# تشخیص مولکولی بیماری‌های ارثی و استفاده از آن در تشخیص قبل از تولد و تشخیص پیش‌کاشتی

## استفاده از روش‌های نوین تعیین توالی


**نویسندگان:**

1. **مریم‌السادات دانشپور، دکتری ژنتیک ملکولی** *
2. **محمدصادق فلاح، پزشک، دکتری ژنتیک ملکولی** *
3. **ساجده مسجودی، کارشناس ارشد ژنتیک** *

* شرکت خدمات تخصصی ژنتیک، ژن کاوش آزما

## خلاصه

به دنبال پیشرفت‌های حاصل در روش‌های تشخیصی بیماری‌های ارثی و مادرزادی، اکنون امکان تشخیص مولکولی در بسیاری از بیماری‌های ارثی که ژن مسئول آن شناخته شده است، فراهم می‌باشد. با استفاده از روش‌های سنتی و نیز نوین تشخیص ژنتیک و حصول به تشخیص مولکولی، می‌توان از نتایج حاصله در تشخیص قبل از تولد [1] و تشخیص پیش‌کاشتی[2] بهره برد تا از تولد نوزاد معلول بعدی پیشگیری شود.

اولین توالی‌های DNA در اوایل دهه 1970 توسط پژوهشگران با بکارگیری روش‌های بسیار مشکل و پرزحمت بر اساس کروماتوگرافی دوبعدی به دست آمد و به‌تدریج به دنبال پیشرفتِ روش‌های آنالیز خودکار مبتنی بر رنگ، انجام تعیین توالیِ DNA آسان‌تر و سریع‌تر شد [1]. استفاده از تعیین توالی مستقیم ژنوم در بسیاری از بیماری‌های ژنتیک به‌عنوان استاندارد طلایی[3] مطرح بوده و هنوز نیز مورد استفاده می‌باشد.

به دنبال انجام پروژه ژنوم و معرفی نسل جدید روش‌های تعیین توالی ژنوم[4] با توان عملیاتی بالا[5] امروزه امکان استفاده از روش‌های نوین ژنومیک در تشخیص بیماری‌های ارثی فراهم گردیده است. با استفاده از این روش‌های نوین تشخیصی ژنتیک می‌توان در کودکان مبتلا به اختلالات ژنتیک پیچیده با ارائه نتایج به‌موقع و دقیق، به پزشک و خانواده بیمار جهت تشخیص و پیشگیری کمک نمود.

انجام آزمایشات تشخیص ژنتیک با استفاده از نسل جدید روش‌های تعیین توالی برای بیماران مبتلا به بیماری‌های ارثی مانند عقب‌ماندگی ذهنی، ناشنوایی، بیماری‌های عصبی عضلانی، بیماری‌های متابولیک و ... در موارد زیر کمک‌کننده است [2]:

1- مواردی که فنوتیپ بیماری قویاً مؤید یک بیماری ارثی بوده ولی آن را نمی‌توان به یک بیماری مشخص با ژن مشخص نسبت داد.

2- در مواردی که با یک بیماری مشخص با ژن‌های متعدد روبرو هستیم[6] و یا ژن مسئول بیماری به حدی بزرگ است که استفاده از روش‌های نوین تشخیصی، هزینه بررسی و زمان موردنیاز برای حصول جواب نسبت به روش‌های سنتی به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد.

3- در مواردی که تست‌های اختصاصی یک بیماری ارثی به نتیجه‌ای نرسیده ولی همچنان مشکوک به یک بیماری ارثی با ظن قوی می‌باشیم.

[1] PND
[2] PGD
[3] Gold standard
[4] **NGS**:Next Generation Sequencing
[5] High Throughput
[6] genetic heterogeneity

## مقدمه:

اولـــین توالی‌های DNA در اوایـــل دهـــه 1970 توســـط پژوهشگران با بکارگیری روش‌های بسیار مشکل و پرزحمـت بر اساس کروماتوگرافی دوبعدی به دست آمـد و به‌تدریج بـه دنبال پیشرفتِ روش‌های آنالیز خودکار مبتنی بـر رنـگ، انجـام تعیین توالیِ DNAآسان‌تر و سریع‌تر شد [1]. یکی از نخستین نمونه‌های تعیینِ توالی کامل، تعیین توالی RNA مربوط به ژنوم باکتریوفاژ MS2بود کـه توسـط والتـر فیـرز[۷] و همکـارانش در دانـشگاه Ghent بـین سال‌های 1972 و 1976 انجام شد [3-5]. قبل از پیشرفت سریع روش‌های تعیـین تـوالی DNA، در اوایل دهه 1970، روش‌های بسیار پرزحمتـی توسـط فردریک سانگر[8] در دانشگاهCambridge انگلستان و همچنین والتر گیلبـرت[۹] و آلـن ماکسام[10] در Harvard به کار گرفتـه شد [6]، به‌عنوان مثـال در سـال 1973 گیلبـرت و ماکـسام توسـط بکارگیری روش شناخته‌شده آنـالیز نقطه‌ای[۱۱] تعیینِ توالی 24 جفت باز را گزارش دادند [7]. ایـن روش بـه روش بـرش شـیمیایی[۱۲] معروف شد که یک روش پرزحمت و مبتنی بر استفاده از مواد رادیواکتیو و برش شیمیایی بود. در سال 1977 سانگر و همکارانش روش تعیین تـوالی بـر مبنای ختم زنجیره[۱۳] را پیشنهاد نمودنـد که بعدها به دلیل آسان بـودن نـسبی و قابـل اطمینـان بـودنش تبدیل به روش انتخابی تعیین توالی شد [6،8،9]. اسـاس ایـن روش بر مبنای تعیین توالی بازهای DNA بر اساس ختم سـنتز DNA در حال تکثیـر در نقـاط مختلـف DNA و جداسـازی قطعات کوچکDNA است. در مقاله حاضـر روش‌های تعیـین تـوالی ماکـسام- گیلبرت، ختم زنجیره و ختم زنجیره با استفاده از رنگ معرفی و چالش‌های موجود در این زمینه بررسی می‌شود، سـپس نـسل جدید روش‌های تعیـین تـوالی بـا تـوان عملیـاتی بـالا[14] و مواردی که امـروزه به‌صورت تجـاری در دنیای ژنتیک کاربرد بیشتری دارد به‌اختصار معرفی می‌شود [10].

## روش‌های تعیین توالی

1. ماکسام- گیلبرت
2. ختم زنجیرسازی (روش سانگر)
3. ختم زنجیرسازی با استفاده از رنگ[۱۵]
4. تعیین توالی انبوه

الف- تعیین توالی به روش ایلومینا

ب- تعیین توالی به روشSOLiD

[7] Walter Fiers
[8] Frederick Sanger
[9] Walter Gilbert
[10] Allan Maxam
[11] Wandering Spot Analysis
[12] Chemical cleavage
[13] Chain-termination
[14] High Throughput
[15] Dye-termination

ج- روش تعیین توالی حرارتی[۱۶]

د- روش SMRT

5- روش‌های کم‌کاربرد ولی مطرح

الف- نانو منفذ[۱۷]

ب-Helioscope

**1- ماکسام- گیلبرت:**

یک روش تعیین توالی DNA بر اساس تغییر شیمیایی DNA و متعاقب آن ایجاد شکاف در بازهای خاص می‌باشد [6]. این روش نیازمند نشان‌دار کردن انتهای'5 DNA به‌وسیله رادیواکتیو- به‌طور معمول به‌واسطه یک واکنش کیناز و با استفاده از Gamma-32P ATP- است. ابتدا قطعه DNA برای تعیین توالی استخراج و تخلیص می‌شود و تحت تیمار شیمیایی قرار می‌گیرد. این تیمار شیمیایی باعث ایجاد شکست در نسبت کوچکی از 1 یا 2 نوکلئوتید از مجموع 4 نوکلئوتید می‌شود. قطعات حاصل از این تیمار عبارتند از: گوانین، سیتوزین، پورین‌ها (آدنین+گوانین) و پیریمیدین (سیتوزین+گوانین). هم‌اکنون قطعات حاصله می‌توانند تحت اثر مواد شیمیایی تغییر شکل دهند تا جهت ردیابی آماده شوند. به‌عنوان مثال:

1) پورین‌ها (A+G) با استفاده از فرمیک اسید، پورین‌زدایی[۱۸] می‌شوند.

