Archive of SID

Review Article

Revolution of DNA Sequencing Method from the Past until Today

Maryam Alsadat Daneshpour[1*], Mohammad Sadegh Fallah[1,2], Parisa Eshraghi[3]

1- Assistant Professor, Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Kawsar Human Genetics Research Center, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Max Plung Institute, Ulm University, Ulm, Germany

**Corresponding Address: P.O.Code: 1985717413, Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
Email: daneshpour@yahoo.com

Received: 18/Nov/2013, Accepted: 06/Jan/2014

Abstract

DNA sequence determination is a tremendous human achievement. DNA sequencing includes several methods and technologies in use for determining the order of the nucleotide bases (adenine, guanine, cytosine, and thymine) in a molecule of DNA.

Knowledge of DNA sequences has become indispensable for basic biological research, other research branches utilizing DNA sequencing, and in numerous applied fields such as diagnostic, biotechnology, forensic biology and biological systematics. The advent of DNA sequencing has significantly accelerated biological research and discovery. Rapid sequencing, the result of modern DNA sequencing technology, is instrumental in the sequencing of the human genome for the Human Genome Project. Related projects, often by scientific collaboration across continents, have generated complete DNA sequences of humans as well as numerous animals, plants and microbial genomes.

DNA sequencing methods currently under development include labeling DNA polymerase and reading the sequence as a DNA strand transits through nanopores. Additional methods include microscopy-based techniques such as atomic force microscopy or transmission electron microscopy that are used to identify the positions of individual nucleotides within long DNA fragments (>5000 bp) by nucleotide labeling with heavier elements (e.g., halogens) for visual detection and recording. Third generation technologies aim to increase throughput and decrease the time to result and cost by eliminating the need for excessive reagents and harnessing the processivity of DNA polymerase.

Researchers in the field of genetics in Iran use this technology in their studies, but unfortunately our literature lack proper Persian language resources. The authors intend to write a series of review articles in this field. The present paper is an introduction to the summary of important techniques in DNA sequencing.

Keywords: DNA sequencing, High throughput, Automated sequencer

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 4, Winter 2014, Pages: 1-13

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله مروری

سیر تحولات روش‌های تعیین توالی ژنوم از ابتدا تاکنون

مریم‌السادات دانشپور[1*]، محمدصادق فلاح[1،2]، پریسا اشراقی[3]

۱- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی غدد، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- استادیار، مرکز پژوهش‌های ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران
۳- استادیار، مؤسسه ماکس پلانگ، دانشگاه Ulm، اولم، آلمان

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۹۸۵۷۱۷۴۱۳، بزرگراه شهید چمران، ولنجک، خ یمن، ابتدای خیابان پروانه، پلاک ۲۴، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
Email: daneshpour@yahoo.com

دریافت مقاله: ۹۲/۰۸/۲۷ پذیرش مقاله: ۹۲/۱۰/۱۶

چکیده

تعیین توالی DNA یکی از مهم‌ترین دستاوردهای بشر محسوب می‌شود. امروزه روش‌های متفاوتی به منظور تعیین توالی نوکلئوتیدها (آدنین، گوانین، سایتوزین و تیمین) در یک مولکول DNA به‌کار گرفته می‌شود. آشنایی با دانش تعیین توالی DNA از ارکان اجتناب ناپذیر پژوهش‌های مرتبط با علم زیست‌شناسی است و در گرایش‌های پژوهشی و کاربردی وسیعی مانند تشخیص بیماری‌ها، زیست فنآوری، زیست‌شناسی جنایی و زیست‌شناسی سیستماتیک استفاده می‌شود. امکان تعیین توالیِ DNA به طور چشمگیری پژوهش در زیست‌شناسی و کشفیات در این زمینه را سرعت بخشید. پس از ابداع روش‌های خودکار تعیین توالی با استفاده از فنآوری‌های پیشرفته، پروژه‌های بزرگی به واسطه همکاری‌های علمی بین‌المللی انجام شد که منجر به تعیین توالی کامل ژنوم انسان و بسیاری از حیوانات، گیاهان و میکروب‌ها شد.
هدف اصلی نسل سوم فنآوری تعیین توالی، افزایش توان عملیاتی، کاهش هزینه‌ها، زمان و مواد مصرفی است. در این راستا امروزه دانشمندان در صدد طراحی یک میکروسکوپ ژنی هستند که در این سیستم با نشاندار کردن DNA پلیمراز، توالی ژنوم هنگام عبور از حفره‌های ریز با روش‌های میکروسکوپی خوانده می‌شود. با نشاندار کردن نوکلئوتید با اجزای سنگین‌تر مانند هالوژن‌ها، شرایطی فراهم می‌شود تا جایگاه نوکلئوتیدها در قطعات بزرگ‌تر از ۵۰۰۰ نوکلئوتید با چشم مشاهده و ثبت شود.
از آن‌جا که پژوهشگران علم ژنتیک در ایران نیز از این فنآوری استفاده می‌نمایند و با توجه به نیاز به منابع فارسی قابل فهم در این زمینه، مؤلفان مقاله حاضر بر آن شدند تا به ترجمه و نگارش مجموعه‌ای از مقالات مروری در این زمینه بپردازند. مقاله حاضر اولین مقاله از این سری مقالات است که تنها به معرفی مختصر روش‌ها بسنده کرده است.

کلیدواژگان: تعیین توالی ژن، توان عملیاتی بالا، دستگاه‌های تعیین توالی خودکار

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، صفحات: ۱-۱۳

مقدمه

اولین توالی‌های DNA در اوایل دهه ۱۹۷۰ توسط پژوهشگران با به‌کارگیری روش‌های بسیار مشکل و پرزحمت بر اساس کروماتوگرافی ۲ بعدی به‌دست آمد و به تدریج به دنبال پیشرفتِ روش‌های آنالیز خودکار مبتنی بر رنگ، انجام تعیین توالیِ DNA آسان‌تر و سریع‌تر شد [۱]. یکی از نخستین نمونه‌های تعیینِ توالی کامل، تعیین توالی RNA مربوط به ژنوم

www.SID.ir

Archive of SID

باکتریوفاژ MS2 بود کـه توسـط والتـر فیـرز (Walter Fiers) و همکـارانش در دانـشگاه Ghent بـین سـال‌هـای ۱۹۷۲ و ۱۹۷٦ انجام شد [۲-٤]. قبل از پیشرفت سریع روش‌های تعیـین تـوالی DNA، در اوایل دهه ۱۹۷۰، روش‌های بسیار پرزحمتـی توسـط فردریک سانگر (Frederick Sanger) در دانشگاه Cambridge انگلستان و همچنین والتر گیلبـرت (Walter Gilbert) و آلـن ماکسام (Allan Maxam) درHarvard [٥] به‌کار گرفتـه شـد. به عنـوان مثـال در سـال ۱۹۷۳ گیلبـرت و ماکـسام توسـط بـه کارگیری روش شناخته شده آنـالیز نقطـه‌ای یـا Wandering-Spot Analysis تعیینِ توالی ٢٤ جفت باز را گزارش دادند [٦]. ایـن روش بـه روش بـرش شـیمیایی یـا Chemical cleavage معروف شد. این روش یک روش پرزحمت و مبتنی بر استفاده از مواد رادیواکتیو و برش شیمیایی بود.

