مقاله تحقیقی

ژنوتایپینگ بیست و پنج SNP اتوزومال با درجه آگاهی بخش بالا در جمعیت استان خوزستان با استفاده از روش SNapShot

پیام حاجی بابایی[۱]، *محمود تولایی [*۲]، شهره زارع کاریزی [۱]

۱. گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران
۲.مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

***مسئول مکاتبات:** پست الکترونیکی: tavalla.mah@gmail.com

محل انجام تحقیق: مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۸

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۲- شماره ۳ - پاییز ۱۳۹۶

چکیده

استفاده از پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs) در تشخیص هویت ژنتیکی کاربردهای گسترده ای را نشان داده است. در جمعیت ایرانی جهت ارزیابی فرکانس آللی و نیز تعیین تنوع ژنتیکی SNP ها بر مبنای پایگاه SNIPforID مطالعات محدودی گزارش شده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی تنوعات ژنتیکی، تعیین فراوانی آللی و ارزیابی هتروزیگوسیتی، به طور همزمان در بیست و پنج جایگاه SNP اتوزومال آگهی بخش در استان خوزستان با تکنیک SNapShot اجرا شد.در مطالعه حاضر، نتایج ارزیابی های بیوانفورماتیکی نشان داد حداقل ۲۵ جایگاه SNP اتوزمال قدرت تمایز بین قومیت های ایرانی را داشتند. استخراج DNA از نمونه‌ی خون ۵۰ نفر از افراد با قومیت عرب با روش فنول-کلروفورم انجام شد. تعیین ژنوتیپ SNP های منتخب با استفاده از روش SNapShot با دستگاه ژنتیک آنالایزر اجرا شد. آنالیز های آماری همچون فرکانس اللی و تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از نرم افزار های Arlequine 3.5 و GenALEX 6.5 محاسبه شد. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده برابر با ۰/۴۴۲ بود. کمترین هتروزیگوسیتی محاسبه شده مربوط به rs2056277 به میزان ۰/۰۸۰ به دست آمد. کمترین فرکانس اللی برای rs2056277 برابر با ۰/۰۴۰ محاسبه شد. مجموع فرکانس آللی SNP های مورد مطالعه از تعادل هاردی-واینبرگ به استثناء rs938283, rs1413212 و rs354439 انحراف نشان دادند. ارزیابی همزمان ۲۵ جایگاه اتوزمال SNP توانایی ایجاد تمایز بین قومیت های درون جمعیتی را دارد. نتایج نشان داد قومیت عرب از نظر ژنتیکی با قومیت های لر، فارس و کرد مشابه می باشد. روش SNapShot از حساسیت و اختصاصیت مناسبی جهت ژنوتایپینگ SNP هابه طور همزمان برخودار بود.

واژگان کلیدی: پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP)، روشSNapShot ، قومیت عرب، صفحه تارنمای SNPforID

مقدمه

تجزیه و تحلیل تنوعات ژنومی جمعیتی یکی از جذابترین زمینه های ژنتیک پزشکی است. این تنوعات نقش مهمی در آنالیز ژنتیک جمعیتی، قرابت قومیتی، تعیین دودمان های نیایی، پزشکی قانونی و حتی پیش بینی بیماری ها دارند (۱). جمعیت ایرانی متشکل از حدود

هشتاد میلیون نفر با قومیت ها و ادیان مختلف است که همگی وابسته به فرهنگ فارسی هستند. گروه های قومیتی ایران به ترتیب فراوانی شامل فارس (٪۵۱)، آذری (٪۲۴) گیلکی و مازنی (٪۸)، کرد (٪۷)، عرب (٪۳)، بلوچ (٪۲)، لر (٪۲)، ترکمن (٪۲) و دیگران (٪۱) است (۲). مطالعه تنوعات در توالی DNA هنگامی که آن را در میان افراد یک جمعیت و یا در بین چند جمعیت مختلف بررسی می شوند ارزشمند هستند. اندازه گیری تنوعات بین قومیتی به تعداد افراد هتروزیگوت در جمعیت ها وابسته است. ارزیابی فرکانس اللی بر پایه آنالیز پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNP) آگاهی بخش در جمعیت های انسانی می تواند درک مفیدی را در ارتباط با تنوعات ژنتیکی و تفاوت های موجود در بین جمعیت ها و افراد فراهم نماید.(۳). یکی از کاربردهای بررسی تنوعات ژنتیکی تعیین هویت افراد است (۴).

