

Introduction and Assessment of 25 Informative Autosomal SNPs for Human Genetically Identification

Reza Bazyar¹, Sayed Mostafa Hosseini^{*2}, Mahmoud Tavallaee³, Payam Hajibabei¹,
Hasan Bahmani¹, Alireza Rafati¹

¹MSc Medical Genetics, Human Genetic Research Center, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran

²Assistant Professor, Molecular genetics, Human Genetic Research Center, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran

³Associated Professor, Biological Products, Human Genetic Research Center, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran

Received: 6 November 2017 Accepted: 17 April 2018

Abstract

Background and Aim: Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are being increasingly used by forensic laboratories. In the Iranian population, few studies have been reported that aim to investigate allelic frequencies and determine genetic variation of SNPs based on SNPforID database. The goal of the current study was to evaluate the population genetic diversity by genotyping of 25 informative autosomal single nucleotide polymorphisms residing in Gilan province in Northern Iran, using the SNaPshot assay.

Methods: In this cross-sectional study, the results of the bioinformatics analysis indicated that at least 25 autosomal loci SNP could help discriminate between Iranian ethnic groups. A total of 53 unrelated individuals from the Gilakis ethnicity group provided blood samples for extraction of genomic DNA by the RGDE method. The SNaPshot method was used to genotyping 25 selected SNPs on the 3110x1 ABI Genetic Analyzer. Statistical analysis was conducted using the Arlequin 3.5, GeneAlex 6.5 and GeneMapper 5.0 software.

Results: The mean heterozygosity was 0.428. The minimum heterozygosity observed was 0.190 that related to rs938283. Minor allele frequency (MAF) for rs938283 was 0.105. There was significant deviation in allelic frequencies from Hardy-Weinberg equilibrium for all the studied SNPs except rs1382387. The calculated F_{ST} values presented among Gilak and three Iranian ethnic groups including Kurd, Persian and Lurs were not significantly genetic different.

Conclusion: Evaluation of the 25 autosomal SNP simultaneously enabled discrimination among ethnic groups within the population. The results presented Gilakis ethnicity genetically when compared to the other ethnicity, Lor, Persian and Kurdish, are similar. The SNaPshot method has appropriate sensitivity and specificity to simultaneously genotype SNPs.

Keywords: Autosomal SNPs, SNPforID, SNaPshot, Gilan

*Corresponding author: Sayed Mostafa Hosseini, Email: smhosseini@bmsu.ac.ir

معرفی و ارزیابی پانل بیست و پنج گانه SNP های اتوزمال آگاهی بخش جهت تعیین هویت ژنتیکی انسان

رضا بازاریار^۱، سید مصطفی حسینی^{۲*}، محمود تولایی^۳، پیام حاجی بابایی^۱، حسن بهمنی^۱، علیرضا رفعتی^۱

^۱ کارشناسی ارشد ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

^۲ استادیار، ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

^۳ دانشیار، فرآورده های بیولوژیک، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs) در تشخیص هویت ژنتیکی کاربرد های گسترده ای را نشان داده است. در جمعیت ایرانی جهت ارزیابی فرکانس آلی و نیز تعیین تنوع ژنتیکی SNP ها بر مبنای پایگاه SNPforID مطالعات محدودی گزارش شده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی، تعیین فراوانی آلی و ارزیابی هتروزیگوسیتی، به طور همزمان در ۲۵ جایگاه SNP اتوزمال آگاهی بخش در استان گیلان با تکنیک SNaPShot اجرا شد.

روش ها: در مطالعه توصیفی - مقطعی حاضر، نتایج ارزیابی های بیوانفورماتیکی نشان داد حداقل ۲۵ جایگاه SNP اتوزمال قدرت تمایز بین قومیت های ایرانی را داشتند. استخراج DNA از نمونه خون ۵۳ نفر از افراد با قومیت گیلک با روش (Rapid Genomic) RGDE (DNA Extraction) انجام شد. تعیین ژنوتیپ SNP های منتخب با استفاده از روش SNaPShot به وسیله دستگاه ژنتیک آنالایزر 3130 XL شرکت ABI اجرا شد. آنالیز های آماری با استفاده از نرم افزار های Arlequine 3.5، GenALEX 6.5 و GeneMapper 5.0 محاسبه شد.

یافته ها: میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده برابر با ۰/۴۲۸ بود. کمترین میزان هتروزیگوسیتی محاسبه شده مربوط به rs938283 به میزان ۰/۱۹۰ به دست آمد. کمترین میزان فرکانس آلی برای rs938283 برابر با ۰/۱۰۵ محاسبه شد. مجموع فرکانس آلی SNP های مورد مطالعه از تعادل هاردی-واینبرگ به استثناء rs1382387 انحراف نشان دادند. ارزیابی پارامتر شاخص تثبیت (FST) نشان داد بین قومیت گیلک و سه قومیت کرد، فارس و لر تفاوت ژنتیکی قابل توجهی دیده نشد.

نتیجه گیری: ارزیابی همزمان ۲۵ جایگاه اتوزمال SNP توانایی ایجاد تمایز بین قومیت های درون جمعیتی را دارد. نتایج نشان داد قومیت گیلک از نظر ژنتیکی با قومیت های لر، فارس و کرد مشابه می باشد. روش SNaPShot از حساسیت و اختصاصیت مناسبی جهت ژنوتایپینگ SNP ها به طور همزمان برخوردار بود.

کلیدواژه ها: پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP)، روش SNaPShot، قومیت گیلک، صفحه تارنمای SNPforID

مقدمه

بر جای مانده ناشی از انفجارات و یا حوادث غیر مترقبه با آتش سوزی همراه باشد. در این مواقع به دلیل آب گیری از DNA سلولی، انجام پروفایل بر پایه STR با موفقیت کامل معمولاً همراه نخواهد بود (۸).

به علاوه، زمانی که ماده زیستی شامل مخلوطی از DNA جنس مونث به میزان بیشتر و DNA مذکر به میزان ناچیز باشد و یا نمونه ها از افرادی گرفته شود که دارای قرابت خانوادگی نزدیکی با یکدیگر باشند، وجود تشابه پروفایل ژنتیکی یک چالش در شناسایی افراد مجهول الهویه خواهد بود (۹، ۱۰) که ضرورت به کارگیری دیگر مارکر های مولکولی را آشکار می سازد.

استفاده از پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs) در تشخیص هویت ژنتیکی کاربرد های گسترده ای را نشان داده است. بررسی SNPs اتوزومال به دلیل خصوصیات شامل نرخ جهش پایین، برخورداری از طول محصول PCR کوتاه و امکان آنالیز همزمان چندگانه به روش الکتروفورز موئینه می توانند در تهیه شناسنامه ژنتیکی کارایی بالایی را از خود نشان دهد (۱۱). در سال های اخیر، جهت دسته بندی و شناسایی SNP های پر اهمیت و تعیین نقشه ی ژنومی آنها تلاش های زیادی انجام گرفته است که نتایج آنها در پایگاه داده SNPforID گسترش یافته است (۱۲). در این پایگاه داده، مارکر های SNP بر اساس کاربرد های آن طبقه بندی شده اند که شامل SNP های تعیین هویتی (IISNPs) (۱۱)، SNP های نیایی (LISNPs) (۱۳)، SNP های مرتبط با تبار شناسی (AISNPs) (۱۴) و نیز SNP های مرتبط با فنوتیپ (PISNPs) (۱۵) می باشند.

