دکتر سارا چراغی، دکتر حمزه رحیمی
بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران و شرکت ژن فن پیشرو طب

نسل تازه تعیین توالی در تشخیص بالینی

توالی یابی های نسل تازه

امروزه روش های گوناگونی برای تعیین توالی نوکلئوتید وجود دارد. تعیین توالی DNA یکی از مهمترین دستاوردهای بشر به شمار می آید. توالی یابی DNA از دهه ۱۹۷۰ آغاز شده‌است [۱]. در سال ۱۹۷۷، Frederick Sanger(سنگر) و همکارانش روش تازه ای را برای توالی یابی DNA پیشنهاد کردند که در این روش بازهای رشته ی DNA براساس پایانه ی سنتز DNA ای که در حال تکثیر است و در نهایت جداسازی این قطعات که درازایی با اختلاف یک باز دارند، خوانده می شوند. روش سنگر به دلیل کارآمدی بیشتر، آسانتر بودن و همچنین استفاده ی کمتر از مواد رادیواکتیو و سمی، جایگزین روش های قبل شد[۲]. در سال ۱۹۹۰ پروژه ژنوم انسان آغاز شد، که پیش درآمدی برای پیدایش نوآوری در توالی یابی (نسل تازه توالیی ابی (NGS)) شد، و دگرگونی شگفت انگیزی در ژنتیک ایجاد کرد [۲].

انقلاب در توالی‌یابیNGS، در سال ۲۰۰۵ با فناوری توالی‌یابی به‌وسیله سنتز (SBS) نمایان شد. فناوری‌های تازه متشکل از استراتژی‌های مختلفی هستند، که بر ترکیبی از روش‌های تهیه الگو توالی‌یابی، تصویربرداری و انطباق توالی و سرهم سازی تکیه دارند. NGS، دارای توانایی تولید حجم بسیار زیادی از داده‌ها با قیمت بسیار ارزان است. با این پدیده امکان تازه‌ای برای طراحی آزمایش‌های مختلف فراهم شده است[۳] و راه های تازه‌ای برای بررسی بیماری های تک ژنی و اختلالات نادر در پزشکی به ارمغان آورده است. مزایا NGS نسبت به نسل قبل توالی یابی شامل ۱) تهیه کتابخانه در یک سیستم مستقل از سلول، ۲) میلیون ها واکنش توالی یابی به موازات هم و ۳) خروجی اطلاعات تعیین توالی بدون نیاز به الکتروفورز و به طور مستقیم بوده است[٤]. به طور کلی این NGS در سه مرحله انجام می شود. در مرحله اول DNA ژنومی به کتابخانه ای از قطعات کوچک تقسیم می شود و سپس این کتابخانه تکثیر شده تا برای توالی یابی آماده شوند. مرحله دوم تعیین توالی و تصویربرداری و مرحله سوم تحلیل داده ها است [۵].

انواع توالی یابی های نسل تازه

برای توالی‌یابی DNA سه روش پایه وجود دارد که عبارتند

از: ۱) توالی یابی کل ژنوم (WGS) که اجازه تشخیص تمام دگرگونی های ژنوم را می دهد و در آن همه نواحی ژنی شامل اگزون ها، اینترون ها و نواحی بین ژنی تعیین توالی می شوند، اما به دلیل هزینه های بالای آن برای بیشتر مطالعات عملی مناسب نیست. ۲) توالی یابی کل اگزوم (WES) که ما را قادر به توالی یابی کل مناطق کدکننده پروتئین می سازد [۶, ۷] و ۳) روش های توالی یابی هدفمند که جایگزین های مفیدی را ارائه می دهند. در این روش نواحی محدود به منطقه مورد نظر مانند ژن های نابینایی، ناشنوایی یا عقب ماندگی ذهنی تعیین توالی می شوند.[۸]

نسل جدید دستگاه های توالی یابی

نسل جدید دستگاه های توالی یابی در سال های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶ تجاری شدند. در حال حاضر چندین پلتفرم تجاری برای NGS در دسترس است از جمله Roch /454 Life Science، Illumina/Solexa، ABI/SOLiD، Ion Torrent ،Helicos Biosciences و Polonator Instrument. این سیستم عامل ها از روش های مختلفی برای توالی یابی استفاده می کنند که هر کدام دارای معایب و مزایایی از جمله: طول قطعه DNA استفاده شده، آماده سازی آسان، نرخ خطا، زمان انجام کار، میزان داده های تولید شده در هر پردازش و غیره است [۳, ۹, ۱۰].

منابع:

1. Olsvik, Ø., et al., Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in Vibrio cholerae O1 strains. Journal of clinical microbiology, 1993. 31(1): p. 22-25.

2. Pourmoshir, N., F. Mohamadi Farsani, and S. Vallian Borujeni, Next generation sequencing and its application in diagnosis of genetic diseases. Laboratory & Diagnosis, 2017. 8(34): p. 56-66.

3. Metzker, M.L., Sequencing technologies—the next generation. Nature reviews genetics, 2010. 11(1): p. 31.

4. Weinbrecht, A.G.a.K., Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. Investigative Dermatology, 2013. 133(e11).

5. Buermans, H. and J. Den Dunnen, Next generation sequencing technology: advances and applications. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2014. 1842(10): p. 1932-1941.

6. Dinwiddie, D.L., et al., Diagnosis of mitochondrial disorders by concomitant next-generation sequencing of the exome and mitochondrial genome. Genomics, 2013. 102(3): p. 148-156.

7. Van Dijk, E.L., et al., Ten years of next-generation sequencing technology. Trends in genetics, 2014. 30(9): p. 418-426.

8. Rabbani, B., et al., Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. Journal of human genetics, 2012. 57(10): p. 621.

9. Adey, A., et al., Rapid, low-input, low-bias construction of shotgun fragment libraries by high-density in vitro transposition. Genome biology, 2010. 11(12): p. R119.

10. Glenn, T.C., Field guide to next-generation DNA sequencers. Molecular ecology resources, 2011. 11(5): p. 759-769.