در حال حاضر پرکاربردترین مارکر زیستی در تعیین هویت STR ها هستند (۵)، در مطالعات پزشکی قانونی زمانی که با آسیب بافت انسانی و نیز تجزیه در سطح DNA (مانند آتش سوزی) مواجه هستیم STRها به دلیل محصول PCR طویلی که دارند پروفایل ژنتیکی مناسبی را ارائه نمی دهند. در چنین مواردی یکی از مارکرهای جایگزین برای STR ها، ارزیابی پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNP) می باشند (۶). SNPs اتوزومال واجد خصوصیاتی شامل نرخ جهش پایین، محصول PCR کوتاه و امکان آنالیز همزمان چندگانه به روش الکتروفورز موئینه بوده که می توانند در بررسی های ژنتیک جمعیت و پزشکی قانونی-ژنتیکی کارایی بالایی داشته باشند (۷).

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 (۸). در این پایگاه داده، مارکرهای SNP بر اساس کاربرد طبقه بندی شده اند که می توان به SNP های تعیین هویتی (IISNPs) (۷)، SNP های نیایی (LISNPs) (۹)، SNPهای مرتبط با تبار شناسی (AISNPs) (۱۰) و SNPهای مرتبط با فنوتیپ (PISNPs) (۱۱) اشاره کرد.

Drobnic و همکاران با ارزیابی SNPهای اوتوزمال منتخب در ۱۲۰ از پرونده پزشکی قانونی نشان دادند که استفاده از SNPs اتوزومال می تواند ابزار قدرتمندی در شناسایی هویت افراد باشد (۱۲). Tomas و همکاران (۲۰۱۳) با مطالعه روی ۱۰۱ شهروند عراقی ساکن دانمارک گزارش کردند قومیت عرب عراقی از نظر نرخ تنوع ژنتیکی با جمعیت ترکیه ای و ایرانی قرابت دارد (۱۳). همچنین خانم شرفی و همکاران، با مطالعه در جمعیت های لر، کرد و فارس نشان داد جمعیت های فارس و لر نزدیکی بیشتری دارند در حالی که جمعیت کرد فاصله ی بیشتری با این دو جمعیت دارد (۱۴).

هدف مطالعه حاضر در جهت بررسی فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی، شاخص تثبیت، احتمال تطابق و خروج برای ۲۵ SNP اتوزومال آگاهی بخش در قومیت عرب بر پایه استفاده از روش SNaPshot طراحی گردید.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی – مقطعی از ۵۰ داوطلب عرب (ساکن استان خوزستان) با جمع آوری پرسشنامه خون گیری به عمل آمد. معیار ورود به مطالعه شامل سکونت سه نسل قبل از سمت پدری و مادری در استان خوزستان، عدم رابطه خویشاوندی و نیز گویش به زبان محلی بود.

میزان ۲ میلی لیتر خون محیطی از افراد واجد شرایط با استفاده از لوله های آغشته به EDTA اخذ گردید. استخراج DNA با روش فنول-کلروفروم (RGDE) (۱۵) اجرا و در ادامه کنترل کیفی نمونه ها با روش الکتروفورز مورد تایید قرار گرفت. معیار انتخاب SNPs های مورد مطالعه آگاهی بخشی در قومیت ساکن در خاورمیانه بر مبنای اطلاعات منتشر شده در تارنمای SNPforID بود. با به کارگیری ابزار بیوانفورماتیکی، لیست SNP های شاخص و ویژگی هر کدام از پایگاه داده ی dbSNP ، اطلاعات پروژه HapMap و پروژه ۱۰۰۰ ژنوم به دست آمد (۱۶).طراحی آغازگر های فاز اول و دوم به وسیله نرم افزار Allele ID انجام گردید، صحت عملکرد هر کدام از آغازگر ها به صورت

جداگانه مورد تایید قرار گرفت. تکنیک مینی سکانس[1] که با نام SNaPshot نیز شناخته می شود با استفاده ازگسترش آغازگرهای مختص جایگاه[2] توسط ddNTP[3] های نشان دار شده با رنگ فلوروسنت عمل می کند.

