مجله دانش و تندرستی، دوره ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v10i1.506

مقاله پژوهشی

طراحی، انتخاب و بهینه‌سازی توالی‌های تکراری کوتاه به‌منظور تشخیص بیماری‌های تک ژنی قبل از لانه‌گزینی

اصغر شایان‌نیا[۱]، سعید امانپور[۲]، سعیدرضا غفاری*[۳]

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 باتوجه به گستردگی کاربردهای STR و باتوجه به تعداد زیاد این نشانگرها در سطح ژنوم، بایستی از بین هزاران STR موجود، چند STR مناسب را باتوجه به نوع کاربرد انتخاب نمود.*

مواد و روش‌ها: *در این پژوهش بیماری آتروفی 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 اندازه اللی 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 به‌دست آمده الکتروفورز مویئنه 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 آتروفی 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، آتروفی عضلانی نخاعی.

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

ارجاع: شایان نیا اصغر، امانپور سعید، غفاری سعیدرضا. طراحی، انتخاب و بهینه‌سازی توالی‌های تکراری کوتاه به‌منظور 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 به‌صورت یکنواخت در سرتا سر ژنوم انسان پراکنده شده‌اند و به‌راحتی قابل PCR شدن هستند. لوکس‌های STR نشانگرهای بسیار پلی‌مورفیکی هستند، زیرا موتیف واحد تکرار شونده می‌تواند بین ۲-۷bp متغیر باشد (۱-۳). به همین دلیل امروزه کاربردهای متعددی در ژنتیک پیدا کرده‌اند. به‌عنوان مثال این نشانگرها به‌دلیل پلی‌مورفیسم و هتروزیگوسیتی بالایشان به‌عنوان 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 به‌عنوان 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 به‌دست آمده به روش لقاح آزمایشگاهی یا IVF (Invitro 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 به‌کار می‌رود (۷-۱۲).

در PGD به‌روش ملکولی به‌دلیل محدود بودن مقدار DNA موجود در سلول‌های دیپلوییید ممکن است مشکلاتی ایجاد شود که اصولاً در تشخیص به‌صورت معمول ممکن است، مطرح نباشند. ازجمله مشکلات PCR تک سلول می‌توان به افزایش آلودگی PCR، عدم تکثیر و تکثیر نشدن یکی از الل‌ها در یک سلول دیپلوییید 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 موردنیاز را از میان صدها نشانگر STR انتخاب و بهینه‌سازی نمود. به‌منظور دسترسی به یک مجموعه نشانگرخوب جهت کاربردهای مختلف، بایستی از یک استراتژی جهت این امر استفاده گردد تا به‌راحتی و در کمترین زمان ممکن بتوان یک مجموعه نشانگر STR مناسب را متناسب با کاربرد موردنظر طراحی و بهینه‌سازی نمود.

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

به‌منظور 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 موردنظر قرار گرفته باشند، تک لوکوسی بوده، چند لوکوسی نباشند، فاصله آنها تا ژن موردنظر زیاد نباشد تا امکان ردیابی ژن بیماری از طریق آنالیز پیوستگی امکان‌پذیر باشد و براساس بررسی متون انجام شده، از هتروزیگوسیتی بالایی برخوردار باشد.

پس از انتخاب نشانگرها، توالی نوکلئوتیدی لوکوس‌های STR دانلود شدند. توالی‌های به‌دست آمده قبل از طراحی پرایمرها، با استفاده از یک نرم‌افزار ویژه، انطباق چند تایی شدند (۱۴). تعداد الل‌ها و طیف اندازه آنها با بررسی متون مربوطه برآورد گردید و مارکرهای همپوشان به‌منظور عدم تداخل سیگنال‌های به‌دست آمده، با استفاده از رنگ‌های فلوئورسانت متفاوت نشان‌دار شدند. در ادامه، پرایمرهای موردنیاز 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 MgCl2 و PH بافر PCR را فراهم می‌کند. علاوه‌براین، به کمک موادی 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) PCRبهینه سازی شدند (۱۶).

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

نتایج

در این مطالعه بیماری SMA به‌عنوان 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.

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 STSها 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 مروگر از نام‌های آلتر ناتیو 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 D551417، D55637، D55629، D55610 و D551408 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 رفرانس بود. علاوه بر توالی رفرانس 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 چند تایی، از طراحی پرایمرها در قسمت‌هایی که SNP وجود دارد، اجتناب گردید.

