

اطلاعات جمعیتی مارکر D7S2425 در پنج قوم از جمعیت ایرانی: یک مارکر به شدت اطلاع دهنده در

تشخیص‌های مولکولی ناشنوایی غیر سندرمی با وراثت اتوزومی مغلوب (ARNSHL)

مرجان مجتبی نائینی^۱، صادق ولیان بروجنی^۲، مرتضی هاشم‌زاده چالستری^{۱*}

خلاصه

مقدمه: جهش‌های ژن *SLC26A4* پس از ژن *GJB2* مهم‌ترین عامل ژنتیکی ایجاد کننده ناشنوایی غیر سندرمی با وراثت اتوزومی مغلوب (Autosomal recessive nonsyndromic hearing loss یا ARNSHL) است که امروزه در تشخیص‌های مولکولی مورد بررسی قرار می‌گیرد. تعداد زیادی از مارکرهای STR مرتبط با این ناحیه در پایگاه داده‌ها معرفی شده‌اند. در مطالعه حاضر خصوصیات و اطلاع دهنده‌گی مارکر D7S2425 با توالی‌های تکراری CA که در ناحیه ۳ ژن *SLC26A4* می‌باشد، در پنج قوم مختلف جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. روش: تعیین ژنوتیپ جایگاه ژنی مارکر D7S2425 در ۱۶۵ فرد شنوای غیر خویشاوند از پنج قوم فارس، آذری، ترکمن، گیلک و عرب توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase chain reaction یا PCR)، ژل الکتروفورز پلی‌اکریل‌آمید (PAGE یا Polyacrylamide gel electrophoresis) و در نهایت الکتروفورز فلورسنت موئینه صورت گرفت. به منظور تفسیر نتایج از نرم‌افزارهای Human STR Identity، GeneMarker HID، Genepop، GeneMarker و Microsatellite Tools استفاده شد.

یافته‌ها: بررسی آلل‌های مارکر D7S2425 بیانگر حضور ۸ آلل در جمعیت ایرانی بود که آلل ۲۴۶ جفت باز با فراوانی ۰/۳۰ درصد فراوان‌ترین آلل به شمار آمد. بالاترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده متعلق به قوم گیلک به میزان ۹۳/۹ درصد بود. بررسی تعادل Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg equilibrium یا HWE) نشان داد که همه اقوام جمعیت ایرانی برای مارکر D7S2425 در تعادل بودند. در نهایت بررسی مقدار (Polymorphism information content) PIC (Highly informative) آن را در اقوام مورد بررسی جمعیت ایرانی نشان داد (مقدار PIC بالاتر از ۰/۷).

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر مارکر D7S2425 را در تشخیص‌های مولکولی ناشنوایی غیر سندرمی وابسته به *SLC26A4* با توارث اتوزومی مغلوب به روش تحلیل پیوستگی در جمعیت ایرانی به شدت اطلاع دهنده معرفی می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: مارکر D7S2425، *SLC26A4*، ناشنوایی غیر سندرمی اتوزومی مغلوب، جمعیت ایرانی

۱- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران ۲- استاد، بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم،

دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران ۳- استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: mchalesh@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۳/۲۴ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۲/۹/۲ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۱/۱۶

مقدمه

ناشنوایی مادرزادی متداولترین نقص حسی در انسان است و شیوع آن ۱ در ۱۰۰۰ نوزاد می‌باشد (۱). عوامل مختلفی موجب ناشنوایی می‌گردند که بیش از ۵۰ درصد موارد مادرزادی، از نوع وراثتی هستند (۲). ناشنوایی وراثتی به دو دسته سندرمی و غیر سندرمی تقسیم می‌شود. نوع غیر سندرمی (Nonsyndromic hearing loss یا NSHL) ۷۰ درصد و نوع سندرمی (Syndromic hearing loss یا SHL) ۳۰ درصد کل ناشنوایی‌های وراثتی را تشکیل می‌دهد. ناشنوایی غیر سندرمی بر اساس سن آغاز پیش‌گفتاری (Prelingual) و پس‌گفتاری (Postlingual) خوانده می‌شود و با توجه به الگوی وراثتی به چهار دسته اتوزومی غالب (DFNA)، اتوزومی مغلوب (DFNB)، وابسته به X (DFN) و میتوکندریایی (DFNM) تقسیم می‌گردد (۳). از میان چهار گروه، ناشنوایی با وراثت اتوزومی مغلوب با فراوانی ۷۵-۸۰ درصد دارای بیش‌ترین فراوانی است (۴). شایع‌ترین جهش‌های مسؤول ناشنوایی غیر سندرمی با وراثت اتوزومی مغلوب در بسیاری از جمعیت‌های جهان از جمله جمعیت ایرانی جهش‌های ژن *GJB2* و پس از آن ژن *SLC26A4* می‌باشد (۵، ۶).