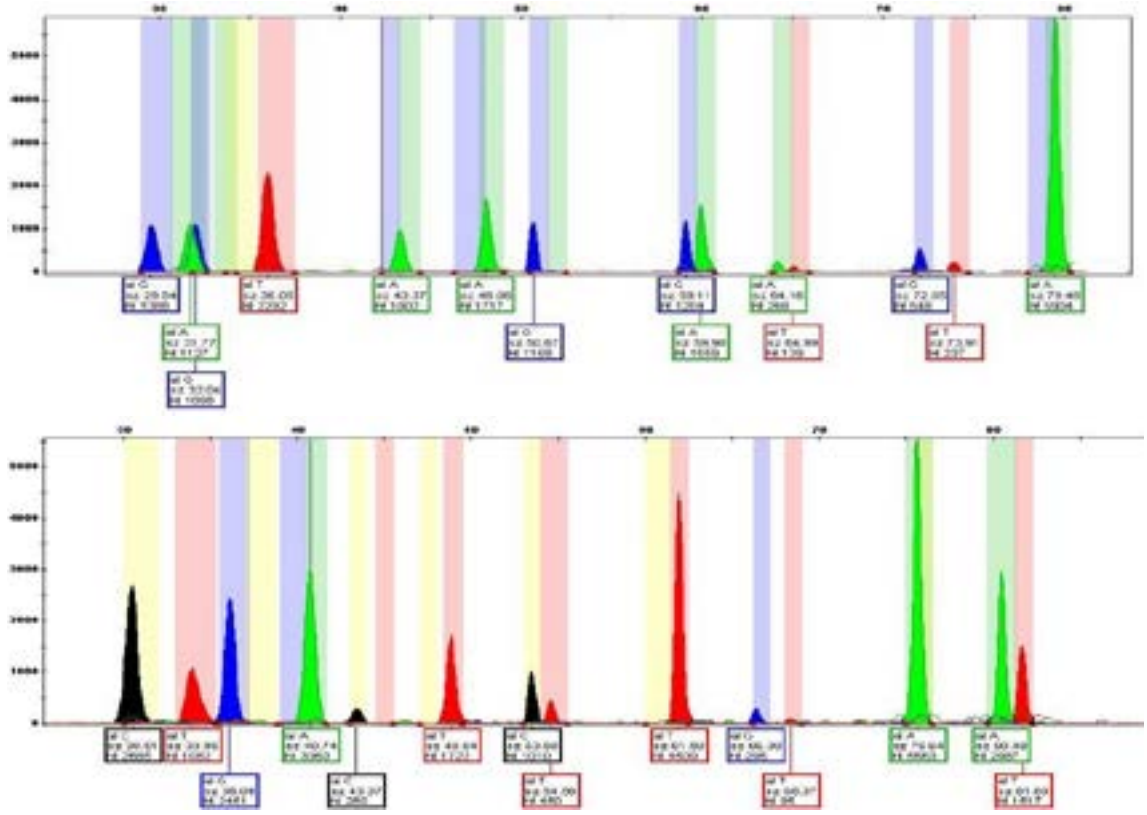
سه مرحله اولیه در اجرای SNaPshot وجود دارد شامل: ۱) PCR اولیه ۲) PCR آغازگرهای SBE[4] ۳) تحلیل داده ها (۱۷). در مرحله PCR اولیه ناحیه ای از ژنوم که SNP ها در آن قرار گرفته اند تو سط آغازگرهای رفتی و برگشتی تکثیر شد. واکنش PCR اولیه با استفاده از مخلوط واکنش *Taq* DNA Polymerase Master Mix RED (شرکت Amplicon ،کره جنوبی) اجرا شد. در این مرحله آغازگرها به دو دسته ۱۲ و ۱۳تایی 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 نانوگرم، یک میکرولیتر از مخلوط آغازگر ها و در نهایت ۴ میکرولیتر آب دوبار تقطیر به واکنش اضافه شد و حجم نهایی واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامه دمایی دستگاه ترموسایکر به صورت زیر اجرا گردید. یک سیکل با ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، در ادامه ۳۵ سیکل با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد (۳۰ثانیه)، 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. به منظور خالص سازی محصول PCR اولیه از آغازگرها و dNTPهای 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 دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه و نیز یک سیکل ۷۵ درجه سانتیگراد ۱۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر اجرا گردید. در مرحله SNapShot، با استفاده از آغازگرهای SBE و ddNTPهای نشانه گذاری شده با فلئوروسنت و مسترمیکس SNapShot (شرکت ABI، آمریکا)، SNPهای 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 دو بار 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) گرمادهی شد. پس از انجام مرحله SNapShot، با استفاده از آنزیم CIP[5] محصول واکنش از ddNTPهای 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. 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 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 ها ی مربوط به هر SNP مشاهده خواهند شد. به منظور آنالیز فراوانی SNP مارکر های منتخب و سایر پارامتر های ژنتیک جمعیت از نرم افزارهای GenAlex6.5، Arlequin 3.5(18) و GeneMapper 5.0 برای محاسبه ی پارامتر هایی چون شاخص شانون، تثبیت و فاصله ژنتیکی جمعیت ها (AMOVA) استفاده گردید

