

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

چکیده

DNA Typing در حال حاضر حساس‌ترین و دقیق‌ترین روش شناخته شده جهت تعیین هویت اشخاص است. هدف از این تحقیق، تعیین فراوانی آلل‌های جایگاه ژنی^۱ HUM.CSF1PO از مناطق کوتاه تکرار شونده ژنوم انسانی یا STR^۲ 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 پلیمرز^۳ (PCR) محصولات PCR آللهای مختلف برای هر محل توسط الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل امید جدا شد.

برای جایگاه ژنی HUM.CSF1PO هفت آلل شناسایی شد. هتروزیگوسیتی مشاهده

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

شده آن برای 0.63830 ، (DP^1) برابر 0.86242 و (PE^2) برابر 0.44792 بود. مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های مشاهده شده و ژنوتیپ‌های مورد انتظار از طریق آزمون استاندارد کای اسکوئر^۳، دال بر تبعیت پراکندگی ژنوتیپ‌های مشاهده شده از قانون هاردی واینبرگ 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^۴) استفاده کرد.

کلید واژه‌ها:

توالی تکرار شونده موجود در پروتئوکوزن انسانی (CSF1PO)، منطقه کوتاه تکرار شونده ژنوم انسانی (STR)، واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، آلل، ژنوتیپ، کروموزوم.

نشانی نویسنده مسؤول:

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

مقدمه

مناطق کوتاه تکرار شونده STR یا میکروستلایت‌ها^۵، سکانس‌هایی متشکل از ۶-۲ جفت باز هستند که بسیار پلیمرف هستند و به فراوانی (تقریباً یک لوکوس در هر ده کیلو باز) در طول ژنوم انسان یافت می‌شوند [۱]. اندازه کوچک این قطعات (300bp) امکان بررسی آنها

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

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 slippage و 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 هر یک از لوکوس‌های STR در هر نژاد یا جمعیت خاص برای تفسیر صحت نتایج حاصل از انجام آزمایش‌های تعیین هویت به کمک STR و انجام محاسبات آماری مربوطه امری ضروری است. برای بهره‌گیری 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.CSF ۱PO (توالی تکرار شونده ۴ نوکلئوتیدی ساده با واحد تکرار شونده STR، متشکل از نوکلئوتیدهای AGAT که بر روی 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 روش‌ها

نمونه‌گیری 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.CSF ۱PO) در حجم ۲۵ میکرولیتر PCR Mix متشکل از PCR Buffer ۱۰X (شرکت TAPO-)

TILI روسیه)، (۱۰ pmol) primers و Tag-Polymerase (۲۰ u) بود. PCR به وسیله ترموسایکلر Eppendorf در ۲۸ سیکل (۶۴ = °C Taneling) 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 بر روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪ (AcryAmid:BisAcryAmid ۱:۲۹) با ضخامت ۰/۵ میلی‌متر، الکتروفورز شد. سپس ژل‌ها با نیترات نقره رنگ آمیزی شد و آلل‌ها، تک به تک در مقایسه با شاخص نردبانی^۱ آن (Allelic Ladder شرکت TAPOTILI روسیه)، شماره گذاری گردید.

تعیین ترادف آلل‌های یافت شده در جمعیت مورد مطالعه ایرانی توسط شرکت Primm (کشور کره) صورت گرفت.

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

نتایج عینی

برای مارکر CSF1PO با بررسی ۱۸۸ کروموزوم، تعداد ۷ آلل مختلف مشاهده شد (جدول ۱). پس از انجام Sequence، توالی ۷ آلل یافت شده تعیین و با سکانس X۱۴۷۲:gi.Genban مقایسه شد (تصویر شماره ۱).