به علت ناهمگونی بالا و نقش کم بسیاری از ژن‌های ایجاد کننده ناشنوایی، غربالگری کامل جهش‌ها در تشخیص‌های مولکولی امکان‌پذیر نمی‌باشد و در تشخیص‌های مولکولی بسیاری از نقاط جهان غربالگری جهش‌ها تنها برای دو ژن *GJB2* و *SLC26A4* صورت می‌گیرد (۵). تشخیص مولکولی ناشنوایی بر پایه دو روش بررسی مستقیم جهش و بررسی غیر مستقیم توسط تحلیل پیوستگی انجام می‌شود. انتخاب روش در تشخیص‌های مولکولی به ویژگی‌های ژن مورد بررسی بستگی دارد و

اولویت آن‌ها در ژن‌های مختلف متفاوت است (۷). روش بررسی مستقیم شامل تعیین توالی ژنوم بیماران برای تشخیص جهش‌های ایجاد کننده بیماری می‌باشد که برای جهش‌ها، ژن *GJB2* به علت وسعت کم ژن و شیوع بالای جهش ۳۵delG مناسب به نظر می‌رسد (۸)؛ در حالی که به دلیل وسعت زیاد ژن *SLC26A4* و پراکندگی جهش‌های مشاهده شده در جمعیت ایرانی در نواحی مختلف ژن و نیز شیوع به نسبت یکسان این جهش‌ها، روش مستقیم برای بررسی جهش‌های این ژن مطلوب نمی‌باشد و بهتر است به منظور صرفه‌جویی در وقت و هزینه از روش غیر مستقیم استفاده گردد (۹).

بررسی غیر مستقیم جهش‌ها یا تحلیل پیوستگی توسط مارکرهای چند شکلی متصل به ژن انجام می‌شود. یکی از مارکرهای مورد استفاده در بررسی غیر مستقیم توالی‌های تکراری، دسته ریزماهواره‌های موجود در ژنوم است که به مقدار بسیار زیاد و به شکل تصادفی در طول ژنوم پراکنده می‌باشد و به آن‌ها توالی‌های تکراری پشت سر هم (Short tandem repeats یا STR) می‌گویند (۱۰). چند شکلی‌های STR از تغییر در تعداد تکرارهای پشت سر هم مربوط به واحدهای توالی کوتاه ۲ تا ۴ نوکلئوتیدی ایجاد می‌شود. برای افزایش کیفیت بررسی در تحلیل پیوستگی باید از مارکرهای اطلاع دهنده استفاده شود. اطلاع دهنده‌گی یک مارکر توسط عامل ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی (Polymorphism information content یا PIC) اندازه‌گیری می‌شود. مقدار PIC برای جایگاه‌های ژنی به صورت تعادل Hardy-Weinberg در جمعیت تعریف می‌شود که به تعداد آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مارکر بستگی دارد. بنابراین در جمعیت‌های مختلف به دلیل ساختارهای ژنتیکی متفاوت، متغیر می‌باشد (۱۱، ۱۲). در نتیجه به منظور غربالگری بهینه

جهش‌ها به روش غیر مستقیم، مارکرهای مورد استفاده باید در جمعیت‌های مختلف ارزیابی شود و مارکرهای اطلاع دهنده هر جمعیت به طور جداگانه معرفی گردد.

تاکنون هیچ مطالعه‌ای مبنی بر بررسی مارکرهای اطلاع دهنده مرتبط با ژن *SLC26A4* در جمعیت ایرانی صورت نگرفته است. در پایگاه داده‌ها مارکرهای مختلفی در ناحیه ژن *SLC26A4* معرفی شده است. یکی از مارکرهای پیوسته به ژن *SLC26A4*، *D7S2425* می‌باشد که در ناحیه ۳ این ژن قرار دارد و دارای هتروزیگوسیتی بالا در پایگاه‌های گزارش شده می‌باشد. به همین دلیل برای بررسی در جمعیت ایرانی انتخاب شد (۱۴، ۱۳). در مطالعه حاضر خصوصیات و اطلاع دهنده‌گی مارکر *D7S2425* در پنج قوم جمعیت ایرانی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت که نتایج آن می‌تواند موجب بهینه‌سازی تشخیص‌های مولکولی نا شنوایی‌های وابسته به ژن *SLC26A4* و همچنین تقویت اطلاعات ساختاری ژنتیکی جمعیت ایرانی گردد.

Phenol-Chloroform استخراج شد و کمیت حاصل شده با استفاده از دستگاه NanoDrop1000 (Isogen, Rockland/Montchanin, USA) مورد بررسی قرار گرفت. همه مارکرهای STR ناحیه ژن *SLC26A4* موجود در پایگاه داده UniSTS بررسی شد و در نهایت مارکر *D7S2425* (UniSTS = ۳۶۰۴۹) به منظور مطالعه بیشتر به علت گزارش هتروزیگوسیتی بالا در پایگاه داده‌هایی از جمله center Genethon انتخاب گردید (۱۴).

پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق از تحقیقات پیشین و پایگاه داده UniSTS در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) استخراج شد. توالی پرایمر پیشرو (F) و پرایمر پیرو (R) به صورت زیر می‌باشد که با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase chain reaction یا PCR) قطعاتی با طول متغیر ۲۴۶-۲۳۴ جفت باز تولید می‌نماید (۱۵).

F: 5'-CTAGTCCTGAGAAGACATTACCC-3'

R: 5'- CCTGTTTCAGATGTTTTATCCA -3'

انجام روش PCR بر روی نمونه‌های DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler) (ASTEC PC818-) (Japan) توسط برنامه تاچ داون (Touch down) طبق جدول ۱ انجام شد. شرایط واکنش PCR شامل ۱ میکرولیتر از دو پرایمر (۱۰ pm)، ۱ میکرولیتر Taq DNA Polymerase ۵ واحد بین‌الملل بر میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر dNTP mix ۱۰ میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر Taq DNA buffer (۱۰X)، ۲ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار و ۲ میکرولیتر DNA (۸۰ نانوگرم) که با آب مقطر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

روش بررسی

از ۱۶۵ فرد شنوایی غیر خویشاوند در پنج قوم مختلف ایرانی «شامل فارس، آذری، ترکمن، گیلک و عرب» و تعداد مساوی از زنان و مردان نمونه‌گیری به عمل آمد. پس از کسب رضایت‌نامه کتبی، با استفاده از روش نمونه‌گیری آسان ۱۰ میلی‌لیتر خون فرد در لوله حاوی یک میلی‌لیتر EDTA (Edetic acid) با غلظت ۰/۵ مولار جمع‌آوری شد و پس از ثبت اطلاعات افراد بر روی آن تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. DNA (Deoxyribonucleic acid) نمونه‌های خون به روش استاندارد

جدول ۱. برنامه بهینه شده نهایی دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler) برای مارکر D7S2425

مرحله	دما (درجه سانتی گراد)	مدت	تعداد سیکل
۱	۹۴	۳ دقیقه	۱
	۹۴	۳۰ ثانیه	
۲	۵۳-۶۲	۳۰ ثانیه (کم شدن یک درجه در هر سیکل)	۱۰ سیکل تاچ داون (Touch down)
	۷۲	۳۰ ثانیه	
	۹۴	۳۰ ثانیه	
۳	۵۲	۳۰ ثانیه	۲۵ سیکل معمولی
	۷۲	۳۰ ثانیه	
۴	۷۲	۷ دقیقه	۱

وجود دارد، مناسب است. بنابراین باید برای مارکرهایی که تعداد زیادی آلل دارند مانند لوکوس های ریزماهوره استفاده شود (۱۷، ۱۸). این نرم افزار با استفاده از آزمون Fisher exact به بررسی تعادل می پردازد.

در نهایت با استفاده از نرم افزار Microsatellite Tools میزان PIC تخمین زده، به بررسی اطلاع دهندگی مارکر در اقوام مختلف پرداخته شد (۱۹). عامل PIC یک شاخص محاسباتی برای تعیین اطلاع دهندگی مارکرها به منظور استفاده در تحلیل پیوستگی می باشد. این شاخص برای جایگاه مارکرهای دارای تعادل Hardy-Weinberg در جمعیت تعریف می شود که به تعداد و فراوانی آلل ها و هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت وابسته است.

نتایج

محصول PCR نمونه های افراد شنوای غیر خویشاوند برای مارکر D7S2425 ابتدا با روش الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد مورد مشاهده و ارزیابی قرار گرفت و پس از اطمینان از وجود محصولات PCR مناسب، با استفاده از فلورسنت الکتروفورز موئینه تعیین ژنوتیپ و آلل بندی شد. این آلل بندی ها به دو صورت تعداد جفت باز طول محصولات و تعداد تکرارهای CA بیان گردید. نتایج حاصل به طور کلی نشان دهنده حضور مجموع ۸ آلل در جمعیت ایرانی است (شکل ۱). از میان تمام آلل ها قوم