نتایج

[1]. Minisequenceing
[2]. allele-specific
[3]. Di-deoxy Nucleotide Three Phosphate
[4] Single Base Extension
[5] Calf Intestinal Phosphatase

پیک ها مروبط به هر دسته و مختص هر فرد توسط دستگاه پیشرفته ژنتیک آنالایزر به همراه اطلاعات خام در اختیار ما قرار می گیرد (شکل ۱).

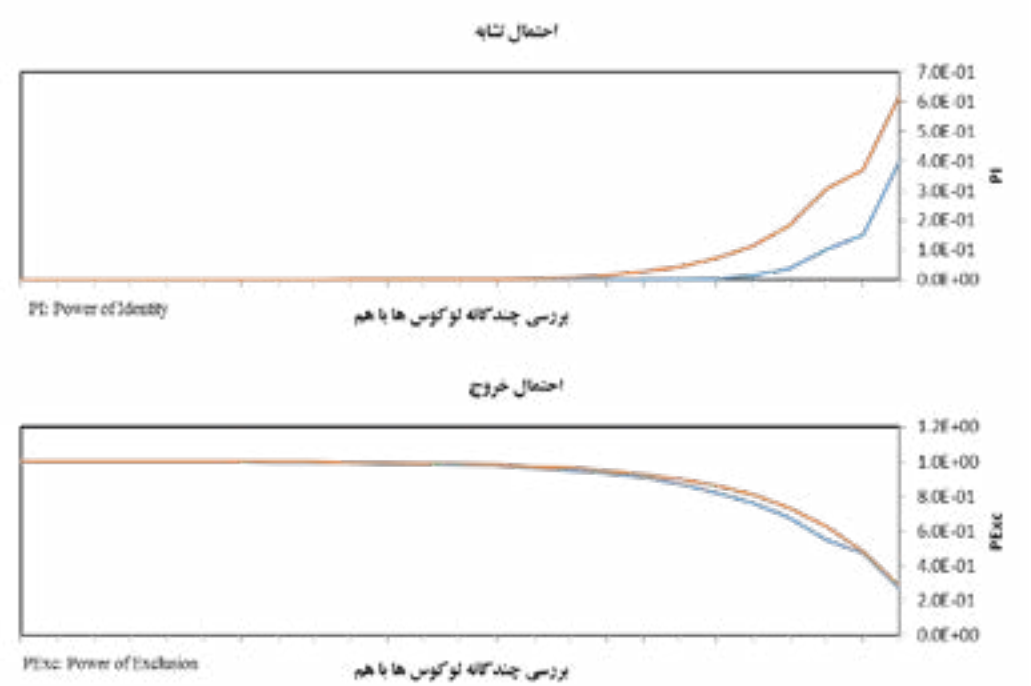


شکل ۱ - پروفایل ژنتیکی بررسی بیست و پنج جایگاه SNP مارکر اتوزومال آگهی بخش در ۵۰ داوطلب عرب با استفاده از تکنیک SNapShot. پیک های به رنگ قرمز، سبز، آبی و مشکی به ترتیب نشان دهنده آلل های T، A، G و C می باشند. با بررسی فرکانس اللی برای هر لوکوس به صورت جداگانه در قومیت عرب خوزستان مشخص شد که آلل A از rs2056277 کمترین میزان فرکانس اللی با ۰/۰۴۰ را نشان داد. همه ی SNP های مورد مطالعه از تعادل هاردی-واینبرگ به استثناء rs1413212 ,rs938283 و rs354439 انحراف نشان دادند.

