

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۲ شماره ۴ مهر و آبان ۱۳۸۹ صفحات ۲۰-۱۶

بررسی چند شکلی تعدادی از ریزماهوره‌های کروموزوم ایگرگ در جمعیت آذربایجان شرقی

مرتضی جبارپور بنیادی: دانشیار ژنتیک مولکولی پزشکی، قطب علمی سیتومولکولی تنوع زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز. مرکز تحقیقات بیماریهای کبد و گوارش، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، نویسنده رابط:

Email: Jabbarpour@tabrizu.ac.ir

معصومه ابهری: گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
امید عمرانی: گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
بابک امامعلیزاده: گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

دریافت: ۸۷/۱۱/۲۹، پذیرش: ۸۸/۹/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: کروموزوم ایگرگ نقش تعیین جنسیت در انسان را بعهده دارد. ریزماهوره‌هایی که بر روی این کروموزوم قرار گرفته اند در تعیین ابویت، هویت، امور جنائی و پزشکی قانونی و تعیین جنسیت جنین مورد استفاده قرار می‌گیرند. این کاربرد ریزماهوره‌های کروموزوم ایگرگ در اکثریت موارد بستگی به درصد چندشکلی آنها در جمعیت انسانی دارد. هدف این مطالعه، انتخاب و بررسی درصد چندشکلی تعدادی از ریزماهوره‌های کروموزوم ایگرگ در جمعیت استان آذربایجان شرقی است.

روش بررسی: در این مطالعه ۵۰ فرد مذکر غیرخویشاوند از منطقه آذربایجان شرقی بصورت تصادفی انتخاب و DNA آنها استخراج گردید. تک تک این افراد مذکر به همراه تعدادی افراد مونث بعنوان کنترل منفی با استفاده از سه عدد ریزماهوره (DYS438, DYS390, DYS385) انتخاب شده از کروموزوم ایگرگ مورد بررسی قرار گرفتند. محصولات PCR بدست آمده از این مارکرها بر روی ژل پلی آکریل آمید رنگ آمیزی شده و باندهای بدست آمده مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: مارکرهای بررسی شده در هیچکدام از افراد مونث قابل تکثیر نبود و این امر نشان می‌دهد که جایگاه این مارکرها تنها بر روی کروموزوم ایگرگ هستند و توالی مشابهی بر روی کروموزومهای دیگر وجود ندارد. مارکر DYS385 که یک مارکر چندآلی است، بیشترین حالت چندشکلی (در حدود ۹۵٪) را در جمعیت مورد مطالعه نشان داد. مارکرهای DYS438 و DYS390 بعد از مارکر فوق به ترتیب بیشترین حالت چندشکلی را نشان دادند.

نتیجه گیری: در جمعیت آذربایجان شرقی، مارکر DYS385 بهترین مارکر جهت تعیین هویت و ابویت و کاربرد در امور پزشکی قانونی دارد. در صورت استفاده ترکیبی از این مارکر به همراه دو مارکر دیگر امکان کاربرد آن در امور ذکر شده به مراتب افزایش خواهد یافت.

کلیدواژه‌ها: ریزماهوره، جمعیت، کروموزوم ایگرگ

مقدمه

۲۳ مگاجفت‌باز است. ۲۷ پروتئین مختلف توسط این قسمت از کروموزم ایگرگ کد می‌شود. در مقایسه با ۷۱۷ ژن که روی ۱۶۰ مگاجفت‌باز از کروموزم ایکس قرار گرفته‌اند یعنی ۴/۵ ژن در هر

کروموزوم ایگرگ نقش تعیین جنسیت در انسان را بعهده دارد که تنها از پدر به پسر منتقل می‌گردد. کروموزم ایگرگ از لحاظ ژنی بسیار فقیر است. اندازه قسمت یوکروماتینی غیرشبه‌اتوزومی

مواد و روشها

نمونه‌گیری: ۵۰ فرد مذکر بطور تصادفی از خانواده‌های منطقه آذربایجان شرقی کشور انتخاب شد. به منظور استخراج DNA از بافت خون، از هر فرد ۵ میلی‌لیتر خون گرفته و در فالتکون‌های حاوی ماده ضدانعقاد EDTA ۰/۵ مولار ریخته شد (به ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر خون ۱۰۰ میکرولیتر از EDTA). نمونه‌ها در فریزر نگهداری شدند.

