مقاله پژوهشی

بهینه سازی روش I–PEP و تأثیر آن بر نتایج حاصل از تعیین طرح واره با استفاده از تعداد اندک نسخه های DNA

زهرا ظفری* - فائزه رحیمی نژاد ** - سوده کیان فر - آمنه بندهی سرحدی** - عاطفه شیرکوند*** - نجات مهدیه****- محمدرضا مشایخی***** - اکرم قاسمی****** - دکتر محمود تولایی******* - دکتر سیروس زینلی********

* دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه خاتم، تهران.
** کارشناس مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران.
*** دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه رازی کرمانشاه.
**** دانشجوی دکتری ژنتیک پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
***** دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.
****** دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم، جهرم.
******* دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی.
******** دکترای تخصصی ژنتیک انسانی، دانشیار انستیتو پاستور ایران، بخش تحقیقات بیوتکنولوژی.

چکیده

مقدمه: تعیین طرح واره‌ی DNA (DNA Profiling) یکی از قدرتمندترین و قابل اعتمادترین ابزارهای تشخیص هویت در پزشکی قانونی است. هرگاه مقدار DNA حاصل از اجساد و بقایای مواد زیستی موجود در صحنه‌ی جرم کم باشد (کمتر از ۱۰۰پیکوگرم یا ۳۳ نسخه)، تعیین طرح واره با مشکل مواجه خواهد شد. تکثیر تعداد اندک نسخه‌های DNA، با استفاده از روش‌های تکثیر کلی ژنوم (WGA) مانند روش خاص I–PEP PCR (Preamplification Improved Primer Extension) امکان پذیر است.

روش‌ها: با ارزیابی شیوه های موجود PEP و I–PEP بر روی رقت های متفاوت DNA، تلاش در جهت دستیابی به روش بهینه ای که با کمترین مقدار DNA الگو، طرح واره ای قابل اعتماد را ارایه دهد، انجام گرفت. این روش شامل نوعی PCR است که از پرایمرهای ۱۵ نوکلئوتیدی تصادفی استفاده می‌شود. به دنبال این روش، تکثیر اختصاصی DNA با پرایمرهای اختصاصی مختلف انجام شد.

یافته‌ها: پس از بهینه سازی روش I–PEP و تکثیر کلی ژنوم با روش جدید، که ما آن را KI–PEP PCR نامیدیم، تعیین طرح واره با تنها ۲/۵ پیکوگرم از DNA اولیه صورت گرفت. هم چنین با استفاده از پرایمر های اختصاصی، قطعه ای به طول ۱۱۰۶ باز به راحتی تکثیر شد.

نتیجه گیری: روش KI–PEP نه تنها توانایی تکثیر مقادیر کم DNA را دارد، بلکه با توجه به طول STR های موجود در کیت های مرسوم تشخیص هویت، طول مناسب برای تعیین طرح واره را نیز ایجاد می کند.

واژگان کلیدی: پزشکی قانونی؛ تشخیص هویت؛ تعیین طرح واره‌ی DNA؛ تکثیر کل ژنوم (WGA)؛ KI–PEP PCR

وصول مقاله: ۱۳۸۹/۲/۱۰ تأیید مقاله: ۱۳۸۹/۸/۱۵

نویسنده پاسخگو: تهران، خیابان ولی عصر، بالاتر از فاطمی، خیابان مجلسی، پلاک ۴۱، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر. کدپستی: ۱۵۹۵۶۴۵۵۱۳

zeinali@kawsar.ir

مقدمه

تعیین طرح واره‌ی DNA[1]، یکی از قابل اعتمادترین روش‌های تشخیص هویت در مسایل جنایی و پزشکی قانونی است. در این روش، از DNA حاصل از اجساد و بقایای مواد زیستی موجود در صحنه‌ی جرم، برای شناسایی مجرمین، تعیین هویت اجساد گمشده یا قربانیان به جا مانده از حوادث جمعی استفاده می‌شود و انواع مشخصی از تکرارهای کوتاه پشت سرهم(STR) [2] موجود در ژنوم انسان با استفاده

1 - DNA profiling or DNA fingerprinting or DNA typing
2 - Short Tandem Repeat

Archive of SID

www.SID.ir

از کیت‌های تجاری مرسوم در تعیین هویت، تکثیر می‌شوند (۱،۲). این کیت‌ها معمولاً به ۲۰۰ پیکوگرم تا ۳-۲ نانو گرم DNA اولیه نیاز دارند (۳)، اما با توجه به آن که شواهد زیستی هم چون بقایای موجود در اثر انگشت[3]، اغلب کمتر از ۱۰۰ پیکوگرم یا ۳۳ نسخه از DNA را در برمی‌گیرند، امکان تعیین طرح واره از چنین نمونه‌هایی با تعداد اندک نسخه‌های DNA[4]، با استفاده از روش‌های متداول وجود ندارد یا طرح واره‌ای ناقص و غیرقابل اعتماد به دست می‌آید (۷-۴).

امروزه تلاش برای دستیابی به روش‌هایی که تعیین طرح واره با استفاده از تعداد اندک نسخه‌های DNA را امکان‌پذیر سازند، هم‌چنان ادامه دارد (۳،۴،۸،۹). اگرچه افزایش تعداد چرخه‌های PCR (۱۰)، ساده‌ترین روش به نظر می‌رسد، اما وجود مشکلاتی چون خطر گسترده‌ی آلودگی و محدودیت در افزایش تعداد چرخه‌ها، از معایب آن به شمار می‌رود (۹). استفاده از شیوه‌های تغییر یافته‌ی PCR مانند Nested PCR نیز روش مشابه دیگری است که از دو PCR پشت سر هم با حدود ۶۰-۵۰ چرخه، تشکیل می‌شود و می‌تواند محصولات غیراختصاصی را کاهش و مقدار کم DNA اولیه را افزایش دهد. این روش، نتایج یکسانی با روش افزایش تعداد چرخه‌های PCR از نظر مشاهده‌ی آلل‌های اضافی، حذف آللی و افزایش اندازه قطعات استاترها در استفاده از کیت‌های تکثیر PCR مانند کیتIdentifiler ارایه می‌کند، اما به علت نیاز به انتقال محصولات به ریز لوله‌های[5] جداگانه، از کارایی کمتری در مقایسه با روش قبلی برخوردار است (۴،۱۰). نیاز به ایجاد هم سازگاری در پرایمرها در هنگام استفاده از واکنش‌های PCR چندگانه نیز، از دشواری‌های این روش در تعیین طرح واره محسوب می‌شود (۱۱).

تکثیر کل ژنوم (WGA)[6] راه حل دیگری است که برخلاف دو روش بالا، پیش از روش تعیین طرح واره یا آنالیزهای اختصاصی انجام می‌پذیرد و می‌تواند با تکثیر عمومی DNA، مقادیر بسیار کم DNA استخراج شده از شواهد زیستی را افزایش دهد. WGA شامل مجموعه‌ای از روش‌هاست که در میان آن ها، روش I-PEP PCR [7] (۱۲،۱۳) در مقایسه با DOP PCR [8] (۱۴،۱۵) و MDA [9] (۱۶)، از بیشترین کارایی و پوشش ژنومی برخوردار است (۱۲،۱۷،۱۸).

