



## Performance of Illumina Next Generation Sequencing

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Analytical Review

#### Authors

Daneshpour M.S.\* *PhD*,  
Masjoodi S.<sup>1</sup> *MSc*,  
Ghafari N.<sup>1</sup> *MSc*,  
Raesi M.<sup>1</sup> *MSc*,  
Fallah M.S.<sup>2</sup> *PhD*

#### How to cite this article

Daneshpour M S, Masjoodi S, Ghafari N, Raesi M, Fallah M S. Performance of Illumina Next Generation Sequencing. Pathobiology Research. 2018;21(3):153-161.

\*"Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences" and "Celluar & Molecular Department, Research for Endocrine Sciences Faculty" Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>1</sup>"Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences" and "Celluar & Molecular Department, Research for Endocrine Sciences Faculty" Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Kawsar Human Genetics Research Center, Tehran, Iran

#### Correspondence

Address: Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, NO. 24, Parvaneh Street, Yaman Street, Velenjak, Shahid Chamran Highway, Tehran, Iran.  
Postal Code: 1985717413  
Phone: +98 (21) 22432569  
Fax: +98 (21) 22416264  
daneshpour@sbmu.ac.ir

#### Article History

Received: June 26, 2017

Accepted: February 14, 2018

ePublished: September 03, 2018

### ABSTRACT

**Introduction** Nowadays, new methods have been developed to reduce the cost of disease-related laboratory methods and to achieve the shortest response time, which in a short time, determine a large portion of the genome. These methods are known as the next generation sequencing techniques. One of the most common application of such as these methods is diagnosis of disease. The aim of this study was to investigate the performance of Illumina next generation sequencing.

**Conclusion** With the advanced technology of sequencing the whole genome, determining the structural changes of the genes, comprehensive studies of the number of genes, the identification of polymorphism, spot mutations and small mutations, the study of the expression of genes, and other applications are possible. In this method, first, the whole genome is broken into double strand DNA fragments; then, the bumps of fragmentation are converted to the smooth end, and adapters are connected to both ends of the components, and the sample pieces of the gene are connected to the flow cell with the help of hybridization by the same adapters. In the next step, centralized colonies of fragments (clusters) are formed through amplification of samples, using the bridge method, which subsequently, could be read. In a chemical reaction, the growth inhibitors will be taken by the end of 3' and a new cycle begins. The mentioned step is continued until the sequence of whole cycle of the fragment is detected. The sequences of the whole genome are, then, determined with reference sequences, and ultimately the results are compared with the panel of genes associated with the disease and the changes are determined. Different methods can identify changes in the gene area and, in some cases, with investigating the rare changes, the relationship between these changes and the diagnosis of certain diseases can be known.

**Keywords** Next Generation Sequencing; Genome; Mutation; Polymorphism

### CITATION LINKS

[1] The genetic basis of common diseases [2] Haplotype analysis of Apo AI-CIII-AIV gene cluster and lipids level: Tehran Lipid and Glucose Study [3] 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 [4] Allele frequency distribution data for D8S1132, D8S1779, D8S514, and D8S1743 in four ethnic groups in relation to metabolic syndrome: Tehran Lipid and Glucose Study [5] Revolution of DNA sequencing method from the past until today [6] 8q24.3 and 11q25 chromosomal loci association with low HDL-C in metabolic syndrome [7] Next-generation DNA sequencing [8] Human genome project [9] Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome [10] Next-generation DNA sequencing methods [11] NEXTflex™ Bisulfite-Seq Kit - for illumina sequencing [12] Next generation sequencing for clinical diagnostics-principles and application to targeted resequencing for hypertrophic cardiomyopathy: A paper from the 2009 william beaumont hospital symposium on molecular pathology [13] Improved protocols for the illumina genome analyzer sequencing system [14] Improved protocols for illumina sequencing [15] A tale of three next generation sequencing platforms: Comparison of ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers [16] Native chromatin preparation and Illumina/Solexa library construction [17] Comparison of the illumina genome analyzer and roche 454 GS FLX for resequencing of hypertrophic cardiomyopathy-associated genes [18] Rapid whole-genome mutational profiling using next-generation sequencing technologies [19] The impact of next-generation sequencing technology on genetics [20] TruSeq™ DNA PCR-Free

## اساس عملکرد نسل جدید تعیین توالی با روش ایلومینا

مریم‌السادات دانشپور \* PhD

"مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم" و "گروه ژنتیک سلولی و مولکولی، دانشکده تحقیقاتی غدد درون‌ریز و متابولیسم"، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

ساجده مسجودی MSC

"مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم" و "گروه ژنتیک سلولی و مولکولی، دانشکده تحقیقاتی غدد درون‌ریز و متابولیسم"، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

نسیم غفاری MSc

"مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم" و "گروه ژنتیک سلولی و مولکولی، دانشکده تحقیقاتی غدد درون‌ریز و متابولیسم"، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

مرضیه رئیسی MSC

"مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم" و "گروه ژنتیک سلولی و مولکولی، دانشکده تحقیقاتی غدد درون‌ریز و متابولیسم"، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

محمدصادق فلاح PhD

مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران

### چکیده

**مقدمه:** امروزه برای کاهش هزینه در روش‌های آزمایشگاهی مرتبط با بیماری‌ها و رسیدن به کوتاه‌ترین زمان پاسخ‌دهی، روش‌های جدیدی ابداع شده‌اند که در زمانی کوتاه، قسمت بزرگی از ژنوم را تعیین توالی می‌کنند. این روش‌ها به نسل جدید تعیین توالی معروف شده‌اند. از این روش می‌توان در تشخیص بیماری‌ها استفاده کرد. هدف مطالعه حاضر بررسی عملکرد نسل جدید تعیین توالی با روش ایلومینا بود.

**نتیجه‌گیری:** با تکنولوژی پیشرفته توالی‌یابی کل ژنوم، تعیین تغییرات ساختاری ژن‌ها، بررسی‌های جامع تعداد نسخه ژن‌ها، شناسایی پلی‌مورفیسم، جهش‌های نقطه‌ای و جهش‌های کوچک، بررسی بیان ژن‌ها و کاربردهای مختلف دیگر ممکن شده است. در روش تعیین توالی ایلومینا ابتدا کل ژنوم به قطعات ژنی دورشته‌ای شکسته شده، پس از آن برآمدگی‌های ناشی از قطعه‌قطعه شدن به انتهای صاف تبدیل می‌شوند و اتصال آداپتورها به هر دو انتهای قطعات صورت می‌گیرد و قطعات نمونه ژنی به وسیله همین آداپتورها به سطح فلوسل با کمک دورگه‌سازی متصل می‌شوند، سپس با تکثیر نمونه به روش تشکیل پل، مجموعه‌ای از کلونی‌های حاصل از قطعات (خوشه) ایجاد می‌شوند و سپس در یک واکنش شیمیایی، متوقف‌کننده‌های رشد از انتهای ۳ برداشته و چرخه جدید آغاز می‌شود. این مرحله تا تعیین توالی کل قطعه ادامه می‌یابد، سپس با کمک توالی مرجع، توالی کل ژنوم تعیین و در نهایت نتایج با پنل ژن‌های مرتبط با بیماری مقایسه و تغییرات مشخص می‌شوند. با روش‌های متفاوتی می‌توان تغییرات مورد نظر در ناحیه ژنی را شناسایی و در مواردی با بررسی تغییرات نادر به ارتباط این تغییرات و تشخیص برخی بیماری‌ها پی‌برد.