ارائه پانل های تشخیصی مبتنی بر پروفایل ژنتیکی بر اساس SNP های اتوزومی جهت تعیین هویت ژنتیکی به عنوان یک مسیر جایگزین برای STR ها در سال های اخیر بسیار مورد توجه بوده است. ژنوتایپینگ مارکر های اتوزومی منتخب بر اساس SNPs هایی با درجه آگاهی بخشی بالا در جمعیت خاورمیانه، می تواند به عنوان یک روش جایگزین نوظهور جهت شناسایی هویت ژنتیکی افراد در حوادث نظامی و غیر نظامی مورد استفاده قرار گیرد. هدف مطالعه حاضر معرفی و ارزیابی یک پانل بیست و پنج گانه مبتنی بر SNP های منتخب با درجه آگاهی بخشی بالا در یکی از قومیت های منتخب ایرانی (گیلک) به منظور ارزیابی فراوانی آلی، میزان هتروزیگوسیتی، شاخص تشبیت، احتمال تطابق PI (Power of Identity) و خروج PEx (Power of Exclusion) جهت به کارگیری در سامانه های هویت یابی ژنتیکی نظامی و غیر نظامی بود.

روش ها

جمع آوری نمونه: در این مطالعه توصیفی - مقطعی از ۵۳ داوطلب گیلکی (ساکن استان گیلان) با جمع آوری پرسشنامه خون گیری به عمل آمد. معیار ورود به مطالعه شامل سکونت سه نسل

تعیین هویت ژنتیکی انسان باتوجه به تنوع مارکر های مولکولی، زمینه تحقیقاتی بسیاری از مطالعات در دهه های اخیر بوده است (۱). در روش تعیین هویت ژنتیکی، ماده وراثتی (DNA) می تواند از دامنه وسیعی از مواد زیستی به جای مانده در حوادث نظامی یا غیر نظامی تهیه و جهت ایجاد پروفایل ژنتیکی افراد مجهول الهویه به کار گرفته شود (۲). موفقیت آمیز بودن این روش مرهون ایجاد یک بانک ذخیره اطلاعات ژنتیکی با تعداد رکورد بالا می باشد که به واسطه آن بتوان در شناسایی افراد مجهول الهویه و نیز در پرونده های پزشکی قانونی از آن استفاده نمود.

ثبت اطلاعات در بانک ذخیره اطلاعات ژنتیکی می تواند از پرسنل نظامی در مشاغل پر خطر، بزهکارهای اجتماعی واجد رفتارهایی با ریسک بالا، از شواهد زیستی به جای مانده ناشی از انفجار مواد منفجره، سقوط هواپیما و یا هر ماده زیستی که از اطلاعات ژنتیکی برخوردار باشد تاسیس گردد (۳).

وجود یک پایگاه اطلاعات ژنتیکی به عنوان یک ابزار مناسب جهت تعیین هویت ژنتیکی و نیز ارزیابی قرابت ژنتیکی شمرده می شود. یکی از مشهورترین بانک های ذخیره اطلاعات ژنتیکی در کشور ایالات متحده آمریکا، پایگاه CODIS نام دارد که واجد حداقل ده میلیون رکورد ژنتیکی ثبت می باشد (۴، ۵).

تاکنون استراتژی های متفاوتی در ژنتیک نظامی و جنایی برای شناسایی مارکر های مولکولی بر پایه DNA انسانی معرفی شده است که به طور کلی با دو هدف عمده بوده است: الف) شناسایی افراد بر اساس بقایای زیستی به جای مانده در صحنه، ب) خارج کردن افرادی که تطابق ژنتیکی آنها با شواهد زیستی کشف شده در صحنه بر اساس اطلاعات سامانه تایید نمی گردد (۶).

مارکر های کوتاه تکرار شونده پشت سر هم (STR) یکی از مهمترین مارکر های ژنتیکی استاندارد است که در آزمایشگاه های ژنتیک در سراسر جهان مورد استفاده قرار می گیرد (۳). روش استاندارد هویت یابی ژنتیکی، بررسی حداقل ۱۰ الی ۱۷ جایگاه کروموزومی اتوزومال (غیر جنسی) در توالی ژنوم انسانی است که به اندازه کافی دارای تنوع آلی و قدرت تمایز برای تعیین هویت ژنتیکی باشد. کیت های تجاری در دسترس برای تعیین هویت ژنتیکی با توجه به مارکر های STR، شامل AmpFiler (شناسایی ۲۳ جایگاه اتوزومال) و نیز Powerplex (شناسایی ۲۳ جایگاه اتوزومال) می باشد که قابلیت ایجاد پروفایل ژنتیکی را از DNA استخراج شده از شواهد زیستی دارد و احتمال مشابهتی که به آن نسبت داده می شود به میزان تقریبی یک در هر پانصد میلیون نفر در جمعیت جهان است (۷).

اگرچه STR مارکرها، در اکثر مطالعات هویت یابی ژنتیکی به کار گیری می شوند اما در برخی موارد نمی توانند به اندازه کافی اطلاعات در اختیار ما بگذارند. به ویژه هنگامی که شواهد زیستی

با نام SNaPshot نیز شناخته می شود با استفاده از گسترش آغازگرهای مختص جایگاه، توسط ddNTP های نشان دار شده با رنگ فلوروسنت عمل می کند. سه مرحله اولیه در اجرای SNaPshot وجود دارد شامل: (۱) PCR اولیه (۲) آغازگرهای SBE (Single Base Extension) (۳) تحلیل داده ها (۱۸).

در مرحله PCR اولیه ناحیه ای از ژنوم که SNP ها در آن قرار گرفته اند توسط آغازگرهای رفتی و برگشتی تکثیر شد. واکنش PCR اولیه با استفاده از مخلوط واکنش Taq DNA Polymerase Master Mix RED (شرکت Amplicon، کره جنوبی) اجرا شد. در این مرحله آغازگرها به دو دسته ۱۲ و ۱۳ تایی تقسیم شده و با هم مخلوط شدند، به هر کدام از تیوب های واکنش ۱۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش، ۵ میکرولیتر از DNA با غلظت ۲۰ نانو گرم، یک میکرولیتر از مخلوط آغازگرها و در نهایت ۴ میکرولیتر آب دوبار تقطیر به واکنش اضافه شد و حجم نهایی واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامه دمایی دسته-دسته-گاه ترموس-ایگر به صورت زیر اجرا گردید. یک س-یکل با ۹۵ درجه س-انتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، در ادامه ۳۵ س-یکل با ۹۵ درجه سانتیگراد (۳۰ ثانیه)، ۶۰ درجه سانتیگراد (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتیگراد (۳۰ ثانیه) و در نهایت یک سیکل ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه اجرا شد.