در سال ۱۹۷۷ سانگر و همکارانش روش تعیین تـوالی بـر مبنای ختم زنجیره (Chain-termination) را پیشنهاد نمودنـد که بعدها به دلیل آسان بـودن نـسبی و قابـل اطمینـان بـودنش تبدیل به روش انتخابی تعیین توالی شد [٥، ۷، ۸]. اسـاس ایـن روش بر مبنای تعیین توالی بازهای DNA بر اساس ختم سـنتز DNA در حال تکثیـر در نقـاط مختلـف DNA و جداسـازی قطعات کوچک DNA است.

در مقاله حاضـر ابتـدا روش‌هـای تعیـین تـوالی ماکـسام-گیلبرت، ختم زنجیره و ختم زنجیره با استفاده از رنگ معرفی و چالش‌های موجود در این زمینه بررسی می‌شـود. سـپس نـسل بعدی روش‌های تعیـین تـوالی بـا تـوان عملیـاتی بـالا (High Throughput) و مواردی که امـروزه بـه صـورت تجـاری در دنیای ژنتیک کاربرد بیشتری دارد به اختصار معرفی می‌شود. ایـن روش‌ها به طور مفصل‌تر در مقالات بعدی بررسی خواهد شد.

روش های تعیین توالی

تعیین توالی ماکسام- گیلبرت

بین سال‌های ۱۹۷٦ تا ۱۹۷۷ توسـط آلـن ماکـسام و والتـر گیلبرت یک روش تعیین توالی DNA بر اساس تغییر شیمیایی DNA و متعاقب آن ایجاد شکاف در بازهای خاص ابداع شـد [٥]. هر چند ماکسام و گیلبرت روش شیمیایی تعیـین تـوالی را ۲ سال بعد از مقالـه پیـشگام (Ground-breaking) سـانگر و کولسون (Coulson) روی تعیینِ توالی رشته‌های مثبت- منفـی (Plus-minus Sequencing) چـاپ کردنـد [۷]، امـا روش پیـشنهادی ایـشان بـه دلیـل آن‌کـه در آن DNA خـالص شـده مستقیماً قابل استفاده بود به سرعت محبوبیت پیـدا کـرد. روش اولیه سانگر نیازمند کلون کردن هـر نقطـه شـروع بـرای تولیـد DNA تک رشته‌ای بود. در هر صورت با پیشرفت روش خـتم زنجیره‌سازی، روش تعیین تـوالی ماکـسام- گیلبـرت بـه دلیـل پیچیـدگی روش، مـصرف فـراوان مـواد شـیمیایی خطرنـاک و سخت بودن استفاده از این روش در حجمِ انبوه نمونـه و عـدم کاربرد آن در کیت‌های استاندارد زیست‌شناسی محبوبیت خـود را از دست داد.

این روش نیازمند نشاندار کردن انتهای ´5 DNA به وسـیله رادیواکتیو (به طور معمول به واسـطه یـک واکـنش کینـاز و بـا استفاده از Gamma-32P ATP) اسـت. سـپس قطعـه DNA برای تعیین توالی خالص‌سازی می‌شود و توسط تیمار شیمیایی، شکست در نـسبت کـوچکی از ۱ یـا ۲ نوکلئوتیـد از مجمـوع ٤ نوکلئوتید در هـر کـدام از ٤ واکـنش (G، A+G، C، C+T) ایجاد می‌شود به عنوان مثال:

۱) پورین‌ها (A+G) با استفاده از فرمیک اسید، پورین‌زدایـی (Depurinated) می‌شود.

۲) گوانین‌ها (و تا حدی آدنین‌هـا) بـا دی متیـل سـولفات، متیله می‌شود.

۳) پیریمیدین‌ها (C+T) با هیدرازین متیله می‌شود.

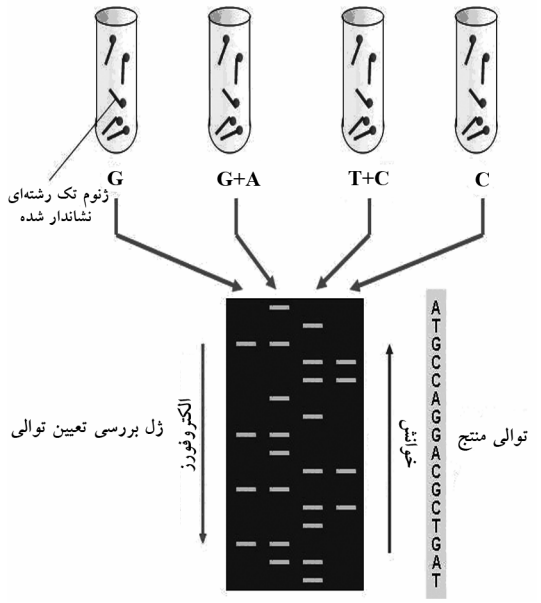
٤) اضافه نمودن نمک (سدیم کلراید) به واکنش هیدروژنی که متیله شدن تیمین را در واکنش‌هـای فقـط حـاوی سـیتوزین مهار می‌کند.