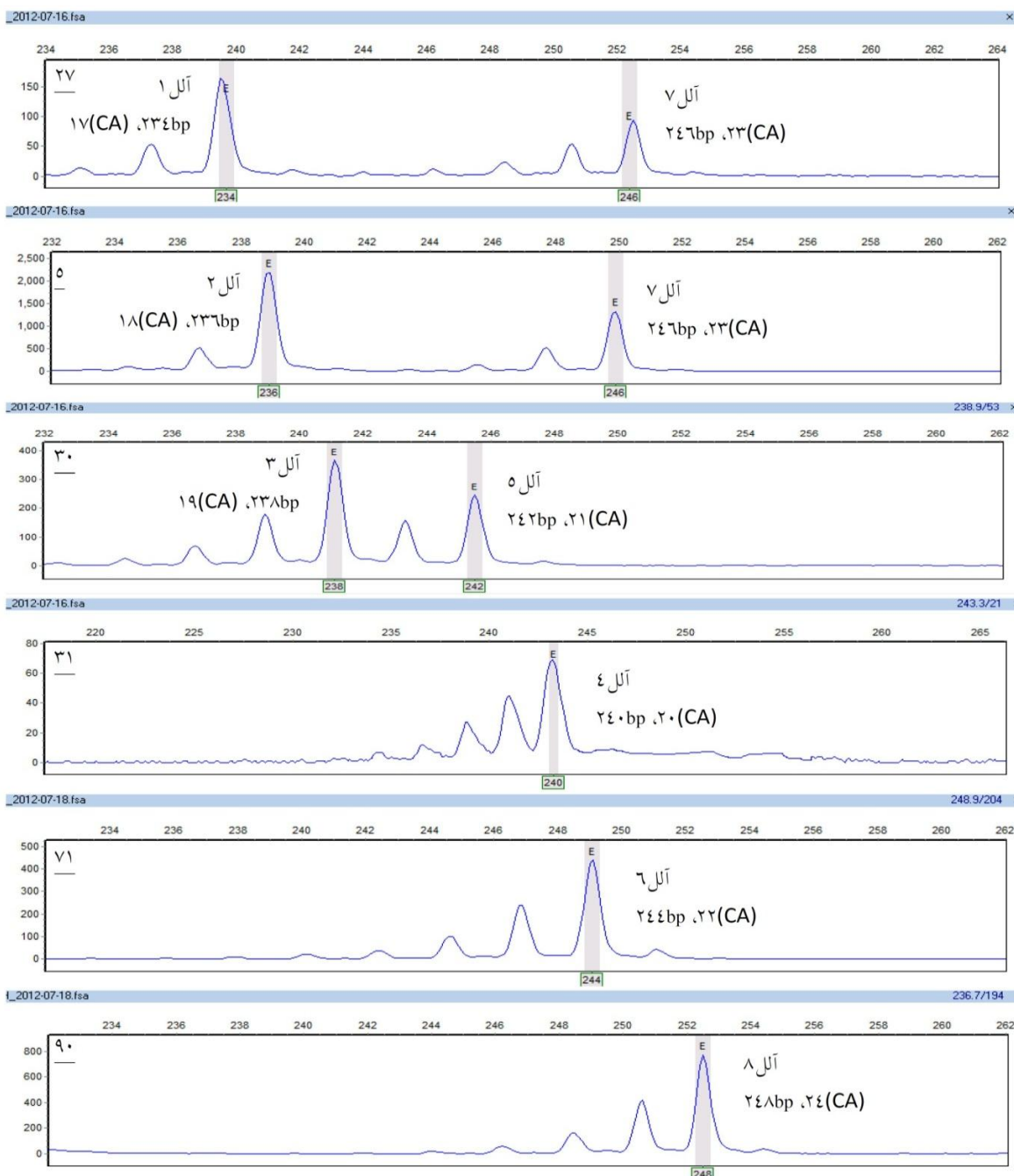
همه محصولات بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد (نسبت ۱ بیس اکریل آمید: ۱۹ اکریل آمید) به مدت سه ساعت با ولتاژ ۲۰۰ ولت رانده و ژل به دست آمده با نیترات نقره رنگ آمیزی گردید. پس از تأیید کیفیت باندها، محصولات توسط الکتروفورز موئینه فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند. در سر ۵ پرایمر معکوس و به منظور تعیین طول محصولات PCR توسط تکنیک الکتروفورز موئینه، رنگ فلورسنت 6-Fam (رنگ آبی) افزوده و توسط دستگاه ABI Prism 3130 خوانده شد. در نهایت نتایج به صورت نمودار نمایش داده شد. نمودارهای به دست آمده توسط نرم افزار GeneMarker HID Human STR تعیین ژنوتیپ و آلل بندی شدند.

تحلیل آماری نتایج به دست آمده مانند تعیین ژنوتیپ افراد شامل تخمین فراوانی آللی، درجه هتروزیگوسیتی و فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار فنوتیپ های هموزیگوت و هتروزیگوت و همچنین بررسی تعادل Hardy-Weinberg با استفاده از نرم افزار پایگاه GenePop انجام شد (۱۶). روش هایی که تاکنون برای بررسی تعادل Hardy-Weinberg استفاده شده است در دو گروه قرار می گیرند. روش اول استفاده از آزمون χ^2 است. این آزمون وقتی که اندازه نمونه کوچک باشد و یا آلل های نادر وجود داشته باشد، قابل اعتماد نیست. روش دیگر بر اساس آزمون Fisher exact می باشد. این آزمون وقتی که آلل های نادر

هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای هر یک از قوم‌ها به صورت جداگانه و در نهایت برای جمعیت ایرانی توسط نرم‌افزار GenePop محاسبه شد که به تفصیل در جدول ۳ آمده است.