استخراج DNA: برای استخراج DNA ژنومی از روش اصلاح شده فنل - کلروفرم استفاده شد (۵). جهت لیز کردن سلول‌های گلبول‌های قرمز، از بافر لیز کننده (بی‌کربنات سدیم ۰/۱ میلی مولار، کلرید آمونیوم ۱۵۵ میلی مولار، pH حدود ۷/۲) استفاده شد. جهت جدا کردن گلبول‌های سفید از مایع حاصل از لیز گلبول‌های قرمز، محلول حاصل بمدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و در نهایت گلبول‌های سفید رسوب داده شده در بافر سالین - ای - دی - تی آ (Saline-EDTA) (SE) (کلرید سدیم ۷۵ میلی مولار، EDTA ۲۵ میلی مولار، pH ۸)، سدیم دو دسیل سولفات (SDS) ۱۰ درصد و پروتئیناز K حل گردید و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد جهت تجزیه پروتئین‌های موجود و لیز کردن سلول‌های سفید خون در بن ماری نگهداری شد. بعد از اضافه کردن فنل کلروفرم به اندازه یکسان، محلول حاوی DNA جدا شده و با افزودن اتانول مطلق سرد رشته‌ی DNA ظاهر گردید. رشته DNA حاصل، در مقدار مناسبی از آب استریل شده و یا بافر Tris-EDTA (TE) حل شد. انجام واکنش PCR: سه جایگاه ریزماهورای بر روی کروموزم ایگرگ با استفاده از سه جفت آغازگر با روش PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز) بر اساس گزارشات قبلی از جمعیت‌های دیگر (۶،۷) تکثیر یافت (جدول شماره ۱). بطور خلاصه، برای انجام PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ با غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار، بافر PCR (۱۰X: ۵۰۰ میلی مولار، Tris-HCl ۲۰۰ میلی مولار، pH = ۸/۴) با غلظت نهایی یک برابر، یک واحد آنزیم Taq پلیمرز (سیناژن) و dNTP با غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار استفاده گردید. مشخصات برنامه PCR پس از بهینه‌سازی برای هریک از نشانگرهای استفاده شده به‌قرار ذیل بود: جهت تکثیر نشانگر DYS 385 برنامه PCR برای ۲۵ چرخه به ترتیب سی ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. جهت تکثیر نشانگرهای دیگر، از برنامه ذیل استفاده گردید. شصت ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۵ چرخه تکرار گردید. در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. ژل آگارز با محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و باندهای حاصل از محصولات PCR زیر اشعه ماوراءبنفش مشاهده گردید.

مگاجفت‌باز، بازای هر مگاجفت‌باز از کروموزم ایگرگ ۱/۲ ژن وجود دارد (۲۱). بسیاری از ژن‌هایی که روی کروموزم‌های اجدادی کروموزم ایگرگ حضور داشته‌اند در کروموزم ایگرگ امروزی حذف شده‌اند. به ژن‌های باقیمانده روی کروموزم ایگرگ نظیر ژن SRY، ژن‌های دیگری که دارای عملکردهای اختصاصی در جنس نر می‌باشند (نظیر ژن مربوط به اسپرماتوژنز)، اضافه شده است. بسیاری از این ژن‌های ضمیمه شده بصورت کپی‌های متعددی افزایش یافته‌اند. فرضیه این است که حذف ژن‌ها از روی کروموزم ایگرگ تا حدودی در ارتباط با عدم توانایی این کروموزم در حذف ال‌های جهش یافته از طریق نوترکیبی با کروموزم همولوگ غیرموتانت می‌باشد. چنین امری باعث شده است که بسیاری از ژن‌هایی که در کروموزوم‌های اجدادی کروموزم ایگرگ حضور داشته‌اند در کروموزم ایگرگ امروزی حذف شوند (۱). با توجه به اینکه جفت شدگی کروموزوم‌های همولوگ در تقسیمات میوزی نقش مهمی را به‌عهده دارد، علی‌رغم اینکه کروموزوم ایگرگ با کروموزوم ایکس تشابه خیلی کمی دارد، این دو کروموزوم در ناحیه‌های ویژه‌ای که دارای تشابه توالی حفظ شده می‌باشند، با همدیگر جفت شده و این امر امکان رخداد نوترکیبی در این منطقه را بوجود می‌آورد. این مناطق می‌تواند از هر یک از والدین به ارث برسد و ویژگی نظیر ویژگی کروموزم‌های اتوزومی را دارا می‌باشند که به این دلیل به این مناطق، نواحی شبه اتوزومال یا اتوزوم کاذب اطلاق می‌گردد. نواحی شبه اتوزومی از دو منطقه، PAR1 و PAR2 تشکیل یافته‌اند (۳۱و۴).