سـپس DNA تغییـر شـکل یافتـه بـه واسـطه پیپریـدینِ (Piperidine) داغ در مکان باز تغییر یافته برش داده مـی‌شـود. غلظت مواد شیمیایی که باعث تغییـر مـی‌شـود، طـوری کنتـرل می‌شود که به طور متوسط یـک تغییـر در هـر مولکـول DNA

www.SID.ir

Archive of SID

ایجاد شود. در نتیجه 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 ٤ واکنش در کنار یکدیگر برای جداسازی بر اساس اندازه روی ژل آکریل آمید تغییر ماهیت داده شده (Denaturing Acrylamide) الکترفورز می‌شود. برای 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 ۱). این روش که تعیین توالی شیمیایی نامیده می‌شود، بعدها منجر به ابداع سنجش تداخلی متیلاسیون (Methylation Interference Assay) شد که در پیدا کردن مکان‌های اتصال پروتئین‌ها به DNA استفاده می‌شود.



شکل ۱ روش تعیین توالی ماکسام- گیلبرت

ختم زنجیرسازی

روش ختم زنجیرسازی که به روش سانگر نیز معروف شد، به دلیل کارآمدی بیشتر، استفاده کمتر از مواد شیمیایی سمی و میزان رادیواکتیو کمتر در مقایسه با روش ماکسام و گیلبرت به سرعت تبدیل به روش منتخب شد. مبنای روش سانگر کاربرد دی دئوکسی نوکلئوزید تری فسفات (ddNTPs) به عنوان ختم کنندهٔ زنجیره DNA است. روش کلاسیک ختم زنجیرسازی نیاز به DNA تک رشته‌ای به عنوان الگو، آغازگر، DNA پلیمراز، دی دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs) و نوکلئوتیدهای تغییر یافته (dideoxyNTPs) برای ختم طویل شدن رشته DNA دارد. در این روش ddNTPs به وسیله 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 ۲ الف و ب). بعدها با استفاده از روش ddNTP نشاندار شده با فلورسنس برای تعیین توالی و الکتروفورز روی ژل اکریل آمید روی دستگاه، تعیین توالی نیمه خودکار شد. در این روش نمونه DNA برای واکنش تعیین توالی به چهار گروه مجزا تقسیم می شود که شامل تمام ٤ نوع دئوکسی نوکلئوتیدهای استاندارد (dATP، dGTP، dCTP و dTTP) و DNA پلیمراز است. سپس در هر لوله واکنش فقط یکی از ٤ دی دئوکسی نوکلئوتید (ddATP، ddGTP، ddCTP، یا ddTTP) که نوکلئوتیدهای ختم کننده زنجیره هستند اضافه می‌شود که این نوکلئوتیدها فاقد گروه 3′OH لازم برای تشکیل پیوند فسفو دی استر بین ۲ نوکلئوتید است. نکته مهم در این روش استفاده بسیار کم از هر یک از ddNTP ها در هر لوله بود تا زنجیره در حال ساخت به طور اتفاقی ddNTP را به جای dNTP استفاده کرده و در نتیجه تکثیر متوقف شود. بنابراین تکثیر در محل‌های مختلفی که مثلا باز dATP (در لوله حاوی ddATP) قرار دارد متوقف می‌شد. بدین‌ترتیب طویل شدن رشته DNA متوقف شده و منجر به تشکیل قطعات DNA با طول متفاوت می‌شود.

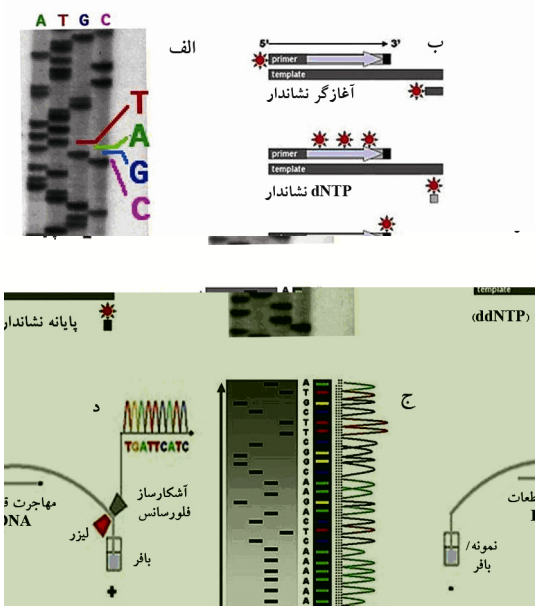
قطعات DNA نشاندار و تازه ساخته شده به واسطه گرما واسرشت می‌شود و بر اساس اندازه (با تفکیک‌پذیری فقط ۱ نوکلئوتید) روی ژل آکریل آمید- اوره تغییر شکل یافته الکترفورز می‌شود. بدین‌ترتیب که هر کدام از ٤ واکنش در

www.SID.ir

Archive of SID

یکی از ٤ چاهک G، C، A و T به طور جداگانه الکتروفورز می‌شود و سپس باندهای DNA به وسیله تصویربرداری خودکار رادیو ایزوتوپی قابل مشاهده شده و توالی DNA به طور مستقیم از روی تصویر ژل یا فیلم رادیولوژی قابل خواندن می‌شود. وجود هر خط یا قطعه یا باند تیره در یک خط عمودی تعیین کننده یک قطعه از توالی DNA است که نتیجه ختم زنجیره بعد از تلفیق یک دی دئوکسی نوکلئوتید (ddATP، ddGTP، ddCTP یا ddTTP) است. در این روش موقعیتِ نسبی باندهای متفاوت در بین ٤ 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 مربوز 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 (Primer) نشاندار در انتهای ´٥ با رنگ فلورسنس برای نشاندار کردن 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 به عنوان روشی مقرون به صرفه می‌شود. پیشرفت‌های بعدی توسط لروی هوود (Leroy Hood) و همکارانش با به کارگیری ddNTPs نشاندار و آغازگرها، زمینه را برای انجامِ خودکار این روش توسط دستگاه‌ها و تعیین توالی DNA در حجم انبوه فراهم کرد (شکل ۲- ج). در این روش در ابتدا از مواد رادیو اکتیو استفاده می‌شد و بعدها شرکت Pharmacia (سوئد) در دستگاه تعیین توالی نیمه اتوماتیک ALF از تک رنگ فلوئورسین (Fluorescein) 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 اکریل آمید انجام می‌شد. در سال‌های ابتدایی ۹۰ میلادی شرکت Applied Biosystems (آمریکا) دستگاهی را وارد بازار کرد که با استفاده از چهار رنگ فلورسنتی و دستگاه لیزر متفاوت با طول موج مختلف تعیین توالی می‌کرد. در این روش به جای 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 اکریل آمید وابسته بود.