روش I-PEP _ حاصل بهبود روش PEP PCR [10] (۱۹) در سال ۱۹۹۹_ از مخلوطی از پرایمرهای ۱۵ نوکلئوتیدی تصادفی برای تکثیر تصادفی توالی‌های DNA موجود در نمونه استفاده می‌کند و می‌تواند مقدار DNA استخراج شده را تا حدود ۳۰ برابر افزایش دهد (۲۰). استفاده از یک DNA پلی‌مراز مقاوم به گرما و دارای فعالیت تصحیح کننده‌ی اگزونوکلئازی ′۳ به ′۵، در کنار پلی مراز Taq از موارد عمده ای است که بهبود مشاهده شده در I-PEP را سبب شده است. این روش در مواردی مانند نمونه‌های پزشکی قانونی که DNA به میزان کم در آن‌ها وجود دارد، به کار می‌رود. به طی مراحل پیچیده‌ای نیاز ندارد و می‌توان با بهینه‌سازی آن به تعداد نسخه‌های بیشتری از DNA دست یافت (۱۲،۱۹). با وجود مزایای ذکر شده، اگرچه تاکنون درباره‌ی تأثیر روش‌های WGA بر نمونه‌های با کیفیت خوب و دارای مقادیر بالای DNA مطالعاتی انجام شده است، اما به طور کلی، سهم پژوهش هایی که روش خاص I-PEP را در بهبود نتایج حاصل از تعیین طرح واره با استفاده از مقادیر اندک DNA به کار گرفته اند، بسیار ناچیز می‌نماید (۱۱،۲۰) و در واقع تنها یک پژوهش به بهینه‌سازی روش I-PEP در استفاده از مقادیر کم DNA پرداخته است که روش mI-PEP نام دارد (۱۱).

هدف از پژوهش حاضر، بهینه‌سازی هرچه بیشتر روش I-PEP با استفاده از نمونه‌های شبیه‌سازی شده به نمونه‌های پزشکی قانونی از نظر وجود تعداد اندک نسخه‌های DNA و بررسی تأثیر این روش در نتایج حاصل از تعیین طرح‌واره‌ی DNA بود. مقادیر DNA به گونه‌ای تعیین شدند که بتوان با کمترین مقدار DNA موجود، نتایج قابل اعتمادی را در تکثیر اختصاصی با پرایمرهای اختصاصی و در تعیین طرح‌واره‌ی DNA با استفاده از کیت تکثیر PCR ارایه داد.

روش‌ها

آماده سازی DNA ژنومی

پس از گرفتن رضایت نامه‌ی آگاهانه از بیماران مراجعه‌کننده به مرکز ژنتیک انسانی کوثر، DNA ژنومی با روش استاندارد نمک اشباع[11] (۲۱) از نمونه‌های خون بیماران استخراج شد و پیش از انجام PCR، کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ و دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ[12] ۲۰۰۰c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) تعیین شدند.

رقیق سازی پیاپی DNA

به منظور شبیه‌سازی با نمونه‌های پزشکی قانونی از نظر وجود تعداد اندک نسخه‌های DNA، از نمونه های DNA با غلظت‌های ۲۰۰ تا ۶۰۰ نانوگرم در میکرولیتر و دارای کیفیت خوب، با استفاده از آب مقطر رقیق سازی پیاپی انجام گرفت و رقت های ۱، $۱/۱۰$ ، $۱/۱۰۰$ ، $۱/۱۰۰۰$ ، $۱/۲۰۰۰$ ، $۱/۴۰۰۰$ ، $۱/۸۰۰۰$ و $۱/۱۰۰۰۰$ تهیه شدند.

3 - Fingerprints
4 - Low Copy Number DNA (LCN DNA)
5 - Micro tube
6 - Whole Genome Amplification
7 - Improved Primer Extension Preamplification
8 - Degenerate oligonucleotide primed PCR
9 - Multiple-Displacement Amplification
10 - Primer Extension Preamplification PCR
11 - Salting out
12 - NanoDrop

Archive of SID
www.SID.ir

تکثیر کل ژنوم با استفاده از روش‌های موجود برای دستیابی به روش بهینه‌ی KI-PEP RCP

تکثیر کل ژنوم طی شش واکنش متفاوت PCR، بر روی ۱ میکرولیتر از رقت‌های مختلف DNA و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. تفاوت این واکنش‌ها در مقادیر مواد (dNTP،MgCL۲، پرایمر و بافر×۱۰)، نوع آنزیم، برنامه‌ی PCR یا ترکیبی از آن‌ها بود که بر اساس پروتکل‌های موجود PEP RCP (۱۹) و I-PEP PCR(۱۳) تعیین شده بودند. به عبارتی از شش واکنش انجام شده، تنها یک واکنش مطابق با پروتکل PEP و یک واکنش نیز مانند پروتکل I-PEP بود. بافر ×۱۰ به کار گرفته شده در این واکنش‌ها، متعلق به شرکت Applied Biosystems بود. از ژلاتین استفاده نشد و مخلوط آنزیم‌های DNA پلیمراز Taq وPfu (شرکت زیست فنآوری کوثر، تهران، ایران) با نسبت ۱۲ واحد به ۱ واحد، جایگزین آنزیم پیشنهاد شده در پروتکل I-PEP شد. واکنش‌ها دو به دو با هم مقایسه شدند. برای مقایسه‌ی هر چه دقیق‌تر، واکنش‌ها به صورت هم زمان و در دستگاه PCR یکسان (Mastercycler gradient, Eppendorf Scientific, Germany) انجام شدند و از همان رقت‌های DNA مورد استفاده در یک واکنش، در واکنش دیگر نیز استفاده شد. این واکنش‌ها، بر روی رقت‌های حاصل از نمونه‌های مختلف DNAنیز تکرار شدند و پس از ارزیابی محصولات آن‌ها،که در ادامه توضیح داده خواهد شد، روش بهینه‌ای که ما آن را " KI-PEP RCP " نامیدیم، به دست آمد.

تکثیر کل ژنوم با استفاده از روش KI-PEP PCR

۱ میکرو لیتر از هر یک از رقت‌های ساخته شده‌ی DNA در هشت ریز لوله به طور جداگانه ریخته شد و با افزودن ۳ میکرو لیتر از بافر ×۱۰ (Applied Biosystems, USA)، ۰/۴۸ میلی مولار dNTPs، ۳ میلی مولار MgCl۲، ۴۰ میکرو مولار پرایمر ۱۵ نوکلئوتیدی (´۵-NNN NNN NNN NNN NNN-´۳ Metabion, Germany,)، ۲/۵ واحد مخلوط آنزیم Taq پلیمراز و آنزیم Pfu با نسبت ۱۲ به۱ واحد به هر ریز لوله، واکنش KI-PEP PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و طی ۵۰ چرخه در دستگاه Mastercycler gradient انجام شد. هر چرخه شامل ۱ دقیقه در ۹۴ درجه، ۲ دقیقه در ۲۸ درجه، ۰/۳ درجه بر ثانیه صعود[۱۳] به ۵۵ درجه، ۴ دقیقه در ۵۵ درجه و۳۰ ثانیه در ۶۸ درجه بود. در هریک از واکنش‌های PCR، یک یا چند ریز لوله به عنوان کنترل منفی، در نظر گرفته شد. هر آزمایش حداقل ۳ بار تکرار شد و از نمونه‌های DNA مختلف نیز استفاده شد. سپس ۱ میکرو لیتر از محصولات این واکنش‌ها برای ارزیابی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