برخلاف فقر ژنی کروموزم ایگرگ، این کروموزم غنی از انواع مختلفی از تکرارهای نوکلئوتیدی شامل SINES و همچنین شامل مضاعف شدگی‌های قطعه ای می‌باشد. احتمال نوترکیبی بصورت نوترکیبی همولوگوس غیرآللی منجر به بروز سطح بالای چندشکلی ساختاری بین افراد مختلف می‌شود. ناپایداری کروموزم ایگرگ و طبیعت و محتوای ژنی آن نشانگر این است که محتمل‌ترین انواع جهش‌های بیمارزا در روی این کروموزم تنها می‌تواند منجر به عقیم شدن فرد نر در نتیجه حذف ژن اسپرماتوژنز گردد (۴).

ریزماهوره‌هایی که بر روی این کروموزوم قرار گرفته‌اند در تعیین ابویت، هویت، امور جنائی و پزشکی قانونی، تعیین جنسیت جنین و در بسیاری از موارد دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند. این کاربرد ریزماهوره‌های کروموزم ایگرگ در اکثریت موارد بستگی به درصد پلی‌مورفیسم آنها در جمعیت مورد مطالعه دارد. در مواردی که این ریزماهوره‌ها غیرپلی‌مورفیک باشند، امکان استفاده از آنها در تعیین ابویت و تعیین هویت و در امور جنائی و پزشکی قانونی وجود نخواهد داشت. هدف این مطالعه، انتخاب و بررسی تعدادی از ریزماهوره‌های کروموزوم ایگرگ در جمعیت آذربایجان شرقی است که این مارکرها اولاً در زن‌ها تکثیر نیافته و تنها در مردها تکثیر یابد، سپس در بین مردها از خانواده‌های مختلف در منطقه آذربایجان شرقی پلی‌مورف و چندشکلی باشد.

بارگیری فرآورده‌های PCR و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید^۱: با استفاده از این روش، داده‌های حاصل از آنالیز اولیه جهت تشخیص وجود چندشکلی و تفسیر نتایج حاصل از بندهای ظاهر شده، مورد تجزیه و تحلیل نهایی قرار می‌گیرند. مقدار کافی محصول PCR بسته به کیفیت نوارهای حاصل از تکثیر آن‌ها، با حدود ۲ میکرولیتر بافر بارگیری بروموفلن آبی مخلوط گردید و بر روی ژل اکریلامید با غلظت ۱۰ درصد، در چاهک‌ها بارگیری شد. ژنوم تعدادی افراد مونث نیز با نشانگرهای استفاده شده تکثیر و بر روی ژل لود گردید. پس از این مراحل نمونه‌ها با ولتاژ شبانه ۱۷۰ ولت و ولتاژ پایانی ۲۲۰ ولت به مدت حدود ۲۰ ساعت در دمای اتاق الکتروفورز می‌شدند. تعادل بین طول قطعه، وضوح مورد نیاز و زمان در هنگام الکتروفورز، اغلب بطور تجربی تعیین می‌شود. آشکارسازی باندها با روش موسوم به روش سریع رنگ آمیزی نیترات نقره انجام شد. جهت بررسی درصد چندشکلی و پلی-مورفیک بودن هر کدام از ریزماهوره‌ها، تعداد افرادی که ریزماهوره مورد مطالعه در آنها قابلیت تمیز آن فرد را از دیگر افراد مورد مطالعه ارائه می‌داد بصورت درصدی مشخص گردید.