**کلیدواژه‌ها:** نسل جدید تعیین توالی، ژنوم، جهش، پلی‌مورفیسم

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۵

\* نویسنده مسئول: daneshpour@sbmu.ac.ir

### مقدمه

در جوامع امروزی علی‌رغم پیشرفت‌های حاصل در علوم مختلف خصوصاً در حوزه بهداشت و درمان، ابتلا به بسیاری از بیماری‌ها همچنان شایع و درمان آنها مستلزم صرف هزینه‌های گزاف است. بسیاری از این بیماری‌ها منشأ ژنتیکی داشته و با الگوی توارثی خود در افراد خانواده یا در نسل‌های مختلف انتقال می‌یابند [1]. تشخیص و درمان بیشتر این بیماری‌ها مستلزم تحمیل هزینه‌های مالی و بار اضافی بر جامعه است. از این رو همواره سعی بر این بوده توسط ابداع روش‌های آزمایشگاهی، عوامل ژنی نظیر جهش‌ها

که باعث ایجاد بیماری می‌شوند، شناسایی و به پیشگیری و درمان بیماری کمک نمایند.

تعیین توالی ژنتیکی از اوایل دهه ۱۹۷۰ همواره مورد توجه دانشمندان و محققان علوم زیستی، زیست‌شناسی مولکولی، ژنتیک پزشکی، جانوری و گیاهی بوده و روش‌های متنوعی برای این منظور ابداع و اختراع شده است. روش‌های ابتدایی بسیار وقت‌گیر و پرهزینه بوده و تنها می‌توانست یک قطعه از ژن مورد نظر را در یک آزمایش مورد بررسی قرار دهد.

در دو دهه اخیر روش‌های تعیین توالی سرعت بیشتری گرفت [2-4]. برای اولین بار در سال ۲۰۰۲ با استفاده از روش تعیین توالی در قالب پروژه‌ای توسط محققان و دانشمندان کشورهای آمریکا، انگلیس و ژاپن با صرف هزینه ۸ میلیارد دلار، کل اطلاعات ژنتیکی ۲ نفر تعیین توالی و تحلیل شد.

تکمیل پروژه ژنوم انسان در سال ۲۰۰۳، زمینه‌ساز پیشرفت‌های قابل توجه در تکنولوژی‌های تعیین ژنوم بوده است. نسل جدید تعیین توالی ژنوم توسط تکنیک‌های توالی‌یابی جدیدی که در مجموع توالی‌یابی نسل جدید نامیده می‌شوند، این امکان را فراهم می‌کند که کل ژنوم انسان با هزینه کمتر و طی چند روز توالی‌یابی شود [5, 6]. تکنولوژی‌های نوین تعیین توالی تحول شگرفی را در پیش‌بینی، تشخیص بیماری‌ها و حتی ارابه دستورالعمل‌های درمانی ایجاد کرده است که این قابلیت مرهون امکان بررسی گسترده و همزمان ژن‌های متعدد است.

شناخت اساس و کاربردهای وسیع، همچنین مزیت روش‌های جدید تعیین توالی، در تحلیل ژنوم به‌منظور تعیین تغییرات ژنتیکی ایجادکننده بیماری، ما را بر آن داشت تا در مقاله پیش‌رو به بررسی جزئیات روش ایلومینا (Illumina) و اساس آن بپردازیم. این روش توسط شرکت آمریکایی Solexa که هم اکنون بخشی از شرکت ایلومیناست، ابداع شده است. این روش به نام تعیین توالی Solexa نیز شناخته شده است [7].

تعیین توالی ژنوم مرجع انسان در پروژه ژنوم [8] حاصل سال‌ها تلاش گروه زیادی از دانشمندان در سراسر دنیا و صرف میلیون‌ها دلار هزینه بود. پس از پایان پروژه ژنوم، تجربیات زیادی حاصل شد و از این رو تغییرات زیادی در روش کار به وجود آمد و تعیین توالی از روش‌های مبتنی بر استفاده از کلون‌های کروموزومی مصنوعی با کتریابی (BAC clone) به سمت تعیین توالی کل ژنوم پیش رفت. تا مدتی بعد از پروژه ژنوم، روش‌های نوین نیز مبتنی بر تعیین توالی به‌وسیله الکتروفورز مویرگی بود. اما اکنون روش‌های موسوم به روش‌های نوین تعیین توالی به‌سرعت در حال تجاری شدن هستند و در موارد تعیین توالی کل ژنوم یا قسمت بزرگی از آن استفاده می‌شوند. این روش‌ها رویکرد جدیدی همراه با هزینه و زمان کمتر در رسیدن به نتیجه نهایی را ممکن ساخته‌اند [7].

چندین روش عمده در تعیین توالی انبوه مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش‌ها شامل SMRT، Ion Torrent، تعیین توالی حرارتی (Pyrosequencing 454)، تعیین توالی به روش ایلومینا، تعیین توالی به روش SOLiD، تعیین توالی DNA با نانو منفذ و روش ختم زنجیرسازی است. در این مقاله به توضیح اصول عمومی در روش تعیین توالی به روش ایلومینا خواهیم پرداخت [9]. در سال ۲۰۰۵ سیستم تحلیل‌گر ایلومینا معرفی و ارابه شد و ۲ سال بعد توسط شرکتی با همین نام افتتاح و راه‌اندازی شد. در آن زمان سالانه تنها ۱/۳ ژنوم انسانی را می‌توانستند تعیین توالی نمایند. حدود ۱۰ سال بعد، با سیستم‌های تعیین توالی ایلومینا HiSeq X

نمونه ژنومی و اتصال ۳ یا ۵ آداپتور آماده می‌شود. به همین ترتیب واکنش افزودن نشانه شامل ترکیبی از واکنش‌های اتصالی و تقسیمی است. این مراحل کارایی فرآیند آماده‌سازی آرشیو را به‌طور چشمگیری افزایش می‌دهد. به‌طور کلی مراحل که برای تهیه کتابخانه ژنی ضروری است را می‌توان در ۴ مرحله اصلی مد نظر گرفت: الف) قطعه‌قطعه کردن DNA یا cDNA ب) تعمیر برآمدگی‌های انتهایی و افزودن نوکلئوتید آدنین به انتهای زنجیره ج) اتصال آداپتورها د) انتخاب ژنوم‌های لیگاند شده. روش ایلومینا برای پیشبرد این فرآیندها، میکروفلوئید (microfluidic) دیجیتالی را به‌منظور افزایش دقت با سهولت استفاده از آن به روش خود ترکیب کرده تا به سیستم آماده‌سازی NeoPrep™ (که یک آرشیو کامل و خودکار است) دست یابد. خودکاربودن آماده‌سازی این آرشیوها شانس خطا را کاهش داده، بازدهی را افزایش و زمان مورد نیاز برای دستیابی به این فرآیند را کاهش می‌دهد.