در بررسی پارامتر های هتروزیگوسیتی، شاخص شانون و تثبیت برای تعیین میزان تنوع ژنتیکی موجود در قومیت عرب خوزستان مشخص شد که کمترین میزان هتروزیگوسیتی مربوط به rs2056277 با مقدار ۰/۰۸۰ و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جمعیت مورد مطالعه به ترتیب ۰/۴۴۲ و ۰/۴۴۹ نشان داده شد. همچنین میانگین شاخص شانون ۰/۶۳۷ محاسبه شد. بیشترین شاخص تثبیت مربوط به rs891700 با مقدار ۰/۲۳۲ به دست آمد. به علاوه، به منظور بررسی میزان تنوع موجود در قومیت عرب، میانگین شاخص تثبیت ۰/۰۱۶ محاسبه شد. به منظور ارزیابی قدرت تمایز نتایج به دست آمده، مقایسه ای با اطلاعات ۸ جمعیت دیگر (جدول ۱) شامل چین، ژاپن، برزیل، الجزایر، بریتانیا، ایتالیا، روسیه و پاکستان که از پایگاه داده ی SNPforID بدست آمده بود انجام داده شد.

جدول ۱ - میانگین هتروزیگوسیتی و شاخص تشبیت.

جمعیت	میانگین هتروزیگوسیتی	میانگین شاخص تشبیت
چین	۰/۴۳۲	-۰/۱۰۹
ژاپن	۰/۳۴۶	۰/۲۰۲
برزیل	۰/۳۱۷	۰/۰۴۲
الجزایر	۰/۳۷۹	۰/۱۲۷
بریتانیا	۰/۴۲۲	۰/۰۲۴
ایتالیا	۰/۳۱۸	۰/۳۴۴
روسیه	۰/۴۲۱	۰/۰۸۲
پاکستان	۰/۳۶۳	۰/۱۷۹
عرب	۰/۴۴۲	۰/۰۱۶



شکل ۲ - احتمال تشابه (بالا) و احتمال خروج (پایین) با بررسی پروفایل ژنتیکی ۲۵ جایگاه SNP مارکر اوتوزومال آگهی بخش.

بحث و نتیجه گیری

پلی مورفیسم های تک نوکلئوتید (SNPs) ابتدا برای تحقیقات قانونی در اوایل دهه ۱۹۹۰ استفاده شدند، اما به سرعت توسط STRS جایگزین شدند. با این حال، SNP ها می توانند به عنوان یک مارکر مکمل در شرایط خاصی که شامل نمونه های بسیار تخریب شده، منشاء قومیتی، اطلاعات اجدادی و خصوصیات ظاهری (فنوتیپی) هستند، بسیار مفید باشند (۱۹). در طی چند سال گذشته با پیشرفت علوم ژنتیکی و بیوشیمیایی روش های مختلفی برای تشخیص SNP ها ابداع شده است از جمله : ARMS-PCR ، ASO-PCR، HRM و SNapShot (۷).

ما برای بررسی بیست و پنج SNP اتوزومال، تکنیک SNaPshot را به عنوان یک گزینه مناسب برای کار انتخاب

کردیم، زیرا برای بررسی های چندگانه روش دقیق تر و کارآمدتری نسبت به روش های دیگر می باشد و مراحل آزمایشگاهی ساده تر و ارزان تری دارد.

در این مطالعه به منظور بهینه کردن انجام تکنیک SNaPShot و به دست آوردن یک پروفایل کامل از ۲۵ SNP اتوزومال بررسی شده موارد زیر لحاظ گردید: الف) تفکیک SNP ها به دو دسته ۱۲ تایی و ۱۳ تایی با هدف جلوگیری از اندرکنش های بین پرایمر ها؛ ب) به کارگیری SBE پرایمر ها با درجه خلوص بالا؛ ج) متناسب سازی غلظت استفاده شده از محصول PCR مرحله اول در مرحله SNapShot؛ د) استفاده از یک دستور ماکرو (macro) جهت خوانش قله های پیک ها به منظور کاهش زمان آنالیز و خوانش پیک ها، در نتیجه رعایت موارد ذکر شده 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.