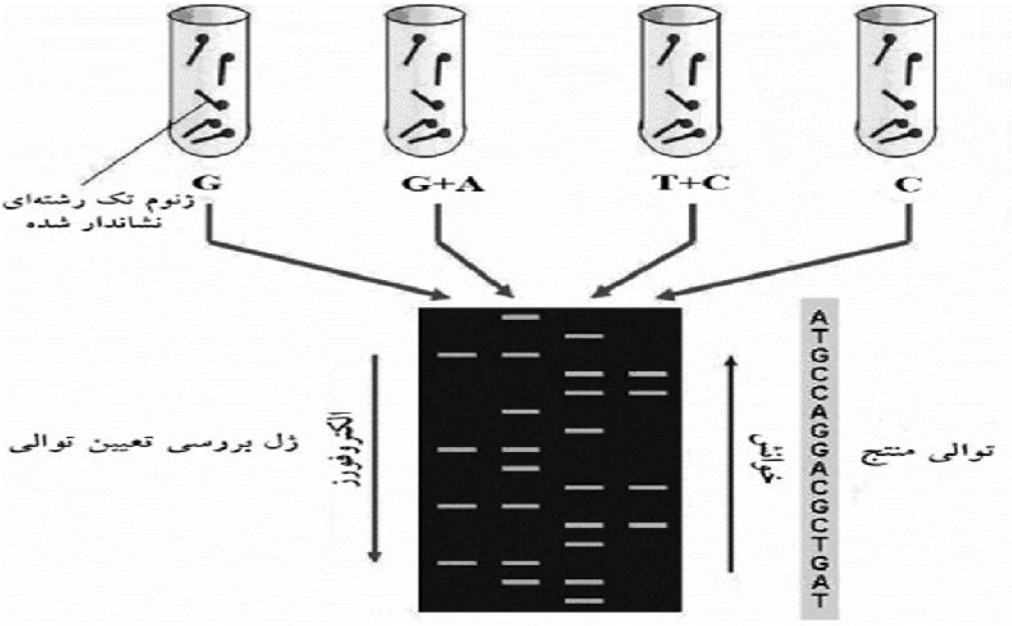
2) گوانین‌ها (و تا حدی آدنین‌ها) با دی‌متیل سولفات، متیله می‌شوند.

3) پیریمیدین‌ها (C+T) با هیدرازین متیله می‌شوند.

4) اضافه نمودن نمک (سدیم‌کلراید) به واکنش هیدروژنی که متیله شدن تیمین را در واکنش‌های فقط حاوی سیتوزین مهار می‌کند.

سپس DNA تغییرشکل‌یافته به‌واسطه پیپریدینِ[۱۹] داغ در مکان باز تغییریافته برش داده می‌شود. غلظت مواد شیمیایی که باعث تغییر می‌شود، طوری کنترل می‌شود که به‌طور متوسط یک تغییر در هر مولکول DNA ایجاد شود. درنتیجه یک سری از قطعات نشان‌دار شده با فاصله متفاوت بین انتهای نشان‌دار شده و اولین محلِ برش در هر مولکول تولید می‌شود. قطعات حاصل از 4 واکنش در کنار یکدیگر برای جداسازی بر اساس اندازه روی ژل آکریل‌آمید تغییرماهیت‌داده‌شده[20] الکترفورز می‌شود و جهت مشاهده قطعات، ژل و فیلم رادیولوژی کنار هم قرار می‌گیرند. فیلم در نقاطی تیره و روشن خواهد بود که باندهای تیره نشانگر یک قطعه نشان‌دار DNA است که توسط آن توالی DNA استنباط می‌شود (شکل 1). این روش که

[16] Pyrosequensing 454
[17] Nanopore
[18] Depurinated
[19] Piperidine
[20] Denaturing Acrylamide




تعیین توالی شیمیایی نامیده می‌شود، بعدها منجر به ابداع سنجش متیلاسیون تداخلی[21] شد که در پیدا کردن مکان‌های اتصال پروتئین‌ها به DNA استفاده می‌شود.

**شکل 1 – روش تعیین توالی ماکسام- گیلبرت**

### 2. ختم زنجیرسازی (روش سانگر):

این روش دارای کارآمدی بیشتر، استفاده کمتر از مواد شیمیایی سمی و میزان رادیواکتیو کمتر در مقایسه با روش ماکسام و گیلبرت می‌باشد. مبنای روش سانگر کاربرد دی‌دئوکسی نوکلئوزید تری‌فسفات[22] به‌عنوان ختم‌کنندهٔ زنجیره DNA است. روش کلاسیک ختم زنجیرسازی نیاز به DNA تک‌رشته‌ای به‌عنوان الگو، آغازگر، DNA پلیمراز، دی‌دئوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات و نوکلئوتیدهای تغییریافته [23] برای ختم طویل شدن رشته DNA دارد. در این روش دی‌دئوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات به‌وسیله رادیواکتیو نشان‌دار شده (معمولاً با $S^{35}$) و روی ژل اکریل آمید الکتروفورز و در خاتمه ژل از لایه شیشه‌ای جدا می‌شود و یک فیلم رادیولوژی روی ژل قرار می‌گیرد و بعد از اثرگذاری رادیواکتیو روی فیلم تفسیر نتایج صورت می‌گیرد (شکل 2 الف و ب). بعدها با استفاده از روش دی‌دئوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات نشان‌دار شده با فلورسنس برای تعیین