فارس ۷ آلل، آذری ۶ آلل، ترکمن ۷ آلل، گیلک ۶ آلل و عرب ۸ آلل را دارا بودند که در جدول ۲ فراوانی آلل‌ها به طور جداگانه در هر قوم و به طور کلی در جمعیت ایرانی بیان شده است. پس از تعیین ژنوتیپ افراد، درصد

شکل ۱. تعداد آلل‌های مارکر D7S2425 نمونه‌های ۲۷، ۵ و ۳۰ هتروزیگوت و نمونه‌های ۳۱، ۷۱ و ۹۰ هموزیگوت



در این ۶ نمونه ۸ آلل مشاهده شده در همه نمونه‌ها نشان داده شده است

جدول ۲. آلل‌ها و درصد فراوانی‌های آللی مارکر D7S2425 در اقوام مختلف و جمعیت ایرانی

شماره	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	قوم
آلل	۲۳۴	۲۳۶	۲۳۸	۲۴۰	۲۴۲	۲۴۴	۲۴۶	۲۴۸	
	۱۷CA	۱۸CA	۱۹CA	۲۰CA	۲۱CA	۲۲CA	۲۳CA	۲۴CA	
کلیه اقوام (جمعیت ایرانی)	۰/۳۰	۳/۹۳	۲/۴۲	۶/۳۶	۲۴/۸۵	۱۷/۸۹	۳۵/۱۵	۹/۰۹	
فارس	-	۹/۰۹	۱/۵۲	۴/۵۵	۲۲/۸۳	۱۸/۱۸	۳۳/۳۳	۱۰/۶۱	
آذری	-	-	۴/۵۵	۶/۰۶	۱۶/۶۷	۲۷/۲۷	۳۷/۸۸	۷/۵۸	
ترکمن	-	۱/۵۲	۳/۰۳	۷/۵۸	۳۳/۳۳	۱۵/۱۵	۳۰/۳۰	۹/۰۹	
گیلک	-	۳/۰۳	-	۹/۰۹	۲۷/۲۷	۱۵/۱۵	۳۳/۳۳	۱۲/۱۲	
عرب	۱/۵۲	۶/۰۶	۳/۰۳	۴/۵۵	۲۴/۲۴	۱۳/۶۴	۴۰/۹۱	۶/۰۶	

با توجه به اطلاعات به دست آمده از فراوانی آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مشاهده شده، مقدار PIC در هر قوم به طور جداگانه توسط نرم‌افزار Microsatellite Tools محاسبه شد. مقدار P برای اقوام مختلف به ترتیب فارس ۰/۷۵۱، آذری ۰/۷۰۴، ترکمن ۰/۷۲۲، گیلک ۰/۷۳۲ و عرب ۰/۷۱۱ و برای کلیه اقوام ۰/۷۳۵ به دست آمد و نشان می‌دهد که تمام مقادیر PIC بزرگتر از ۰/۷ می‌باشد.

بحث

مطالعه حاضر به منظور شفاف‌سازی ویژگی‌ها و خصوصیات مارکر D7S2425 در جمعیت ایرانی و در اقوام مختلف آن صورت گرفت که خود به انتخاب بهینه مارکرهای مورد استفاده در تشخیص مولکولی جهش‌های SLC26A4 مسؤوّل ناشنوایی به روش غیر مستقیم کمک می‌نماید و در پیشرفت روش‌های تشخیصی جمعیت ایرانی مؤثر می‌باشد. همچنین نتایج مطالعه حاضر موجب تقویت اطلاعات ساختاری ژنتیکی جمعیت ایرانی و اقوام مختلف آن گردید.

در مطالعه حاضر از بین ۸ آلل شناسایی شده بر روی مارکر D7S2425، آلل ۷ (که دارای طول محصول PCR ۲۴۶

تبادل Hardy-Weinberg بیان می‌کند که در جمعیتی با جفت‌گیری تصادفی بدون انتخاب، جهش یا مهاجرت فراوانی‌های آللی و فراوانی‌های ژنوتیپی از نسلی به نسل دیگر ثابت است. در این مطالعه تعادل Hardy-Weinberg برای جایگاه مارکر در قوم‌های مختلف و در جمعیت ایرانی توسط نرم‌افزار GenePop بررسی شد. این نتایج مقدار P محاسبه شده از آزمون Fisher exact می‌باشد و در قوم فارس، آذری، ترکمن، گیلک و عرب به ترتیب با مقادیر ۰/۰۷۵، ۰/۴۷۴، ۰/۶۶۷، ۰/۸۴۱ و ۰/۲۱۴ مشخص شد. لازم به ذکر است که مقدار P برای کلیه اقوام برابر با ۰/۹۲۹ بود. مقدار P بزرگ‌تر از ۰/۰۵ برای مارکر D7S2425 در جمعیت ایرانی نشان دهنده حضور تعادل Hardy-Weinberg در این جمعیت می‌باشد. همچنین مقدار P محاسبه شده برای پنج قوم مورد بررسی بزرگ‌تر از ۰/۰۵ به دست آمد و در نتیجه همه اقوام برای جایگاه مارکر مورد بررسی در تعادل Hardy-Weinberg می‌باشند و این موضوع نشان می‌دهد که عوامل بر هم زننده تعادل Hardy-Weinberg در جمعیت ایرانی برای جایگاه مارکر D7S2425 چشمگیر و قابل توجه نبوده است. در نهایت به دلیل حضور جایگاه ژنی مارکر مورد بررسی در تعادل Hardy-Weinberg در اقوام مورد بررسی و