قبل از سمت پدری و مادری در استان گیلان، عدم رابطه خویشاوندی و نیز گویش به زبان محلی بود. وجود ارتباط خویشاوندی و عدم اطلاع کافی داوطلبان از اطلاعات شجره نامه از معیارهای خروج از مطالعه لحاظ گردید. میزان ۲ میلی لیتر خون محیطی از افراد واجد شرایط با استفاده از لوله های آغشته به EDTA اخذ گردید. استخراج DNA با روش RGDE (۱۶) اجرا و در ادامه کنترل کیفی نمونه ها با روش الکتروفورز مورد تایید قرار گرفت. معیار خروج از مطالعه، نبودن اطلاعات قومیتی، زبانی و نیز وجود ازدواج خویشاوندی در نظر گرفته شد.

انتخاب SNP های آگاهی بخش و طراحی پرایمر های بیست و پنج گانه: معیار انتخاب SNPs های مورد مطالعه آگاهی بخشی (جدول ۱ و ۲) در قومیت های خاورمیانه بر مبنای اطلاعات منتشر شده در تارنمای SNPforID بود. با به کارگیری ابزار بیوانفورماتیکی، لیست SNP های منتخب و ویژگی هر کدام از آنها بر اساس اطلاعات پایگاه داده ی dbSNP، پروژه HapMap و پروژه ۱۰۰۰ ژنوم به دست آمد (۱۷). طراحی آغازگرهای اولیه جهت تکثیر نواحی منتخب بیست و پنج گانه (جدول ۳ و ۵) و طراحی پرایمرهای فاز دوم (جدول ۴ و ۶) جهت واکنش SNaPshot به وسیله نرم افزار Allele ID و Blast اجرا گردید، صحت عملکرد هر کدام از آغازگرها به صورت جداگانه مورد تایید قرار گرفت.

انجام واکنش SNaPshot: تکنیک مینی سکانس

جدول-۱. لیست SNP های دسته اول

No.	SNPforID	NCBI dbSNP ID	Allele	Chromosome	nt Position	Amplicon size(bp)
1	A01	rs1490413	G-A	1	4,037,521	68
2	A02	rs876724	C-T	2	104,974	83
3	A03	rs1357617	T-A	3	936,782	90
4	A04	rs2046361	A-T	4	10,719,942	79
5	A05	rs717302	G-A	5	2,932,133	86
6	A06	rs1029047	T-A	6	1,080,939	100
7	A07	rs917118	C-T	7	4,201,341	87
8	A08	rs763869	C-T	8	1,363,017	100
9	A09	rs1015250	G-C	9	1,813,774	95
10	A10	rs735155	G-A	10	3,328,178	100
11	A11	rs901398	C-T	11	11,060,530	70
12	A12	rs2107612	G-A	12	741,262	93

جدول-۲. لیست SNP های دسته دوم

No.	SNPforID	NCBI dbSNP ID	Allele	Chromosome	nt Position	Amplicon size(bp)
14	A14	rs1454361	A-T	14	23,840,960	73
15	A15	rs2016276	A-G	15	22,119,157	90
16	A16	rs729172	C-A	16	5,606,490	60
17	A17	rs740910	A-G	17	5,907,188	87
18	A18	rs1493232	C-A	18	1,117,986	59
19	A19	rs719366	C-T	19	33,155,177	105
20	A20	rs1031825	A-C	20	4,442,483	98
21	A21	rs722098	A-G	21	15,607,469	81
22	A22	rs733164	G-A	22	26,141,338	68
23	A23	rs826472	T-C	10	2,360,631	85
24	A24	rs2831700	A-G	21	28,601,558	62
25	A25	rs873196	C-T	14	96,835,572	63
26	A26	rs1382387	G-T	16	79,885,888	69

جدول-۳. توالی پرایمرهای اولیه دسته اول

Marker code	NCBI number	PCR forward primers	PCR reverse primers	Amplicon size(bp)
A01	rs1490413	GTGTGGACTGGGCTGATGT	TTCTCACTAGTGTCCCTGCTCTG	68
A02	rs876724	GCAGGCTCCATTTTTATACTACT	GAATATCTATGAGCAGG CAGTTAGC	83
A03	rs1357617	AGCTGATGCAGACCACTTCAC	GGATAGCTGATAAGAAAC ATGACCA	90
A04	rs2046361	CCTATTTGATGTATCTATTGT CTATGAACG	GTCATTGTTGACACTTCAC CTTCTA	79
A05	rs717302	CTTTAGAAAGGCATATCGTAT TAACTGTG	AACACAGAAAGAGGTTTCAT ATGTTGG	86
A06	rs1029047	CATAACGTGGATTTGTCAGCA	GGAATAAACTGAAGGCT AAAGAAAAG	100
A07	rs917118	GCCCTTTAGGGTCGGTTC	GTAAGAGATGACTGAGGTC AACGAG	87
A08	rs763869	ATCAAGTGCTTTCTGTTGACATTTG	GGCTACTCCCTCATAATGTAATGC AAGACATTAGGTGGATTC	100
A09	rs1015250	AAGTGATGGAGTTAGGAAAAGAACC	ATAGCTG	95
A10	rs735155	GGAGAAAACCGGAGAGCTG	GAGTGTCACCGAATTCACCG	100
A11	rs901398	CTGGGTGCAAACCTAGCTGAATATC	CTGGAATGTACTAGGCAA GAAACTAA	70
A12	rs2107612	GAGCATTCTCTTCTGTAAAATTGC	TGAGTACATTATTCAACTG TTTTGGAG	93

جدول-۴. توالی پرایمرهای SBE دسته اول

Marker code	NCBI number	توالی پرایمرهای SBE دسته اول	ال تشخیص داده شده
A01	rs1490413	CTCTCTCTCTCTCTCTCTATCTGAGGCCAGCCAGTT	C/T
A02	rs876724	CTCTCTCTCTCAACACTGCAGTGAAGTATAAGTA	C/T
A03	rs1357617	CTCTGACAATGATAAGAAACATGACCAAGC	A/T
A04	rs2046361	CCCCCCCCCCCCCCAACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAA G TCTGACAATTGTTGACACTTCACCTTCTA	A/T
A05	rs717302	CCCCCCCCCCCCCCAACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCT GACA AGGCATATCGTATTAAGTGTGT	G/A
A06	rs1029047	AAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAGTAAGAATTCAAGAT GGTATTT	A/T
A07	rs917118	TGACTGAGGTCAACGAGC	G/A
A08	rs763869	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTATGAAAATCACTGG GACAG	G/C
A09	rs1015250	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTATGAAAATCACTGG GACAG	G/C
A10	rs735155	CT CTCTCCACCGAATTCACGGGAAG	C/T
A11	rs901398	AGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAACTAGCTGAATATCAGCCC	C/T
A12	rs2107612	TAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAGTGTTTTTCTAAAT CA TATTGTCT	G/A