این روش‌ها تا حد زیادی تعیین توالی DNA را ساده‌تر کرد. به عنوان مثال، در حال حاضر کیت‌هایی بر اساس ختم زنجیره به صورت تجاری در دسترس است که به صورت آماده دارای معرف‌های مورد نیاز برای تعیینِ توالی است؛ اگرچه در این روش محدودیت‌هایی مثل غیر اختصاصی بودن محل اتصال آغازگر به DNA یا ساختار دوم DNA می‌تواند میزان صحیح بودن نتایج به دست آمده از توالی DNA راتحت تأثیر قرار دهد.



شکل ۲ (الف) قسمتی از رادیوگرافی ژل قطعات تعیین توالی شده نشاندار (ب) آغازگرها با فلورسنت یا رادیو اکتیو نشانه‌گذاری می‌شوند و در نهایت قطعه DNA با dNTP یا ddNTP نشاندار می‌شود ج) نقاط اوج (Peaks) فلورسنس در مقایسه با باندهای رادیو اکتیو د) الکتروفورز مویینه‌ای

www.SID.ir

Archive of SID

ختم زنجیرسازی با استفاده از رنگ (Dye-termination)

در این روش از نشاندار کردن دی دزوکسی نوکلیوتید ختم کننده زنجیره که امکان تعیین توالی در یک واکنش واحد را می‌دهد - به جای چهار واکنش در روش آغازگر نشاندار- استفاده می‌شود. در این روش هر یک از چهار دی دزوکسی نوکلیوتید ختم کننده با یک رنگ فلورسنت نشاندار می‌شود که در طول موج‌های مختلف هر یک از آن‌ها، نور منتشر می‌کند. با توجه به سرعت بیشتر روش ختم زنجیرسازی رنگی، این روش در حال حاضر روش اصلی تعیین توالی خودکار است. در عین حال از جمله محدودیت‌های این روش می‌توان به اثر رنگ اشاره کرد که باعث تفاوت در اتصال ختم کننده نشاندار شده به قطعات مختلف DNA می‌شود که در نهایت سبب ارتفاع نابرابر و اشکال نابرابر در رنگ‌نگار (Chromatogram) حاصل از الکتروفورز مویین می‌شود (شکل ۲- د)؛ هرچند این مشکل با تغییر در غلظت آنزیم DNA پلیمراز و رنگ برطرف شده است. این کار موجب به حداقل رساندن تنوع در اتصال به زنجیره DNA و نیز روشی برای از بین بردن «حباب رنگ» است. روش تعیین توالی ختم زنجیرسازی، همراه با آنالیز توالی DNA به صورت خودکار و توان عملیاتی بالا در حال حاضر در اکثریت قریب به اتفاق پروژه‌های تعیین توالی استفاده می‌شود.

چالش‌ها

در تعیین توالی زنجیره DNA چالش‌هایی نیز وجود دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به کیفیت پایین داده‌های به‌دست آمده در ۱۵ تا ٤٠ باز ابتدای قطعه مورد نظر و همچنین پس از باز ۷۰۰ تا ۹۰۰ اشاره کرد. اگرچه نرم‌افزارهای شناسایی توالی به طور معمول در پیرایش نتایج این نواحی کمک می‌کند. در مواردی که قطعات DNA قبل از تعیین توالی کلون شود، توالی به‌دست آمده ممکن است شامل بخش‌هایی از ناقل (Vector) همسانه‌سازی نیز باشد که برای شناسایی شروع توالی قطعه مورد نظر استفاده می‌شود. یعنی بعد از خاتمه توالی مربوط به ناقل ژنی توالی ژن یا قطعه مورد توالی یابی قابل خواندن بود. امروزه از محصول مستقیم PCR برای تعیین توالی استفاده می‌شود و نیازی به کلون کردن قطعه مورد نظر نیست زیرا این کار خود به تنهایی زمان زیادی را طلب می‌کند. در این روش از تعیین توالی در هنگام سنتز استفاده می‌شود که در آن‌ها از همسانه‌سازی (Cloning) استفاده نمی‌شود. از سوی دیگر؛ اخیراً روش‌های تعیین توالی یک مرحله‌ای (ترکیب تکثیر و تعیین توالی) از قبیل Ampliseq و SeqSharp نیز معرفی شده‌است که تعیین توالی سریع ژن مورد نظر بدون نیاز به همسانه‌سازی یا تکثیر قبلی را فراهم می‌سازد [۹].

روش‌های کنونی می‌تواند به طور مستقیم فقط قطعات نسبتاً کوتاه DNA (۳۰۰ تا ۱۰۰۰ نوکلئوتید) را در یک واکنش، تعیین توالی نماید. مانع اصلی برای تعیین توالی قطعات بزرگ‌تر DNA توان ناکافی برای جداسازی قطعات بزرگ DNA در هنگام الکتروفورز است که لازم است به گونه‌ای از هم جدا شوند که تفکیک در حد یک نوکلئوتید میسر باشد. در تمام موارد استفاده از آغازگر با انتهای ´۳ آزاد ضروری است.

تجهیزات خودکار تعیین توالی DNA (DNA Sequencer) تا حدی پیشرفت کرده‌است که امروزه می‌توانند تا ۳۸٤ نمونه DNA در یک سری واکنش و تا ۲٤ سری واکنش در روز را، تعیین توالی نمایند. روش کار در این دستگاه‌ها به ترتیب عبارتست از الکتروفورز مویین برای جداسازی بر اساس طول قطعه، تشخیص و ثبت رنگ فلورسانس و در نهایت تولید داده. تکثیر قطعه مورد نظر، خالص‌سازی و تعلیق دوباره در محلول بافر قبل از ورود به دستگاه به صورت جداگانه صورت می‌پذیرد. تعدادی نرم‌افزار تجاری و غیر تجاری قادر به پیرایش توالی کم کیفیت DNA به طور خودکار است. این برنامه‌ها به کیفیت هر نگاره (Peak) نمره می‌دهد و نگاره‌های کم کیفیت (که به طور معمول در انتهاهای توالی قرار دارد) را حذف می‌کند. هر چند دقت الگوریتم کمتر از دقت یک مشاهده‌گر است، اما برای پردازش خودکار اطلاعات توالی‌های بزرگ کافی است.