در نهایت پس از ژنوتایپ کردن ۲۵ جایگاه مورد بررسی در هر فرد، در مجموع یک پروفایل شامل ۱۲۵۰ ژنوتایپ متفاوت به دست آمد و از نظر فراوانی اللی ، تعادل هاردی واینبرگ ، هتروزیگوسیتی و احتمال تطابق و احتمال خروج مورد بررسی قرار گرفتند. کمترین فرکانس اللی در جمعیت خوزستان مربوط آلل A از rs2056277 به میزان ۰/۰۴۰ بود، در حالی که کمترین فرکانس اللی در بین تمام جمعیت ها مربوط به جمعیت ساکن برزیل و rs1005533 به میزان ۰/۰۳۸ مشاهده شد . کمترین میزان میانگین هتروزیگوسیتی در جمعیت برزیل به میزان ۰/۲۱۷ بود به این معنی که تنوع کمتری در بین افراد این جمعیت وجود دارد و هموزیگوسیتی آن بالا است. در حالیکه در جمعیت منتخب مورد مطالعه از استان خوزستان برابر با ۰/۴۴۲ به دست آمد که این میزان از هتروزیگوزسیتی نشان دهنده تنوع ژنتیکی متعادل در قومیت عرب است.

بیشترین میزان شاخص تثبیت مربوط به ایتالیا به میزان ۰/۳۳۲ می باشد و کمترین میزان آن مربوط به جمعیت بریتانیا به مقدار ۰/۰۱۲ بود، اما در جمعیت عرب خوزستان این پارامتر به میزان ۰/۰۱۶ به دست آمد که نشان دهنده ی وجود درون آمیزی بالا در قومیت عرب است (جدول ۱). همچنین با مقایسه FST بین جمعیت عرب خوزستان و جمعیت های کرد، فارس و لر مشخص شد که این جمعیت ها به لحاظ تنوعات ژنتیکی به هم نزدیک و فاصله ی ژنتیکی چندانی از یکدیگر ندارد(۱۴). به منظور محاسبه فاصله ژنتیکی جمعیت خوزستان با سایر جمعیت های مورد مطالعه از آنالیز AMOVA استفاده گردید. نتایج نشان داد قومیت عرب بیشترین فاصله را با جمعیت ساکن آمریکای جنوبی (برزیل) وکمترین فاصله را با جمعیت الجزایر (۰/۰۱۹) دارد (جدول ۲).

جدول ۲ - نتایج آنالیز ANOVA.

	الجزایر	برزیل	روسیه	ایتالیا	بریتانیا	خوزستان	پاکستان	ژاپن	چین
چین									۰/۰۰۰
ژاپن								۰/۰۰۰	۰/۰۳۰
پاکستان							۰/۰۰۰	۰/۰۴۰	۰/۰۲۳
خوزستان						۰/۰۰۰	۰/۰۲۵	۰/۰۳۹	۰/۰۳۱
بریتانیا					۰/۰۰۰	۰/۰۲۴	۰/۰۲۲	۰/۰۳۸	۰/۰۲۸
ایتالیا				۰/۰۰۰	۰/۰۱۶	۰/۰۲۹	۰/۰۱۹	۰/۰۳۱	۰/۰۳۲
روسیه			۰/۰۰۰	۰/۰۱۵	۰/۰۲۱	۰/۰۳۴	۰/۰۲۵	۰/۰۳۸	۰/۰۳۲
برزیل		۰/۰۰۰	۰/۱۰۲	۰/۱۱۰	۰/۱۳۰	۰/۱۴۴	۰/۱۲۰	۰/۱۱۸	۰/۱۰۸
الجزایر	۰/۰۰۰	۰/۱۲۶	۰/۰۱۵	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۱۹	۰/۰۱۸	۰/۰۳۲	۰/۰۲۷

با بررسی شاخص های احتمال تشابه (PI) و احتمال خروج (PExc) مشخص شد که آنالیز بیست و پنج جایگاه SNP اتوزومال 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 (شکل ۲).