جدول-۵. توالی پرایمرهای اولیه دسته دوم

Marker code	NCBI number	PCR forward primers	PCR reverse primers	Amplicon size(bp)
A14	rs1454361	AGGGAAATACACCCTGAGCTG	AGCTGTCCATCATCAGTAAGACAC	73
A15	rs2016276	TGCATCCCAGCCTCCACT	ATTGTACCTTGCCACTTT GTGTG	90
A16	rs729172	CATTAATATGACCAAGGCTCC TCT	ACATTTCCCTCTTGCGGTTAC	60
A17	rs740910	GTATAACAGTTTGCTAAG TAAGGTGAGTG	AGATAGGTTTCGAGTTTTGGCTTTA	87
A18	rs1493232	CTATTCTCTCTTTGGGTGCTA GG	CAAACCTGTTTATTGTGAGGCCTGT	59
A19	rs719366	CCACAGCATCTTTAACTC TTTTATTATCC	GTAAGGACTTATAGTGAGTA AAGGACAGG	105
A20	rs1031825	CTTATCTTTCCACATTATGGT CCT	AAGATATAATCACTGCTTT CAAGTATGC	98
A21	rs722098	GGAAGTACACATCTGTTGA CAGTAATGA	GGGTAAGAAATATTTCAGC ACATCC	81
A22	rs733164	AGCTTTCAGCCCCAGGTC	CGGCTCAGGAATGTCAGG	68
A23	rs826472	TGAATTTGTCTCTGTTATAT TAGTCACC	TGTAATTGAAATTTGTAGGC AATAGAC	85
A24	rs2831700	GGCTAAACTATTGCCGGAGA	TTCCCTAGAACCACAATTA	62
A25	rs873196	GCATTCAAATCCCAAGTGCT	GCAGGAGTTGGAGTCAATCAG	63
A26	rs1382387	ACGAAGGAGAAACACTGAAC T	TGGAGTACTTAATAAGACGCTGCA T	69

جدول-۶. توالی پرایمرهای SBE دسته دوم

A14	rs1454361	CCCCAACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACA AAAATACAC CCTGAGCTGC	A/T
A15	rs2016276	CCCCCCCCCCCCCAACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGA AAGTCTG ACAATGAGAGAGAGAAAAATGTGC	C/T
A16	rs729172	CCCCCCCCCAACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGT CTGACAATC TTGCGTTACATACATTC	G/T
A17	rs740910	CGTCGTGAAAGTCTGACAATAAGGTGAGTGGTATAATCATAT	G/A
A18	rs1493232	CCCCCAACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGAC AATTGTGAG GCCTGTTTATTTTG	G/T
A19	rs719366	ACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAATTC CTCTCCCA TTCTAG	C/T
A20	rs1031825	AAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAATTTCAAGTATG CTCGGGG	G/A
A21	rs722098	CGTGAAAGTCTGACAATGACAGTAATGAAATATCCTTG	G/A
A22	rs733164	CGTGAAAGTCTGACAAGGCCATCCCCTTGAAA	G/A
A23	rs826472	GTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAGACTAATTAATCTGCTAT CCTG	G/A
A24	rs2111980	CTC TCTCTCTCTCTCTCCATCTTGGCAGCATCCTTC	G/A

جدول-۷. میانگین هتروزیگوسیتی و شاخص تثبیت

میانگین شاخص تثبیت	میانگین هتروزیگوسیتی	جمعیت
-۰/۱۰۹	۰/۴۳۲	چین
۰/۲۰۲	۰/۳۴۶	ژاپن
۰/۰۴۲	۰/۳۱۷	برزیل
۰/۱۲۷	۰/۳۷۹	الجزایر
۰/۰۲۴	۰/۴۲۲	بریتانیا
۰/۳۴۴	۰/۳۱۸	ایتالیا
۰/۰۸۲	۰/۴۲۱	روسیه
۰/۱۷۹	۰/۳۶۳	پاکستان
۰/۰۷۲	۰/۴۲۸	گیلان

جدول-۸. نتایج آنالیز AMOVA

جمعیت	گیلان	پاکستان	روسیه	ایتالیا	بریتانیا	الجزایر	برزیل	ژاپن	چین
چین	۰/۰۲۳	۰/۰۲۲	۰/۰۲۷	۰/۰۴۵	۰/۰۳۴	۰/۰۲۴	۰/۰۷۹	۰/۰۴۶	۰/۰۰۰
ژاپن	۰/۰۳۹	۰/۰۳۵	۰/۰۴۲	۰/۰۴۲	۰/۰۵۶	۰/۰۵۴	۰/۰۸۰	۰/۰۰۰	۰/۰۴۶
برزیل	۰/۰۷۵	۰/۰۷۰	۰/۰۷۹	۰/۱۱۰	۰/۱۰۶	۰/۰۹۷	۰/۰۰۰	۰/۰۸۰	۰/۰۷۹
الجزایر	۰/۰۲۲	۰/۰۲۸	۰/۰۱۹	۰/۰۴۰	۰/۰۲۴	۰/۰۰۰	۰/۰۹۷	۰/۰۵۴	۰/۰۲۴
بریتانیا	۰/۰۱۷	۰/۰۱۸	۰/۰۰۹	۰/۰۳۲	۰/۰۰۰	۰/۰۲۴	۰/۱۰۶	۰/۰۵۶	۰/۰۳۴
ایتالیا	۰/۰۲۰	۰/۰۲۹	۰/۰۲۷	۰/۰۰۰	۰/۰۳۲	۰/۰۴۰	۰/۱۱۰	۰/۰۴۲	۰/۰۴۵
روسیه	۰/۰۱۱	۰/۰۱۳	۰/۰۰۰	۰/۰۲۷	۰/۰۰۹	۰/۰۱۹	۰/۰۷۹	۰/۰۴۲	۰/۰۲۷
پاکستان	۰/۰۰۸	۰/۰۰۰	۰/۰۱۳	۰/۰۲۹	۰/۰۱۸	۰/۰۲۸	۰/۰۷۰	۰/۰۳۵	۰/۰۲۲
گیلان	۰/۰۰۰	۰/۰۰۸	۰/۰۱۱	۰/۰۲۰	۰/۰۱۷	۰/۰۲۲	۰/۰۷۵	۰/۰۳۹	۰/۰۲۳

SNapShot (شرکت ABI، آمریکا)، SNP های مورد نظر شناسایی گردید. در این مرحله ۱ میکرولیتر از محصول PCR مرحله قبل به تیوب جدید اضافه گردید و سپس ۱ میکرولیتر از کیت مسترمیکس SNapShot، ۱ میکرولیتر از مخلوط آغازگر های SBE (مانند PCR اولیه به دو دسته ۱۲ و ۱۳ تایی تقسیم شده اند) و ۲ میکرولیتر آب دوبار مقطر اضافه شد. در نهایت حجم واکنش به ۵ میکرولیتر رسانده شد. در نهایت برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر به صورت ۳۰ سیکل با ۹۶ درجه سانتیگراد (۱۰ ثانیه)، ۵۰ درجه سانتیگراد (۵ ثانیه) و ۶۰ درجه سانتیگراد (۳۰ ثانیه)