درصد بود. همچنین آلل ۲۳۶ جفت باز با فراوانی ۳/۰۳ درصد کمترین فراوانی را در این قوم داشت. آلل‌های ۲۳۴ و ۲۳۸ جفت باز در این قوم مشاهده نشد. در نهایت قوم عرب از میان ۸ آلل مشاهده شده جمعیت ایرانی، هر ۸ آلل را دارا بود که در میان آن‌ها آلل ۲۴۶ جفت باز با فراوانی ۴۰/۹۱ درصد و آلل ۲۳۶ جفت باز با فراوانی ۱/۵۲ درصد به ترتیب شایع‌ترین و کمیاب‌ترین به شمار می‌آیند. همان‌طور که بررسی‌ها نشان می‌دهد این مارکر در اقوام مختلف دارای بیش از ۶ آلل می‌باشد.

درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار اقوام مورد بررسی و به طور کلی جمعیت ایرانی در جدول ۳ آمده است. درصد هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای مارکر D7S2425 در جمعیت ایرانی ۷۵/۸ درصد بود که کمی کمتر از درصد هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۷۷/۱ درصد) می‌باشد. درصد هتروزیگوسیتی گزارش شده توسط Genethon center و MGS به ترتیب ۶۳ و ۶۴ درصد به دست آمد. در نتیجه درصد هتروزیگوسیتی این مارکر در جمعیت ایرانی نسبت به این دو گزارش حدود ۱۲ درصد بیشتر است (۱۴، ۱۳). مطلب فوق نشان دهنده این است که مارکر D7S2425 در جمعیت ایرانی از ارزش بیشتری نسبت به سایر جمعیت‌ها برخوردار است. بالاترین درصد هتروزیگوسیتی مشاهده شده متعلق به قوم گیلک و پایین‌ترین درصد متعلق به اقوام فارس و آذری بود. یکی از مهم‌ترین دلایل پایین بودن درصد هتروزیگوسیتی، تمایل افراد به درون زادآوری قومی است که خود منجر به افزایش هموزیگوسیتی و کاهش هتروزیگوسیتی می‌گردد، اما به دلیل پایین بودن درصد هتروزیگوسیتی در قوم فارس که در آن نسبت به سایر اقوام درون زادآوری قومی به میزان کمتری دیده می‌شود و همچنین بالا بودن آن در قوم گیلک، به نظر می‌رسد که عوامل دیگری نیز در تعیین درصد هتروزیگوسیتی نقش دارد.

جفت باز است) با فراوانی ۳۵/۱۵ درصد و آلل ۱ (که دارای طول محصول PCR ۲۳۴ جفت باز می‌باشد) با فراوانی ۰/۳۰ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را در جمعیت ایرانی داشت (جدول ۲). بر اساس اطلاعات پایگاه داده UniSTS (۳۶۰۴۹ = UniSTS)، آلل‌های این مارکر دارای محدوده محصول PCR ۲۳۴-۲۴۶ جفت باز می‌باشد. پایگاه داده Genethon center فرانسه و همچنین MGS (Mammalian genotyping service) گزارش مشابهی با پایگاه داده UniSTS ارائه داده است (۱۴، ۱۳). مطالعه بر روی جمعیت ایرانی نشان می‌دهد که علاوه بر آلل‌های فوق، آلل دارای ۲۴۸ جفت باز نیز در جمعیت ایرانی وجود دارد و دارای فراوانی آلی به نسبت بالا (۹/۰۹ درصد) در این جمعیت می‌باشد. در نتیجه می‌توان آلل ۲۴۸ را به عنوان یک آلل جدید معرفی نمود.

ژنوتیپ‌های بررسی شده از قوم فارس حاکی از حضور ۷ آلل از این مارکر بود که در میان آن‌ها آلل ۲۳۴ جفت بازی حضور نداشت. در این قوم آلل ۲۴۶ جفت باز با فراوانی ۳۳/۳۳ درصد شایع‌ترین و آلل ۲۳۸ جفت باز با فراوانی ۱/۵۲ درصد کمیاب‌ترین آلل‌ها بود. قوم آذری از ۸ آلل جمعیت ایرانی تنها ۶ آلل را دارا بود که از میان آن‌ها آلل ۲۴۶ جفت باز با فراوانی ۳۷/۸۸ درصد و آلل ۲۳۸ با فراوانی ۴/۵۵ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را داشت. در قوم آذری نیز دو آلل ۲۳۴ و ۲۳۶ جفت بازی مشاهده نشد (جدول ۲). بررسی‌های انجام شده بر روی افراد قوم ترکمن نشان دهنده حضور ۷ آلل از مارکر D7S2425 در این قوم می‌باشد و آلل ۲۴۲ جفت باز با فراوانی ۳۳/۳۳ درصد شایع‌ترین و آلل ۲۳۶ جفت باز با فراوانی ۱/۵۲ درصد کمیاب‌ترین بود. بررسی ژنوتیپ‌های افراد این قوم حاکی از عدم حضور آلل ۲۳۴ جفت بازی بود.