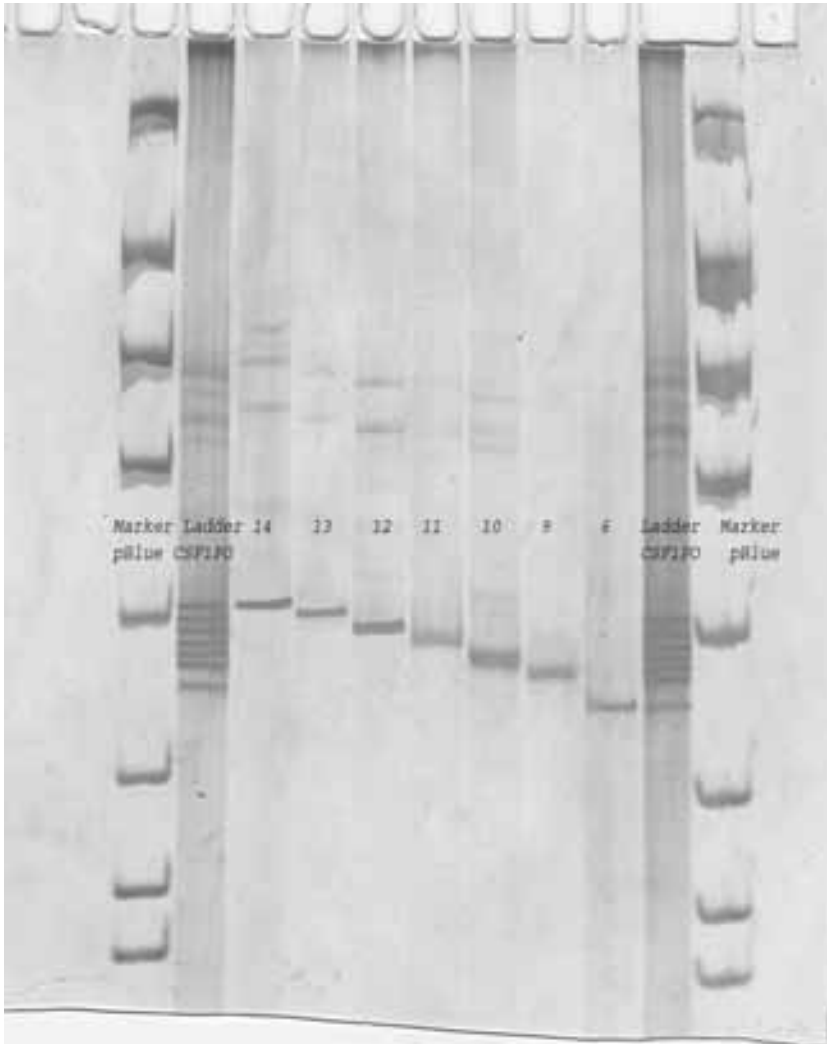
1. Allelic Ladde
2. Sequencing



تصویر شماره ۱ (مقایسه سکانس ۷ آلل لوکوس CSF1PO در سایت NCBI

آلل‌ها بر حسب تعداد واحدهای تکرار شونده^۱ شماره گذاری شدند. هیچ گونه آلل حد واسطی یافت نشد.

۷ آلل مختلف با توجه به تعداد توالی واحد تکرار شونده از کوچکترین آلل (آلل ۶) به طول ۲۰۴ bp تا بزرگترین آلل (آلل ۱۴) به طول ۲۴۱ bp نامگذاری شد. نردبان آللی^۲ جایگاه CS-F1PO جمعیت ایرانی با ترکیب محصول PCR ۷ آلل یافت شده تهیه شد (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲) انواع آلل‌های HUM.CSF1PO به دست آمده در جمعیت ایران

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

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، ۱۱-۱۲، ۱۲-۹، ۱۳-۹، ۱۳ و ۱۱-۱۴ با فراوانی ۱,۰۶٪ (۱/۹۴) ژنوتیپ‌های بررسی شده، کمترین درصد فراوانی را داشتند (جدول شماره ۱).

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

فراوانی ژنوتیپ‌های مشاهده شده و ژنوتیپ‌های مورد انتظار با فرض قانون هاردی واینبرگ، $(p^2 + 2pq + q^2 = 1)$ ، از طریق آزمون استاندارد کای اسکور مقایسه شد و تبعیت پراکندگی ژنوتیپ‌های مشاهده شده از قانون هاردی واینبرگ تأیید شد ($\chi^2 = 12,98$ ، $df = 15$ ، $P = 0,990$).

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 ژنوتیپی لوکوس جدول شماره ۱ دارای آلل ۱۱ و نادرترین آلل‌ها دارای ۶ و ۱۴ واحد تکرار شونده بود. CSF1PO شایعترین آلل داری نشان نداد. با مقادیر مورد انتظار قانون هاردی واینبرگ اختلاف معنی CSF1PO

مقایسه فراوانی ژنوتایپی

* در سایت CSF1PO ژنوتایپ‌های ۹،۱۱،۱۳،۱۳،۱۴،۱۱،۱۲،۹ و ۶،۱۱ دارای فراوانی ۱ و ژنوتایپ‌های ۱۳، ۱۰، ۱۰، ۹ و ۱۱، ۱۳ دارای فراوانی ۲ هستند.

نتیجه گیری

از آنجا که لازمه به کارگیری 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 شماره ۱).

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 ($\chi^2=12,98$, $df=15$, $P=0,990$).

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 شماره ۱).

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 Approoachto Analysis of Polymorphic Short Tandem Repeat Loci(1996). Biotech-

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