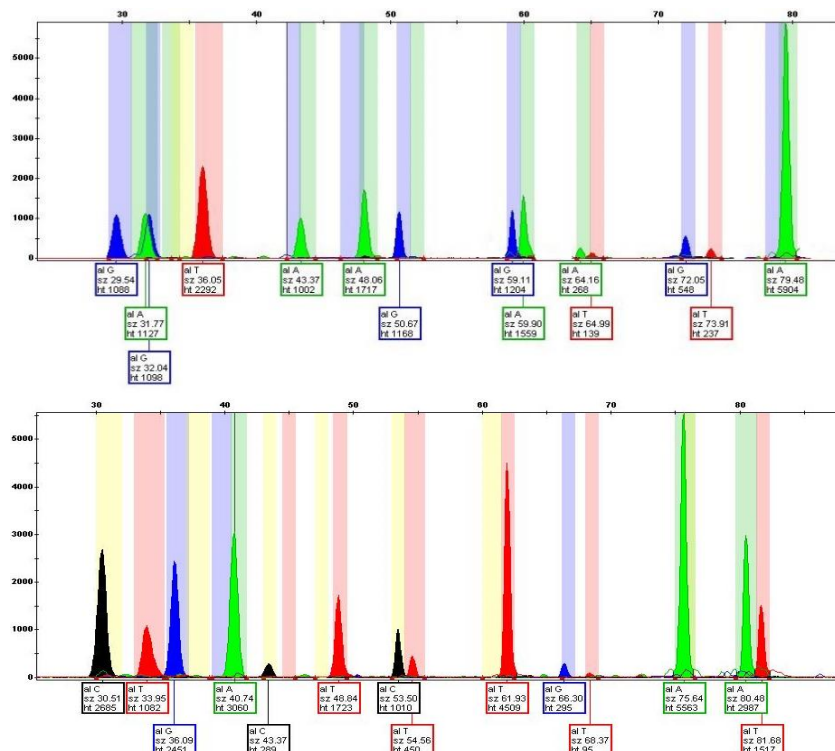
به منظور خالص سازی محصول PCR اولیه از آغازگرها و dNTP های اضافی از آنزیم ExoI/SAP استفاده شد. در این مرحله ۵ میکرولیتر از محصول PCR به تیوب جدید منتقل شده و ۲ میکرولیتر از آنزیم به آن اضافه و با برنامه دمایی شامل یک سیکل دمایی ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه و نیز یک سیکل ۷۵ درجه سانتیگراد ۱۵ دقیقه ادر دستگاه ترموسایکلر اجرا گردید.

در مرحله SNapShot، با استفاده از آغازگرهای SBE و ddNTP های نشان گذاری شده با فلئوروسنت و مستر میکس

یک به صد تهیه و به میزان ۹ میکرولیتر از این محلول به هر یک از چاهک های پلیت مخصوص دستگاه ژنتیک آنالایزر به همراه یک میکرولیتر از محصول SNaPShot را به چاهک ها اضافه شد. پس از اجرای کامل برنامه ی دستگاه ژنتیک آنالایزر، داده های به دست آمده در نرم افزار GeneMapper اجرا شدند و پیک های مربوط به هر SNP مشاهده شدند (شکل-۱).

آنالیز آماری: به منظور آنالیز فراوانی SNP مارکر های منتخب و سایر پارامتر های ژنتیک جمعیت از نرم افزار GeneMapper 5.0 و Arlequin 3.5(19)، GenAlex6.5 استفاده گردید.

ملاحظات اخلاقی: مطالعه حاضر با رعایت اصول معاهده هلسینکی در مورد پژوهشهای انسانی انجام گرفت.



شکل-۱. پروفایل ژنتیکی بررسی بیست و پنج جایگاه SNP مارکر اتوزومال آگاهی بخش در ۵۳ داوطلب گیلکی با استفاده از تکنیک SNaPShot. پیک های به رنگ قرمز، سبز، آبی و مشکی به ترتیب نشان دهنده آل های A، T، G و C می باشند.

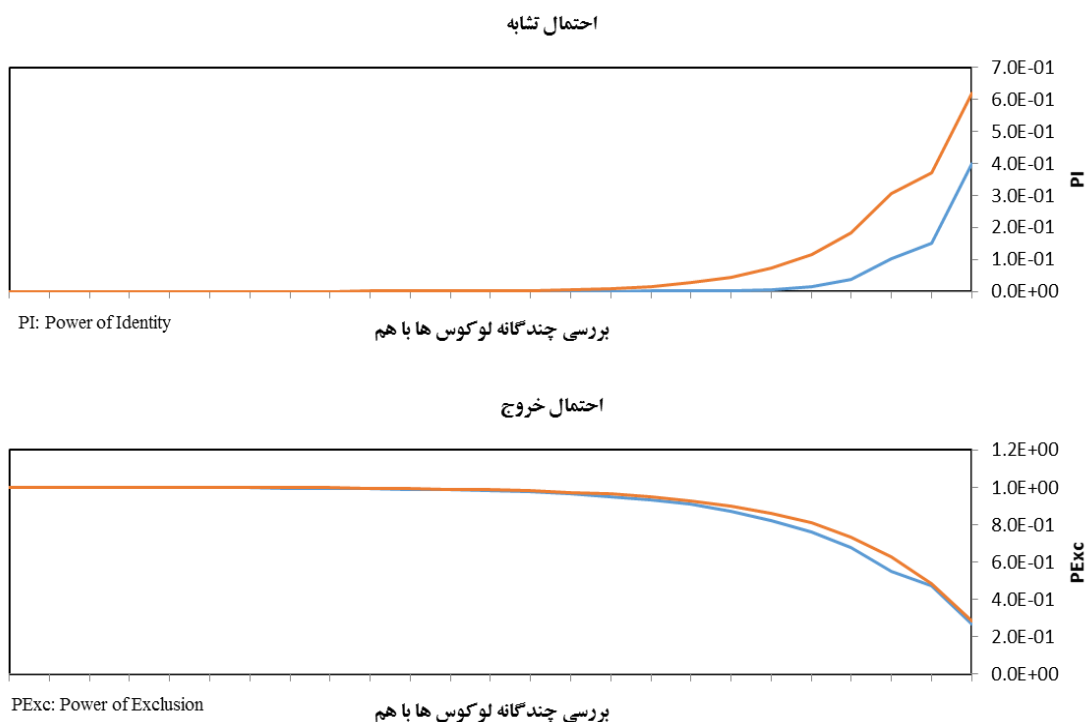
نتایج

شاخص تثبیت مربوط به rs876724 با مقدار ۰/۱۸۴ به دست آمد. به علاوه، به منظور بررسی میزان تنوع موجود در قومیت گیلک، میانگین شاخص تثبیت ۰/۰۵۵ محاسبه شد. نتایج نشان داد قومیت گیلک بیشترین فاصله را با جمعیت ساکن آمریکای جنوبی (برزیل) و کمترین فاصله با جمعیت پاکستان (۰/۰۰۸) دارد (جدول-۸). جهت محاسبه های شاخص های ژنتیکی تعیین هویت دو شاخص احتمال تشابه و احتمال خروج مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج شاخص PI و PEXC نشان داد که به کارگیری همزمان بیست و پنج SNP مارکر قدرت تمایز بین افراد درون جمعیت را دارا می باشند (شکل-۲).