نتایج انطباق چند تایی 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. همان‌طوری‌که در شکل مشخص است، در محل قرارگیری پرایمرها، تمام توالی‌های نوکلئوتیدی یکسان بوده و SNP وجود ندارد، بنابراین پرایمرهای طراحی شده قادرند تمام الل‌های نشان داده شده را تکثیر نمایند.

تعداد الل‌ها و طیف اندازه آنها (تعیین بزرگترین و کوچکترین آلل هر STR) با بررسی متون مربوطه برآورد گردید. در مورد نشانگرهایی که این اطلاعات در دسترس نبود، اندازه پرایمرها در زمان طراحی و براساس محل قرارگیری پرایمرها تخمین‌زده شد و ترجیحاً برای اجتناب از همپوشانی با الل‌های سایر نشانگرهای STR از رنگ فلورسانت متفاوتی استفاده گردید.

در این مطالعه نشانگرهای D5S610 و D5S629 با رنگ فلورسانت Atto، 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 اللی و اندازه الل‌ها 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 الل متوسط در نظر گرفته شد و برای نرم‌افزار تعریف گردید. مثلاً برای مارکر D5S1417 براساس بررسی متون انجام شده اندازه بزرگترین الل و کوچکترین آلل گزارش شده باهم جمع شد، سپس بر عدد ۲ تقسیم گردید و این عدد به‌عنوان طول یک الل 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 از 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 MgCl2 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، NH4SO4 استفاده گردید. شرایط PCR بهینه‌سازی شده برای هر یک از ۵ STR درجدول ۱ و شریط 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

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 به‌صورت 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 به‌طور کامل از ابتدا تا انتها ذکر کرده باشد، یافت نگردید. در این مطالعه، کلیه مراحل انجام کار به‌صورت مرحله به مرحله از انتخاب نشانگرها، طراحی پرایمرها و رنگ‌های فلورسنت، الکتروفورز کاپیلاری نرم‌افزارها و وب سایت‌های موردنیاز ذکر گردیده است. برای این منظور کلیه مراحل با استفاده از یک مجموعه ۵ تایی از نشانگر های اطراف ژن SMN1 نشان داده شده است. به‌طوری‌که 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 موردنظرش 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 به‌صورت غیرمستقیم ژنوتیپ جنین را تعیین نمود. فلورنتینو و همکاران از این روش برای تعیین هاپلوتایپ ناحیه HLA استفاده کرده‌اند (۱۳). علاوه‌بر این در مطالعات متعددی از جمله در دو مطالعه فیگویرا و هلانی از نشانگرهای STR برای تعیین ADO آلودگی با DNA خارجی و نیز تعیین پلوئیدی استفاده شده است.

در این پژوهش PCR لوکوس‌های STR به‌صورت تک تک (Singleplex) انجام شد و در ادامه محصولات PCR پنج نشانگر با هم مخلوط شدند و سپس به‌صورت همزمان الکتروفورز مویینه انجام شد. انجام PCR به‌صورت تکی مستلزم صرف زمان و هزینه بیشتری نسبت‌به 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 به‌صورت چندتایی را داشته باشند.

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 از مطالعه ۵ نشانگر STR که براساس مطالعات قبلی از هتروزیگوسیتی نسبتاً بالایی برخوردار بودند استفاده گردید. ولی با وجود این هتروزیگوسیتی بالا، همچنان تضمین‌کننده گویا بودن و کاربردی بودن نشانگرها در تمام خانوادها نمی‌باشند. بنابراین توصیه می‌شود که تعداد نشانگر های 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 علاوه‌بر 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 مادری را شناسایی نمود.

References

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Agrawal S, Khan F. Reconstructing recent human phylogenies with forensic STR loci: a statistical approach. BMC Genet 2005;6:47.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Fiorentino F, Kahraman S, Karadayi H, Biricik A, Sertyel S, Karlikaya G, et al. Short tandem repeats haplotyping of the HLA

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.

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.

of Knowledge & Health 2015; Vol 10, No 1
Shahroud University of Medical Sciences

DOI: 10.22100/jkh.v10i1.506
Original Article

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

AsgharShayannia (Ph.D.)[1], Saeed Amanpour (Ph.D.)[2], Saeed Reza Ghaffari (Ph.D.)[3*]

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 optimizationof short tandem repeat used in preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. Journal of Knowledge & Health 2015;10(1):31-36.