[21] Methylation Interference Assay
[22] ddNTP
[23] dideoxyNTPs

توالی و الکتروفورز روی ژل اکریل‌آمید روی دستگاه، تعیین توالی نیمه‌خودکار شد. در این روش نمونه DNA برای واکنش تعیین توالی به چهار گروه مجزا تقسیم می‌شود که شامل تمام چهار نوع دئوکسی نوکلئوتیدهای پلیمراز استاندارد (dTTP و dCTP و dGTP و dATP) و DNA پلی‌مراز است. سپس در هر لوله واکنش فقط یکی از چهار دی‌دئوکسی نوکلئوتید (ddTTP و ddCTP و ddGTP و ddATP) که نوکلئوتیدهای ختم‌کننده زنجیره هستند اضافه می‌شود که این نوکلئوتیدها فاقد گروه 3'OH لازم برای تشکیل پیوند فسفودی‌استر بین دو نوکلئوتید است. نکته مهم در این روش استفاده بسیار کم از هر یک از دی‌دئوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات‌ها در هر لوله بود تا زنجیره در حال ساخت به‌طور اتفاقی دی‌دئوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات را به‌جای دئوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات استفاده کرده و درنتیجه تکثیر متوقف شود، بنابراین تکثیر در محل‌های مختلفی که مثلاً باز dATP (در لوله حاوی ddATP) قرار دارد متوقف می‌شد. بدین ترتیب طویل شدن رشته DNA متوقف شده و منجر به تشکیل قطعات DNA با طول متفاوت می‌شود. قطعات DNA نشان‌دار و تازه ساخته‌شده به‌واسطه گرما واسرشت می‌شود و براساس اندازه (با تفکیک‌پذیری فقط 1 نوکلئوتید) روی ژل آکریل‌آمید- اوره تغییرشکل‌یافته، الکتروفورز می‌شود، بدین ترتیب که هرکدام از 4 واکنش در یکی از 4 چاهک A، C، G و T به‌طور جداگانه الکتروفورز می‌شود و سپس باندهای DNA به‌وسیله تصویربرداری خودکار رادیوایزوتوپی قابل‌مشاهده شده و توالی DNA به‌طور مستقیم از روی تصویر ژل یا فیلم رادیولوژی قابل‌خواندن می‌شود. وجود هر خط یا قطعه یا باند تیره در یک خط عمودی تعیین‌کننده یک قطعه از توالی DNAاست که نتیجه ختم زنجیره بعد از تلفیق یک دی‌دئوکسی نوکلئوتید (ddTTP و ddCTP و ddGTP و ddATP) است. در این روش موقعیتِ نسبی باندهای متفاوت در بین 4 مسیر عمودی (از انتها به سمت بالا) برای خواندن توالی DNA استفاده می‌شود؛ یعنی پایین‌ترین باند، مربوط به همان بازی است که در مسیر آن دیده شده است، به‌طور مثال اگر پایین‌ترین باند مربوط به مسیر رشته A باشد نشان می‌دهد که شروع با این باز است و اگر دومین باز نیز بالاتر از این باز باشد نشان می‌دهد که دومین باز نیز A است. اگر باز بعدی در خانه مربوط به T باشد باز بعدی T خواهد بود، بنابراین برای سه باز خواهیم داشت AAT و به همین ترتیب خواندن به سمت بالا بین چهار خانه ادامه پیدا می‌کند تا توالی تا حد امکان خوانده شود و معلوم شود. از سوی دیگر، برای تعیین توالی ختم زنجیره می‌توان از برچسب نوکلئوتیدهای حاوی فسفر رادیواکتیو یا از یک آغازگر[24] نشان‌دار در انتهای '5 با رنگ فلورسنس برای نشان‌دارکردن نیز استفاده کرد. تعیین توالی با آغازگر دارای رنگِ فلورسنس، خواندن در یک سیستم نوری را سریع‌تر کرده و امکان انجام خودکار را فراهم می‌آورد که سبب معرفی این روش به‌عنوان روشی مقرون‌به‌صرفه می‌شود. پیشرفت‌های بعدی توسط لروی هوود[25] و همکارانش با بکارگیری دی‌دئوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات‌های نشان‌دار و آغازگرها، زمینه را برای انجامِ خودکار این روش توسط دستگاه‌ها و تعیین توالی DNA در حجم انبوه فراهم کرد (شکل 2-ج). در این روش در ابتدا از مواد رادیواکتیو استفاده می‌شد و بعدها شرکت Pharmacia(سوئد) در دستگاه تعیین توالی نیمه‌اتوماتیکALF از تک‌رنگ فلوئورسین[26] و در دستگاه ALF Express از رنگ CY5 استفاده کرد. در هر دو دستگاه لازم بود نمونه‌ها در چهار خانه جداگانه ریخته شود و جداسازی با استفاده از ژل اکریل‌آمید انجام می‌شد. در سال‌های ابتدایی 90 میلادی شرکت Applied Biosystems (آمریکا) دستگاهی را وارد بازار کرد

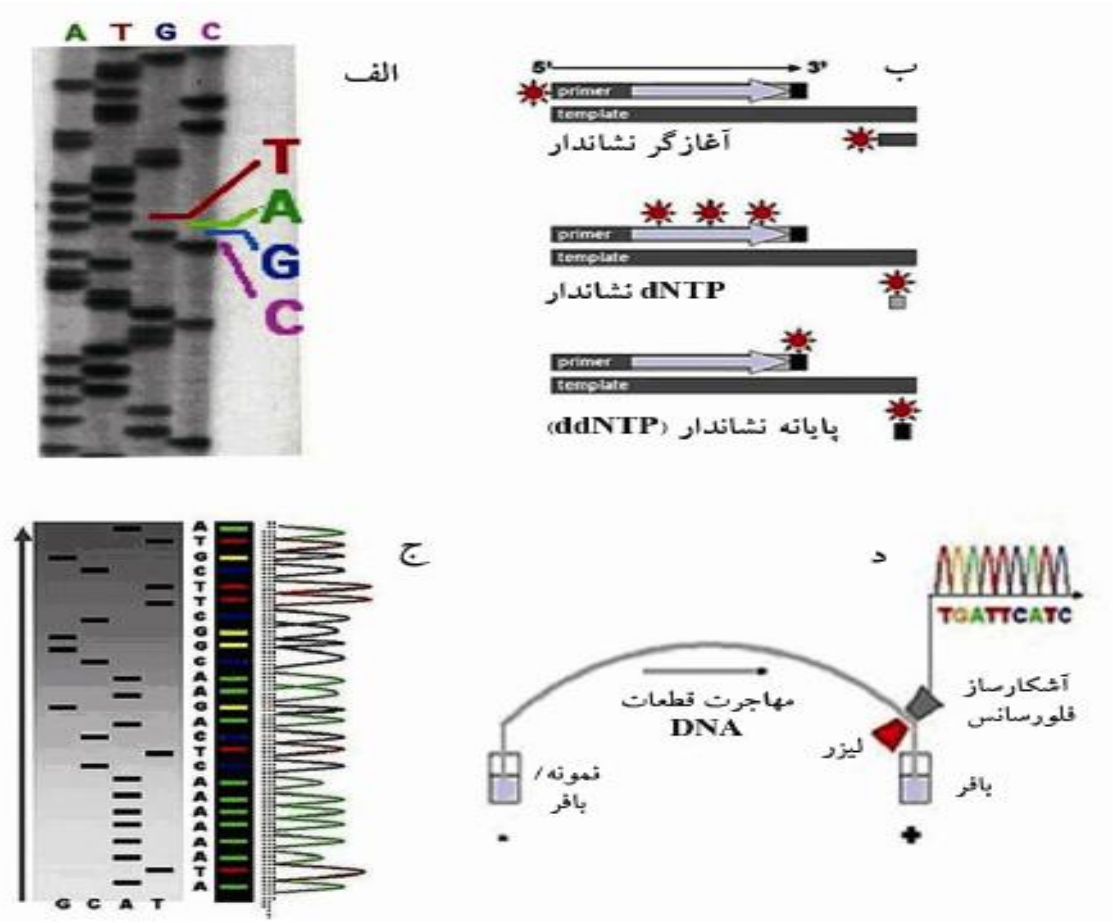
[24] Primer
[25] Leroy Hood
[26] Fluorescein

که با استفاده از چهار رنگ فلورسنتی و دستگاه لیزر متفاوت با طول‌موج مختلف تعیین توالی می‌کرد. در این روش به‌جای چهار خانه برای یک نمونه از یک خانه استفاده می‌شد؛ بنابراین چهار برابر بیشتر از روش ALF می‌توانستند نمونه را تعیین توالی کنند. این دستگاه نیز به ژل اکریل‌آمید وابسته بود. این روش‌ها تا حد زیادی تعیین توالی DNA را ساده‌تر کرد، به‌عنوان مثال در حال‌حاضر کیت‌هایی بر اساس ختم زنجیره به‌صورت تجاری در دسترس است که به‌صورت آماده دارای معرف‌های موردنیاز برای تعیینِ توالی است؛ اگرچه در این روش محدودیت‌هایی مثل غیراختصاصی بودن محل اتصال آغازگر به DNA یا ساختار دوم DNAمی‌تواند میزان صحیح بودن نتایج به‌دست‌آمده از توالی DNA را تحت‌تأثیر قرار دهد [10].

