

## رمزگشایی ژنوم با استفاده از Next-Generation Sequencing

هزینه برای تشخیص مولکولی بیماری‌ها، مشخص کردن مکانیسم‌های دخیل در ایجاد بیماری و به تبع آن شناسایی مارکرهای جدید تشخیص بیماری، پیش بینی‌کننده‌ی بیماری و درمانی [۸].

از استراتژی‌های برپایه‌ی NGS می‌توان در: شناسایی متغیرهای نوکلئوتیدی در مناطق DNA، مشخص کردن وضعیت متیلاسیون DNA (در هر دو سطح ژنوم منفرد و به وسعت کل ژنوم) [۹]، همچنین در تحقیقات متازنومیکس اشاره کرد. به راستی کار برپایه‌ی NGS، پیچیدگی میکروبیوتا را نه تنها در اندام‌ها و بافت‌های متنوع که در رابطه با طیفی از وضعیت‌های فیزیولوژیکی (مانند سن، جنسیت و ریتم شبانه‌روزی) و نیز شرایط پاتولوژیکی هم آشکار کرده‌است [۱۰].

### شناسایی متغیرهای موجود در توالی DNA

برای تدارک کتابخانه NGS، دو استراتژی وجود دارد: می‌توان به استراتژی برپایه‌ی PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز) و استراتژی برپایه‌ی روش‌های غیر PCR اشاره کرد. انتخاب استراتژی بهینه، بستگی دارد به اندازه بخش‌های هدف، شمار نمونه‌هایی که مورد آزمون، هزینه و زمان لازم و اهداف بیولوژیکی مورد نظر.

### استراتژی‌های برپایه‌ی PCR

از آنجایی که به طور کامل با روش توالی‌یابی سنگر (CE) و نیز با تمامی ابزارها و روش‌های NGS سازگاری دارد، به عنوان یکی از استراتژی‌های پیش از توالی‌یابی کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده‌است. با این وجود تکثیر PCR برای کاربرد NGS در مقیاس بزرگ که قرار است به دنبال PCR

توالی‌یابی DNA فرآیندی است که در آن به تعیین نظم دقیق نوکلئوتیدها در تکه‌ی DNA می‌پردازد. این قطعه‌ی DNA می‌تواند متناظر با تک ژن (ها) یا طیفی از مولکول‌های مورد نظر در کل ژنوم یا قطعه‌ی بزرگی از آن باشد. از همین رو تکنیک‌هایی که بتواند به این کار بپردازد، به طور اساسی تحقیقات مولکولی را در تمامی زمینه‌های کاربردی آن دچار تغییر و تحول می‌سازد [۱]. با ظهور دو روش توالی‌یابی به وسیله‌ی Sanger و همکاران و Maxam و Gilbert در دهه‌ی ۱۹۷۰ میلادی، علوم مرتبط با زیست‌شناسی دچار تحولات بزرگ و بنیادی شدند [۲]. در ۳۰ سال گذشته، توالی‌یابی (توالی‌یابی مبتنی بر الکتروفورز مویرگی) سنگر (CE) بیشترین کاربرد گسترده را در بین فناوری‌های توالی‌یابی جهان داشته‌است و کاربرد آن در پروژه‌ی ژنوم انسان (سال ۲۰۰۱)، که به منظور مشخص سازی کل توالی‌های ژنوم انسان به اجرا درآمد، به اوج خود رسید [۳، ۴]. اگرچه امروزه این تکنیک به طور کامل اتوماتیک شده‌است، روشی است برپایه‌ی یک آمپلیکون یا شماربیشتری از آن که رشته‌های کمابیش کوچک DNA را به جای ژن کامل DNA یا مجموعه‌ای از ژن‌های موجود در ژنوم مورد توالی‌یابی قرار می‌دهد.

در نتیجه، اگر برای تعیین کل کروموزوم‌های یک بافت خاص در یک اندام یا حتی یک سلول مورد استفاده قرار بگیرد، شیوه‌ای بسیار پرهزینه و زمان‌بر خواهد بود. در ده سال گذشته، فناوری‌های جدید که به آن‌ها "توالی‌یابی‌های نسل جدید" (NGS) می‌گویند، در دسترس پژوهشگران قرار گرفته و به طرز چشمگیری با افزایش توان عملیاتی توالی‌یابی DNA هزینه‌های کار را کاهش داده‌است [۵].

برای سنجش این پدیده، باید گفت که نخستین توالی‌یابی ژنوم انسان با هزینه‌ی ۳ میلیارد دلار آمریکا و در زمانی بیش از ۱۰ سال انجام شد، ولی با استفاده از ابزار NGS، توالی کل ژنوم هر فرد را می‌توان امروزه در مدتی کمتر از یک سال و با هزینه‌ای بسیار کمتر توالی‌یابی کرد [۶]. این انتظار وجود دارد که توالی‌یابی کل ژنوم هر فرد به زودی با هزینه‌ی چند هزار دلار آمریکا اجرا شود (هم اکنون ۲۰۰۰ دلار آمریکا به ازای هر ژنوم بدون تفسیر) [۷]. برنامه راهبردی رسیدن به موارد زیر است: ایجاد مسیرهای جدید، حساس، دقیق و کارآمد از نظر زمان و





## FreshBiostats

از طریق ابزارهای بیوانفورماتیک برای هر یک توالی خوانشی اختصاص داده می‌شود. با استفاده از این رویکرد، میکروبیوم لوله‌ی گوارشی بیماری را پیش و پس از درمان با رژیم غذایی رصد نمودیم که مبتلا به بیماری Crohn ( التهاب مزمن روده به ویژه در دو بخش کولون و ایلئوم که توام با اولسر و فیستول است) بود. مشخص شد که این درمان در بازگرداندن برهم‌خوردن میکروبیوم لوله‌ی گوارشی مؤثر بوده‌است [۲۰]. به تازگی ها از استراتژی همسانی هم بهره داری شده تا ویژگی‌های میکروبیوم مری را در بیماری التهاب مری تعیین نماید [۲۱].