روش های ارزیابی محصولات حاصل از تکثیر کل ژنوم

۱- تکثیر جایگاه‌های خاص با طول‌های متفاوت از ژنوم: پس از الکتروفورز محصولات شش واکنش PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪، تکثیر اختصاصی محصولات هر یک از واکنش‌ها با استفاده از یک یا چند جفت پرایمر موجود در جدول ۱ انجام شد و نتایج بر روی ژل آگاروز مشاهده و مقایسه شدند. با دستیابی به روش بهینه‌ی KI-PEP و تکثیر کل ژنوم به وسیله‌ی آن، کارایی این روش نیز، طی چندین PCR اختصاصی و با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی مختلف (جدول ۱) که قطعاتی با طول‌های متفاوت ایجاد می‌کردند و متعلق به جایگاه‌های متفاوت از ژنوم بودند، ارزیابی شد. این PCR های اختصاصی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر ، شامل بافر× ۱، ۰/۸ میلی مولارdNTPs ، ۱/۵ میلی مولار MgCl۲ و ۰/۰۵ واحد آنزیم Taq پلیمراز به همراه ۱ میکرولیتر از رقت های مختلف DNA تیمار شده با روش (KI-PEP DKIP)[۱۴] به عنوان الگو، انجام شدند. غلظت‌های نهایی پرایمرهای ۷۴۵N-F II : ۱/۵ میکرو مولار، R Hinf۱β C: ۰/۷۵ میکرو مولار و R Com C: ۰/۵ میکرو مولار برای ژن بتا گلوبین انسانی عامل بیماری بتا تالاسمی و غلظت نهایی سایر پرایمرها، ۱ میکرو مولار بود. برنامه‌ی مورد استفاده در این PCR ها، شامل ۳۰ چرخه بود که هر چرخه ۱ دقیقه در ۹۳ درجه، ۱ دقیقه در ۶۸ درجه (دمای ۶۲ درجه برای تکثیر ژن بتا گلوبین انسانی با پرایمر ۷۴۵N-II و اگزون پنجم از ژن فاکتور ۸ انعقادی خون عامل بیماری هموفیلی A با پرایمر Hem A و دمای ۶۴ درجه برای تکثیر ژن آلفا گلوبین انسانی عامل بیماری آلفا تالاسمی با پرایمر IIα) و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه به طول می‌انجامید. سپس ۵ میکرولیتر از محصول هر ریز لوله بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز شد. این PCR های اختصاصی با شرایط یکسان و به صورت هم زمان بر روی ۱ میکرولیتر از همان نوع DNA بدون تیمار با روش KI-PEP و در رقت‌های ۱/۲۰، ۱/۲۰۰، ۱/۴۰۰، ۱/۸۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۲۰۰۰، ۱/۲۰۰۰۰ و ۱/۴۰۰۰۰ نیز انجام شد (برای توضیح بیشتر به قسمت بحث رجوع شود).

۲- تکثیر STR ها با استفاده از کیت Identifiler: تکثیر STR ها با استفاده از کیت Identifiler (Applied Biosystems, Foster City, CA) و ۰/۵ میکرولیتر از هریک از رقت های DNAو DKIP انجام شد. مقادیر مواد مورد استفاده در این واکنش، براساس راهنمای کیت بود و واکنش در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر صورت پذیرفت. آشکارسازی قطعات حاصل از تکثیر، با استفاده از دستگاه ۳۱۳۰xl Genetic Analyzer، متعلق به شرکتApplied Biosystems ، انجام شد و داده های حاصل با نرم افزار ABI GeneMapper ID، نسخه‌ی ۱/۰ و میزان RFU آستانه‌ی[۱۵] ۵۰ آنالیز شدند.

یافته‌ها

الکتروفورز محصولات واکنش‌های تکثیر کل ژنوم منجر به تولید

13 - Ramp
14 - DNA with KI-PEP PCR treatment (DKIP)
15 - Threshold RFU

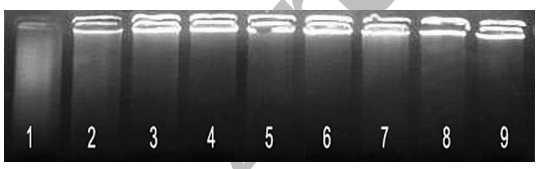
Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- فهرست پرایمرهای اختصاصی و طول قطعات حاصل

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه (باز)
F Fr8-9N R Com C	5′-CCTTGCCCCACAGGGCAGTAACGGCACACT-3′ 5′-ACCTCACCCTGTGGAGCCAC- 3′(R Com C)	۲۱۳
F C-30N R Com C	5′-TAAACCTGTCTTGTAACCTTGATACCTACC-3′ R Com C	۲۷۹
F I-110N R Com C	5′-ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATACAAC-3′ R Com C	۳۸۵
F C-44N R Com C	5′-AGCATCAGGAGT GGACAGATCCCCAATGG-3′ R Com C	۴۵۰
F II-1N R Com C	5′-AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAC-3′ R Com C	۶۳۳
F II-745N R Hinf1β C	5′-GGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCGAGC-3′ 5′- CTGCAGATTCCGGGTCACTGTGAGTG-3′	۱۱۰۶
F αII R αII	5′-CGCGCCAGCCAATGAGCG-3′ 5′-CTGTCTCAGACCAAGGACCTCTC-3′	۹۹۵
F HemA R HemA	5′-CACACAGTGTGTGAGGGCTTG-3′ 5′-AGCTGCCAGTGGAACTGAGG-3′	۵۴۴

F: پرایمر رو به جلو، R: پرایمر معکوس، N: نرمال، Fr: جهش تغییر چارچوب، C: کدون، Com: مشترک. پرایمر های αII برای تکثیر ژن آلفا گلوبین انسانی، HemA برای تکثیر اگزون پنجم از ژن فاکتور هشت انعقادی خون و سایر پرایمرها برای تکثیر ژن بتا گلوبین انسانی به کار می روند.

گسترش[16] در سطح ژل آگاروز شد. با مقایسه‌ی غلظت گسترش‌های حاصل از هر شش واکنش PCR و نتایج حاصل از تکثیر اختصاصی محصولات آن‌ها در سطح ژل آگاروز، واکنشی که منجر به نتایج برتر شده بود، انتخاب شد – داده‌ها نشان داده نشده‌اند-. مقادیر dNTP و پرایمر مورد استفاده در این واکنش، مشابه مقادیر ذکر شده در روش PEP بود، از برنامه ی دما و زمانی روش I-PEP پیروی می کرد و از مخلوط آنزیم DNA پلیمراز Taq و آنزیم دارای فعالیت تصحیح کنندگی Pfu بهره می‌برد. ما این روش جدید را که در واقع ترکیبی از مزیت‌های موجود در روش‌های پیشین بود، KI-PEP PCR نامیدیم و از آن برای تکثیر عمومی DNA های رقیق شده استفاده کردیم (تصویر ۱) در نتیجه‌ی این روش، تکثیر اختصاصی DKIP برای جایگاه‌های اختصاصی از ژنوم تا طول ۶۳۳ باز و تا رقت واقعی $^{1}/_{۲۰۰۰۰}$ (۲۵ پیکوگرم) امکان پذیر شد. این در حالی بود که بدون انجام روش KI-PEP، تکثیر اختصاصی DNA های رقیق شده برای همان جایگاه‌های خاص و برای همان نوع DNA، تنها تا رقت واقعی $^{1}/_{۸۰۰}$ (۶۲۵ پیکوگرم) بر سطح ژل آگاروز قابل مشاهده بود (جدول ۲). علاوه بر آن، بیشینه‌ی طول قطعه‌ی تکثیر شده در تکثیر اختصاصی DKIP، ۱۱۰۶ باز و تا رقت حقیقی $^{1}/_{۲۰۰۰}$ (۲۵۰ پیکوگرم) و در تکثیر اختصاصی DNA، تا رقت $^{1}/_{۲۰}$ (۲۵۰۰۰ پیکوگرم) در سطح ژل آگاروز به دست آمد. هم چنین تکثیر DKIP برای جایگاه‌های