### 3. ختم زنجیرسازی با استفاده از رنگ:

در این روش از نشان‌دارکردن دی‌دزوکسی نوکلئوتید ختم‌کننده زنجیره که امکان تعیین توالی در یک واکنش واحد را می‌دهد- به‌جای چهار واکنش در روش آغازگر نشان‌دار- استفاده می‌شود. در این روش هر یک از چهار دی‌دزوکسی نوکلئوتید ختم‌کننده با یک رنگ فلورسنت نشان‌دار می‌شود که در طول‌موج‌های مختلف هر یک از آن‌ها نور منتشر می‌کند. با توجه به‌سرعت بیشتر روش ختم زنجیرسازی رنگی، این روش در حال‌حاضر روش اصلی تعیین توالی خودکار است. درعین‌حال ازجمله محدودیت‌های این روش می‌توان به اثر رنگ اشاره کرد که باعث تفاوت در اتصال ختم‌کننده نشان‌دارشده به قطعات مختلف DNA می‌شود که درنهایت سبب ارتفاع نابرابر و اشکال نابرابر در رنگ‌نگار[۲۷] حاصل از الکتروفورز مویین می‌شود (شکل 2- د)؛

[27] Chromatogram




**شکل 2 – (الف) قسمتی از رادیوگرافی ژل قطعات تعیین توالی شده نشان‌دار (ب) آغازگرها با فلورسنت یا رادیواکتیو نشانه‌گذاری می‌شوند و درنهایت قطعه DNA با ddNTP یاdNTP نشان‌دار می‌شود ج) نقاط اوج (Peaks) فلورسنس در مقایسه با باندهای رادیواکتیو د) الکتروفورز مویینه‌ای**

هرچند ایـن مشکل با تغییر در غلظت آنزیم DNA پلیمراز و رنگ برطـرف شده است. این کار موجب به حداقل رساندن تنوع در اتصال به زنجیره DNA و نیز روشی برای از بـین بـردن «حبـاب رنـگ» است. روش تعیین توالی ختم زنجیرسازی، همراه با آنـالیز تـوالی DNA به‌صورت خودکار و توان عملیاتی بالا در حال حاضر در اکثریت قریب به‌اتفاق پروژه‌های تعیین توالی استفاده می‌شود.

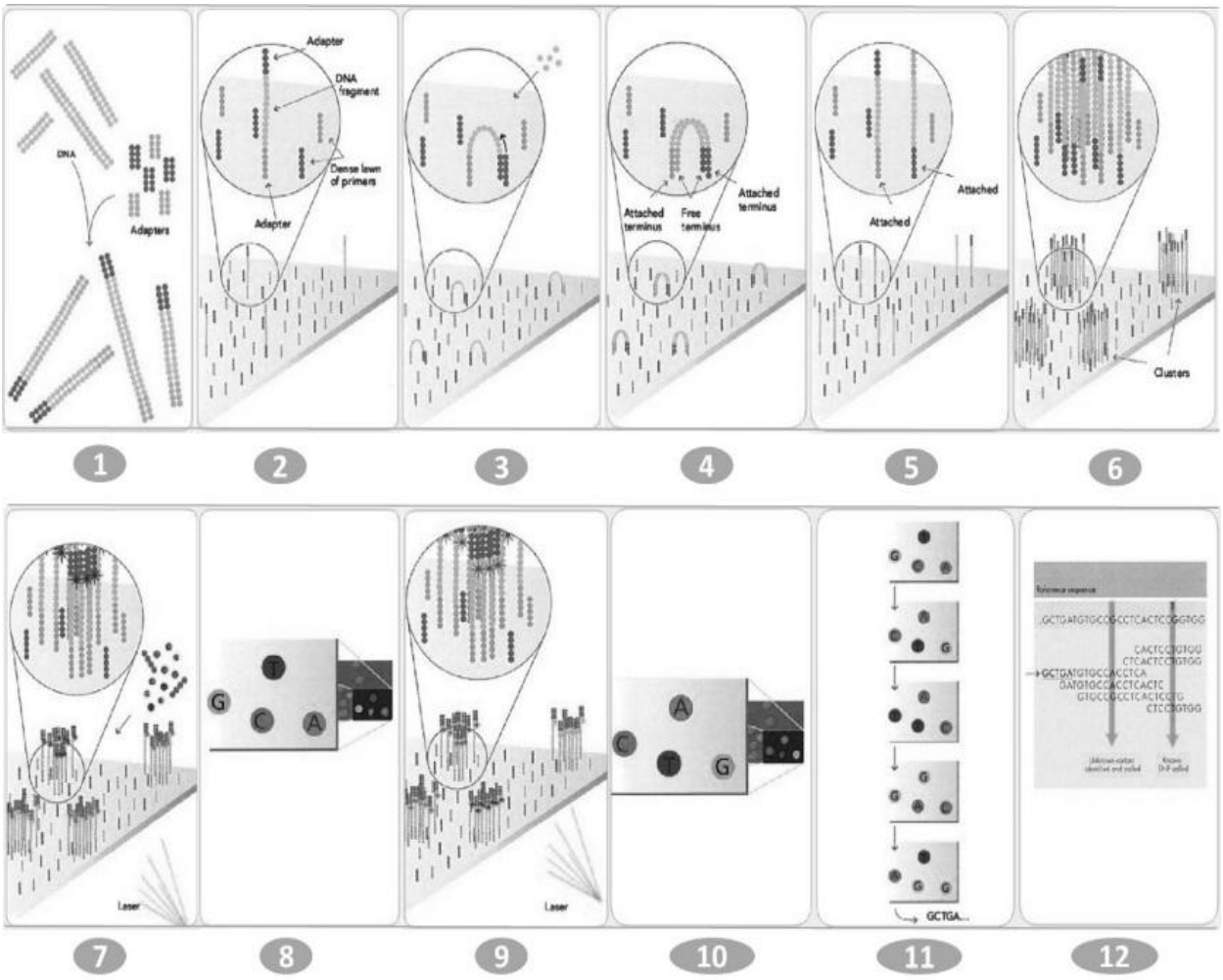
## 4. تعیین توالی انبوه (نسل جدید تعیین توالی):