گرمادهی شد. پس از انجام مرحله SNaPShot، با استفاده از آنزیم فسفاتاز (CIP) محصول واکنش از ddNTP های اضافی خالص سازی گردید. برای این منظور یک میکرولیتر از آنزیم CIP را به محصول SNaPShot اضافه و برنامه دمایی دستگاه ترمو سایکلر با ۳۷ درجه سانتیگراد (۳۰ دقیقه)، ۷۵ درجه سانتیگراد (۱۵ دقیقه) گرمادهی گردید.

آنالیز الکتروفورز موئینه با دستگاه ABI Prism 3130
xl Genetic Analyzer در نهایت برای اجرای الکتروفورز موئینه با دستگاه ژنتیک آنالایزر، محصولات SNaPShot آماده سازی شدند. در این مرحله یک مخلوط استاندارد از HiDi Formamid و Gene Scan – 120 LIZ Size به نسبت

با بررسی فرکانس اللی برای هر لوکوس به صورت جداگانه در قومیت گیلک مشخص شد که آل C از rs938283 کمترین میزان فرکانس اللی با ۰/۱۰۵ را نشان داد. تنها SNP مارکر با درجه آزادی دو در تعادل هاردی-واینبرگ rs1382387 بود. به منظور بررسی میزان تنوع ژنتیکی در قومیت گیلک از پارامتر های هتروزیگوسیتی، شاخص شانون و تثبیت استفاده شد. کمترین میزان هتروزیگوسیتی مربوط به rs938283 با مقدار ۰/۱۹۰ و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جمعیت مورد مطالعه به ترتیب ۰/۴۲۸ و ۰/۴۵۱ نشان داده شد. همچنین میانگین شاخص شانون ۰/۶۴۱ محاسبه شد. بیشترین



شکل-۲. احتمال تشابه (بالا) و احتمال خروج (پایین) با بررسی پروفایل ژنتیکی بیست و پنج جایگاه SNP مارکر اوتوزومال آگهی بخش

بحث

شده؛ ب) استفاده از SBE پرایمرها با درجه خلوص بالا؛ ج) رقت سازی غلظت پرایمرها و محصولات PCR مرحله اول در مرحله SNaPShot جهت پیشگیری از ایجاد پدیده حذف آل (Allele drop out). تا کنون مطالعه ای در ارتباط با معرفی پانل های بیست و پنج گانه در بین جمعیت های انسانی گزارش نشده است، اما انجام واکنش مالتی پلکس های چندگانه با تعداد بیشتر که بر اساس مبنای مشابهی می باشد گزارش شده است. ارزیابی پروفایل ژنتیکی SNP های اوتوزومال در سایر جمعیت ها شامل ونزوئلا، ایتالیا، ژاپن، چین، برزیل و سایر قومیت ها گزارش گردیده است اما تا کنون گزارشی از معرفی پانل هوبیتی یابی ژنتیکی با رویکرد تشخیص ژنتیکی گزارش نشده است.

در مطالعه ای که شرفی و همکاران (۲۲) با هدف آنالیز چهل و نه گانه SNP های آگهی بخش بر روی سه قومیت لر، کرد و فارس بر پایه تکنیک SNaPShot اجرا گردید. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که قومیت های انتخاب شده فاصله ژنتیکی کمی با یکدیگر داشته و می توان از نتایج روی هم ریخته شده آنها جهت مطالعات آنالیز ژنتیک جنایی به کار برد. نتایج محاسبات آماری مبتنی بر ژنتیک جمعیتی نشان می دهد که قومیت گیلک نیز دارای فراوانی هتروزیگوسیتی و نیز تنوع ژنتیکی مشابه با جمعیت های مشتق شده از آسیای میانه می باشند و همسو با نتایج فوق، جمعیت گیلک با سایر جمعیت ساکن در ایران فاصله ژنتیکی کمی را نشان می دهد. نتایج مقایسه بر اساس شاخص F_{ST} بر مبنای آنالیز همردیفی چندگانه نشان داد که جمعیت هایی که از نظر ژنتیکی نزدیکی به یکدیگر باشند فاصله کمتری را روی پلات نشان می

در حال حاضر استفاده از SNP های اوتوزومال به عنوان یکی از مهم ترین شاخصهای مکمل و تایید کننده به همراه STRs جهت رمزگشایی موارد پیچیده پزشکی قانونی بکار می رود (۲۰). در ژنتیک جنایی استفاده از SNP ها به دلیل مزیت های فراوانی که دارند بسیار نوید بخش می باشند. در پرونده های ژنتیک جنایی زمانی که نمونه زیستی تحت تاثیر هضم و تجزیه، سوختگی شدید و یا انفجارات قرار می گیرد ماده وراثتی آن (DNA) آسیب شدید می بیند. در این گونه موارد، توالی هدف با روش های معمول قابل شناسایی نبوده و استفاده از SNP ها به عنوان کوچک ترین مارکر های تشخیصی نقش بسزایی در تشخیص هویت ژنتیکی بازی می کنند. به علاوه، یکی از چالش ها در انجام محاسبات آماری ژنتیک جنایی و جمعیتی برای رسیدن به دقیق ترین نتایج، پیش بینی فراوانی وقوع بروز جهش در نشانگر های ژنتیکی به کار گرفته شده در مطالعه می باشد که از این حیث مارکر های مبتنی بر SNP با توجه به نرخ پایین جهش (۱۰-۸) از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است (۲۱).

در مطالعه حاضر به منظور نشان دادن قدرت افتراقی بیست و پنج جایگاه SNP اوتوزومال و نیز پتانسیل کاربردی آن در تعیین هویت ژنتیکی بین اقوام ایرانی از روش SNaPShot استفاده شد. مهمترین فاکتور هایی که در این تحقیق جهت پروفایلینگ SNP مارکر های بیست و پنج گانه از اهمیت بسزایی برخوردار بودند شامل الف) جداسازی پانل SNP ها به دو گروه ۱۲ تایی و ۱۳ تایی به منظور پیشگیری از اندرکنش های بین پرایمر های طراحی

و ترک های غیر ایرانی، آذربایجانی، ارمنی و کرد نشان داد در حالی فاصله ژنتیکی زیادی بین ایرانیان عرب با جمعیت های شمال و جنوب طالش، گرجستانی و قزاق گزارش شده است. به طور همسو در تایید نتایج مطالعه حاضر، به نظر می رسد بین قومیت گیلک با سایر قومیت های لر، کرد و فارس اختلاف ژنتیکی معنی داری وجود ندارد در حالی که به نظر می رسد با جمعیت های ساکن در آمریکای جنوبی ای فاصله به حداکثر میزان خود می رسد که حاکی از وجود نیایی مشترک با فاصله زیاد می باشد.