تصویر ۱- گسترش‌های حاصل از الکتروفورز محصولات KI-PEP PCR. نتایج حاصل از الکتروفورز ۵ میکرو لیتر از هر یک از رقت های ۱، $^{1}/_{۱۰}$، $^{1}/_{۱۰۰}$، $^{1}/_{۱۰۰۰}$، $^{1}/_{۲۰۰۰}$، $^{1}/_{۴۰۰۰}$، $^{1}/_{۸۰۰۰}$ و $^{1}/_{۱۰۰۰۰}$ از DNA پس از تیمار با روش KI-PEP، به ترتیب از شماره‌ی ۱ تا ۸ بر سطح ژل آگاروز ۱/۵٪ مشاهده می‌شود. گسترش شماره‌ی ۹، مربوط به الکتروفورز محصول کنترل منفی در واکنش KI-PEP PCR است (برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه شود).

16 - Smear

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲- مقایسه ی میزان تکثیر اختصاصی مشاهده شده برای DNA و DKIP در سطح ژل آگاروز

الف)

نام پرایمر	1/20 (25000 pg)		1/200 (2500 pg)		1/2000 (250 pg)		1/20000 (25 pg)		1/40000 (12.5pg)	
	*DKIP	DNA	DKIP	DNA	DKIP	DNA	DKIP	DNA	DKIP	DNA
C-30 N	++++	++	++++	+	+++	-	+	-	-	-
N 1-110	++++	+++	++++	++	+++	-	++	-	+	-
C-44 N	++++	+++	++++	++	+++	-	++	-	+	-
II-1 N	++++	++	++++	+	+++	-	++	-	-	-
II-745 N	++	+	+	-	+	-	-	-	-	-

ب)

نام پرایمر	1/400 (1250 pg)	1/800 (625 pg)	1/1000 (500 pg)
C-30 N	+	+	-
N 1-110	+	+	+
C-44 N	+	+	-
II-1 N	+	+	-

میزان تکثیر اختصاصی رقت‌های متفاوت یک نمونه DNA و DKIP با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مختلف، در سطح ژل آگاروز ۱/۵٪ مشاهده می شود. غلظت نمونه‌ی DNA مورد استفاده، ۵۲۴/۴ نانوگرم در میکرولیتر بود که برای سهولت در محاسبه و مقایسه، ۵۰۰ نانوگرم در میکرولیتر در نظر گرفته شد. تعداد مثبت ها به شدت و ضعف باندها اشاره دارد و علامت منفی بیانگر عدم تکثیر است. الف) تکثیراختصاصی تا رقت $^{1}/_{۴۰۰۰}$ برای DNA و DKIP و ب) تکثیراختصاصی برای رقت های بیشتر از $^{1}/_{۲۰۰}$ و کمتر از $^{1}/_{۲۰۰۰}$ برای DNA نشان داده شده است.

* DKIP: DNA with KI-PEP PCR treatment.

ژنی مختلف (مانند اگزون پنجم از ژن فاکتور هشت انعقادی خون و ژن آلفا گلوبین انسانی) نیز با موفقیت انجام شد که در جدول ذکر نشده است.

در نتایج حاصل از آنالیز STR ها با استفاده از کیت Identifiler و ۰/۵ میکرولیتر DNA و DKIP، طرح واره ای کامل و قابل اعتماد تا رقت واقعی $^{1}/_{۲۰۰۰۰}$ از DKIP که تنها ۲/۵ پیکوگرم از DNA اولیه را شامل می شد، به دست آمد (تصویر ۲). در حالی که تعیین طرح واره از همان نوع DNA، بدون تیمار با روش KI-PEP، تا رقت واقعی $^{1}/_{۲۰۰۰}$ (۲۵۰ پیکوگرم)، به صورت ناقص انجام شد و در رقت واقعی $^{1}/_{۴۰۰۰}$ (۱۲۵پیکوگرم)، طرح واره ای به دست نیامد.