تعیین توالی ژنوم مرجع انسان در پروژه ژنوم (رفرنس) نتیجه سال‌ها تلاش گروه کثیری دانشمند در سراسر دنیا و هزینه‌هایی میلیون دلاری بود. تجربیات حاصل از کار در پروژه ژنوم باعث ایجاد تغییرات زیادی در روش کار گردید و تعیین توالی از روش‌های مبتنی بر استفاده از کلون‌های کروموزومی مصنوعی باکتریایی[۲۸] به سمت استفاده از تعیین توالی کل ژنوم[۲۹] رفت. تا مدت‌ها پس از پروژه ژنوم، روش‌های نوین نیز مبتنی بر تعیین توالی به‌وسیله الکتروفورز کاپیلری بود، اما امروزه روش‌های موسوم به روش‌های نوین تعیین توالی به‌سرعت در حال تجاری شدن هستند و در موارد تعیین توالی کل ژنوم و یا قسمت بزرگی از آن استفاده می‌گردند. این روش‌ها رویکرد جدیدی همراه با هزینه و زمان کمتر در رسیدن به نتیجه نهایی را ممکن ساخته‌اند. سه روش اصلی مورد استفاده در تعیین توالی انبوه شامل روش 454[۳۰]، ایلومینا[۳۱] و بیوسیستم سولید[۳۲] می‌باشند. دو روش هلیکوس[۳۳] و ریل‌تایم[۳۴] نیز در حال مطرح شدن و رواج می‌باشد.

### الف- تعیین توالی به روش ایلومینا:

این روش شامل چهار مرحله اصلی آماده‌سازی کتابخانه ژنی، ایجاد کلاستر ژنی، تعیین توالی و آنالیز داده‌ها می‌باشد. (شکل 3) [11]. این روش تعیین توالی با استفاده از خاصیت رنگ‌های پایان‌دهنده ولی برگشت‌پذیر[35] طراحی شده است. ابتدا قطعات شکسته شده مولکول DNA به آغازگرهای متصل به اسلاید وصل و سپس تکثیر می‌شود. درنهایت کلونی‌های متمرکز ایجاد شده و پل‌هایی[36] تشکیل می‌دهد، سپس

28 BAC clone
29 Whole genome sequencing
30 Roche/454
31 Illumina/Solexa Genome Analyzer
32 Applied Biosystem SOLiD TM System
33 Helicos Heliscope
34 Single molecule real time sequencing
35 Reversible Dye-Terminators
36 Bridge Amplification


DNA
Adapters
Adapter
DNA fragment
Dense lawn of primers
Adapter
Attached terminus
Free terminus
Attached terminus
Attached
Attached
Clusters
1
2
3
4
5
6
Laser
G
C
A
Laser
A
C
G
GCTGA...
7
8
9
10
11
12

**شکل 3- مراحل طی شده در روش تعیین توالی ایلومینا**

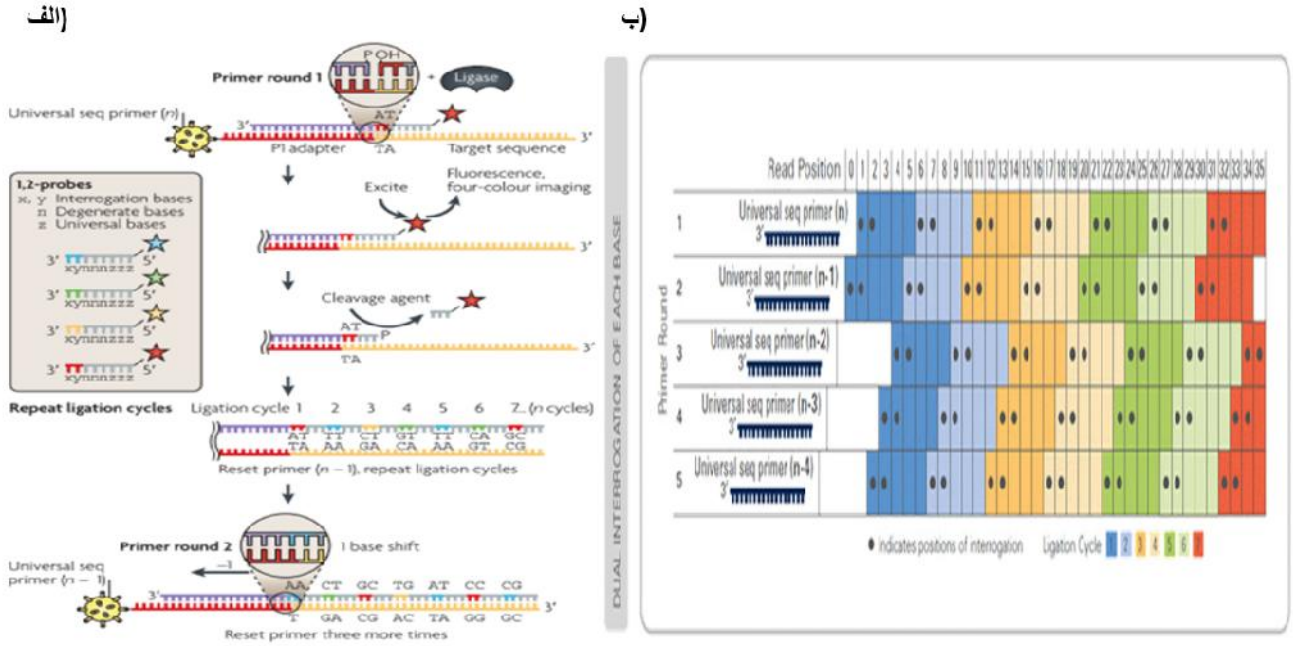
**1. فراهم کردن کتابخانه 2. اتصال نمونه ژنی به سطح فلوسل 3. تکثیر به روش پل 4. قطعات دورشته‌ای شده 5. واسرشته شدن مولکول‌های دورشته‌ای 6. اتمام تولید خوشه‌ها 7. اولین مرحله تعیین توالی 8. اولین مرحله عکس‌برداری 9. دومین مرحله تعیین توالی 10. مرحله دوم عکس‌برداری 11. چندین چرخه عکس‌برداری 12. اطلاعات حاصل از عکس‌برداری**

چهار نوع باز متصل به رنگ‌های پایان‌دهنده ولی برگشت‌پذیر[37] به واکنش افزوده می‌شود و هر باز درصورتی‌که محل مناسبی برای اتصال وجود داشته باشد، به آن ناحیه متصل می‌شود و سپس نوکلئوتیدهای آزاد شسته شده و از محیط واکنش حذف می‌شود و تنها یک نوکلئوتید در هر مرحله به DNA اضافه می‌شود. در این لحظه دوربینی از نوکلئوتیدهای نشان‌دار شده با فلورسنت تصویربرداری می‌نماید. در پایان متوقف‌کننده رشد DNA از سر 3' توسط واکنش‌های شیمیایی جدا می‌شود و چرخه بعدی آغاز می‌شود [12] (شکل 3). این روش توسط شرکت Solexa (آمریکا) ابداع شد و با توجه به این‌که این شرکت هم‌اکنون بخشی از شرکت Illumina (آمریکا) است، به روش تعیین توالی ایلومینا[38] معروف شد.

**ب- تعیین توالی به روش SOLiD:**

در این روش پیش از تعیین توالی، DNA توسط دانه‌های پوشیده از آغازگر در حباب‌های روغنی[39] تکثیر می‌شود. این روش امولسیون PCR[40] نامیده می‌شود. هرکدام از این حباب‌ها حاوی یک نسخه از مولکول‌های DNA مشابه است که بر سطح اسلاید شیشه‌ای قرار دارد. الیگونوکلئوتیدهای دورشته‌ای باز می‌شود و درصورتی‌که جایگاه‌های مشابه برای اتصال پیدا کند به آن متصل می‌شود. لازم به ذکر است که نتیجه تعیین توالی، کیفیت و طول قطعات در این روش، قابل‌مقایسه با روش ایلومینا است (شکل 4).