### الف) قطعه‌قطعه کردن ژنوم

در روش ایلومینا ابتدا کل اسیدنوکلئیک به قطعات کوچک‌تر تقسیم می‌شود. این عمل باعث ایجاد قطعات دورشته‌ای با برآمدگی‌های ۳ یا ۵ می‌شود (شکل‌های ۱ و ۲) [11]. لازم به ذکر است که نمونه ژنی ورودی به این مرحله می‌تواند علاوه بر نمونه ژنومی، شامل اولیگونوکلئوتید تکثیرشده یا PCR یا اسیدنوکلئیک ساخته شده از روی رونوشت (cDNA) باشد. برای برش‌دادن اسیدنوکلئیک ورودی و داشتن نمونه قطعه‌قطعه شده می‌توان از ۳ روش مه‌پاشی، فراصوت و هضم آنزیمی استفاده کرد. در این مرحله هدف تولید تصادفی قطعاتی است که دارای روی هم‌افتادگی‌هایی با هم هستند. بسته به خطمشی و سازوکار پیش رو، قطعات مورد نظر در محدوده اندازه ۱۵۰ تا ۶۰۰ جفت‌باز قرار می‌گیرند. در روش قطعه‌قطعه کردن مه‌پاشی از جریان هوای فشرده استفاده می‌شود که از میان محلول آبی اسیدنوکلئیک به‌مدت چند دقیقه عبور داده می‌شود. از معایب این روش این است که امکان از دست‌دادن حجم نمونه و پتانسیل ایجاد آلودگی در نمونه وجود دارد. علاوه بر این گستردگی توزیع در اندازه قطعات تولیدی در این روش، زمانی که قطعاتی با اندازه کوچک‌تر و خاص مورد نیاز است سودمند نیست. دستگاه‌هایی که براساس روش فراصوت برای قطعه‌قطعه کردن در لوله‌های دربسته به کار می‌روند، در محدوده قیمتی ۱۰ تا ۱۵ هزار دلار در دسترس است و از بین آنها کواریس هنوز بهترین ابزار ساخته شده برای قطعه‌قطعه کردن است که در آزمایش‌ها استفاده می‌شود. این ابزار از انتقال امواج صوتی به لوله‌های دربسته حاوی محلول آبی اسیدنوکلئیک استفاده می‌کند که در نتیجه انتقال امواج صوتی، حباب‌های هوایی در اندازه میکرو ایجاد می‌شوند که ایجاد و تخریب این حباب‌ها باعث برش فیزیکی اسیدنوکلئوتید می‌شود. کواریس توانایی تولید قطعاتی با اندازه قابل تنظیم را دارد که این عملکرد کاملاً قابل تکرار است [12]. در این وسیله نمونه ژنی دورشته‌ای در معرض امواج اکوستیک قرار گرفته و قطعه‌قطعه می‌شود. در روش قطعه‌قطعه کردن با امواج اکوستیک نیازی به دانستن توالی نمونه ژنی نیست و جایگاه خاصی برای برش نیاز ندارد و به همین علت برای ایجاد کتابخانه‌های نمونه ژنی مناسب است. وقتی نمونه ژنی تحت شرایط کنترل شده و مشخص در معرض امواج اکوستیک قرار می‌گیرد، می‌توان اندازه قطعات ایجاد شده در انتها را به‌دقت انتخاب نمود و زمانی که شرایط دوباره

Ten، این تعداد به ۱۸ هزار ژنوم انسانی در سال افزایش یافت. نسل جدید تعیین توالی ژنتیکی، روش نوین تعیین توالی نوکلئوتیدی است که با دقت و سرعت بالا صدها میلیون قطعه نوکلئوتیدی (DNA or cDNA) را به‌صورت همزمان تعیین توالی نموده و انبوهی از توالی ژنوم مورد نظر را تولید می‌نماید. پس از بررسی اطلاعات به‌دست‌آمده و مطابقت این اطلاعات با ژنوم مرجع تمامی نواقص اعم از جهش‌های بیماری‌زا یا پلی‌مورفیسم‌های غیربیماری‌زا، جابه‌جایی‌ها، حذف و اضافه قطعات نوکلئوتیدی یا تغییرات تعداد نسخه‌های ژنی را با وضوح بسیار بالا تشخیص می‌دهد. برخلاف روش‌های تعیین توالی نسل گذشته که توالی تنها یک ژن یا قطعه نوکلئوتیدی را مشخص می‌کند، توالی یابی نسل جدید (NGS) تمام ژنوم یا قطعات وسیع و گسترده را به‌صورت همزمان و با سرعت و دقت فوق‌العاده تعیین توالی می‌نماید. تکنولوژی NGS در حال تبدیل شدن به یک ابزار رایج و پرکاربرد در حوزه تحقیقات زیست‌شناسی و پزشکی است. قدرت وضوح و تشخیص بالای NGS، ما را قادر به اکتشافاتی می‌کند که با تکنولوژی‌های قبلی قابل انجام نبود.

روش ایلومینا براساس این که برای تعیین توالی قطعات از چه دستگاه تعیین توالی استفاده شود، به ۴ گروه تحت عنوان‌های GA، HiSeq 2000، HiScan SQ، و GAllx تقسیم‌بندی می‌شود. جدیدترین روش در این میان HiSeq 2000 است. روش کار در تمامی این روش‌ها بسیار نزدیک به هم است و تنها در هزینه‌ها، مدت زمان رسیدن به نتیجه و برخی نکات تکنیکی دیگر متفاوت است. بسته به نوع هدفی که از تعیین توالی انتظار می‌رود و همچنین امکاناتی که در اختیار است می‌توان از هر کدام از این روش‌ها استفاده نمود.

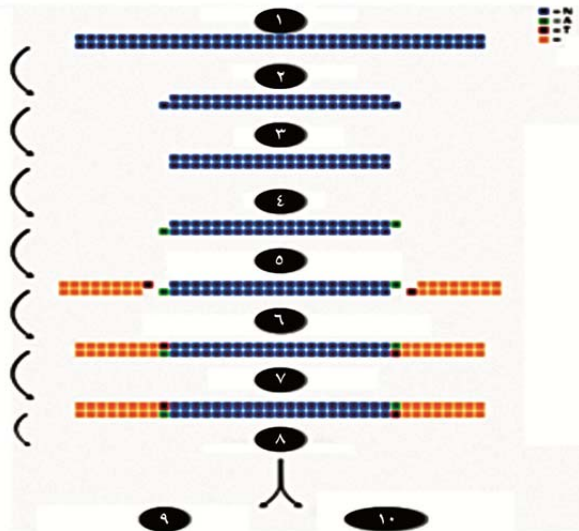
در تمامی این روش‌ها ۴ مرحله اصلی آماده‌سازی کتابخانه ژنی، ایجاد خوشه ژنی، تعیین توالی و تحلیل داده‌ها وجه مشترک آنها است که در مقاله پیش رو هر مرحله با جزئیات لازم شرح داده خواهد شد [10].

هدف مطالعه حاضر، بررسی عملکرد نسل جدید تعیین توالی با روش ایلومینا بود.

### آماده‌سازی کتابخانه ژنی

روش‌های آماده‌سازی آرشیو برای NGS بسیار سریع‌تر و ساده‌تر از روش تعیین توالی مبتنی بر سانجر (Sanger sequencing) هستند. اولین دستورالعمل‌های آماده‌سازی آرشیو شامل قطعات تصادفی از نمونه‌های DNA یا RNA، انتخاب اندازه براساس ژل، اتصال الیگونوکلئوتیدهای اختصاصی پلتفورم، گسترش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و چندین مرحله دیگر است. این در حالی است که با پیشرفت‌های چشمگیر این تکنیک‌ها نسبت به تکنیک‌های سنتی، زمان لازم برای تولید آرشیوهای NGS به ۱ تا ۲ روز رسیده است، اما در برخی دستورالعمل‌های NGS موجود همچون دستورالعمل آماده‌سازی آرشیو Nextera XT DNA، زمان آماده‌سازی این آرشیوها به کمتر از ۹۰ دقیقه کاهش یافته است. به‌علاوه، دستورالعمل‌های بدون نیاز به PCR (PCR-Free) و کیت‌های عاری از ژل‌ها (Gel-free) برای تعیین توالی‌های حساس در دسترس هستند. کیت‌های آماده‌سازی آرشیو به‌صورت PCR-free منجر به پوشش بهتر مناطقی چون مناطق غنی از AT/GC، پروموتورها و مناطق هومو پلیمری می‌شود. به‌طور کلی کتابخانه یا آرشیو توالی‌ها با قطعه‌قطعه کردن تصادفی

تکرار شود دوباره همان نتایج به دست خواهد آمد. این امر نشان‌دهنده تکرارپذیری بودن نتایج است که بسیار هم حایز اهمیت است.