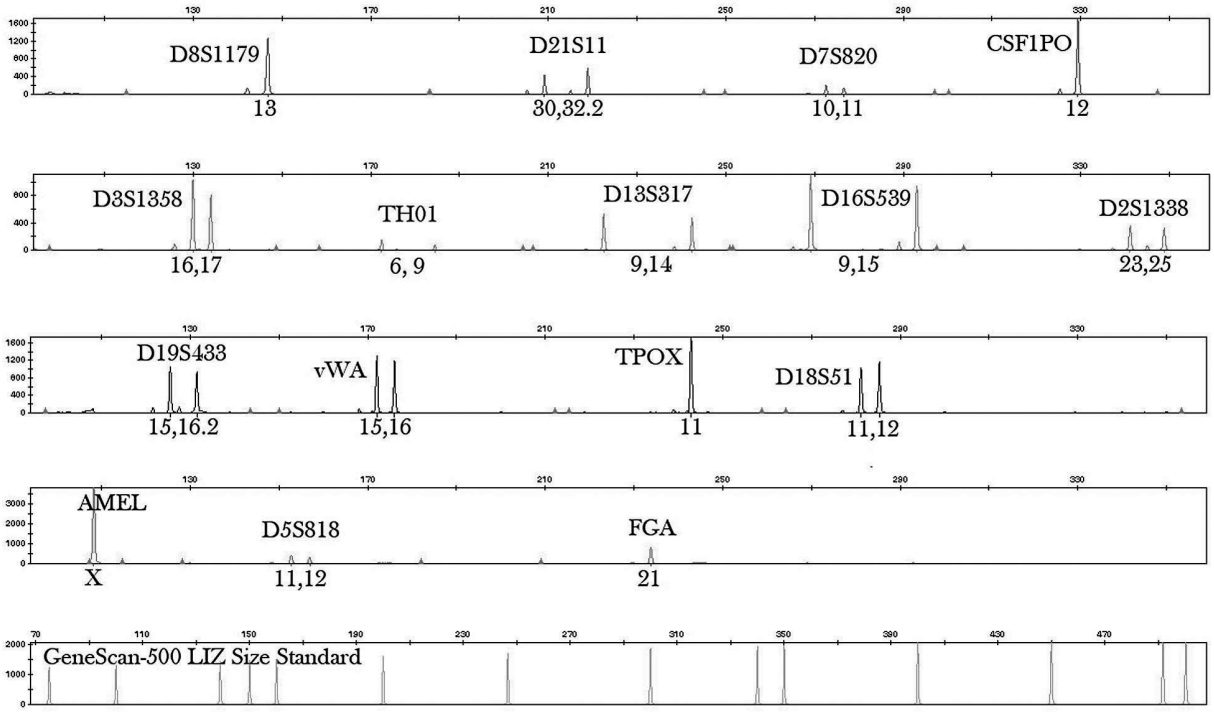
بحث

وجود تعداد اندک نسخه‌های DNA در بسیاری از شواهد زیستی مانند بزاق به جا مانده بر روی فنجان یا ته سیگار، خراش دست، شوره‌ی سر، بقایای به جا مانده در اثر انگشت (۸ ، ۴)، شواهد حاصل از تجاوز جنسی (۲۰) و لکه‌ی خون یافت شده، یکی از مشکلات متداول تشخیص هویت مولکولی در پزشکی قانونی است (۴،۶). اما با توجه به آن که وجود عوامل دیگری مانند DNA تخریب شده[17] و یا مهارکننده‌های PCR نیز در بسیاری از بقایای زیستی مانند استخوان و دندان به اثبات رسیده است (۲۲)، در این پژوهش از نمونه‌های DNA خون تازه و دارای کیفیت مطلوب استفاده شد تا با حذف هرگونه تداخل اثر احتمالی عوامل دیگر، روشی بهینه‌تر برای از میان برداشتن عامل نخست و افزایش تعداد اندک نسخه‌های DNA در نمونه‌های وابسته به پزشکی قانونی ارایه شود.

پس از معرفی روش PEP برای نخستین بار در سال ۱۹۹۲ و امکان انجام تغییرات مختلف بر روی آن، روش I-PEP بر پایه‌ی روش نخستین و با تکیه بر بهینه‌سازی تکثیر کل ژنوم ارایه شد. روش I-PEP با ۲۵٪ افزایش در کارایی تکثیر نسبت به روش PEP، تاکنون توانسته است نقش خود را در تکثیر کل ژنوم از غلظت‌های بالای DNA الگو حفظ کند (۱۲). اما با آزمودن این روش بر روی غلظت‌های بسیار کم DNA، بهینه‌سازی بیشتر این روش ضرورت یافت. کاهش حجم واکنش از ۵۰ میکرولیتر به ۲۵ میکرولیتر، به‌کارگیری آنزیم DNA

17 - DNA degradation

Archive of SID
www.SID.ir



تصویر ۲- حساسیت روش KI-PEP PCR. طرح واره‌ی به دست آمده از رقت واقعی ۱/۲۰۰۰۰۰ از DNA پس از تکثیر با روش KI-PEP PCR که برابر با ۲/۵ پیکوگرم از DNA اولیه است. همه ی آلل های موجود در طرح واره ی حاصل از رقت ×۱ از DNA، در این طرح واره نیز مشاهده می‌شود که بیانگر قابل اعتماد بودن طرح واره‌ی بالا است.

پلی مراز Pfu همراه با آنزیم Taq و افزایش میزان پرایمر و dNTP ها، از موارد عمده‌ی تغییر یافته در پژوهش حاضر است که روش I-PEP را بیش از پیش بهینه ساخته است و در نتیجه‌ی آن، امکان تعیین طرح واره با استفاده از تنها ۲/۵ پیکوگرم از DNA اولیه را پس از تکثیر کل ژنوم موجود در نمونه‌ای با رقت واقعی ۱/۱۰۰۰۰۰ (شامل ۵ پیکوگرم DNA) فراهم آورده است. مشاهده‌ی طرح واره‌های یکسان در تکرار آزمایش بر قابلیت تکرارپذیری پژوهش و عدم وجود خطا در آن دلالت دارد. این در حالی است که مقدار مورد نیاز DNA اولیه برای تعیین طرح واره با کیت Identifiler، پس از تکثیر آن با روش mI-PEP، ۵ پیکوگرم گزارش شده است (۱۱). در حقیقت حساسیت روش KI-PEP PCR در مقایسه با روش mI-PEP که در نوع و ترکیب آنزیم ها، نوع بافر و در مقدار dNTP و MgCl۲ با روش KI-PEP PCR متفاوت است، به حدود دو برابر افزایش یافته است. این امر با توجه به این که روش mI-PEP خود از حساسیت بیشتری نسبت به روش I-PEP برخوردار است، گویای بهینه‌سازی بیشتر روش KI-PEP است (۱۱). موفقیت در تعیین طرح واره با استفاده از مقادیر بیش از ۲/۵ پیکوگرم DNA اولیه و پس از تکثیر کل ژنوم موجود در نمونه‌های دارای کمتر از ۵ پیکوگرم DNA (۴/۲ و ۳/۶ پیکوگرم)، بر بهینه‌سازی بیشتر این روش تأکید می‌کند (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

استفاده از آنزیم DNA پلی مراز Pfu همراه با آنزیم Taq از جمله مواردی است که به نظر می‌رسد در افزایش حساسیت روش KI-PEP نقش داشته است. آنزیم DNA پلی مراز Pfu کمترین نرخ خطا را در مقایسه با تعدادی از آنزیم‌های مقاوم به گرما از جمله آنزیم Taq دارد (۲۳) و قادر است برخلاف آنزیم Taq و با استفاده از فعالیت اگزو نوکلئازی ´۳ به ´۵ خود، بازهای اشتباه وارد شده در قطعه‌ی در حال ساخت را حذف کند (۲۴،۲۵). این خاصیت به ویژه در مواردی که تعداد نسخه‌های اولیه‌ی DNA کمتر و یا تعداد چرخه‌های تکثیر PCR بیشتر باشد، مانند روش KI-PEP در این پژوهش، از اهمیت بیشتری برخوردار است و مانع از ایجاد خطای بزرگ در مجموعه‌ی تکثیر شده خواهد شد (۱۲). وجود بازهای اشتباه از کارایی تکثیر قطعات بزرگ می‌کاهد و حتی منجر به ناتمام ماندن تکثیر یک قطعه می‌شود (۲۶). در نتیجه آنزیم Taq به ویژه در مواردی که DNA تخریب و خرد شده باشد، می‌تواند با ایجاد قطعات کوچکتر از DNA الگو، کوتاه‌تر شدن بیشتر قطعات را سبب شود ولی استفاده از آنزیم با فعالیت تصحیح کنندگی Pfu که منجر به ساخت قطعات بزرگتر و با دقت بیشتری می‌شود (۲۳،۲۷)، این احتمال را کاهش خواهد داد. از دیگر توانایی‌های آنزیم Pfu، حذف باز جفت نشده‌ی انتهای ´۳

Archive
www.SID.ir

پرایمرهای متصل به DNA الگو و همانندسازی DNA با استفاده از چنین پرایمرهایی است. در نتیجه در روش‌هایی چون KI-PEP که از پرایمرهای تصادفی استفاده می شود و احتمال جفت نشدن بازها در استفاده از این گونه پرایمرها بسیار زیاد است، میزان بیشتری از پرایمرهای موجود در واکنش، برای تکثیر قابل استفاده خواهند بود (۲۸).