[37] RT-bases
[38] Illumina (Solexa) Sequencing
[39] Aqueous droplets within an oil phase
[40] Emulsion PCR

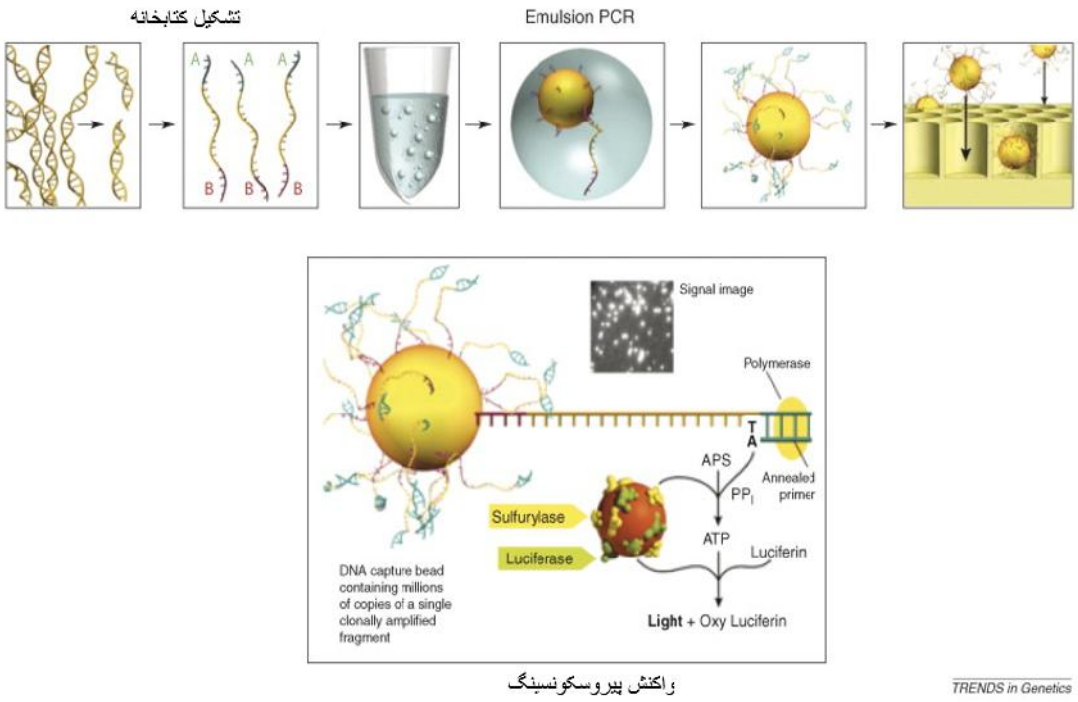



**شکل 4 – روش تعیین توالی SOLID**

**(الف) قطعات پرایمر برای همانندسازی به‌منظور تعیین توالی به قطعات نمونه ژنی مجهول متصل به قطعات آداپتور وصل می‌شوند. لازم به ذکر است که آداپتورها از قبل به دانه‌ها وصل شده‌اند تا باعث تثبیت تمامی قطعات بروی دانه‌ها گردند. 4 نوع پروب به‌کاررفته به‌منظور توالی‌یابی که هرکدام به یک رنگ فلوئورسنس خاص متصل می‌باشند که پس از اتصال هرکدام عامل برش‌دهنده انتهای پروب‌ها را برش داده و ادامه چرخه به‌منظور تعیین توالی را میسر می‌کند. (ب) هر باز در سیستم 2 بار توسط 2 پرایمر مختلف خوانده می‌شود تا توسط دستگاه به‌عنوان خوانشی از آن جایگاه در نظر گرفته شود.**

### ج- روش تعیین توالی حرارتی (454):

یکی از روش‌هایی است که به‌موازات روش تعیین توالی حرارتی[41] توسط شرکت 454 Life Sciences (آمریکا) پیشنهاد شد و این روش بعدها توسط شرکت Roche (سوئیس) خریداری شد. در این روش قطعات DNA در داخل قطرات آب در یک محیط روغنی تکثیر می‌شود (امولسیون PCR) در هرکدام از این قطرات آب یک الگوی DNA قرار دارد که به یک دانه حاوی آغازگر متصل می‌شود و درنهایت بر اثر تکثیر آن یک کلونی فشرده ایجاد می‌شود. دستگاه توالی‌خوان حاوی تعداد زیادی چاهک با حجم در حد پیکولیتر است که هرکدام از این چاهک‌ها حاوی یک دانه و آنزیم مخصوص تعیین توالی است. این سیستم از آنزیم لوسیفراز[42] که تولید نور می‌کند برای تشخیص هر نوکلئوتید که به رشته DNA تازه تشکیل‌شده افزوده می‌شود، استفاده می‌کند [13]. این روش نسبت به روش تعیین توالی سانگر، دقت خوانش بیشتر و هزینه کمتری دارد؛ هرچند که روش‌های Solexa و SOLiD از این نظر دارای برتری هستند [14] (شکل 5).




**شکل 5- روش تعیین توالی حرارتی (454) Pyrosequensing**

**پس از تشکیل کتابخانه از قطعات، تکثیر قطعات ژنی در داخل قطرات آب در یک محیط روغنی صورت می‌گیرد. داخل هر قطره آب دانه‌ای پوشیده از پرایمر به همراه یک نمونه ژنی قرار می‌گیرد و سپس نمونه ژنی متصل به پرایمرهای روی دانه با روش PCR ایجاد کلونی از نمونه ژنی روی دانه می‌کند. دستگاه توالی‌خوان دارای چاهک‌هایی است که حاوی 1 دانه و تعداد زیادی آنزیم لوسیفراز به همراه تعداد زیادی آنزیم پلیمراز می‌باشد. هر**

[41] Pyrosequencing
[42] Luciferase Enzyme

**بار با اضافه شدن نوکلئوتیدهای مشخص در صورت همخوانی با توالی و اتصال، تولید pp آزاد که به کمک سولفوراز باعث تولید نور توسط آنزیم لوسیفراز شده و دستگاه توالی را مشخص می‌نماید.**

### د- روش SMRT (Single Molecular Real Time):

شرکت PacBio (کانادا) ابداع‌کننده روش تعیینِ توالیSMRT[43] است. این روش براساسِ فرآیند طبیعی همانندسازی DNAطراحی شده که از کارآیی و درستی بالایی برخوردار است. فن‌آوری SMRT مشاهده سنتز (ساخت) DNA را در همان زمان وقوع امکان‌پذیر می‌سازد. در این روش آنزیم DNA پلیمراز در ته چاهک که[44]ZMW نامیده می‌شود، ثابت می‌گردد، سپس بر اساس رشته الگو، از میان انبوهی از نوکلئوتیدهای نشان‌دار شده با فلورسنت، نوکلئوتید مناسب انتخاب شده و سنتز انجام می‌شود و بر اساس فلورسنتِ آزادشده توالی خوانده می‌شود [15]. تعیین توالی بر اساس این روش دارای مزایای زیر است:

1) امکان تجزیه و تحلیل منحصربه‌فرد تک مولکول DNA و تشخیص تنوع توالی خاص از یک سلول به سلول دیگر