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از حمایت های مالی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) و بیمارستان بقیه الله (عج) کمال تشکر و قدردانی را دارد. همچنین از زحمات آقایان دکتر حسینی، رضا بازیار، حسن بهمنی، مصطفی خفایی، ابراهیم کیانی، محسن قمری، حبیبی و میری نهایت تقدیر و تشکر به عمل می آید.

منابع مورد استفاده

1. Cheung, K. H., Osier, M. V., Kidd, J. R., Pakstis, A. J., Miller, P. L., Kidd, K. K., Alfered. H., 2000. An allele frequency database for diverse populations and DNA polymorphisms. Nucleic Acids Research 28(1): 361-3.
2. http://www.nationsencyclopedia.com/Asia-and-Oceania/Iran-ETHNIC– GROUPS.html.
3. Goodwin, W., Linacre, A., Hadi, S., 2011. An introduction to forensic genetics. second edition, John Wiley & Sons. UK, pp. 38-220.
4. Sunnucks, P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. Trends in Ecology & Evolution 15(5):199-203.
5. Butler, J. M., 2005. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers. second edition, Academic Press. USA, pp.220-310.
6. Butler, J. M., Coble, M. D., Vallone, P. M., 2007. STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. Forensic Science, Medicine and Pathology 3(3): 200-5.
7. Sanchez, J. J., Phillips, C., Børsting, C., Balogh, K., Bogus, M., Fondevila, M., 2006. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. Electrophoresis 27(9): 1713.
8. Amigo, J., Phillips, C., Lareu, M., Carracedo, Á., 2008. The SNP for ID browser :an online tool for query and display of frequency data from the SNPforID project. International Journal of Legal Medicine 122(5): 435-40.
9. Coble, M. D., Just, R. S., O'Callaghan, J. E., Letmanyi, I. H., Peterson, C. T., Irwin, J. A., 2004. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. International Journal of Legal Medicine 118(3): 137-46.
10. Phillips, C., Salas, A., Sanchez, J., Fondevila, M., Gomez-Tato, A., Alvarez-Dios, J., 2007. Inferring ancestral origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs. Forensic Science International Genetics 1(3): 273-80.
11. Walsh, S., Liu, F., Ballantyne, K. N., Van-Oven, M., Lao, O., Kayser, M., 2011. Iris Plex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. Forensic Science International Genetics 5(3): 170-80.
12. Drobnic, K., Borsting, C., Rockenbauer, E., Tomas, C.., Morling, N., 2010. Typing of 49 autosomal SNPs by SNaPshot in the Slovenian population. Forensic Science International Genetics 4(5): e125-7.
13. Tomas, C., Diez, I. E., Moncada, E., Borsting, C., Morling, N., 2013. Analysis of 49 autosomal SNPs in an Iraqi population. Forensic Science International Genetics 7(1): 198-9.
14. Sharafi, F. M., Tomas, C., Borsting, C., Zeinali, Z., Malekdoost, M., Zeinali, S., 2013. Analysis of 49 autosomal SNPs in three ethnic groups from Iran: Persians, Lurs and Kurds. Forensic Science International Genetics 7(4): 471-3.
15. Ali, S. M., Mahnaz, S., Mahmood, T., 2008. Rapid genomic DNA extraction (RGDE). Forensic Science International Genetics Supplement Series 1(1): 63-5.

16. Budowle, B., Van-Daal, A., 2008. Forensically relevant SNP classes. Biotechniques: The International Journal of Life Science Methods 44(5): 603.
17. Daniel, R., Santos, C., Phillips, C., Fondevila, M., Van-Oorschot, R., Carracedo, A., 2015. A SNaPshot of next generation sequencing for forensic SNP analysis. Forensic Science International Genetics 14: 50-60.
18. Waples, R. S., Gaggiotti, O., 2006. 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 15(6): 1419-39.
19. Phillips, M. L., 2008. Crime scene genetics: transforming forensic science through molecular technologies. BioScience 58(6): 484-9.
20. Børsting, C., Sanchez, J. J., Hansen, H. E., Hansen, A. J., Bruun, H. Q., Morling, N., 2008. Performance of the SNP for ID 52 SNP-plex assay in paternity testing. Forensic Science International Genetics 2(4): 292-300.