یافته‌ها

در ۵۰ فرد مذکر غیرخویشاوند بررسی شده از منطقه آذربایجان شرقی، چندشکلی مورد انتظار در نشانگرهای بررسی شده از کروموزوم ایگرگ، برای هر فرد بصورت باندهایی در روی ژل پلی اکریلامید که جایگاه آن در افراد مذکر مختلف با یکدیگر متفاوت بود آشکار گردید (شکل ۱). بدنبال آن بررسی آماری نتایج بدست آمده روی ژل‌ها، جهت شناسایی نشانگری که در بین نشانگرهای استفاده شده چند شکلی بیشتری داشته باشد صورت گرفت. از محصولات PCR افراد مونث تکثیر یافته با همین مارکرها نیز جهت لود روی ژل آکريل آمید در کنار محصولات PCR افراد مذکر بعنوان کنترل منفی و به‌منظور اطمینان از اختصاصی بودن نشانگرها، استفاده شد (شکل ۱).

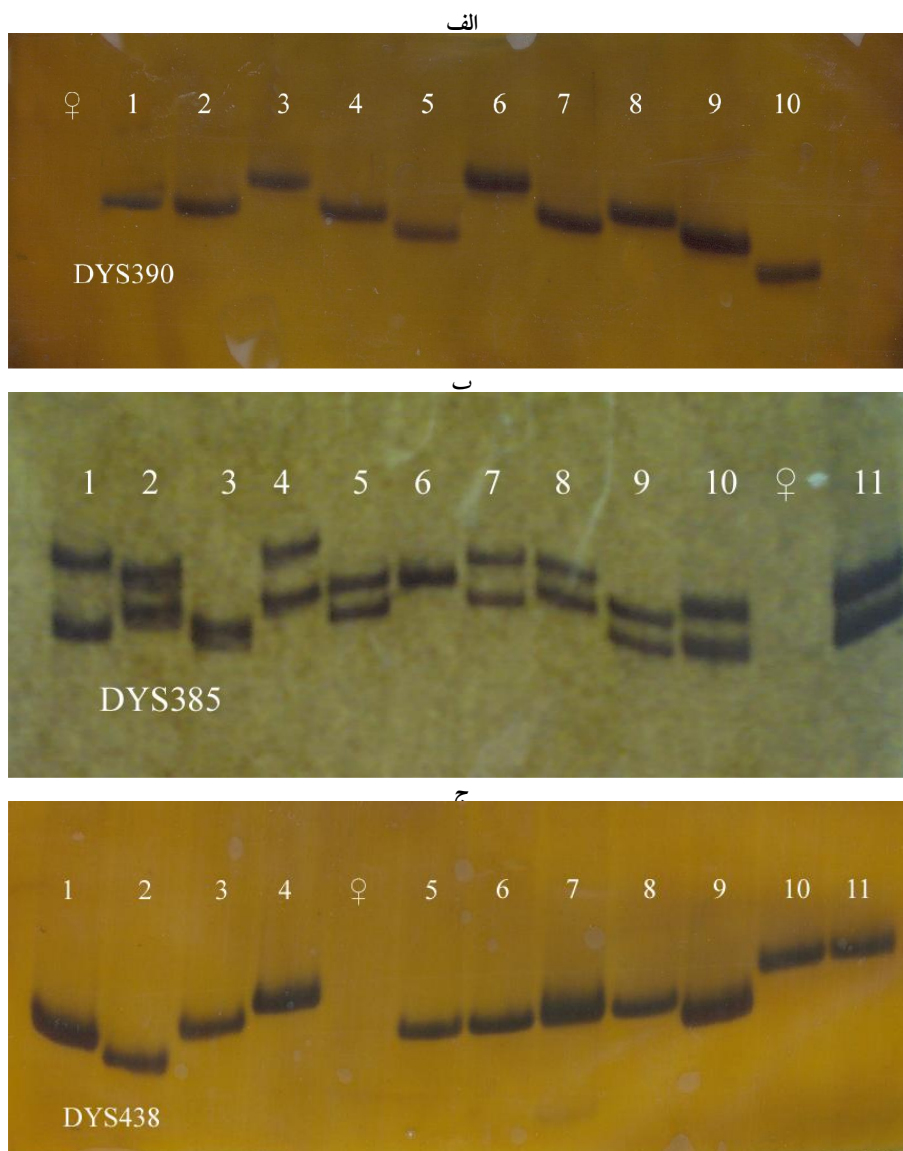
براساس نتایج بدست آمده مشخص گردید که مارکر DYS385 دارای پلی مورفيسم ۹۰ درصد در کروموزوم ایگرگ مردان در منطقه آذربایجان شرقی می‌باشد (در ۹۰ درصد از افراد بررسی شده، این مارکر پلی مورفیک بوده و امکان تمیز هر فرد با فرد دیگر با استفاده از این مارکر در ۹۰ درصد موارد مقدور بوده است). مارکرهای DYS438 در ۷۰ درصد و DYS390 پس از مارکر ذکر شده دارای ۴۵ درصد پلی مورفيسم می‌باشد.