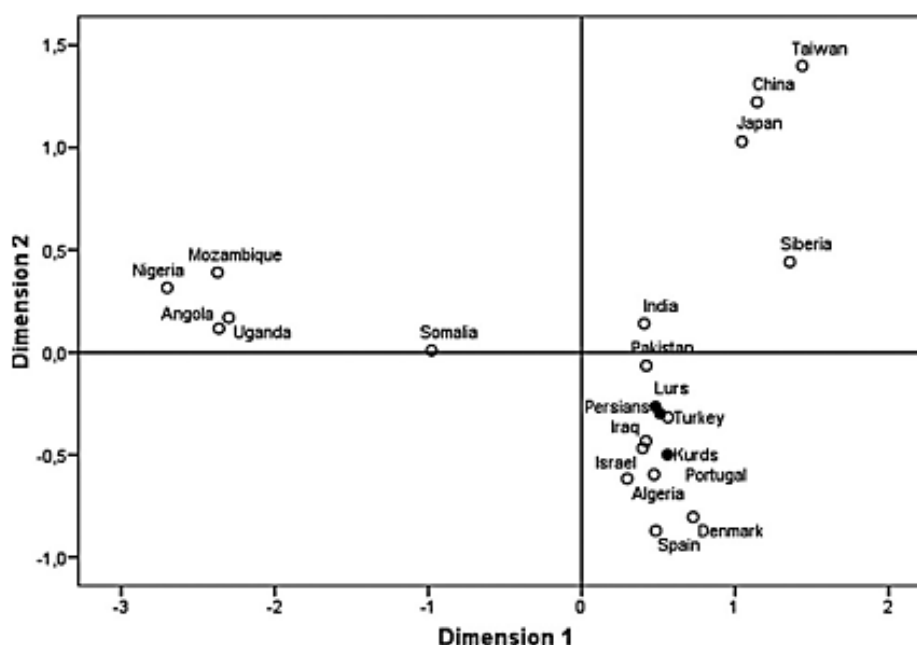
به منظور ارزیابی قدرت تمایز نتایج به دست آمده با ۸ جمعیت دیگر شامل چین، ژاپن، برزیل، الجزایر، بریتانیا، ایتالیا، روسیه و پاکستان مقایسه شدند. کمترین فرکانس اللی در جمعیت گیلان مربوط rs938283 با میزان ۰/۱۰۵ بود در حالیکه کمترین فرکانس اللی در بین تمام جمعیت ها مربوط به جمعیت ساکن ایتالیا و rs740910 به میزان ۰/۳۴ مشاهده شد. کمترین میزان میانگین هتروزیگوسیتی در جمعیت ایتالیا به میزان ۰/۳۱۸ بود در حالیکه در جمعیت منتخب مورد مطالعه از استان گیلان برابر با ۰/۴۲۸ به دست آمد که این میزان از هتروزیزگوسیتی نشان دهنده تنوع ژنتیکی متعادل در قومیت گیلک است.

بیشترین میزان شاخص تثبیت مربوط به ایتالیا به میزان ۰/۳۳۴ می باشد و کمترین میزان آن مربوط به جمعیت چین به مقدار ۰/۱۰۹- بود، اما در جمعیت گیلان این پارامتر به میزان ۰/۰۷۲ به دست آمد که نشان دهنده وجود درون آمیزی بالا در قومیت گیلک است (جدول ۷). همچنین با مقایسه F_{ST} بین جمعیت گیلان و جمعیت های لر، کرد، فارس و لر مشخص شد که این جمعیت ها به لحاظ تنوعات ژنتیکی به هم نزدیک و فاصله ژنتیکی چندانی از یکدیگر ندارند (شکل ۳).

دهند (شکل ۳-۳) بررسی مقایسه ای نتایج هم ردیفی حاکی از این است که جمعیت های ساکن در آفریقا در ربع اول قرار دارند (کشور های موزامبیک، اوگاندا، آنگولا و سومالی) در حالی جمعیت های ساکن در ربع دوم (تایوان، چین و ژاپن) به طور محسوسی از جمعیت ساکن در سبیری فاصله قابل توجهی را نشان می دهند. به علاوه، نتایج مطالعه آنها نشان داد که قومیت های لر، کرد، فارس و لر ساکن در ایران نیز فاصله کمی از یکدیگر داشته و در عین حال فاصله ژنتیکی بین قومیت فارس و لر به مراتب کمتر از فاصله آنها با قومیت کرد می باشد. نتایج فوق تایید می کند که جمعیت هایی که احتمالاً نیای مشترک و ارتباطات ژنتیکی بیشتری دارند از نظر ژنتیکی فاصله کمتری با یکدیگر دارند و به طور همسو با نتایج مطالعه حاضر، قومیت گیلک هم به دلیل نزدیکی شاخص F_{ST} به نظر می رسد از نظر تنوع ژنتیکی با سایر قومیت های ایرانی تفاوت معنی دار نداشته باشند.

ارزیابی نتایج مطالعه سرفی و همکاران همچنین نشان می دهد نزدیکی جمعیت ساکن در کشور ترکیه با قومیت های لر و فارس این پیشنهاد رو مطرح می کند که احتمالاً منشا جمعیت ساکن در ترکیه واجد نیای مشترکی با قومیت های ساکن در ایران بوده و از نظر ژنتیکی دارای زمینه اشتراکی ژنتیکی بیشتری می باشند و تفاوت زبانی آنها ناشی از اختلاف در فاصله ژنتیکی آنها نیست.

در همین راستا در مطالعه ای که Lutz و همکاران (۲۳) با هدف ایجاد یک پایگاه داده های مبتنی بر Y-STR انجام دادند، نتایج مقایسه فاصله ژنتیکی قومیت های منتخب در داخل ایران شامل قومیت های بختیاری، گیلک، ایرانیان عرب، مازنی و طالشی با قومیت آذربایجانی (شمال طالش) فاصله ژنتیکی معنی دار و یا فاصله ژنتیکی ناچیزی را بین قومیت های گیلک، مازنی، بختیاری



شکل ۳-۳. نقشه چند بعدی ترسیم شده بر اساس شاخص F_{ST} برای بیست و یک جمعیت از سراسر جهان برای ۴۹ جایگاه SNPs بر اساس پایگاه SNPforID محاسبه شده است. قومیت های ایرانی واجد دایره های سیاه رنگ می باشند (۲۲).

در مطالعه حاضر نشان دادن که اضافه کردن لینکر های انتهایی در SBE ها می تواند با قدرت مناسبی در ایجاد افتراق موثر عمل کنند.