برای تعیین توالی قطعات بسیار بزرگ DNA مانند تمام

www.SID.ir

Archive of SID

کروموزوم‌ها، روش‌های تعیین توالی در مقیاس بزرگ کمک کننده است. این روش‌ها برای تعیین توالی تعداد زیادی از قطعات کوچک DNA مانند Phage Display نیز کاربرد دارد. برای قطعات طولانی مانند کروموزوم‌ها، از روش‌هایی مانند برش با آنزیم‌های محدودگر یا نیروهای مکانیکی (Shearing) استفاده می‌شود و قطعات بزرگ DNA به تکه‌های کوتاه‌تر تبدیل می‌شود. DNA قطعه قطعه شده در یک حامل DNA کلون شده و در باکتری اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) تکثیر می‌شود. سپس قطعات کوتاه DNA از کلونی‌های باکتریایی تخلیص و به صورت جداگانه تعیین توالی می‌شود. توالی‌های به‌دست آمده به صورت الکترونیکی با استفاده از قسمت‌های هم‌پوشان به صورت یک قطعه طولانی و توالی پیوسته سرهم (Assemble) می‌شود.

این روش نیازی به هیچ‌گونه اطلاعات اولیه در مورد توالی DNA مورد نظر ندارد و به عنوان تعیین توالی de novo از آن نام برده می‌شود. هر گونه فاصله در توالی به‌دست آمده را می‌توان از طریق بررسی آغازگرهای متعدد و در کنار هم (Primer Walking) تکمیل کرد. راه‌کارهای مختلف، تفاوت‌هایی در سرعت و دقت دارد. روش Shotgun معمولاً برای تعیین توالی ژنوم‌های بزرگ استفاده می‌شود؛ اما سرهم کردن قطعات در آن به خصوص در مورد توالی‌های تکراری، پیچیده و مشکل است و اغلب باعث ایجاد فاصله‌هایی در ژنوم سرهم شده می‌شود.

اکثر روش‌های تعیین توالی به دلیل این که از حساسیت کافی برای تعیین توالی یک مولکول برخوردار نیستند، از همسانه‌سازی به روش در زیوه (In Vitro) در مرحله تکثیر مولکول DNA استفاده می‌کنند. در این موارد، واکنش PCR در محلول (Emulsion PCR) قادر به جداسازی یک مولکول DNA همراه با دانه‌های ریز پوشش داده شده با آغازگر (Primer-Coated Beads) در قطرات آبی در فاز روغن است. در مرحله بعد با انجام واکنش PCR روی هر دانهٔ ریز، نسخه‌های تکثیر یافته مولکول DNA ثابت شده، برای تعیین توالی استفاده می‌شود. این روش توسط مارگوئیلیس (Marguilis) و همکاران (تجاری شده توسط 454 Life Sciences، آمریکا)، شندور (Shendure) و پورکا (Porreca) و همکاران (شناخته شده به عنوان تعیین توالی Polony) و تعیین توالی SOLiD [ابداع شده توسط Agencourt (آمریکا)، و Applied Biosystems(فرانسه)] استفاده می‌شود [۱۰، ۱۱].

روش دیگری که برای تکثیر کلونال در شرایط درون شیشه‌ای استفاده می‌شود تشکیل پل (Bridge PCR) نام دارد. در این روش قطعات توسط آغازگرهای متصل به سطح جامد تکثیر می‌شود. داده‌های به‌دست آمده در این روش به کمک پردازشگر آنالیز ژنوم Illumina تجزیه و تحلیل می‌شود. روش‌های تک مولکولی مانند روش‌های ایجاد شده توسط آزمایشگاه Stephen Quake's [که بعداً توسط Helicos (آمریکا) تجاری شد] جزء موارد استثنایی در این زمینه است. در این روش از فلوئوروفورس (Fluorophores) روشن و تحریک با لیزر برای تشخیص توالی مولکول DNA که به سطح ثابت متصل شده، بدون نیاز به تکثیر مولکولی استفاده می‌شود [۱۲].

تعیین توالی با توان عملیاتی بالا

برای کاهش هزینه روش‌های تعیین توالی، روش‌های جدیدی ابداع شده‌اند که در زمان کوتاه طول بزرگی از نمونه‌ها را تعیین توالی می‌کنند. در مقایسه با روش ختم زنجیرسازی، هزینه انجام آزمون با این روش‌ها بسیار پایین‌تر است.

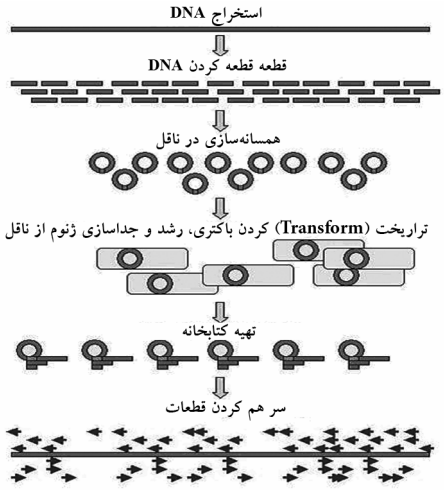
الف- تعیین توالی به روش ایلومینا

این روش تعیین توالی با استفاده از خاصیت رنگ‌های پایان دهنده ولی برگشت‌پذیر (Reversible Dye-Terminators) طراحی شده است. ابتدا قطعات شکسته شده مولکول DNA به آغازگرهای متصل به اسلاید وصل و سپس تکثیر می‌شود. در نهایت کلونی‌های متمرکز ایجاد شده و پل‌هایی (Bridge Amplification) تشکیل می‌دهد. سپس چهار نوع باز متصل

www.SID.ir

Archive of SID

به رنگ‌های پایان دهنده ولی برگشت‌پذیر (RT-bases) به واکنش افزوده می‌شود و هر باز در صورتی که 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 متوقف کننده رشد DNA از سر '3 توسط واکنش‌های شیمیایی جدا می‌شود و چرخه بعدی آغاز می‌شود [۱۳] (شکل ۳). این روش توسط شرکت Solexa (آمریکا) ابداع شد و با توجه به این که این شرکت هم اکنون بخشی از شرکت Illumina (آمریکا) است، به روش تعیین توالی ایلومینا [Illumina (Solexa) Sequencing] معروف شد.



شکل ۳ مرحله خوانش نمونه بعد از تکثیر و تشکیل پل در روش ایلومینا

ب- تعیین توالی به روش SOLiD

در این روش پیش از تعیین توالی، DNA توسط دانه‌های پوشیده از آغازگر در حباب‌های روغنی (Aqueous droplets within an oil phase) تکثیر می‌شود. این روش امولسیون PCR (Emulsion PCR) نامیده می‌شود. هر کدام از این حباب‌ها حاوی یک نسخه از مولکول‌های DNA مشابه است که بر سطح اسلاید شیشه‌ای قرار دارد.