بحث

با توجه به اهمیت و لزوم بررسی‌های مربوط به تعیین هویت در مسایل حقوقی - قضایی و جنایی، آزمایش تشخیص والدین، تعیین جنسیت جنین، بررسی ساختار مهاجرتی، ساکنین و ساختار تولید مثلی جمعیت‌ها جهت انتساب نژادی و بررسی روابط خویشاوندی برای مدیریت جمعیت‌ها و درک الگوهای آمیزشی،

تعیین تنوع و فاصله ژنتیکی جوامع طبیعی از لحاظ اشتقاق تکاملی در هر جمعیتی، امروزه بررسی مارکرهای اختصاصی کروموزوم ایگرگ در هر جمعیت، بعنوان یک وسیله راهبردی کارا در هر یک از این زمینه‌ها، و در برخی موارد بعنوان تنها راه تشخیصی قابل اطمینان، ضرورت قابل ملاحظه‌ای می‌یابد. ریزماهوره‌های کروموزوم ایگرگ به دلیل ویژگی‌های منحصرفردی که دارا می‌باشند و بیشتر به آنها اشاره شد، به عنوان نشانگر ایده‌آل برای این دسته از تحقیقات ژنتیکی شناخته شده است. در این بررسی در مارکر DYS385 در ۹۵-۹۰ درصد مردان بررسی شده از منطقه آذربایجان شرقی حالت چندشکلی مشاهده شد. این مارکر با توجه به اینکه یک آلل چندکپی می‌باشد در گزارشهای قبلی نیز بیشترین حالت پلی مورفيسم را در جمعیت‌های دیگر نشان داده و جهت بیشتر بررسی‌های تشخیص هویتی می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد. لازم بذکر است که در اینگونه مارکرها در مواردی تجزیه و تحلیل داده‌ها مشکل و پیچیده است (۶). درصد بالای حالت پلی مورفيسمی در این نشانگر در مقایسه با مارکرهای دیگر در جمعیت مورد مطالعه آذربایجان شرقی، این نشانگر را جزو بهترین نشانگرها جهت بررسی‌های ژنتیکی معرفی می‌نماید. در نشانگرهای DYS438 و DYS390 بعد از نشانگر ذکر شده به ترتیب پلی مورفيسم با ۷۰ درصد و ۴۵-۵۰ درصد پلی مورفيسم مشاهده شد که خود رقم قابل ملاحظه‌ای می‌باشد. مارکر DYS438 یک میکروستلایت پنتانوکلوئید می‌باشد (۷). این مارکر در جمعیت‌های دیگر نظیر جمعیت پاکستان و جمعیت ویژه ای از هندوستان نیز به‌مراه مارکرهای دیگر مورد بررسی قرار گرفته است (۸ و ۷). بکار بردن دو مارکر با درصد پلی مورفيسم بالا به تنهایی یا بصورت ترکیبی با همدیگر و همچنین در ترکیب با مارکر سوم می‌تواند نتیجه قابل اطمینانی در موارد تشخیصی بویژه در تعیین هویت، آزمایش تعیین والد، تعیین جنسیت جنین و دیگر زمینه‌هایی که کروموزوم ایگرگ حصول به نتیجه را سهولت می‌بخشد، بدست دهد (۹).