### آنالیز و ذخیره‌سازی داده‌های NGS

کاوش داده‌های NGS بیشتر بر پایه‌ی مراحل اصلی آنالیز ارزیابی می‌شود. در بیشتر نمونه‌ها ابزارهای بیوانفورماتیک اختصاصی در تکمیل آن نقش دارند، که عبارتند از: (۱) ایجاد توالی‌ها و تخصیص امتیاز کیفیت باز؛ (۲) تقسیم‌در هنگام نیاز)، تنظیم خوانش و احضار متغیر؛ و (۳) شناسایی و تفسیر متغیرها بر اساس دستورکار [۲۲]. خط سیرهای متفاوتی در این آخرین مرحله بسته به نوع کاربرد، نوع نمونه‌های توالی‌یابی شده و سوال مورد بررسی مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای نمونه ابزارهای اختصاصی برای متانومیکس [۲۳، ۲۴] و بررسی توالی‌یابی RNA [۲۵، ۲۶] در دسترس قرار دارد. ذخیره‌سازی مقدار بسیار زیادی از داده‌هایی که با NGS تولید می‌شوند، مسأله‌ی مهمی است. مراکز پیشگیری و کنترل بیماری، نیازمند ذخیره‌سازی گزارش داده‌ها و ثبت‌های آنالیتیک سیستم برای زمان دست‌کم ۲ سال هستند [۲۷]. در نتیجه مراکز توالی‌یابی باید به تجهیزات ذخیره‌سازی اختصاصی و قدرتمندی مجهز شوند. برآورد شده‌است که برای بک‌آپ از ۲۰۰ اگزوم نیاز به ۳،۲ ترابایت حافظه هست [۲۸].

### نتیجه‌گیری

تکنیک توالی‌یابی NGS از DNA گرفته تا RNA، پژوهشگران را قادر می‌سازد تا از داده‌های بسیار فراوان کمی و کیفی نهفته در هزاران توالی تنظیمی (که در سال‌های اخیر کشف شده‌اند مانند miRNA، RNA طولی غیررمزکننده، RNA کوچک حلقوی، rRNA هسته‌ای و RNA هستکی) را کشف نمایند. با وجود چنین پتانسیل شگفت‌انگیزی، هنوز به شیوه‌ها و دستورکارهای استاندارد شده‌ای نیاز است که بتواند بر ابداع پیوسته‌ی آن‌ها کارساز باشد. نکته‌ی جالب توجه اینکه در مبحث بالینی، NGS علاوه بر تأیید بیماری یا تغییر ژن وابسته با بیماری خاص، این پتانسیل را دارد تا به آنالیز خط مقدم برای تشخیص تفریقی میان بیماری‌هایی مبدل گردد که از نظر بالینی تشخیص آن‌ها از یکدیگر گیج‌کننده است. عرصه‌ی مهم دیگر در تحقیقات که از قبل فناوری NGS سود می‌برد، ایجاد داروهای هدفمند است (یعنی داروها یا ترکیباتی که همچون گلوله کار می‌کنند و می‌توانند درست به هدف مشخصی در توالی DNA برخورد نمایند یا در سطح متناظر پروتئینی به منظور بی‌اثرکردن یا حتی معکوس نمودن توالی‌های نوکلئوتیدی بکار روند). در پایان اینکه رویکردهای استوار بر NGS، آگاهی ما را از مبنای مولکولی بیماری‌های انسان به روش‌های گوناگونی بالا برده است.

### منابع

- 1) Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1977;74(12):5463-5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
- 2) van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C, Ten years of next-generation sequencing technology, Trends in genetics : TIG. 2014 Sep;30(9):418-26. PubMed PMID: 25108476. Epub 2014/08/12. eng.
- 3) Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., et al. The sequence of the human genome. Science. 2001;291(5507):1304-1351. doi: 10.1126/science.1058040. [PubMed] [Cross Ref]
- 4) International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature. 2004;431(7011):931-945. doi: 10.1038/nature03001. [PubMed] [Cross Ref]
- 5) Mardis E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. Trends in Genetics. 2008;24(3):133-141. doi: 10.1016/j.tig.2007.12.007. [PubMed] [Cross Ref]
- 6) von Bubnoff A. Next-generation sequencing: the race is on. Cell. 2008;132(5):721-723. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.028. [PubMed] [Cross Ref]
- 7) Reuter J., Spacek D. V., Snyder M. High-throughput sequencing technologies. Molecular Cell. 2015;58(4):586-597. doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.004. [PMC free article] [PubMed]