الیگونوکلئوتیدهای دو رشته‌ای باز می‌شود و در صورتی که 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، قابل مقایسه با روش ایلومینا است.

ج- روش تعیین توالی حرارتی [Pyrosequensing (454)]

یکی از روش‌هایی است که به موازات روش تعیین توالی حرارتی (Pyrosequencing) 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 هر کدام از این قطرات آب یک الگوی DNA قرار دارد که به یک دانه حاوی آغازگر متصل می‌شود و در نهایت بر اثر تکثیر آن یک کلونی فشرده ایجاد می‌شود. دستگاه توالی‌خوان حاوی تعداد زیادی چاهک با حجم در حد پیکولیتر است که هر کدام از این چاهک‌ها حاوی یک دانه و آنزیم مخصوص تعیین توالی است. این سیستم از آنزیم لوسیفراز (Luciferase Enzyme) که تولید نور می‌کند برای تشخیص هر نوکلئوتید که به رشته DNA تازه تشکیل شده افزوده می‌شود استفاده می‌کند [۱۰]. این روش نسبت به روش تعیین توالی سانگر، دقت خوانش بیشتر و هزینه کمتری دارد؛ هر چند که روش‌های Solexa و SOLiD از این نظر دارای برتری هستند [۱۴].

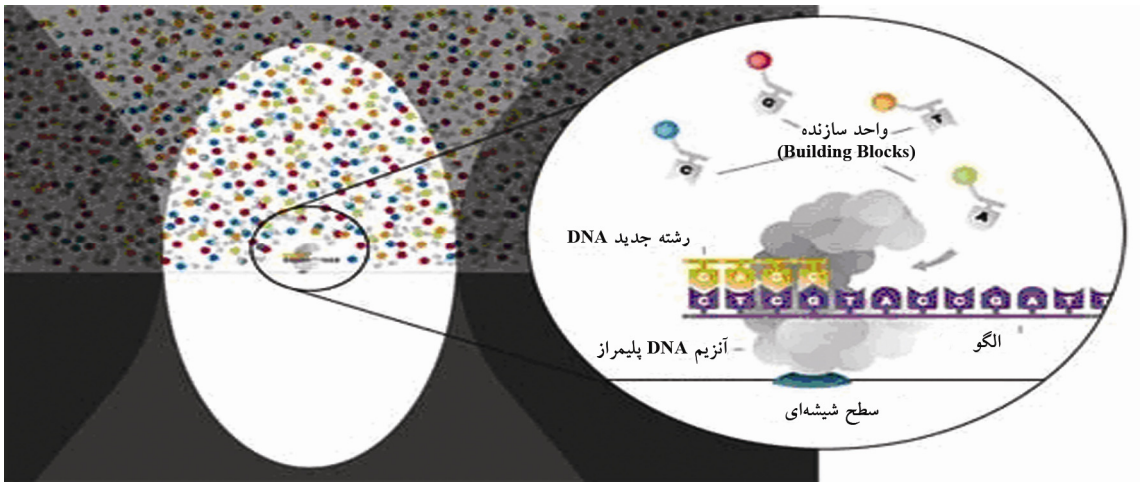
د- روش Ion Torrent

شرکت Ion Torrent (آمریکا) روش جدیدی بر مبنای همان روش شیمیایی استاندارد تعیین توالی ارایه داد که در این روش از یک سیستم شناسایی نیمه رسانا استفاده می‌شود. این روش تعیین توالی بر خلاف روش نوری که در سایر سیستم‌ها استفاده می‌شود، از شناسایی یون‌های هیدروژن که در هنگام پلیمریزه شدن DNA آزاد می‌شود، استفاده می‌کند. چاهک‌های

www.SID.ir

Archive of SID

کوچک شامل الگوی DNA هدف است که یک نوع از نوکلئوتیدهای آن آب‌گیری شده است. در شرایطی که نوکلئوتید معرفی شده به محیط، مکمل نوکلئوتیدهای DNA هدف باشد، به رشته در حال رشد می‌پیوندد. این عمل باعث آزاد شدن یون‌های هیدروژن می‌شود که نتیجه آن بروز یک واکنش در حسگر فوق حساس یونی می‌شود [۱۵]. بسته به تعداد نوکلئوتیدهای حاضر در الگو شدت پیام ارسالی بیشتر می‌شود [۱۶].



شکل ٤ روش تعیین توالی SMRT؛ آنزیم DNA پلیمراز در ته چاهک ثابت می‌شود و بر اساس رشته الگو از میان انبوهی از نوکلئوتیدهای نشاندار شده با فلورسنت، نوکلئوتید مناسب را انتخاب کرده و سنتز انجام می‌شود و بر اساس فلورسنتِ آزاد شده توالی خوانده می‌شود.

هـ- روش SMRT

شرکت PacBio (کانادا) ابداع کننده روش تعیینِ توالی SMRT (Single Molecular Real Time) است. این روش بر اساسِ فرآیند طبیعی همانندسازی DNA طراحی شده که از کارآیی و درستی بالایی برخوردار است (شکل ٤). فنآوری SMRT مشاهده سنتز (ساخت) DNA را در همان زمان وقوع امکان‌پذیر می‌سازد. در این روش آنزیم DNA پلیمراز در ته چاهک که ZMW (Zero-Mode Waveguide) نامیده می‌شود ثابت می‌شود. 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 آزاد شده توالی خوانده می‌شود [۱۷]. تعیین توالی بر اساس این روش دارای مزایای زیر است:

۱) امکان تجزیه و تحلیل منحصر به فرد تک مولکول DNA و تشخیص تنوع توالی خاص از یک سلول به سلول دیگر

۲) امکان خوانش توالی‌های طولانی بیشتر از ۱۰۰۰ جفت باز که امکانِ تعیین نقش ژنی و جمع کردن کلیه اطلاعات توالی مورد نظر را تسهیل می‌کند.