گیلکی‌ها نیز ۶ آلل از مارکر مورد بررسی را دارا بودند که فراوان‌ترین آلل از نوع ۲۴۶ جفت باز با فراوانی ۳۳/۳۳

جدول ۳. درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار مارکر D7S2425 با استفاده از پایگاه داده‌های GenePop

قوم	هتروزیگوسیتی مشاهده شده (درصد)	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (درصد)	هموزیگوسیتی مشاهده شده (درصد)	هموزیگوسیتی مورد انتظار (درصد)
کلیه اقوام (جمعیت ایرانی)	۷۵/۸	۷۷/۱	۲۴/۲	۲۲/۹
فارس	۶۶/۷	۷۹/۴	۳۳/۳	۲۰/۶
آذری	۶۶/۷	۷۵/۴	۳۳/۳	۲۴/۶
ترکمن	۷۵/۸	۷۷/۱	۲۴/۲	۲۲/۹
گیلک	۹۳/۹	۷۷/۹	۶/۱	۲۲/۱
عرب	۷۵/۸	۷۵/۶	۲۴/۲	۲۴/۴

پس از تخمین فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی داده‌ها، وجود تعادل Hardy-Weinberg مورد بررسی قرار گرفت و بیان شد که در جمعیتی با جفت‌گیری تصادفی بدون انتخاب، جهش یا مهاجرت فراوانی‌های آللی و فراوانی‌های ژنوتیپی از نسلی به نسل دیگر ثابت است (۲۰). در مطالعه حاضر به منظور بررسی تعادل Hardy-Weinberg از نرم‌افزار GenePop استفاده گردید. فرض صفر در این آزمون مبنی بر حضور تعادل Hardy-Weinberg در جمعیت و اقوام مورد بررسی بود. در صورتی که مقدار P کوچک‌تر از ۰/۰۵ به دست آید، فرضیه صفر مبنی بر وجود تعادل رد می‌شود. علت انحراف از تعادل Hardy-Weinberg می‌تواند به دلیل عوامل ژنتیک جمعیت مانند درون‌زایی و یا مهاجرت باشد (۲۱).

عامل ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی (PIC) یک عامل محاسباتی برای تعیین اطلاع دهنده‌گی مارکرها به منظور استفاده در تحلیل پیوستگی می‌باشد. این عامل برای جایگاه مارکرهای دارای تعادل Hardy-Weinberg در جمعیت تعریف می‌شود که به تعداد و فراوانی آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت وابسته است. مقدار

PIC بالاتر از ۰/۷ نشان دهنده اطلاع دهنده‌گی شدید (Highly informative) مارکر در تحلیل پیوستگی برای ژن متصل به آن است. هنگامی که مقدار آن بین ۰/۴۴ و ۰/۷۰ باشد، مارکر از اطلاع دهنده‌گی متوسط (Moderately informative) برخوردار است و اگر کمتر از ۰/۴۴ باشد، مارکر اطلاع دهنده ضعیفی به شمار می‌آید (۱۲). مقدار PIC محاسبه شده در این مطالعه در پنج قوم مختلف و جمعیت ایرانی بالاتر از ۰/۷ به دست آمد. بنابراین مارکر D7S2425 در پنج قوم مورد بررسی و به طور کلی جمعیت ایرانی برای بررسی جهش‌های ژن *SLC26A4* به روش تحلیل پیوستگی به شدت اطلاع دهنده می‌باشد. مارکر D7S2425 از میان اقوام مختلف از شدیدترین اطلاع دهنده‌گی برای قوم فارس برخوردار است (PIC = ۰/۷۵۱). با توجه به کمتر بودن هتروزیگوسیتی و تعداد آلل‌های گزارش شده توسط پایگاه داده‌ها، به نظر می‌رسد که جمعیت ایرانی مقدار PIC بالاتری در این مارکر دارند و در نتیجه نسبت به سایر جمعیت‌ها از اهمیت تشخیصی بیشتری نیز برخوردار هستند.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان می دهد که مارکر D7S2425 که در سمت ۳ ژن *SLC26A4* واقع شده است و به آن متصل می باشد، دارای اطلاع دهندگی شدید در تشخیص های مولکولی ناشنوایی غیر سنارمی وابسته به *SLC26A4* با توارث اتوزومی مغلوب به روش تحلیل پیوستگی در جمعیت ایرانی و نسبت به سایر جمعیت ها دارای ارزشمندی بیشتری نیز می باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد جهت تأمین بودجه (شماره گرانت ۱۰۴۵) و از کلیه کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی شهرکرد و همچنین تمام افرادی که در دادن نمونه ما را یاری نموده اند، تشکر و قدردانی می گردد. این مقاله حاصل پایان نامه می باشد.