به طور کلی استفاده از آنزیم Pfu در روش های برپایه‌ی PEP PCR که به منظور تکثیر کل ژنوم انجام می‌شوند و محصول آن‌ها به عنوان الگو برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار می‌گیرد، امکان تکثیر دقیق‌تر از توالی‌های ژنومی را پیش از انجام آنالیزهای اختصاصی بعدی فراهم می‌آورد و در نتیجه با افزایش کارایی در اتصال پرایمرهای اختصاصی، می‌تواند افزایش حساسیت روش KI-PEP را سبب شود (۱۱). اما با توجه به آن که آنزیم Pfu در مقایسه با آنزیم Taq به زمان طولانی‌تری برای طویل سازی رشته‌ی DNA نیاز دارد (۲۴)، مخلوط این دو آنزیم، امکان تکثیر سریع و در عین حال دقیق را فراهم می‌سازد (۲۳،۲۷)؛ هم چنان که نتایج حاصل از ارزیابی محصولات شش واکنش تکثیر کل ژنوم که از هر دو آنزیم به تنهایی و یا از مخلوط آن‌ها استفاده می‌کردند نیز، تأکیدی دیگر بر این گفته است. البته با توجه به آن که آنزیم‌های مورد استفاده در پروتکل‌های موجود I-PEP و mI-PEP (۱۳-۱۱) نیز دارای نرخ خطای بسیار پایینی هستند، نمی‌توان عملکرد بهتر KI-PEP در بهبود نتایج حاصل از تعیین طرح‌واره را تنها در وجود آنزیم Pfu دانست ولی شاید بتوان به نسبت‌های ترکیب دو آنزیم Taq و Pfu، در کنار دو عامل دیگر یعنی کاهش حجم واکنش (۲۹،۳۰) و افزایش میزان پرایمر و dNTP ها نسبت داد که همراه با برنامه‌ی دما و زمانی مناسب در چرخه‌های PCR، سبب ایجاد نتایج بهتری شده‌اند. اثر افزایش میزان پرایمر و به دنبال آن dNTP ها نیز با توجه به خاصیت تصحیح‌کنندگی آنزیم‌هایی چون Pfu که در تخریب سطح خاصی از پرایمرها نقش دارند و در نتیجه به مقادیر نسبتا بالاتری از پرایمر برای تکثیر نیاز دارند (۲۳)، قابل توجیه است.

روش‌های بر پایه‌ی PEP PCR که پیش از انجام آنالیزهای اختصاصی بر روی یک نمونه به کار گرفته می‌شوند، با افزایش تعداد نسخه‌های DNA موجود در آن نمونه، امکان انجام آنالیزهای اختصاصی بیشتر و یا تکرار آن ها را فراهم می‌سازند (۱۹). تکثیر موفق جایگاه‌های مختلف ژنومی محصول KI-PEP در این تحقیق نه تنها گفته‌ی مذکور را تأیید می‌کند بلکه گویای کارایی روش KI-PEP در تکثیر مقادیر اندک DNA است. در تأیید این اثر، هرگونه تکثیر اختصاصی با پرایمرهای مختلف و هم چنین تعیین طرح‌واره، بر روی DNA بدون تیمار با روش KI-PEP نیز انجام گرفت و نتایج با هم مقایسه شدند (جدول ۲). قابل ذکر است که محصولات KI-PEP که به عنوان DNA الگو در PCR های اختصاصی بعدی به کار می رود، دارای رقت یکسان با رقت‌های آغازین نیستند و متناسب با حجم واکنش KI-PEP و با فرض حداکثر ۵ میکرولیتر تبخیر در هر ریزلوله پس از انجام واکنش PCR، رقیق‌تر می‌شوند. به عبارتی، هر یک از محصولات رقت‌های مختلف پس از انجام واکنش KI-PEP، به نسبت $^{1}/_{20}$ رقیق‌تر شدند. بنابراین در نتایج حاصل از تکثیر اختصاصی DNA و DKIP، به ترتیب رقت‌های $^{1}/_{20}$، $^{1}/_{200}$، $^{1}/_{2000}$، $^{1}/_{20000}$ و $^{1}/_{40000}$ از DNA با رقت‌های اولیه‌ی ۱، $^{1}/_{10}$، $^{1}/_{100}$، $^{1}/_{1000}$، $^{1}/_{2000}$ از DKIP قابل مقایسه بودند و با توجه به این که در این مقایسه، تکثیر DNA تنها تا رقت کمتر از $^{1}/_{2000}$ میسر بود، رقت‌های $^{1}/_{400}$، $^{1}/_{800}$ و $^{1}/_{1000}$ از DNA نیز به منظور مشاهده‌ی حداکثر حساسیت واکنش PCR برای DNA مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۲).

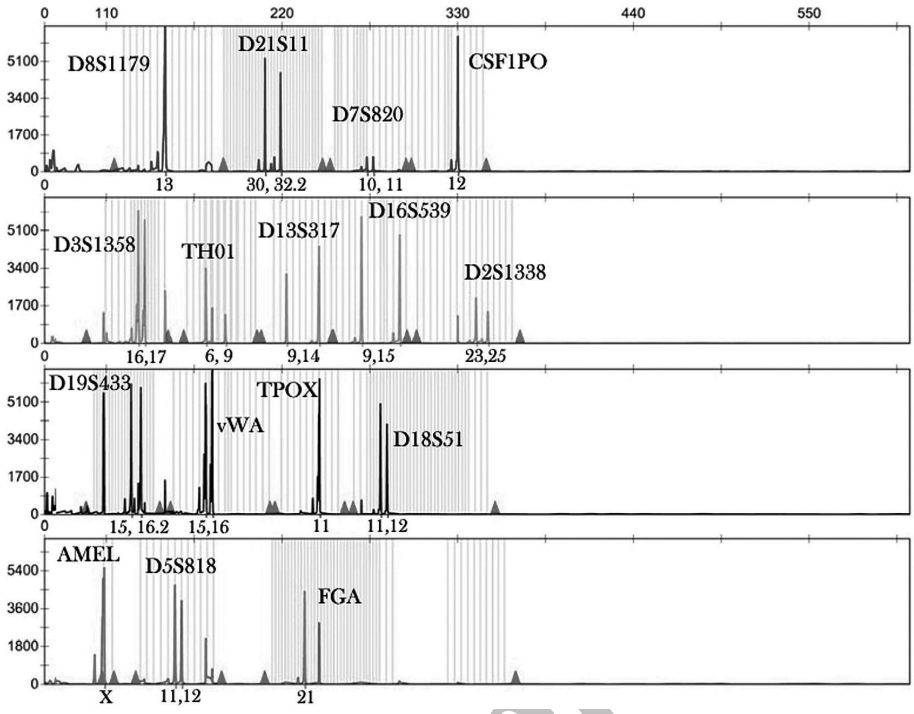
هرچند روش‌های بر پایه‌ی PEP، مقادیر اندک DNA را افزایش می‌دهند و از روش‌های تکثیر کل ژنوم به شمار می‌روند اما در حقیقت، این روش‌ها ژنوم را به صورت قطعاتی ناپیوسته و تصادفی تکثیر می‌کنند که در سطح ژل آگاروز به صورت گسترشی قابل مشاهده‌اند (تصویر ۱) و این قطعات تکثیر یافته هستند که به عنوان الگو در آنالیزهای اختصاصی پس از KI-PEP استفاده می‌شوند. تکثیر اختصاصی موفق قطعاتی با طول‌های مختلف و به ویژه تکثیر قطعه‌ی ۱۱۰۶ باز از DKIP، گواه آن است که KI-PEP برخلاف آن چه انتظار می‌رود، قادر است قطعاتی با طول‌های بلند نیز ایجاد کند و با توجه به این که بیشینه‌ی طول آلل‌های متداول STRهای موجود در کیت Identifiler، کمتر از ۴۰۰ باز است، روش KI-PEP می‌تواند طول مناسب برای تعیین طرح‌واره را در اختیار قرار دهد. این گسترش ذکر شده حتی در الکتروفورز محصولات ریزلوله‌های کنترل منفی نیز، دیده می‌شود (تصویر ۱) که با توجه به آن که روش‌های بر پایه‌ی PEP، به علت استفاده از پرایمرهای تصادفی، توانایی تکثیر هر نوع DNA را دارا هستند، این گسترش می‌تواند به دلیل تکثیر DNA یوباکتریایی موجود در مخلوط‌های تجاری آنزیم DNA پلیمراز Taq باشد که وجود آن در پژوهش‌های دیگر به اثبات رسیده است (۳۱،۳۲). عدم مشاهده‌ی باند در تکثیر اختصاصی محصولات ریز لوله‌های کنترل منفی واکنش KI-PEP با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های انسانی نیز، شاهدی دیگر بر این ادعاست.