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

و- روش Polony

یکی دیگر از اولین روش‌های پیشنهادی برای نسل جدید تعیین توالی‌ها، تعیین توالی به روش Polony بود که در دانشگاه هاروارد در سال ۲۰۰۵ برای تعیین توالی کامل ژنوم ابداع شد. این یک روش ترکیبی از تشکیل کتابخانه‌های Paired-tag، امولسیون PCR و میکروسکوپ خودکار است. با این روش می‌توان ژنوم اشریشیا کلی را با درستی بیش از ۹۹/۹۹۹۹ درصد و با یک دهم هزینه روش سانگر تعیین توالی نمود. در نهایت این فنآوری توسط شرکت ABI (آمریکا) خریداری شد.

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌های کم کاربرد ولی مطرح

MPSS

یکی از اولین فنآوری‌های پیشنهاد شده برای نسل جدید تعیین توالی‌ها روش MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing) بود. این روش برای اولین بار در سال ۱۹۹۲ پیشنهاد شد. اساس این روش بر مبنای اتصال و انفصال پذیرشگرها همزمان با افزایش چهار نوکلئوتید است. این روش برای شناسایی حذف توالی در مکان‌های خاص مناسب است. به خاطر پیچیدگی مکانیسم، این روش به بازار ارایه نشد و تنها در همان آزمایشگاه پیشنهاد کننده این روش به سرویس‌دهی پرداخت. این روش مبنایی شد که بعدها شرکت Selectra پس از بهینه کردن، آن را به صورت یک روش کاربردی مناسب برای تعیین توالی همزمان با سنتز ارایه داد. یکی از جذابیت های مهم این روش، توانایی تولید صدها هزار توالی‌های کوتاه DNA بود. با وجود این، روش یاد شده تنها برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن به وسیله تعیین توالی cDNA به‌کار گرفته شد و در نهایت در سال ۲۰۰٤ این شرکت توسط Selectra خریده شد.

نانو توپ (Nanoball)

تعیین توالی DNA با روش نانوتوپ یکی از انواع روش‌های مورد استفاده در تعیین توالی با توان عملیاتی بالا برای تعیین توالی کامل ژنوم یک جاندار است. در این روش از تکثیر Rolling circle، برای ازدیاد قطعات DNA و تشکیل نانوتوپ‌های DNA استفاده می‌کند. سپس با استفاده از روش تعیین توالی غیر زنجیره‌ای، توالی نوکئوتیدها مشخص می‌شود. در این روش در مقایسه با دیگر روش‌ها، با مصرف مقدار کمتری مواد، تعداد زیادی از نانوتوپ‌های DNA تعیین توالی می‌شود. اما با این وجود تولید قطعات کوتاه از کارآیی این روش کم می‌کند زیرا نقشه‌برداری ژنی با قطعات کوتاه مشکل است.

Helioscope

روش تعیین توالی Helioscope بر اساس فنآوری «توالی درست مولکولی» (True Single Molecule Sequencing) از قطعات DNA متصل به آداپتورهایی با دنباله پلی A برای اتصال به سطح فلوسل (Flow Cell) استفاده می‌نماید. مرحله بعد شامل تعیین توالی مبتنی بر طویل‌سازی، با شستشوی دوره‌ای سلول‌های در جریان، با افزودن نوکلیوتیدهای نشاندار است (مشابه روش سانگر- یک نوع نوکلیوتید در هر مقطع زمانی). دستگاه Helioscope می‌تواند در هر خوانش ۵۵ باز را بخواند، اما با پیشرفت‌های جدید این فنآوری درستی خوانش هوموپلیمرها (Homopolymer) و تعیین توالی RNA افزایش یافته است.

RNAP (RNA Polymerase)

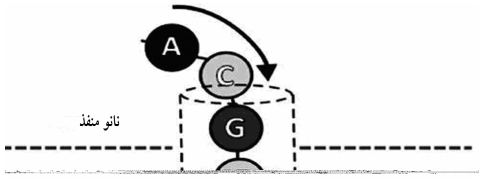
در این روش RNA پلیمراز و الگوی DNA به دو دانه پلی استیرنی جداگانه متصل هستند که هر دو این دانه‌ها در مجاورت حسگر قرار دارد. حرکت RNA پلیمراز در طول عمل ترجمه دانه‌ها را نزدیک‌تر می‌کند و این تغییرات ثبت می‌شود. در این روش ثبت توالی‌ها مشابه روش سانگر است.

نانو منفذ (Nanopore)

این روش بر اساس بازخوانی پیام‌های الکتریکی ناشی از عبور نوکلئوتیدها از منافذ آلفا همولزین (Alpha Hemolysin) پوشیده از سیکلو دکسترین (Cyclodextrin) 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 ۵). این روش از آن‌جا که نیاز به نوکلئوتید تغییر شکل یافته ندارد، قابلیت توسعه را دارد ولی هنوز قدرت تشخیص در حد یک نوکلئوتید را ندارد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵ روش تعیین توالی DNA نانومنفذ؛ بازخوانی پیام‌های الکتریکی ناشی از عبور نوکلئوتیدها از منافذ آلفا همولزین پوشیده از سیکلو دکسترین

VisiGen

زیست فنآوری VisiGen برای تعیین توالی از یک DNA پلیمراز مهندسی شده مخصوص استفاده می‌کند. این پلیمراز مانند یک حسگر عمل می‌نماید. بدین مفهوم که در مرکز فعال خود با یک رنگ فلورسنت ترکیب شده است که به عنوان دهنده عمل می‌کند. این دهنده به وسیله تشدید انرژی انتقالی فلورسنت (Fluorescent Resonant Energy Transfer: FRET) عمل می‌نماید که شامل فلورسنت حاصل از نوکلئوتیدهایی است که به طور مجزا نشاندار شده‌است. این رویکرد سرعت خوانش را در حد چند صدم ثانیه بالا می‌برد زیرا در همان زمان که پلیمراز به نوکئوتید متصل می‌شود خوانش انجام می‌شود و نوکلئوتیدهای فلوروکرومی آزاد می‌شود. این روش توانایی خوانشی به طول ۱۰۰۰ نوکلئوتید را دارد که البته به بررسی و تأیید بیشتری نیاز دارد.

گامی به سوی آینده

امروزه رقابت سنگینی بین شرکت‌های سرویس دهنده تعیین توالی وجود دارد. دانشمندان در صددند که روش‌های جدیدی برای کاهش هزینه و زمان در کنار افزایش دقت ارایه دهند. به عنوان مثال تعیین توالی توسط روش دورگه‌سازی (Hybridization) یک روش غیر آنزیمی است که در آن از ریز آرایه DNA استفاده می‌شود. الگوی DNA مورد نظر برای تعیین توالی با فلورسنت نشانه‌گذاری می‌شود و بر بستری حاوی توالی‌های مشخص دورگه می‌شود. پیام‌های ارسالی قوی ناشی از دورگه شدن و ایجاد لکه بر سطح آرایه نشانگر وجود آن توالی‌ها در قطعه مورد نظر است. طیف سنجی حجمی (Mass Spectrometry) می‌تواند برای بررسی تفاوت توده قطعات DNA تولید شده در واکنش‌های زنجیره‌ای استفاده شود.