**شکل ۲** مراحل طی شده در روش ایلومینا روی قطعات نمونه ژنی؛ به تغییراتی که قبل از اتصال آدپتورها رخ می‌دهند دقت شود. (۱ DNA ژنومی، ۲) قطعه‌قطعه‌کردن، ۳) تعمیرکردن پایان‌ها، ۴) اضافه‌کردن A، ۵) اضافه‌کردن آدپتورها، ۶) اتصال آدپتورها، ۷) PCR، ۸) خالص‌سازی با دانه‌های مغناطیسی، ۹) تکثیر به روش پل، ۱۰) به‌دست‌آوردن توالی

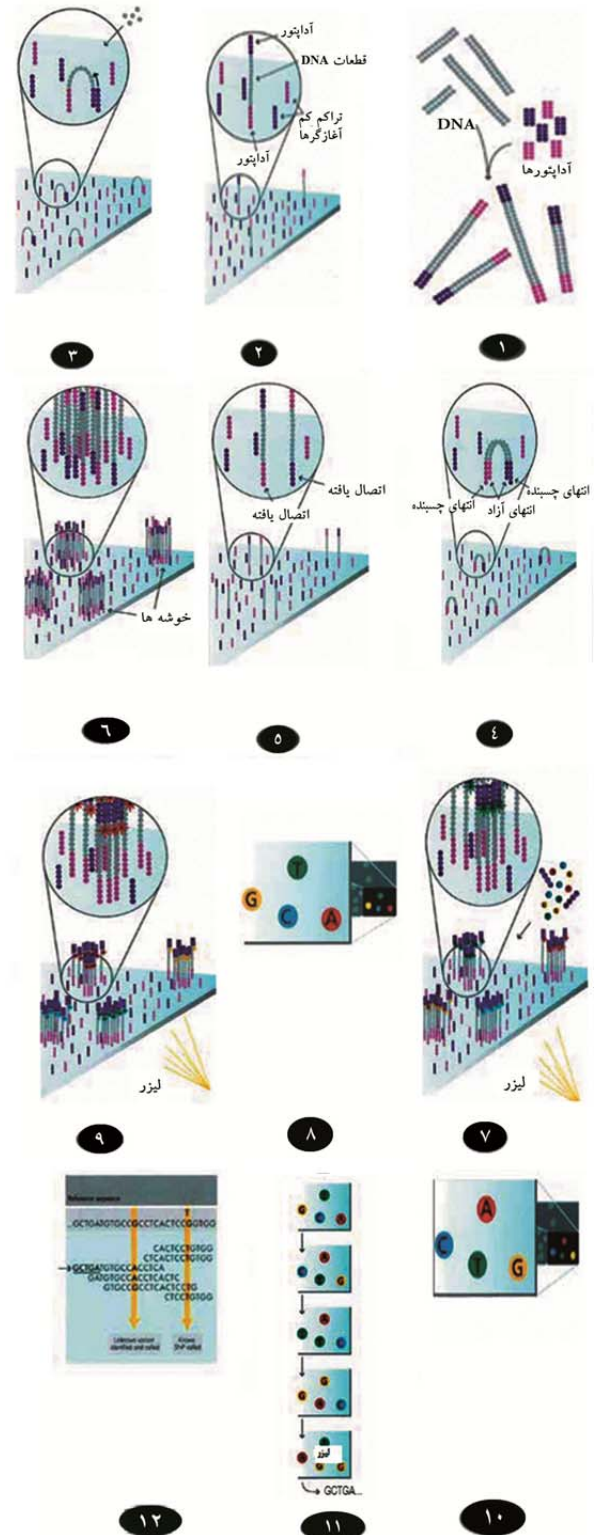
با تغییر شرایط می‌توان اندازه قطعات را با دقت قابل توجهی از اندازه کوچک تا بزرگ (۱۰۰۰ جفت‌باز تا ۵ کیلو جفت‌باز) انتخاب کرد و علاوه بر همه این‌ها در استفاده از امواج اکوستیک نیازی به دخالت و تماس مستقیم کاربر نیست که همین نکته باعث کاهش آلودگی می‌شود و فرآیندهای انجام شده روی نمونه مورد نظر تحت تاثیر شرایط دمایی یکسان، بالاترین کیفیت ایجاد قطعات را برای تعیین توالی تضمین می‌کنند [13].

در تکنولوژی هضم آنزیمی برای قطعه‌قطعه‌کردن نمونه ژن دورشته‌ای از دو آنزیم استفاده می‌شود. یکی از آنزیم‌ها به‌طور تصادفی در دو رشته نمونه ژنی شکاف‌هایی ایجاد می‌نماید و آنزیم دیگر جایگاه شکاف‌ها را شناسایی و در رشته مقابل برای ایجاد شکست دورشته‌ای برش ایجاد می‌کند.

صرف نظر از به‌کارگیری روش قطعه‌قطعه‌کردن ژنی، شرایط مناسب روش مورد استفاده، باید به‌طور تجربی براساس اندازه اسیدنوکلئیک ورودی و همچنین توزیع اندازه قطعات مورد نظر ایجاد شود. به‌طور کلی اندازه قطعات محدودتر با دامنه کوچک‌تر ترجیح داده می‌شود [13, 14].

### ب) تعمیر برآمدگی‌های انتهایی و افزودن نوکلئوتیدآدنین به انتهایی زنجیره

پس از ایجاد قطعات نمونه ژنی باید برآمدگی‌های ناشی از قطعه‌قطعه‌شدن را به انتهاهای صاف تبدیل کرد. برای این منظور از مخلوط تعمیرکننده پایانه‌ها استفاده می‌شود (شکل ۲). این مخلوط دو فعالیت عمده انجام می‌دهد: (۱) فعالیت اگزونوکلازای ۳ به ۵ که به‌وسیله آن برآمدگی‌های انتهایی ۳ قطعات نمونه ژنی را بر می‌دارد. (۲) فعالیت پلیمرازی که توسط آن برآمدگی‌های موجود در انتهایی ۵ را پر می‌کند. مخلوط تعمیرکننده پایانه‌ها می‌تواند نمونه ژنی دارای انتهایی ۵ آسیب‌دیده یا ناسازگار یا انتهایی ۳ بیرون‌زده را به ۵ فسفریله‌شده (و در نتیجه انتهایی صاف) تبدیل کند. در این مخلوط از نمونه ژنی پلیمراز T4 (P708L) که دارای هر دو فعالیت پلیمرازی ۵ به ۳ و اگزونوکلازای ۳ به ۵ است

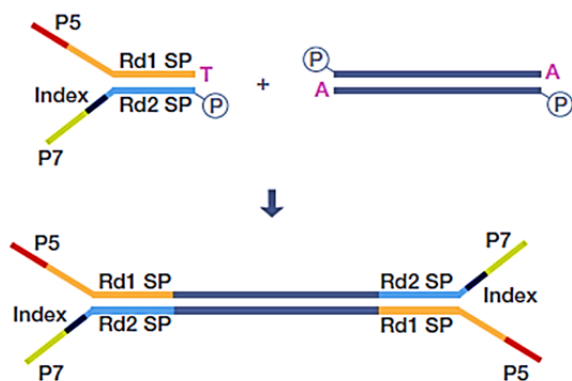


**شکل ۱** مراحل طی شده در روش تعیین توالی ایلومینا (۱) فراهم کردن کتابخانه، (۲) اتصال نمونه ژنی به سطح فلوسل، (۳) تکثیر به روش پل، (۴) قطعات دورشته‌ای شده، (۵) واسرشته شدن مولکول‌های دو رشته‌ای، (۶) اتمام تولید خوشه‌ها، (۷) اولین مرحله تعیین توالی، (۸) اولین مرحله عکس‌برداری، (۹) دومین مرحله تعیین توالی، (۱۰) مرحله دوم عکس‌برداری، (۱۱) چندین چرخه عکس‌برداری، (۱۲) اطلاعات حاصل از عکس‌برداری

### ج) اتصال آداپتورها

فرآیند اتصال آداپتور شاخص چندگانه در انتهای قطعات نمونه ژنی، قطعات را برای اتصال توسط دورگه‌سازی به فلوسل آماده می‌کند (شکل ۲). کلید تعیین توالی تصادفی قطعات نمونه ژنی، اضافه‌کردن توالی نوکلئوتیدی کوتاهی است که اجازه می‌دهد هر قطعه نمونه ژنی به یک فلوسل برای تعیین توالی متصل شود و در ضمن اجازه می‌دهد که PCR برای تکثیر آداپتور متصل به قطعات نمونه ژنی، به تنهایی رخ دهد. در نهایت توالی نوکلئوتیدی مذکور امکان ضمیمه یا بارکردن نمونه قطعات کتابخانه چندگانه را فراهم می‌کند و اجازه می‌دهد که این نمونه قطعات در یک چاهک تعیین توالی با هم مخلوط شوند.

