بافت گرفته شده و آلوده بودن نمونه جنینی با بافت ملاری را شناسایی نمود.

## References

- Hammond HA, Jin L, Zhong Y, Caskey CT, Chakraborty R. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *Am J Hum Genet* 1994;55:175-89.
- Hwa HL, Chang YY, Lee JC, Yin HY, Tsenq LH, Su YN, et al. Fourteen non-CODIS autosomal short tandem repeat loci multiplex data from Taiwanese. *Int J Legal Med* 2010;125:219-26.
- Demeter SJ, Kelemen B, Szekely G, Popescu O. Genetic variation at 15 polymorphic, autosomal, short tandem repeat loci of two Hungarian populations in Transylvania, Romania. *Croat Med J* 2010;51:515-23.
- Kee BP, Lian LH, Lee PC, Lai TX, Chua KH. Genetic data for 15 STR loci in a Kadazan-Dusun population from East Malaysia. *Genet Mol Res* 2011;10:739-43.
- Agrawal S, Khan F. Reconstructing recent human phylogenies with forensic STR loci: a statistical approach. *BMC Genet* 2005;6:47.
- Agrawal S, Khan F, Talwar S, Nityanand S. Short tandem repeat technology has diverse applications: individual identification, phylogenetic reconstruction and chimerism based post haematopoietic stem cell transplantation graft monitoring. *Indian J Med Sci* 2004;58:297-304.
- Matsushita H, Nakamura S, Nagai T, Sugie H, Furukawa M, Kurihara K. Genetic analysis of 18 STR loci on the X chromosome in a Japanese population. *International Congress Series* 2003;1239:3313.
- Nouri K, Zamani M, Modarressi MH, Korzebor A. Statistical analysis of six STR loci located in MHC region in Iranian population for preimplantation genetic diagnosis. *Int J Immunogenet* 2007;34:441-3.
- Fiorentino F, Kahraman S, Karadayi H, Biricik A, Sertyel S, Karlikaya G, et al. Short tandem repeats haplotyping of the HLA

بهینه سازی بیشتر این نشانگر از تقویت‌کننده‌های PCR استفاده شد. جزئیات شرایط واکنش در جدول ۱ و ۲ آورده شده است.

شکل ۵ نمونه‌ای از یک الکتروفورگرام را در فردی که برای هر پنج نشانگر STR هتروزیگوت است، نشان می‌دهد. در قسمت بالای هر پیک نام نشانگر نوشته شده است محور افقی اندازه پیک‌ها را بر حسب جفت باز (bp) مشخص می‌کند و محور عمودی مقدار محصول PCR را بر حسب RFU (Relative fluorescence units) نشان می‌دهد.

## بحث

هدف از این مطالعه ارائه و معرفی یک استراتژی کلی جهت طراحی، توسعه و ایجاد یک مجموعه نشانگر برای کاربردهای مختلف به صورت مرحله به مرحله می‌باشد. هر چند در مطالعات متعددی از نشانگرهای STR استفاده شده است و در برخی از آنها تا حدودی به مراحل طراحی و بهینه‌سازی آنها اشاره گردیده است. اما مطالعه جامعی که کلیه مراحل را برای طراحی و بهینه‌سازی یک مجموعه نشانگر STR برای انجام PGD یک بیماری تک ژنی به طور کامل از ابتدا تا انتها ذکر کرده باشد، یافت نگردید. در این مطالعه، کلیه مراحل انجام کار به صورت مرحله به مرحله از انتخاب نشانگرها، طراحی پرایمرها و رنگ‌های فلورسنت، الکتروفورز کاپیلاری نرم‌افزارها و وب سایت‌های مورد نیاز ذکر گردیده است. برای این منظور کلیه مراحل با استفاده از یک مجموعه ۵ تایی از نشانگرهای اطراف ژن SMN1 نشان داده شده است. به طوری که با استفاده از مراحل ذکر شده و وب سایت‌های معرفی شده یک پژوهشگر بتواند به آسانی و ظرف مدت زمان کوتاهی و با صرف هزینه‌های مالی کمتر، مجموعه نشانگرهای STR را برای پروژه مورد نظرش طراحی نماید.