در ایران نیز محققان زیادی از روش‌های تعیین ژنوتیپ استفاده می‌کنند و در مواردی برای کاهش زمان و هزینه ناچار به اشتراک گذاشتن کار با شرکت‌ها و دانشگاه‌های پیشرفته هستند [۱۸-۲۱]. روش‌های تعیین توالی DNA امروزه در حال پیشرفت است. این روش‌ها تلاش می‌کند تا با نشاندار کردن DNA پلیمراز، عمل خوانش توالی هنگام عبور از حفره‌های ریز انجام گیرد و با روش‌های میکروسکوپی (مانند AFM یا Transmission Electron Microscopy) یا نشاندار کردن نوکلئوتید با اجزای سنگین‌تر مانند هالوژن‌ها، شرایط را طوری فراهم نماید که بتوان جایگاه نوکلئوتیدها را در قطعاتی به بزرگی بیش از ۵۰۰۰ نوکلئوتید با چشم مشاهده و ثبت نمود [۲۲]. هدف نسل سوم فنآوری، حذف مصرف مواد اضافی و افزایش کارآیی عملکردی آنزیم DNA پلیمراز با هدف افزایش توان عملیاتی و کاهش هزینه و زمان است [۲۳].

در روش سانگر میکروفلوییدی، کلیه مراحل تکثیر و جداسازی DNA تنها روی یک سطح شیشه‌ای با طول ۱۰ سانتی‌متر انجام می‌گیرد که این میزان معرف‌های مصرفی و هزینه را کاهش می‌دهد. علاوه بر این دانشمندان نشان داده‌اند که با استفاده از ریز تراشه می‌توانند توان عملیاتی روش تعیین توالی معمولی را بالا ببرند؛ هم اکنون پژوهش‌ها در این زمینه ادامه دارد.

منابع

[1] Olsvik O, Wahlberg J, Petterson B, Uhlén M, Popovic T, Wachsmuth IK, Fields PI. Use of

www.SID.ir

Archive of SID

automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in Vibrio cholerae O1 strains. J Clin Microbiol 1993; 31(1): 22-5.

[2] Fiers W, Contreras R, Duerinck F, Haegeman G, Iserentant D, Merregaert J, Min Jou W, Molemans F, Raeymaekers A, Van den Berghe A, Volckaert G, Ysebaert M. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. Nature 1976; 260(5551): 500-7.

[3] Min Jou W, Haegeman G, Ysebaert M, Fiers W. Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. Nature 1972; 237(5350): 82-8.

[4] Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A. Generations of sequencing technologies. Genomics 2009; 93(2): 105-11.

[5] Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1977; 74(2): 560-4.

[6] Gilbert W, Maxam A. The nucleotide sequence of the lac operator. Proc Natl Acad Sci U S A 1973; 70(12): 3581-4.

[7] Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Biol 1975; 94(3): 441-8.

[8] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1977; 74(12): 5463-7.

[9] Murphy KM, Berg KD, Eshleman JR. Sequencing of genomic DNA by combined amplification and cycle sequencing reaction. Clin Chem 2005; 51(1): 35-9.

[10] Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Goodwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer MLI, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors. Nature 2005; 437(7057): 376-80.

[11] Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, Wang MD, Zhang K, Mitra RD, Church GM. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. Science 2005; 309(5741): 1728-32.

[12] Braslavsky I, Hebert B, Kartalov E, Quake SR. Sequence information can be obtained from single DNA molecules. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100(7): 3960-4.

[13] Church GM. Genomes for all. Sci Am 2006; 294(1): 46-54.

[14] Hall N. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. J Exp Biol 2007; 210(Pt 9): 1518-25.

[15] Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. Nat Methods 2008; 5(1): 16-8.

[16] Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. Annu Rev Genomics Hum Genet

www.SID.ir

Archive of SID

2008; 9: 387-402.

[17] Blow N. Metagenomics: exploring unseen communities. Nature 2008; 453(7195): 687-90.

[18] Daneshpour MS, Faam B, Mansournia MA, Hedayati M, Halalkhor S, Mesbah-Namin SA, Shojaei S, Zarkesh M, Azizi F. Haplotype analysis of Apo AI-CIII-AIV gene cluster and lipids level: Tehran Lipid and Glucose Study. Endocrine 2012; 41(1): 103-10.

[19] Daneshpour MS, Alfadhli S, Houshmand M, Zeinali S, Hedayati M, Zarkesh M, Momenan AA, Azizi F. Allele frequency distribution data for D8S1132, D8S1779, D8S514, and D8S1743 in four ethnic groups in relation to metabolic syndrome: Tehran Lipid and Glucose Study. Biochem Genet 2009; 47(9-10): 680-7.

[20] Daneshpour MS, Hosseinzadeh N, Zarkesh M, Azizi F. Haplotype frequency distribution for 7 microsatellites in chromosome 8 and 11 in relation to the metabolic syndrome in four ethnic groups: Tehran Lipid and Glucose Study. Gene 2012; 495(1): 62-4.

[21] Daneshpour MS, Rebai A, Houshmand M, Alfadhli S, Zeinali S, Hedayati M, Zarkesh M, Azizi F. 8q24.3 and 11q25 chromosomal loci association with low HDL-C in metabolic syndrome. Eur J Clin Invest 2011; 41(10): 1105-12.

[22] Valouev A, Ichikawa J, Tonthat T, Stuart J, Ranade S, Peckham H, Zeng K, Malek JA, Costa G, McKernan K, Sidow A, Fire A, Johnson SM. A high-resolution, nucleosome position map of C. elegans reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. Genome Res 2008; 18(7): 1051-63.

[23] Hanna GJ, Johnson VA, Kuritzkes DR, Richman DD, Martinez-Picado J, Sutton L, Hazelwood JD, D'Aquila RT. Comparison of sequencing by hybridization and cycle sequencing for genotyping of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. J Clin Microbiol 2000; 38(7): 2715-21.

www.SID.ir