[43] Single Molecular Real Time
[44] Zero-Mode Waveguide

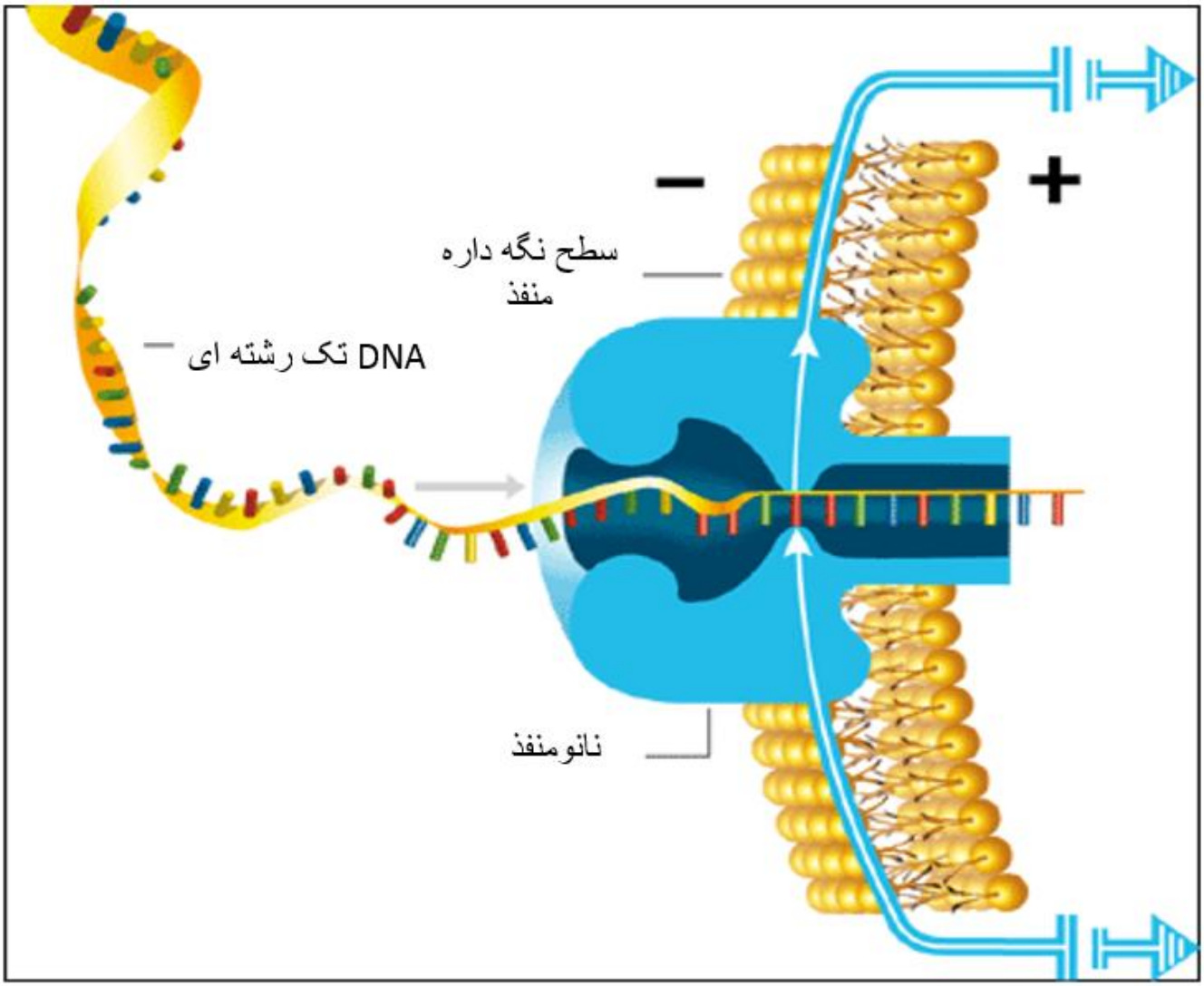
2) امکان خوانش توالی‌های طولانی بیشتر از 1000 جفت باز که امکانِ تعیین نقش ژنی و جمع کردن کلیه اطلاعات توالی موردنظر را تسهیل می‌کند.

3) نتیجه تعیین توالی می‌تواند در یک روز آماده شود.

## 5. روش‌های کم‌کاربرد ولی مطرح:

### الف-نانومنفذ (Nanopore):

این روش بر اساس بازخوانی پیام‌های الکتریکی ناشی از عبور نوکلئوتیدها از منافذ آلفاهمولزین[45] پوشیده از سیکلودکسترین[46] طراحی شده است. هنگامی که DNA از حفره‌ها عبور می‌کند جریان یونی آن تغییر می‌کند. این تغییرات بر اساس شکل، اندازه و طول توالی‌های DNA متفاوت است. هر نوع از این نوکلئوتیدها هنگام عبور از حفره، با دوره‌های زمانی متفاوت جریان یون‌ها را قطع می‌کند (شکل 6). این



**شکل 6 – روش تعیین توالی DNA نانومنفذ**

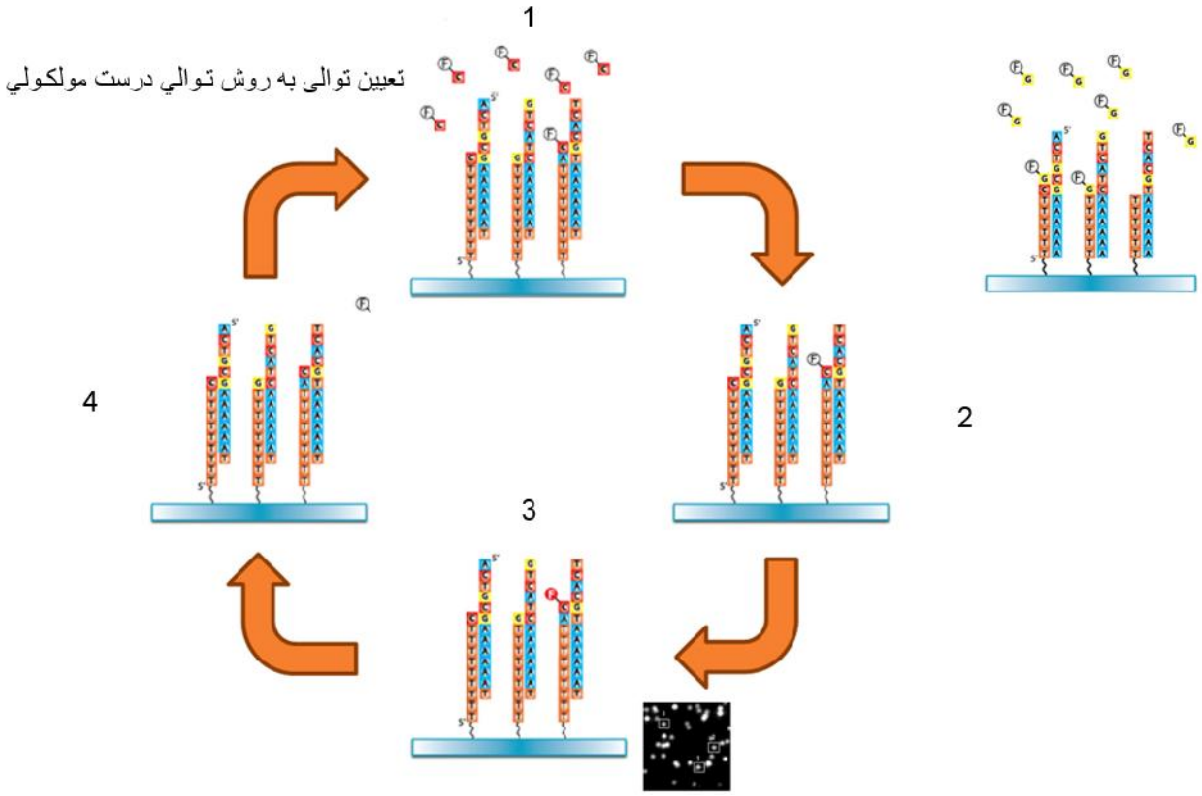
**بازخوانی پیام‌های الکتریکی ناشی از عبور نوکلئوتیدها از منافذ، نمونه ژنی با عبور از بین پروتئین‌های آلفا همولزین پوشیده از سیکلودکسترین هلیکسش باز و از بین سوراخی میکروسکوپی از خلال غشا عبور می‌کند، همزمان با عبور نمونه ژنی از خلال پروتئین، یون‌ها نیز از آن میان جریان هر باز در نمونه با سد کردن جریان عبور یون‌ها میزان متفاوتی تغییر جریان ایجاد می‌کنند که نوع باز را مشخص می‌نماید.**