در حال حاضر کیت‌هایی برای انجام این مرحله به صورت تجاری آماده و تهیه شده است. این کیت‌ها را می‌توان بدون دانستن چگونگی سازوکار آنها در فرآیند اتصال آداپتورها یا اطلاع از این که به‌واقع ساختارشان چیست به راحتی خریداری نمود و آداپتورها را به آنها اضافه نمود. اما آن چه حایز اهمیت است دست‌یافتن به دانش تئوری پشت این مراحل است تا بتوان از اشتباهات گزافی که ممکن است طی کار پیش آید، جلوگیری کرده و حتی در صورت لزوم آداپتورها و آغازگرهای مورد نیاز را خود طراحی نمود (شکل ۴).



**شکل ۴** تصویر کامل با جریبات از قطعات نمونه ژنی که به هر کدام از سرهای آن‌ها آداپتورها متصل شده است. به شکل شل و آزاد انتهای آداپتورها دقت کنید که در توالی کوتاهی به هم متصل و بعد به شکل شل و آویزان قرار می‌گیرند [20].

در این جا لازم است در ادامه به ساختار و توالی دو نوع آداپتور پرکاربرد اشاره نمود. این آداپتورها شامل آداپتورهای TruSeq با توالی عمومی و آداپتورهای TruSeq با توالی شاخص هستند.

در آداپتورهای توالی شاخص، نوکلئوتید N هر نوکلئوتیدی می‌تواند باشد. ۶ نوکلئوتید N در کنار هم یک رشته منحصربه‌فرد می‌سازند که به شکل تک و منحصربه‌فرد در یک کتابخانه خوانده و شناخته می‌شوند. نکته مهم این است که این توالی‌ها چگونه به اطراف و مجاورت قطعه نمونه ژنی متمایل هستند، به چه صورتی به فلوسل متصل شده و شاخص‌ها چگونه خوانده می‌شوند.

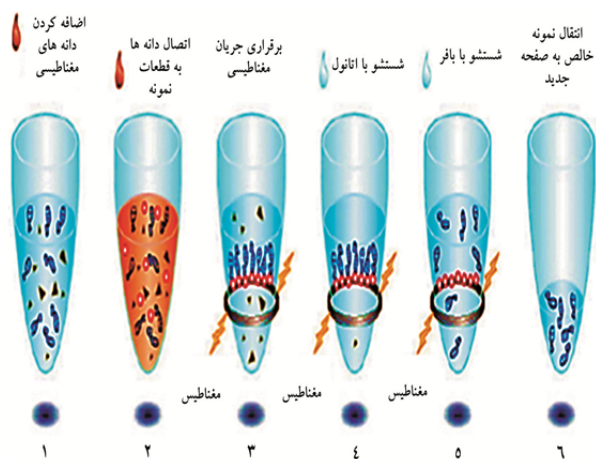
هنگامی که آداپتورهای مورد نیاز سفارش داده می‌شوند دانستن روش مناسب ساخت آداپتورها و چگونگی ترادف آنها از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. توالی عمومی و توالی شاخص هر دو در یک ناحیه بسیار کوتاه تعریف شده و مشخص هستند. توالی عمومی ۵' به ۳' و توالی شاخص ۳' به ۵' به شکل خاصی روبروی هم قرار می‌گیرند.

استفاده می‌شود. فعالیت پلی‌نوکلئوتید کیناز T4 باعث فسفریله‌شدن انتهای ۵ قطعات صاف می‌شود. این فسفریله‌شدن انتهای ۵ برای ایجاد اتصال به‌وسیله نمونه ژنی لیگاز T4 لازم است (اتصال آداپتور به دو سر انتهای).

برای کنترل فعالیت آنزیمی مخلوط تعمیر پایانه‌ها، از قطعات نمونه ژنی به‌منظور کنترل استفاده می‌شود. در فرآیند تهیه کتابخانه از این قطعات طراحی شده دورشته‌ای به‌عنوان الگو، برای گزارش موفقیت یا شکست یک فعالیت آنزیمی خاص استفاده می‌شود. اگر یک توالی کنترل (توالی از قبل مشخص شده) در داده‌های توالی نهایی ظاهر شود، نمایان‌گر این نکته است که مرحله متناظر و مربوط به آن موفقیت‌آمیز بوده است. اگر در توالی نهایی ظاهر نشود یا با تعداد کاهش‌یافته قابل ملاحظه‌ای ظاهر شود، نشان می‌دهد که مرحله مورد نظر شکست خورده است.

مرحله در نظرگرفته شده برای کنترل و عیب‌یابی قادر به شناسایی حالت خاصی از شکست است، اما در مواردی که اطلاعات تعیین توالی از یک کتابخانه منشا نگرفته‌اند و محققان قادر به مشخص‌کردن توالی نیستند، بی‌ارزش است. در این مرحله، اضافه‌کردن گلوله‌های Ampure Xp به‌طور موثری تکه‌های کوتاه ناخواسته را از کتابخانه حذف می‌کند. به این ترتیب که ابتدا نمونه ژنی قطعه‌قطعه می‌شود، قطعات به گلوله‌های مغناطیسی متصل می‌شوند و با قراردادن در معرض جریان مغناطیسی، قطعات متصل به گلوله‌ها به بخشی از طرف متصل شده و سپس می‌توان آلودگی‌ها را از قطعات جدا نمود. نمونه ژنی مورد نظر با اتانول شست‌وشو داده شده و پس از جداسازی آلودگی‌ها و تکه‌های ناخواسته با شست‌وشو به‌وسیله بافر خاص، قطعات نمونه ژنی از گلوله‌های مغناطیسی جدا می‌شوند و در انتها قطعات که حالا از دانه‌ها جدا شده‌اند به یک صفحه جدید انتقال داده می‌شوند [15]. (شکل ۳).

برای جلوگیری از اتصال قطعات نمونه ژنی با انتهای صاف به قطعات دیگر طی واکنش یک تک نوکلئوتید آدنین به انتهای ۳' قطعات دارای انتهای صاف اضافه می‌شود. تک نوکلئوتید آدنین به تک نوکلئوتید تیمین در انتهای ۳' آداپتور متصل می‌شود و هر دو برآمدگی‌هایی مکمل را برای اتصال آداپتور به قطعه فراهم می‌کنند. این روش میزان پایینی از تشکیل کایمر (در این جا به معنی قطعات حاصل از اتصال چندین قطعه کوچک‌تر با ترکیبات متفاوت است) را تضمین می‌کند [13]. (شکل ۲).



**شکل ۳** مراحل طی شده برای خالص‌سازی قطعات نمونه ژنی

جراحی تمیز جدا شده و براساس اندازه از ۴۰۰ تا ۵۰۰ جفت‌باز مرتب می‌شود و از نشانگر اندازه نمونه ژنی به‌عنوان راهنما استفاده می‌شود. اگر هدف غنی‌سازی است، یک باند از ژل اندازه‌گیری در عرض شیار با یک تیغ جراحی تمیز جدا شده و براساس اندازه از ۳۰۰ تا ۴۰۰ جفت‌باز مرتب می‌شود و از نشانگر اندازه نمونه ژنی به‌عنوان راهنما استفاده می‌شود. برش یک باند بین ۴۰۰ تا ۵۰۰ جفت‌باز یک اندازه تقریباً ۳۰۰ تا ۴۰۰ جفت‌بازی را برای محاسبه اندازه آدپتورها ایجاد می‌کند و آدپتورها تقریباً ۱۲۰ جفت‌باز به هر قطعه اضافه می‌کنند. هنگامی که قطعات برش داده می‌شوند لازم است خواندن طول توالی در نظر گرفته شود. خواندن توالی قبل از رسیدن به آدپتور باعث خوانش‌های دوگانه می‌شود که در نتیجه غیرقابل ارجاع به توالی مرجع است [13].