ضرورت انجام PCR برای افراد مونث با همین مارکرها و الکتروفورز این محصولات PCR روی ژل آکريلامید در کنار محصولات PCR افراد مذکر، جهت کنترل و حصول اطمینان از اینکه این ریزماهوره‌ها فقط در کروموزوم افراد نر وجود دارند و تنها از پدر به پسر منتقل می‌شوند، می‌باشد. از آنجایی که این مارکرها به طریقی انتخاب شده بودند که منحصراً در کروموزوم ایگرگ وجود داشته باشند، انتظار می‌رفت روی ژل آکريل آمید در فرد مونث باندهی مشاهده نشود (شکل ۲)، علاوه بر مورد ذکر شده، این نتیجه نشان‌دهنده این امر است که پرایمرهای طراحی شده از درصد بسیار بالایی از اختصاصی بودن برخوردار هستند و به جای دیگری از DNA بجز قسمت مورد انتظار نچسبیده اند.



شکل ۱- الف، ب و ج به ترتیب نمونه ای از عکس های ژل پلی آکرلامید مربوط به مارکر DYS390، DYS385 و DYS438 می باشد. بر روی ژل ها علاوه بر افراد مذکر، یک فرد مونث مورد بررسی قرار گرفته است.

جدول ۱: مشخصات اختصاصی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش PCR جهت تکثیر ریزماهورهای مورد استفاده بر روی کروموزوم ایگرگ.

نام آغازگر	مقدار (μg)	وزن مولکولی (gr/mol)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	طول (mer)	GC (%)	OD
DYS 385 (F)	۲۷۰	۶۰۷۳	۵۱/۲	۲۰	۳۵	۹/۳
DYS 385 (R)	۲۴۷	۵۸۴۳	۵۲/۴	۱۹	۴۲/۱	۹/۰
DYS 390 (F)	۱۶۹	۵۵۱۵	۵۳/۷	۱۸	۵۰	۶/۰
DYS 390 (R)	۳۸۵	۶۰۹۸	۵۳/۲	۲۰	۴۰	۱۳/۴
DYS 438 (F)	۱۲۷	۵۸۳۹	۵۲/۴	۱۹	۴۲/۱	۵/۱
DYS 438 (R)	۱۸۹	۵۹۷۸	۵۳/۲	۲۰	۴۰	۶/۳
DYS 439 (F)	۳۹۴/۰	۷۹۲۸	۵۶/۹	۲۶	۳۰/۸	۱۳/۹
DYS 439 (R)	۳۳۹/۰	۶۰۷۳	۵۱/۱	۲۰	۳۵/۰	۱۱/۱

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از این بررسی نشانگر این هست که ریزماهوره DYS385 بیشترین حالت چندشکلی را در جمعیت آذربایجان شرقی دارد و به همراه دو مارکر دیگر بهترین کاربرد را در تشخیص هویت، تعیین ابویت و دیگر کاربردهای پزشکی - جنایی خواهد داشت.

تقدیر و تشکر

مolfین از خانم رقیه ابراهیمی، همکار پرستار بدلیل همکاری در خونگیری از افراد داوطلب کمال تشکر را دارد. این پروژه مصوب قطب علمی سیتومولکولی تنوع زیستی دانشگاه تبریز بوده و تامین بودجه گردیده است.

References:

1. Jobling MA, Hurles ME, Tyler-Smith C. *Human Evolutionary Genetics*. 1st ed. New York, Garland science, 2004; PP: 256-264.
2. Skaletsky H, Kuroda-lawaguchi T, Minx PJ. The male-specific region of the human Y chromosome: a mosaic of discrete sequence classes. *Natur* 2003; **423**: 825-837.
3. Jobling MA, Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature* 2003; **4**: 598-613.
4. Strachan T, Read AP. *Human molecular genetics*. 3rd ed. New York, Garland science, 2004; PP: 367-370.
5. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1998; **16**: 1215.
6. Kayser M, Kittler R, Erler A. A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellite. *Am J Hum Gene* 2004; **74**: 1183-1197.
7. Qamar R, Ayub Q, Mohyuddin A. Y-Chromosomal DNA Variation in Pakistan. *Am J Hum Genet* 2002; **70**(5): 1107-1124.
8. Kumar V, Reddy AN, Babu JP. Y-chromosome evidence suggests a common paternal heritage of Austro-Asiatic populations. *BMC Evol Biol* 2007; **7**: 47.
9. Kayser M, Brauer S, Weiss G, Schiefenhövel W, Underhill PA, Stoneking M. Independent Histories of Human Y Chromosomes from Melanesia and Australia. *Am J Hum Genet* 2001; **68**(1): 173-190.