از معایب تکثیر ناپیوسته‌ی ژنومی، از دست رفتن برخی آلل‌ها و عدم تعادل در تکثیر آن‌ها در تعیین طرح‌واره عنوان شده است که در استفاده از روش I-PEP هنگامی که میزان DNA اولیه کمتر از ۱۰۰ پیکوگرم باشد، قابل مشاهده است (۱۷). با وجود این، عدم تعادل ذکر شده در تکثیر آلل‌ها با استفاده از روش I-PEP، در مقایسه با دیگر روش‌های تکثیر کل ژنومی کمتر است (۱۷) و در مورد نمونه‌هایی که میزان DNA آن‌ها بسیار کم است و قابل تعیین طرح واره نیست، این روش می‌تواند هم‌چنان موفقیت بسیار چشمگیری را ایجاد کند (۱۷). در این پژوهش نیز از نمونه‌های شامل کمتر از ۱۰۰ پیکوگرم DNA استفاده شد (تصویر ۳) ولی عدم تعادلی در آنالیز آن‌ها مشاهده نشد

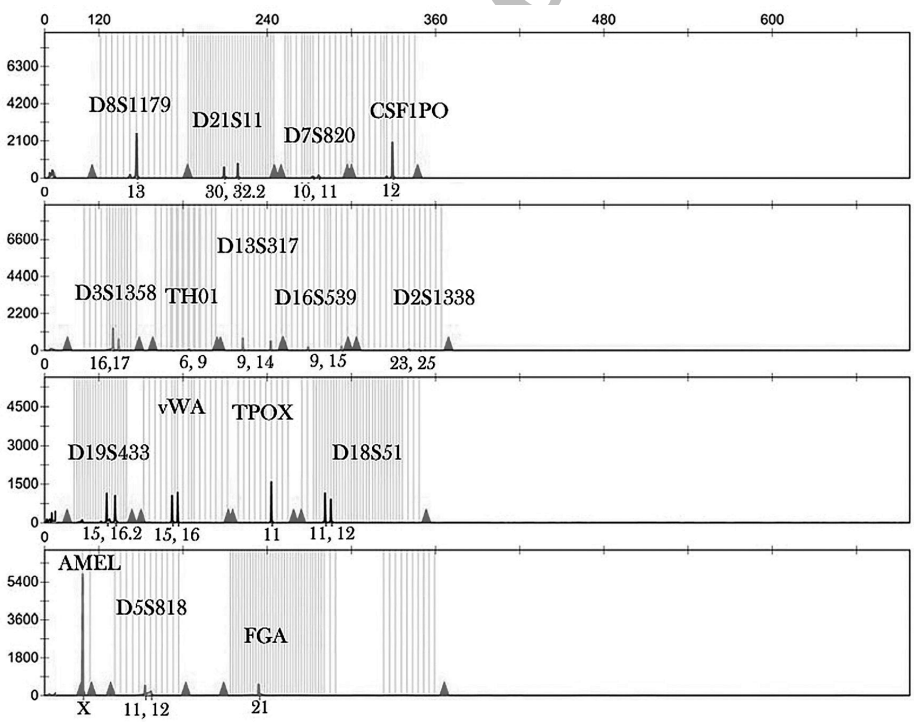
Archive of SID

www.SID.ir

الف)



ب)



تصویر ۳- طرح واره‌های حاصل از دو رقت متفاوت DNA پس از تیمار با روش .KI-PEP PCR الف) طرح واره ی به دست آمده از رقت واقعی ۱/۲۰۰۰۰ از DNA پس از تکثیر با روش KI-PEP PCR که برابر با ۲۵ پیکوگرم از DNA اولیه است. ب) طرح واره ی به دست آمده از رقت واقعی ۱/۸۰۰۰۰ از DNA پس از تکثیر با روش KI-PEP PCR که برابر با ۶/۲۵ پیکوگرم از DNA اولیه است. همه‌ی آلل‌های موجود در طرح واره ی حاصل از رقت ×۱ از DNA، در این دو طرح واره نیز مشاهده می شود.

www.SID.ir

و نتایـج یکسـانی با طرح واره‌ی حاصـل از مقادیر DNA بالای ۱۰۰ پیکوگرم به دسـت آمد که این امر می‌تواند دلیلی دیگر بر بهینه‌سازی مطلوب این روش باشد.

نتیجه‌گیری

با روش KI-PEP PCR، نه تنها می‌توان تعداد اندک نسخه‌های DNA را افزایـش داد و آن را برای انجام PCR های اختصاصی آماده سـاخت بلکه می‌توان تعداد آنالیزهای اختصاصی قابل انجام بر روی هر نمونـه را نیز بالا برد. هم چنین با ایـن روش می‌توان با توجه به طول STRهـای موجود در کیت‌های تجاری مرسـوم در تشـخیص هویت، طول مناسـب را برای تعیین طرح‌واره ایجاد کـرد. در حقیقت کارایی روش KI-PEP PCR در تعیین طرح‌واره‌ی نمونه‌های با تعداد اندک نسـخه‌های DNA نشـان می‌دهد این روش در تشـخیص هویت هر نمونـه‌ای کـه میزان DNA به دسـت آمده از آن ناکافـی ولی دارای کیفیت مطلوب باشـد، همچون برخی از نمونه‌های وابسـته به پزشکی قانونی، قابل اسـتفاده خواهد بود. هرچند اثبـات کارایی این روش در چنیـن نمونه‌هایـی و نیـز نمونه‌هایی که ممکن اسـت عوامل دیگری چون DNA تخریب شـده و یا مهارکننده‌ها را نیز شـامل شـوند، به پژوهش‌های دیگری نیاز دارد.

تقدیر و تشکر

پژوهـش حاضر در نیمـه‌ی دوم سـال ۱۳۸۸ در مرکز تحقیقات ژنتیک انسـانی کوثر و با حمایت مالی این مرکز به انجام رسید. از کادر اداری - آزمایشـگاهی این مرکز، از جمله خانم‌ها صدیقه امینی، مریم عاشری و سیده زهرا حیدری در بخش تخلیص DNA سپاس‌گزاریم.

References

1- Williams R, Johnson P. Inclusiveness, Effectiveness and Intrusiveness: Issues in the Developing Uses of DNA Profiling in Support of Criminal Investigations. J Law Med Ethics. 2005; 33(3): 545-58.