استفاده از نشانگرهای STR در PGD بیماری‌های ژنتیکی می‌تواند مزیت‌های مختلفی داشته باشد. از جمله با استفاده از این نشانگرها می‌توان از طریق آنالیز پیوستگی کروموزوم به ارث رسیده از پدر و مادر به جنین را مشخص و به صورت غیرمستقیم ژنوتیپ جنین را تعیین نمود. فلورنتینو و همکاران از این روش برای تعیین هاپلوتایپ ناحیه HLA استفاده کرده‌اند (۱۳). علاوه بر این در مطالعات متعددی از جمله در دو مطالعه فیگوریا و هلانی از نشانگرهای STR برای تعیین ADO آلودگی با DNA خارجی و نیز تعیین پلوییدی استفاده شده است.

در این پژوهش PCR لوکوس‌های STR به صورت تک تک (Singleplex) انجام شد و در ادامه محصولات PCR پنج نشانگر با هم مخلوط شدند و سپس به صورت همزمان الکتروفورز مویینه انجام شد. انجام PCR به صورت تکی مستلزم صرف زمان و هزینه بیشتری نسبت به انجام PCR چند تایی (Multiplex) می‌باشد. بنابراین توصیه می‌شود که در مطالعات آتی از ابتدا پرایمرها طوری طراحی شوند که قابلیت لازم برای انجام واکنش PCR به صورت چندتایی را داشته باشند.

11. Egozcue J, Santalo J, Gimenez C, Perez N, Vidal F. Preimplantation genetic diagnosis. *Mol Cell Endocrinol* 2000;166:21-5.
12. Wells D, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med* 2001;7:23-30.
13. Thornhill AR, Snow K. Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis. *J Mol Diagn* 2002;4:11-29.
14. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res* 1988;16:10881-90.
15. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, editors. *Bioinformatics methods and protocols. Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press;1999. p.365-86.
16. Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 2008;3:1452-6.
- region in preimplantation HLA matching. *Eur J Hum Genet* 2005;13:953-8.
10. Kuliev A, Verlinsky Y. Place of preimplantation diagnosis in genetic practice. *Am J Med Genet A* 2005;134A:105-10.

Archive of SID



## A Comprehensive Approach to Design, Selection and Optimization of Short Tandem Repeat Used in Preimplantation Genetic Diagnosis of Single Gene Disorders

AsgharShayannia (Ph.D.)<sup>1</sup>, Saeed Amanpour (Ph.D.)<sup>2</sup>, Saeed Reza Ghaffari (Ph.D.)<sup>3\*</sup>

1- Dept. of Basic Sciences, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

2- School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Comprehensive Genetic Center, Hope Generation Foundation, Tehran, Iran.

Received: 17 March 2014, Accepted: 8 May 2014

### Abstract:

**Introduction:** Short tandem repeats (STRs), are DNA sequences that are uniquely scattered throughout the human genome. These markers are ideal candidates for diverse usages including gene mapping, phylogenetic reconstruction, forensic medicine and indirect diagnosis of genetic disorders. Another application of STRs is in PGD (Preimplantation genetic diagnosis) for single gene disorders. Due to wide applications and also huge number of STR markers interspersed in human genome, these markers must be selected among thousands upon thousands markers based on special applications.

**Methods:** In this study, SMA (Spinal muscular atrophy) was used as a model of monogenic disorders. Then STR markers flanking to SMA gene region was searched. Among the hundreds of markers, 5 STRs were selected. The size ranges of the STR markers were determined. A sequence alignment was then performed. Primers were designed, PCR reactions were optimized. PCR products were then separated by capillary electrophoresis.

**Results:** In order to accelerate optimization of a set of STR markers for divers applications, in this study a comprehensive strategy for design, selection and optimization of STR marker was presented. For simplicity, all steps were performed on 5 STR loci that are located in SMA region. These can be applied for PGD of SMA.

**Conclusion:** The strategy presented in this study can be used as an example to design a set of STR marker for similar application in a short time and with a low cost.

**Keywords:** Short tandem repeat (STR); Preimplantation genetic diagnosis (PGD); Spinal muscular atrophy (SMA).

Conflict of Interest: No

\*Corresponding author: S.R. Ghaffari, Email: saeed@ghaffari.org

**Citation:** Shayannia A, Amanpour S, Ghaffari SR. A comprehensive approach to design, selection and optimization of short tandem repeat used in preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. Journal of Knowledge & Health 2015;10(1):31-36.