روش از آنجا که نیاز به نوکلئوتید تغییرشکل‌یافته ندارد، قابلیت توسعه را دارد ولی هنوز قدرت تشخیص در حد یک نوکلئوتید را ندارد.

### ب- Heliscope:

روش تعیین توالی Heliscope بر اساس فن‌آوری "توالی درست مولکولی[۴۷]" از قطعات DNA متصل به آداپتورهایی با دنباله پلی A برای اتصال به سطح فلوسل[۴۸] استفاده می‌نماید. مرحله بعد شامل تعیین توالی مبتنی بر طویل‌سازی، با شستشوی دوره‌ای سلول‌های در جریان، با افزودن نوکلئوتیدهای نشان‌دار است (مشابه روش سانگر- یک نوع نوکلئوتید در هر مقطع زمانی) (شکل 7). دستگاه Helioscope می‌تواند در هر خوانش 55 باز را بخواند، اما با پیشرفت‌های جدید این فن‌آوری درستی خوانش هوموپلیمرها[۴۹] و تعیین توالی RNA افزایش یافته است.

[47] True Single Molecule Sequencing
[48] Flow Cell
[49] Homopolymer




**شکل 7- روش تعیین توالی Heliscope**

**1) همانندسازی رشته‌ها با تک‌نوکلئوتیدهای اضافه شده حاوی رنگ فلئورسنس و خاتمه‌دهنده واکنش 2) شستشوی نوکلئوتیدهای متصل نشده و اضافی 3) عکس‌برداری از خوشه‌های قطعات تکثیرشده که به علت اتصال رنگ فلئورسنس خاص قابل‌شناسایی هستند 4) جداسازی مواد خاتمه‌دهنده واکنش از انتهای نوکلئوتیدها و ادامه همانندسازی و تعیین توالی**

## کاربردهای نسل جدید تعیین توالی در پزشکی امروز:

از مزایای روش‌های نوین تشخیص بیماری‌های ژنتیک نسبت به روش‌های سنتی ژنتیک تشخیصی قابلیت این روش‌ها در تشخیص مواردی از بیماری است که در آن تشخیص دقیق بیماری مشخص نیست و تنها برخی علائم کلی آن مانند عقب‌ماندگی و معلولیت مشخص است. همچنین در بیماری‌هایی که ژن‌های متعددی در بروز بیماری دخیل هستند، با استفاده از روش‌های نوین تشخیصی، هزینه بررسی و زمان موردنیاز برای حصول جواب نسبت به روش‌های سنتی به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد.

**روش‌های مورد استفاده جهت بررسی بیماری‌های ارثی:**

1. Targeted exome sequencing: بررسی مجموعه‌ای از ژن‌های شناخته شده

2. Whole exome sequencing: بررسی کل نواحی کدکننده ژنوم با استفاده از روش‌های نسل جدید تعیین توالی. در این روش ژن‌هایی که تاکنون برای بیماری موردنظر معرفی نگردیده‌اند نیز موردبررسی قرار می‌گیرد.

3. Whole genome sequencing: بررسی کل ژنوم با استفاده از روش‌های نسل جدید تعیین توالی. در این روش علاوه بر نواحی کدکننده پروتئین، نواحی تنظیمی نیز ازنظر وجود واریانت‌های عامل بیماری موردنظر بررسی می‌گردد.

4. بررسی کامل ژن با استفاده از روش تعیین توالی مستقیم

در حال حاضر پانل‌های تشخیصی برای بررسی اختلالات ژنتیکی هتروژن مندلی[۵۰] توسط پانل ژنی[51] با استفاده از روش‌های نوین تعیین توالی[52] قابل‌ارائه می‌باشد. در صورت عدم امکان استفاده از پانل اختصاصی برای یک بیماری، امکان بررسی همه ژن‌ها و نواحی کدکننده با تعیین توالی همه اگزون‌ها (Whole Exome Sequencing) همراه با بررسی بیوانفورماتیک تغییرات ژنومی حاصله، تفسیر بالینی و تأیید با روش تعیین توالی مستقیم[۵۳] فراهم می‌باشد.

**منابع:**


.1 Olsvik, O., et al., *Use of automated sequencing of PCR-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in Vibrio cholerae O1 strains.* Journal of Clinical Microbiology, 1993. **31**: p. 22-25.


[50] locus heterogeneity)
[51] Targeted Exome Sequensing
[52] NGS
[53] Sanger Sequencing

.2 *Points to consider in the clinical application of genomic sequencing.* Genet Med, 2012. **14**(8): p. 759-61.
.3 Fiers, W., et al., *Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene.* Nature, 1976. **260**(5551): p. 500-507.
.4 Jou, W.M., et al ,.*Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein.* Nature, 1972. **237**: p. 82-88.
.5 Pettersson, E., J. Lundeberg, and A. Ahmadian, *Generations of sequencing technologies.* Genomics, 2009. **93**(2): p. 105-111.
.6 Maxam, A.M. and W. Gilbert, *A new method for sequencing DNA.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(2): p. 560-564.
.7 Gilbert, W. and A. Maxam, *The nucleotide sequence of the lac operator.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1973. **70**(12 :(p. 3581-3584.
.8 Sanger, F. and A.R. Coulson, *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.* Journal of molecular biology, 1975. **94**(3): p. 441-448.
.9 Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.
.10 Daneshpour, M.S., M.S. Fallah, and P. Eshraghi, *Revolution of DNA Sequencing Method from the Past until Today.* Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology, 2014. **16**(4): p. 1-13.
.11 Mardis, E.R., *Next-generation DNA sequencing methods.* Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 2008. **9**: p. 387-402.
.12 Church, G.M., *Genomes for all.* Scientific American, 2006. **294**(1): p. 46-54.
.13 Margulies, M., et al., *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors.* Nature, 2005. **437**(7057): p. 376-380.
.14 Hall, N., *Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology.* Journal of Experimental Biology, 2007. **210**(9): p. 1518-1.525
.15 Blow, N., *Metagenomics: exploring unseen communities.* Nature, 2008. **453**(7195): p. 687-690.