به‌منظور خالص‌سازی هر نمونه از ژل، از کیت MiniElute (کیاژن؛ آلمان) استفاده می‌شود. این کیت ستون چرخش، بافرها و لوله‌های جمع‌آوری را برای تصفیه مبتنی بر غشا سلیکا، از قطعات نمونه ژنی ۷۰ جفت‌باز تا ۴ کیلو جفت‌باز و بیشتر از ۴۰۰ میلی‌گرم سلیکا ژل فراهم می‌کند. ستون چرخش برای شست‌وشو در حجم خیلی کوچک (کمتر از ۱۰ لیتر) طراحی شده و نمونه ژنی بسیار غلیظ را در بازه زمانی بالا آزاد می‌کند. شاخص pH یکپارچه باعث تعیین آسان pH بهینه برای اتصال نمونه ژنی در ستون چرخش می‌شود. قطعات نمونه ژنی‌ای که با سیستم MinElute Gel Extraction خالص می‌شوند برای استفاده مستقیم در همه برنامه‌های کاربردی شامل تعیین توالی، تحلیل میکروآرئی، اتصال و انتقال نمونه ژنی، تجزیه محدودالثر، نشان‌داری، ریز تزریقی، PCR و رونویسی در آزمایشگاه است [16].

کیت MinElute و کیت QIAquick (کیاژن؛ آلمان) شامل یک غشای سلیکا ژل قابل مونتاژ هستند. برای اتصال نمونه ژنی از بافر با نمک بالا و برای شست‌وشو از بافر با نمک پایین یا آب استفاده می‌شود. به‌منظور خالص‌سازی محصول نهایی می‌بایست نمونه ژنی، آغازگرهای اضافی، نوکلئوتید، آنزیم، روغن‌های معدنی، آگارز، اتیدیوم بروماید و سایر ناخالصی‌ها حذف شوند. تکنولوژی غشای سلیکا باعث شد که محققان از مشکلات و دردسرهایی که رزین‌های شل و مایع ایجاد می‌کردند راحت شوند. بافرهای اتصال تخصصی برای کاربردهای خاص و افزایش جذب انتخابی مولکول نمونه ژنی در محدوده اندازه خاصی بهینه‌سازی شده‌اند. کیت خالص‌سازی MinElute 96 UF PCR (کیاژن؛ آلمان) تکنولوژی چندچاهکی را با استفاده از یک قالب صفحه-اولترافیلتراسیون برای حالت دستی یا تمام اتوماتیک (با بیشترین عملکرد خالص‌سازی) به کار می‌برد. در این روش تصفیه، مولکول‌های کوچک مثل آغازگرها، نمک و نوکلئوتیدهای غیرقابل آمیختن از عرض غشا عبور می‌کنند، در حالی که محصولات PCR که بزرگ‌تر از ۱۰۰ جفت‌باز باشند باقی می‌مانند و قادر به عبور نیستند. در سیستم‌های MinElute و QIAquick از روش ساده اتصال-شست‌وشو-جداسازی استفاده می‌شود. بافر اتصال مستقیماً به نمونه PCR یا دیگر واکنش‌های آنزیمی اضافه می‌شود و این مخلوط برای MinElute یا ستون چرخشی QIAquick یا نوار ۸ حفره‌ای QIAquick یا صفحه‌های ۹۶ حفره‌ای استفاده می‌شود [16].

وقتی که قطعه ژل حاوی نمونه ژنی در یک بافر دارای معرف pH مشخص قرار داده شود، به‌راحتی می‌توان pH بهینه برای اتصال نمونه ژنی به قطعه ژل را تعیین کرد. اسیدهای نوکلئیک در شرایط

این دو توالی تنها در ۱۲ نوکلئوتید انتها، درست از جایی که به قطعات نمونه متصل می‌شوند، مکمل هم هستند. در توالی قطعات آدپتور به یک گروه ۵' فسفات در انتهای آدپتور توالی ضمیمه و همچنین به یک باند اتصال فسفروتاید بین نوکلئوتیدهای تیمین و سیتوزین در انتهای ۳' در آدپتور توالی عمومی احتیاج است. گروه ۵' فسفات برای اتصال آدپتورها به قطعات نمونه ژنی مورد نظر لازم است. دلیل نیاز به باند فسفروتاید نیز ایجاد یک اتصال بسیار قوی بین تیمین و سیتوزین در برآمدگی است که مانع جدا شدن تیمین توسط فعالیت‌های اگزونوکلازی طی مراحل آزمایش می‌شود. لازم به ذکر است که تک نوکلئوتید تیمین در انتهای برآمدگی برای اتصال مجدد به آدنین در انتهای ۳' برآمدگی لازم است.

در هنگام انجام مراحل آزمایش نیاز به زمان کافی برای واسرشتگی و اتصال مجدد به یکدیگر و شکل‌گرفتن آدپتورهای با برآمدگی‌های به الیگوا است. نحوه قرارگیری توالی‌های دورشته‌ای آدپتورها در دو سر قطعات در سمت راست و سمت چپ کمی متفاوت است. با توجه به نحوه قرارگیری توالی‌ها می‌توان مشاهده کرد که توالی ۱۲ نوکلئوتیدی که در آدپتورها مکمل وجود دارد، در هر دو رشته توسط یک رشته طولانی از نوکلئوتیدهای غیرمکمل دنبال می‌شود و به همین علت حالت آویزان دارد [14].

#### د) انتخاب ژنوم‌های لیگاندشده

برای شناسایی آدپتورهای قطعات نمونه ژنی مورد نظر در حین تکثیر آغازگرها یا بعد از غنی‌سازی آغازگرها با PCR در آزمایشگاه‌های تعیین توالی، از دو آغازگر PCR به نام‌های آغازگر ۱ و آغازگر ۲ استفاده می‌شود. آغازگر ۱ می‌تواند به‌طور مستقیم برای ۴۴ باز اول آدپتورهای توالی عمومی در جهت ۵' به ۳' آدپتور طراحی شود و بنابراین به مکمل این توالی در مراحل PCR متصل می‌شود. آغازگر ۲ می‌تواند به‌عنوان مکمل معکوس برای ۲۴ باز انتهای ۳' به ۵' آدپتورهای توالی ضمیمه خوانده شود. در روش PCR با تکثیر آغازگرها از روی هر دو رشته سنس و آنتی‌سنس، نیازی به وجود برآمدگی سست بلندتر در محصول نیست و فقط باید در کل نمونه ژنی دورشته‌ای به‌دنبال ترکیب مورد نظر بود.