2- Butler JM. Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing. J Forensic Sci. 2006; 51(2): 253-65.

3- Budowle B, Eisenberg AJ, Daal AV. Validity of Low Copy Number Typing and Applications to Forensic Science. Croat Med J. 2009; 50: 207-17.

4- Lagoa AM, Magalha˜es T, Pinheiro MF. Genetic analysis of fingerprints-Could WGA or nested-PCR be alternatives to the increase of PCR cycles number? Forensic Science Int. 2008; Genetics Supplement Series 1: 48-9.

5- Goodwin W, Linacre A, Hadi S. An Introduction to Forensic Genetics. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd; 2007: 39-63.

6- Butler JM. Forensic DNA Typing: Biology and Technology behind STR Markers. London: Academic Press; 2001: 68-179.

7- Perlin MW, Sinelnikov A. An Information Gap in DNA Evidence Interpretation. PLoS ONE. December 2009; 4(12): e8327.

8- Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. Forensic Science Int. 2000; 112: 17-40.

9- Gill P. Application of Low Copy Number DNA Profiling. Croat Med J. 2001; 42(3): 229-32.

10- Findlay R, Frazier A, Taylor AU. Single cell DNA fingerprinting for forensic applications. Nature. 1997; 389: 555.56–

11- Hanson EK, Ballantyne J. Whole genome amplification strategy for forensic genetic analysis using single or few cell equivalents of genomic DNA. Analytical Biochemistry. 2005; 346: 246-57.

12- Dietmaier W, Hartmann A, Wallinger S, Heinmöller E, Kerner T, Endl E, et al. Multiple Mutation Analyses in Single Tumor Cells with Improved Whole Genome Amplification. Am J Pathol. January 1999; 154(1): 83–95.

13- Arneson N, Hughes S, Houlston R, Done S. Whole-Genome Amplification by Improved Primer Extension Preamplification PCR (I-PEP-PCR). Cold Spring Harb. Protoc. 2008; doi:10.1101/pdb.prot4921.

14- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, and Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. Genomics. 1992; 13: 718–25.

15- Cheung VG. and Nelson SF. Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 1996; 93: 14676–

Archive of SID
www.SID.ir

14679.

16- Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. Proc Natl Acad Sci. 2002; 99: 5261–6.

17- Sun G KR, Pal P, Wolujewicz M, Smelser D, Cheng H, Lu M, et al. Whole-genome amplification: relative efficiencies of the current methods. Leg Med (Tokyo). 2005 Oct; 7(5): 279-86.

18- Barker DL, Hansen MST, Faruqi AF, et al. Two Methods of Whole-Genome Amplification Enable Accurate Genotyping Across a 2320-SNPLinkage Panel. Genome Res. 2004; 14: 901-7.

19- Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. Proc Natl Acad Sci. 1992; 89(13): 5847-51.

20- Barber AL, Foran DR. The Utility of Whole Genome Amplification for Typing Compromised Forensic Samples. J Forensic Sci. 2006; 51(6): 1344-9.

21- Miller SA, Dykes, DD, and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research. 1988; 16: 1215.

22- Willerslev E, Cooper A. Ancient DNA. Proc R Soc B 2005;3-16 :272 .

23- Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. Nucleic Acids Research. 1996; 24(18): 546–3551.

24- Nielson KB, Costa GL, Braman J. Optimization of PCR using Pfu DNA polymerase. Strategies. 1996; 9(1): 24–5.

25- Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from pyrococcus furiosus. Gene 1991;1-6 :108 .

26- Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. Proc Natl Acad Sci. 1994; 91: 5695-9.

27- Su X-z, Wu Y, Sifri CD, Wellems TE. Reduced extension temperatures required for PCR amplification of extremely A+T-rich DNA. Nucleic Acids Research. 1996; 24(8): 1574-5

28- Naghibalhossaini F, moaddeb A. An improved PCR-based amplification of unknown homologous DNA sequences. Bimolecular Engineering. 2006; 209-12 :23.

29- Gaines ML, Wojtkiewicz P, Valentine J, Brown CL. Reduced volume PCR amplification reactions using the AmpFISTR Profiler Plus kit. J Forensic Sci 2002; 47(6): 1224-37.

30- Leclair B, Sgueglia JB, Wojtowicz PC, Juston AC, Fregeau CJ, Fourney RM. STR DNA typing: Increased sensitivity and efficient sample consumption using reduced PCR reaction volumes. J Forensic Sci 2003; 48: 1001-13.

31- Hughes MS, Beck L-A, Skuce RA. Identification and elimination of DNA sequences in taq DNA polymerase. J Clin Microbiol. 1994;2007-8 :32 .

32- Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environ Microbiol. 1997; 3741-51 :(10)63.

Archive of SID

www.SID.ir

Improvement in the I-PEP method and its effect on the outcome of low copy number DNA profiling

Zahra Zafari*- Faezeh Rahimi Nejad- Sudeh kiyan Far**- Ameneh B. Sarhaddi**- Atefeh Shirkavand***- Nejat Mahdieh****- Mohammad R. Mashayekhi*****- Akram Ghasemi******-Mahmood Tavallaei*******- Sirous Zeinali********†**

*Postgraduate Student in Cellular and molecular Biology, Khatam University, Tehran, Iran
**BSc, Kawsar's Human Genetics Research Center, Tehran, Iran
***Postgraduate Student in cellular and Molecular Biology, Razi University, Kermanshah, Iran
**** PhD Student in Medical Genetics, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
***** PhD student in Molecular Genetics, Science and Research Branch of Tehran, Islamic Azad University, Tehran, Iran
******Postgraduate Student in Microbiology, Islamic Azad University of Jahrom, Jahraom, Iran
*******PhD in Biotechnology, Assistant Professor of Bagiyatallah University of Medical Sciences, Human Genetic Research Center, Tehran, Iran
******** PhD in Human Genetics, Associated Professor of Pasteur Institute of Iran, Biotechnology Research Center, Tehran, Iran

Archive of SID

Abstract

Background: *DNA Profiling has become one of the most robust and reliable methods at forensic identification; However, an insufficient DNA quantity (less than 100 Pg or 33 copies) found often in forensic evidence samples, is a major hindrance. Amplification of such low copy number DNA samples is attainable with the most efficient whole genome amplification (WGA) method, named improved primer extension preamplification (I-PEP) PCR.*

Methods: *By initial assessment of existing PEP and I-PEP methods on serially diluted DNA, it was attempted to reach an improved method leading to reliable profiling with the lowest amount of template. This method employs degenerate 15-mer PCR primers followed by specific amplification of DNA with specific primers.*

Findings: *Subsequent to the amplification with the new modified and improved I-PEP, which we term KI-PEP PCR, complete DNA profile was obtained from only 2.5 pg of input DNA. Using this method, a fragment size of 1106 bp was effortlessly amplified with the specific primers.*

Conclusions: *The Utility of KI-PEP PCR not only increases the low quantity of DNA, but also provides the optimum length appropriate to DNA Typing techniques.*

Key words: *Forensic Medicine; Forensic Identification; DNA Profiling; WGA; KI-PEP PCR*

Received: 30 Apr 2010 *Accepted: 6 Nov 2010*

†Correspondence: Kawsar's Human Genetics Research Center, No. 41, Majlesi St., Vali-e asr Ave, Tehran, Iran. Zip Code: 1595645513 zeinali@kawsar.ir

www.SID.ir