نتیجه گیری

با بررسی شاخص های احتمال تشابه (PI) و احتمال خروج (PEXC) مشخص شد که آنالیز بیست و پنج جایگاه SNP اتوزومال انتخاب شده در مطالعه حاضر پتانسیل به کارگیری در پرونده های جنایی و پزشکی قانونی را دارد. بررسی ۲۵ گانه امکان یکی شدن پروفایل مربوط به دو نفر به صورت تصادفی را به حداقل می رساند و با احتمال نزدیک به ۱۰۰٪ می توان نمونه ای که عدم ارتباط آن محرز است را از مطالعه کنار گذاشت.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله از حمایت های مالی و معنوی بیمارستان علوم پزشکی بقیه الله (عج) کمال تشکر و قدردانی را دارد. همچنین از زحمات جناب آقای کیانی، آقای قمری و آقای حبیبی نهایت تقدیر و تشکر به عمل می آید. این مطالعه مستخرج از پایان نامه مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی علوم پزشکی بقیه الله (عج) با شماره ثبت ۵۷-۲۰-۱۰ و دارای کد اخلاق به شماره IR.BMSU.RBC.1396.178 می باشد.

تضاد منافع: مولف اظهار می دارد که هیچگونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع

- Cheung K-H, Osier MV, Kidd JR, Pakstis AJ, Miller PL, Kidd KK. ALFRED: an allele frequency database for diverse populations and DNA polymorphisms. *Nucleic acids research*. 2000;28(1):361-3.
- Sunnucks P. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution*. 2000;15(5):199-203.
- Butler JM, Coble MD, Vallone PM. STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic science, medicine, and pathology*. 2007;3(3):200-5.
- Musumeci L, Arthur JW, Cheung FS, Hoque A, Lippman S, Reichardt JK. Single nucleotide differences (SNDs) in the dbSNP database may lead to errors in genotyping and haplotyping studies. *Human mutation*. 2010;31(1):67-73.
- Sherry ST, Ward M-H, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research*. 2001;29(1):308-11.
- Hares DR. Expanding the CODIS core loci in the United States. *Forensic Science International*:

با توجه به گستردگی جمعیت ها و نیز رویه مهاجرت جمعیت های انسانی در جهت کاهش تنوع درون قومیتی و بررسی های بیشتر بر روی شاخص های مبتنی بر ماکر های 169-plex بر پایه ماشین های نسل جدید توالی یابی پیشنهاد می گردد. در مطالعه حاضر با هدف کاهش هزینه ها و نیز ارتقا سرعت ژنوتایپینگ، از یک روش تزریق دو مرحله ای SBE ها استفاده شد که در مقایسه با روش های مولتی پلکس ۲۹ گانه پروفایل کیفیت و دقت مناسب تری را نشان داد که می توان آن را به تعداد SNP های انتخاب شده در هر پانل، سرعت و شدت عبور از لوله موئینه دستگاه ژنتیک آنالایزر اشاره کرد. به منظور بهینه سازی شناسایی پیک های بیست و پنج گانه مربوط به هر SNP در تکنیک SNaPShot، از یک دستور ماکرو (macro) جهت خوانش قله های پیک ها به منظور کاهش زمان آنالیز و خوانش پیک ها استفاده گردید. نتایج اولیه انتخاب روش ژنوتایپینگ SNP های بیست و پنج گانه در مقایسه با روش های قدیمی تر از دقت و حساسیت بسیار مناسب تری برخوردار است. یکی از مهمترین محدودیت های تکنیک حاضر وجود روی هم قرارگیری پیک های خروجی ناشی از ژنوتایپینگ می باشد که در صورت وجود طول های نزدیک ناشی از پرایمر های طویل SBE در تکنیک SNaPShot منجر به ایجاد همپوشانی و عدم افتراق تشخیصی است. یکی از راه حل های به کار گرفته شده اضافه کردن توالی های تکراری پلی T در انتهای توالی SBE و نیز اضافه کردن لینکر های خنثی غیر متصل شونده می باشد. استفاده از این رویکرد

Genetics. 2012;6(1):e52-e4.

7. Butler JM. *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*: Academic Press; 2011.

8. Gill P. Application of low copy number DNA profiling. *Croatian medical journal*. 2001;42(3):229-32.

9. Van Oorschot RA, Jones MK. DNA fingerprints from fingerprints. *Nature*. 1997;387(6635):767-.

10. Lee HC, Ladd C, Scherczinger CA, Bourke MT. Forensic applications of DNA typing: part 2: collection and preservation of DNA evidence. *The American journal of forensic medicine and pathology*. 1998;19(1):10-8.

11. Sanchez JJ, Phillips C, Børsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevila M, et al. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis*. 2006;27(9):1713-24.

12. Amigo J, Phillips C, Lareu M, Carracedo Á. The SNPforID browser: an online tool for query and display of frequency data from the SNPforID project. *International journal of legal medicine*. 2008;122(5):435-40.

13. Coble MD, Just RS, O'Callaghan JE, Letmanyi

IH, Peterson CT, Irwin JA, et al. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *International journal of legal medicine*. 2004;118(3):137-46.

14. Phillips C, Salas A, Sanchez J, Fondevila M, Gomez-Tato A, Alvarez-Dios J, et al. Inferring ancestral origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs. *Forensic Science International: Genetics*. 2007;1(3):273-80.

15. Walsh S, Liu F, Ballantyne KN, van Oven M, Lao O, Kayser M. IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Science International: Genetics*. 2011;5(3):170-80.

16. Ali SM, Mahnaz S, Mahmood T. Rapid genomic DNA extraction (RGDE). *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2008;1(1):63-5.

17. Budowle B, Van Daal A. Forensically relevant SNP classes. *BioTechniques: The international journal of life science methods*. 2008;44(5):603.

18. Daniel R, Santos C, Phillips C, Fondevila M, van Oorschot R, Carracedo A, et al. A SNaPshot of next generation sequencing for forensic SNP analysis. *Forensic Science International: Genetics*. 2015;14:50-60.

19. Waples RS, Gaggiotti O. INVITED REVIEW: What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular ecology*. 2006;15(6):1419-39.

20. Phillips ML. Crime scene genetics: transforming forensic science through molecular technologies. *BioScience*. 2008;58(6):484-9.

21. Børsting C, Sanchez JJ, Hansen HE, Hansen AJ, Bruun HQ, Morling N. Performance of the SNPforID 52 SNP-plex assay in paternity testing. *Forensic Science International: Genetics*. 2008;2(4):292-300.

22. Sharafi Farzad M, Tomas C, Borsting C, Zeinali Z, Malekdoost M, Zeinali S, et al. Analysis of 49 autosomal SNPs in three ethnic groups from Iran: Persians, Lurs and Kurds. *Forensic Sci Int Genet*. 2013;7(4):471-3.

23. Roewer L, Willuweit S, Stoneking M, Nasidze I. A Y-STR database of Iranian and Azerbaijanian minority populations. *Forensic Sci Int Genet*. 2009;4(1):e53-5.