زمانی که از روش ژل استفاده می‌شود محصولات متصل‌شده در یک ژل خالص‌سازی می‌شوند و آدپتورهایی که متصل نشده‌اند و آدپتورهایی که به یکدیگر متصل شده‌اند را حذف می‌کنند و یک اندازه مناسب از کتابخانه تعیین توالی برای تولید خوشه را انتخاب می‌کنند. برای این منظور هر نمونه به‌طور مستقل در ژل آغاز ۲ درصد جدا می‌شود (در زمان انتقال نمونه‌های متعدد، برای جلوگیری از آلودگی بین کتابخانه‌ها، حداقل یک شیار تهی بین نمونه‌ها خالی گذاشته می‌شود و در اولین و آخرین چاهک از نشانگر اندازه استفاده می‌شود که به تعیین محل منطقه‌ای از ژل که برداشته می‌شود کمک می‌کند). انجام مرحله قبل از لکه‌گذاری روی ژل با رنگ مخصوص (SyBr Gold) بسیار مهم است زیرا زمانی که از رنگ‌های دیگری استفاده کرده یا ژل بعد از گذاشتن نمونه ژنی روی آن لکه‌گذاری می‌شود، نمونه ژنی بسیار آهسته‌تر از نشانگر اندازه مهاجرت می‌کند و این امر موجب جدا شدن و برش اندازه اشتباهی از قطعات می‌شود. انتخاب باند برای برش بستگی به هدف آزمایش دارد، در صورتی که هدف تعیین توالی مجدد کل ژنوم است. یک باند از ژل اندازه‌گیری در عرض شیار با یک تیغ

فلوسل صفحه‌ای شیشه‌ای دارای ۸ شیار است که هر کدام از شیارها می‌توانند شامل ۱ تا ۳۰ میلیون خوانش باشند. خطوط مربوط به فلوسل حاوی دسته‌ای از نوارهاست که در سطح بالایی و پایینی آن قرار گرفته‌اند. هر نوار دربرگیرنده تعداد متعددی تایل و هر تایل نیز شامل تعداد متعددی از خوشه‌های نوکلئوتیدی است. سطح فلوسل توسط آغازگرها پوشیده شده است و در دستگاه توالی‌یاب قرار می‌گیرد که ۴ مدل از آن را در ابتدای مقاله معرفی کردیم. شرکت ایلومینا برای تعیین توالی، پلات‌فرم‌های فلوسل را مورد استفاده قرار می‌دهد. این فلوسل‌ها محتوی تعداد زیادی لاین، نوار به ازای هر لاین و تایل به ازای هر نوار هستند. به‌طور مثال فلوسل‌های سیستم NextSeq 500 دارای ۴ خط همراه با ۳ نوار در بالا و پایین هر خط و در مجموع ۸۶۴ تایل واجد صدها الگوی خوشه‌ای هستند و مدل HiSeq2000 دارای فلوسلی با طراحی متفاوت است که دارای ۲ سطح قابل استفاده است و مقادیر بیشتری از نمونه در آن بارگذاری می‌شود.

به‌منظور اتصال قطعات دارای آدپتور به فلوسل و مرحله تولید خوشه، سطح فلوسل توسط الیگونوکلئوتیدهایی (آغازگرها) پوشیده شده است. این الیگوها توسط رنگ‌های P7 و P5 نشان‌دار شده‌اند. در مرحله اتصال قطعات به فلوسل، این آغازگرهای متصل به سطح و آدپتورهای اضافه‌شده به انتهای قطعات با یکدیگر دورگه شده و باعث اتصال قطعات می‌شوند. سپس این قطعات توسط پلیمرز Tag همانندسازی می‌شوند و در نتیجه قطعات مکمل آنها در ادامه آغازگرهای متصل به سطح فلوسل ایجاد می‌شوند که این قطعات ایجاد شده کاملاً به سطح فلوسل متصل هستند. قطعات الگو و قطعات همانندسازی شده توسط ماده فرمامید از هم جدا می‌شوند؛ در این موقعیت مکمل قطعات نمونه ژنی اولیه‌ای وجود خواهند داشت که کاملاً به سطح فلوسل متصل هستند.

حال نوبت به مرحله آمپلی‌فیکاسیون به روش پل می‌رسد. در این مرحله با ایجاد چرخه دمایی و اضافه‌کردن نوکلئوتیدها، قطعات مکمل متصل به سطح همانندسازی می‌شوند. در این مرحله همان قطعات اولیه به‌صورت خوشه‌هایی متصل به سطح فلوسل وجود خواهند داشت. در چرخه اول قطعات مکمل از انتهای آزاد خود که دارای آدپتور نشان‌دار است به آغازگرهای مکمل متصل به سطح فلوسل وصل می‌شوند که در دمای اتصال اتفاق می‌افتد. سپس در دمای گسترش از روی این قطعات همانندسازی می‌شود. پس از مرحله واسرشته‌شدن با فورمامید و انجام این چرخه در حدود ۳۲ بار، خوشه‌هایی از قطعات نمونه ژنی متصل به سطح فلوسل وجود خواهد داشت که از آنها برای مرحله تعیین توالی استفاده خواهد شد [10, 15, 18, 19].

### تعیین توالی و تحلیل داده‌ها

در مرحله تعیین توالی که روی خوشه‌ها صورت می‌گیرد، خوشه‌ها به‌وسیله دی‌دئوکسی‌نوکلئوتیدتری‌فسفات‌های نشان‌دار (ddNTPs) گسترش داده می‌شوند که در هر مرحله با توجه به توالی، یکی از آنها متصل می‌شود. به‌علت ساختاری که دی‌دئوکسی‌نوکلئوتیدتری‌فسفات‌ها دارند، ادامه تولید توالی بلوکه می‌شود و فرصت کافی برای قرائت توسط لیزر و آشکارساز فراهم می‌شود. سپس این مراحل با برداشت بلوک‌کننده دوباره تکرار می‌شود تا تمام توالی خوانده شود [19] (شکل ۵).

در هنگام قرائت توالی قطعات، توالی واقعی نمونه ژنی مستقیم رو به جلو است و خوانده‌شدن آغازگر با خوانش (قرائت) شماره ۱ برای

نمک زیاد که توسط بافر فراهم می‌شوند به غشای سیلیکا ژل جذب می‌شوند. سپس ناخالصی‌ها شسته و نمونه ژنی خالص با بافر کم‌نمک یا آب از غشا شسته می‌شود و این نمونه ژنی خالص برای استفاده در تمام مراحل پس از تعیین توالی آماده است. کیت خالص‌سازی MinElute 96 UF PCR از تکنولوژی اولترافیلتراسیون استفاده می‌کند. محصول PCR در چاهک‌های اولترافیلتراسیون ریخته شده و خلأ اعمال می‌شود. مولکول‌های کوچک آغازگر، نمک و نوکلئوتیدهای متصل‌نشده از غشا عبور می‌کنند و محصولات PCR بزرگ‌تر از ۱۰۰ جفت‌باز باقی می‌مانند. محصولات خالص PCR مستقیماً از سطح غشا در حجم کم (کمتر از ۲۰ میکرولیتر در روش دستی یا ۳۰ میکرولیتر در روش اتوماتیک) شسته شده‌اند که منجر به ایجاد نمونه ژنی بسیار غلیظ می‌شود. از آب، دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) یا بافری مثل سالی‌سدیم‌سیترات (SSC) می‌توان برای شست‌وشو استفاده کرد. از فرآیند PCR برای تکثیر انتخابی قطعات از نمونه ژنی که مولکول آدپتور در هر دو پایانشان دارند یا برای افزایش میزان نمونه ژنی در کتابخانه استفاده می‌شود. این PCR با معجونی از آغازگرهای PCR که به پایان آدپتورها متصل شده است، انجام می‌شود و در ضمن باید تعداد چرخه‌های PCR را برای جلوگیری از تحریف شدن نمایش کتابخانه کاهش داد و به حداقل رساند. توجه شود که تکثیر PCR برای قطعاتی که آدپتور به هر دو پایانشان متصل شده انجام می‌شود و قطعاتی که تنها یک آدپتور به انتهایشان متصل شده یا اصلاً آدپتوری به آنها متصل نشده محصولات فرعی ناشی از عدم کارایی واکنش اتصال هستند. هیچ‌کدام از این دو نوع آخر که گفته شد را نمی‌توان برای تولید خوشه‌ها استفاده کرد به این دلیل که قطعات بدون آدپتور را نمی‌توان به آغازگرهای متصل به سطح فلوسل دورگه کرد و قطعات دارای یک آدپتور هم تنها در یک انتها می‌توانند به آغازگرهای متصل به سطح فلوسل دورگه شوند که در این صورت هم نمی‌توانند تشکیل خوشه دهند. باید به این نکته توجه داشت که روش ایلومینا ۱۰ چرخه از PCR را برای اجرای یک دستورالعمل کارآمد توصیه می‌کند. به‌منظور بهینه‌سازی عملکرد در مقابل تعداد چرخه، ممکن است تیتراسیون چرخه PCR انجام شود [13, 17].