References

1. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *Am J Med Genet* 1993; 46(5): 486-91.
2. Lee KY, Choi SY, Bae JW, Kim S, Chung KW, Drayna D, et al. Molecular analysis of the GJB2, GJB6 and SLC26A4 genes in Korean deafness patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2008; 72(9): 1301-9.
3. Hilgert N, Smith RJ, Van CG. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res* 2009; 681(2-3): 189-96.
4. Hone SW, Smith RJH. Genetic screening for hearing loss. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences* 2003; 28(4): 285-90.
5. Smith RJ, Robin NH. Genetic testing for deafness--GJB2 and SLC26A4 as causes of deafness. *J Commun Disord* 2002; 35(4): 367-77.
6. Tabatabaiefar MA, Alasti F, Montazer Zohour M, Shariati L, Farrokhi E, Farhud DD, et al. Genetic linkage analysis of 15 DFNB Loci in a group of Iranian families with autosomal recessive hearing loss. *Iran J Public Health* 2011; 40(2): 34-48.
7. Zhao H, Pfeiffer R, Gail MH. Haplotype analysis in population genetics and association studies. *Pharmacogenomics* 2003; 4(2): 171-8.
8. Rabionet R, Zelante L, Lopez-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet* 2000; 106(1): 40-4.
9. Yazdanpanahi N, Chaleshtori MH, Tabatabaiefar MA, Noormohammadi Z, Farrokhi E, Najmabadi H, et al. Two novel SLC26A4 mutations in Iranian families with autosomal recessive hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2012; 76(6): 845-50.
10. The International HapMap project. *Nature* 2003; 426(6968): 789-96.
11. Elahi E, Kumm J, Ronaghi M. Global genetic analysis. *J Biochem Mol Biol* 2004; 37(1): 11-27.
12. Hildebrand CE, Torney DC, Wagner RP. Informativeness of polymorphic DNA markers. *Los Alamos Science* 1992; 20: 100-2.
13. National Heart LaBI. Mammalian Genotyping Service [Online]. [cited 2006 Dec]; Available from:

- <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/home/index.asp>
14. Genethon Center database. Available at: URL: <http://www.genethon.fr/> Accessed July 10, 2012
 15. UniSTS Database. Available at: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists/> Accessed July 2012
 16. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered* 1995; 86(3): 248-9.
 17. Weir BS. Genetic data analysis 2. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates; 1996.
 18. Engels WR. Exact Tests for Hardy-Weinberg Proportions. *Early Online* 2009; 183(4): 1431-41.
 19. Park SDE. Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection [Thesis]. Dublin, Ireland: University of Dublin 2001.
 20. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48(2): 361-72.
 21. Balding DJ, Bishop M, Cannings C. Handbook of statistical genetics. 3rd ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2008.

Population Data on D7S2425 Marker in Five Ethnic Groups of the Iranian Population: A Highly Informative Marker for Molecular Diagnosis of ARNSHL

Marjan Mojtabavi Naeini, M.Sc.¹, Sadeq Vallian Boroujeni, Ph.D.²,

Morteza Hashemzadeh Chaleshtori, Ph.D.^{3*}

1. M.Sc. Cellular and Molecular Research Center, School of , Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

2. Professor, Genetics Division, Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3. Professor, Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

* Corresponding author; e-mail: mchalesh@yahoo.com

(Received: 14 June 2013 Accepted: 5 Feb. 2014)

Abstract

Background & Aims: *SLC26A4* gene mutations are the second identifiable genetic cause of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss (ARNSHL) after *GJB2* mutations and are currently investigated in molecular diagnosis. In databases, several potential STR markers related to this region have been introduced. In this investigation, the characteristics and informativeness of D7S2425 CA repeat STR marker in *SLC26A4* gene region was examined in five ethnic groups of the Iranian population.

Methods: The locus was genotyped in 165 individuals of five different ethnic groups including Fars, Azari, Turkmen, Gilaki, and Arab using polymerase chain reaction (PCR) followed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and fluorescent capillary electrophoresis. In this study, the results were analyzed by GeneMarker HID, Human STR Identity software, GenePop program, and Microsatellite Tools.

Results: Analysis of the allelic frequency revealed the presence of 8 alleles for D7S2425 marker in the Iranian population, of which the 246bp allele at the D7S2425 locus with 0.30% frequency was the most frequent. The 93.9% observed heterozygosity of the Gilak ethnic group was the highest among all ethnic groups. Analysis of deviations of the Hardy-Weinberg equilibrium demonstrated that all the ethnic groups were in equilibrium ($P > 0.05$) for D7S2425 locus. Finally, analysis of PIC value revealed that the D7S2425 marker could be considered as a highly informative marker in each ethnic group of the Iranian population (PIC value above 0.7).

Conclusion: Our data suggested that D7S2425 could be introduced as a highly informative marker in molecular diagnosis of *SLC26A4* based ARNSHL by Linkage analysis.

Keywords: D7S2425 marker, *SLC26A4*, Autosomal recessive nonsyndromic hearing loss (ARNSHL), Iranian population