### ایجاد خوشه ژنی

برای تولید خوشه ژنی، آرشیو ایجاد شده به روی صفحه‌ای بارگذاری می‌شود. این صفحه سطح محدودی است و قطعاتی را در بر گرفته که مکمل کتابخانه الیگو و آدپتورها است. هر قطعه به‌طور مجزا افزوده می‌شود، و خوشه‌ها با استفاده از اتصال‌ها گسترش می‌یابند. وقتی دسته‌ها کامل می‌شوند نوبت به توالی الگوها می‌رسد. هنگام آماده‌سازی برای تعیین توالی نمونه ژنی به‌منظور اتصال محصول تکثیرشده به سطح فلوسل، دستورالعمل ایلومینا برای واسرشته‌کردن نمونه ژنی از سود NaOH استفاده می‌شود. این دستورالعمل شرایط اتصال نمونه ژنی تک‌رشته‌ای به سطح فلوسل را فراهم می‌کند و همچنین تکثیر به روش تشکیل پل را تقویت می‌کند. در هنگام طراحی آدپتور باید به این نکته توجه داشت که نوع طراحی نقش مهمی در اتصال نمونه تک‌رشته به سطح فلوسل دارد و این عمل توسط مناطق آدپتورهای توالی عمومی، آدپتورهای توالی ضمیمه و پروتئین متصل به فلوسل انجام می‌گیرد.

در این جا به توضیح مختصری در مورد ساختار فلوسل می‌پردازیم.

شاخص خوانش آغازگر برای نمونه‌های چندگانه به‌سادگی به همه توالی‌های قبل از بارکد ۶جفت‌باز متصل می‌شود و سپس خواندن یکی پس از دیگری صورت می‌گیرد، به طوری که هر خوشه می‌تواند به‌عنوان یک نمونه منحصر‌به‌فرد با یک شیبار، در فلوسل شناخته شود. بنابراین باید برای اتصال، ۱۲ تا شاخص آدپتور نمونه ژنی وجود داشته باشد و هر کدام از آنها به یک ردیف شامل ۸ نمونه اضافه شوند. زمان ضمیمه‌کردن کتابخانه، ایلومینا توصیه می‌کند که نمونه‌ای که در یک حوضچه مشترک ترکیب شده، در همان ردیف مرتب شود. هر ستون باید شامل شاخص مشترک باشد و پس از افزودن مخلوط اتصال و گذشت زمان مشخص، بافر اتصال اضافه می‌شود که باعث توقف فرآیند اتصال می‌شود. برای جداکردن قطعات از ناخالصی‌ها، از دانه‌های مغناطیسی استفاده می‌شود [12]. پس از تعیین توالی قطعات نکته مهم، مرحله تنظیم‌کردن و مرتب‌کردن قطعات خوانده‌شده براساس توالی اصلی نمونه ژنی است. به‌عبارتی مانند یک پازل، قطعات کوچک به‌شکل صحیح کنار هم چیده می‌شوند و تصویر اصلی که همان توالی کلی نمونه ژنی است ساخته می‌شود. با توجه به مثال زده‌شده، قطعات پازل از روی برخی تشابهات بین قطعات، کنار هم قرار داده می‌شوند که این موضوع در مورد نمونه ژنی هم صدق می‌کند. در توالی کلی نمونه ژنی برخی نقاط وجود دارد که توالی‌های تکراری هستند و محققان می‌توانند با کمک این مناطق و خوانش‌های دو سر هر قطعه، توالی کلی نمونه ژنی را به‌دست آورند و قطعات متوالی را به‌شکل درست مرتب نمایند. با توسعه و پیشرفت روزافزون دانش بیوتکنولوژی، همچنین استفاده از تکنولوژی‌های تشخیصی جدید در این رشته، در زمینه ژنتیک پزشکی و پیشرفت سریع دانش ژنتیک در زمینه روش‌های جدید توالی‌یابی، درخواست برای توالی‌یابی رشد چشمگیری داشته است. این در حالی است که حجم یا مقدار DNA ژنومی، نیاز به تحلیل‌های سریع‌تر، ارزان‌تر و دقیق‌تری دارد.

تعیین توالی آدپتور توالی عمومی لازم است. البته این امر در بخش پروتئین که به فلوسل متصل می‌شود صدق نمی‌کند. خواندن دو آغازگر برای خوانش‌های با انتهای جهت‌شونده اساساً همان روش گفته‌شده است که تنها در جهت مخالف خواندن است.

شاخص خوانش آغازگر برای نمونه‌های چندگانه به‌سادگی به همه توالی‌های قبل از بارکد ۶جفت‌باز متصل می‌شود و سپس خواندن یکی پس از دیگری صورت می‌گیرد، به طوری که هر خوشه می‌تواند به‌عنوان یک نمونه منحصر‌به‌فرد با یک شیبار، در فلوسل شناخته شود. بنابراین باید برای اتصال، ۱۲ تا شاخص آدپتور نمونه ژنی وجود داشته باشد و هر کدام از آنها به یک ردیف شامل ۸ نمونه اضافه شوند. زمان ضمیمه‌کردن کتابخانه، ایلومینا توصیه می‌کند که نمونه‌ای که در یک حوضچه مشترک ترکیب شده، در همان ردیف مرتب شود. هر ستون باید شامل شاخص مشترک باشد و پس از افزودن مخلوط اتصال و گذشت زمان مشخص، بافر اتصال اضافه می‌شود که باعث توقف فرآیند اتصال می‌شود. برای جداکردن قطعات از ناخالصی‌ها، از دانه‌های مغناطیسی استفاده می‌شود [12]. در هنگام قرائت توالی قطعات، توالی واقعی نمونه ژنی مستقیم رو به جلو است و خوانده‌شدن آغازگر با خوانش (قرائت) شماره ۱ برای تعیین توالی آدپتور توالی عمومی لازم است. البته این امر در بخش پروتئین که به فلوسل متصل می‌شود صدق نمی‌کند. خواندن دو آغازگر برای خوانش‌های با انتهای جهت‌شونده اساساً همان روش گفته‌شده است که تنها در جهت مخالف خواندن است.

در هنگام قرائت توالی قطعات، توالی واقعی نمونه ژنی مستقیم رو به جلو است و خوانده‌شدن آغازگر با خوانش (قرائت) شماره ۱ برای تعیین توالی آدپتور توالی عمومی لازم است. البته این امر در بخش پروتئین که به فلوسل متصل می‌شود صدق نمی‌کند. خواندن دو آغازگر برای خوانش‌های با انتهای جهت‌شونده اساساً همان روش گفته‌شده است که تنها در جهت مخالف خواندن است.



شکل ۵ (۱) دورگه‌سازی، (۲) تکثیر، (۳) اتصال آغازگر برای تعیین توالی، (۴) تعیین توالی با خوانش یک و دو



4- Daneshpour MS, Alfadhli S, Houshmand M, Zeinali S, Hedayati M, Zarkesh M, et al. 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.

5- Daneshpour MS, Fallah MS, Eshraghi P. Revolution of DNA sequencing method from the past until today. *Modares J Med Sci.* 2014;16(4):1-13. [Persian]

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

7- Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008;26(10):1135-45.

8- Sawicki MP, Samara G, Hurwitz M, Passaro E Jr. Human genome project. *Am J Surg.* 1993;165(2):258-64.

9- Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, et al. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science.* 2005;309(5741):1728-32.

10- Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:387-402.

11- Bioo Scientific. NEXTFlex™ Bisulfite-Seq Kit - for illumina sequencing [Internet]. Vienna: Medibena; 2011 [cited 2016 Dec 19]. Available from: <http://www.medibena.at/nextflex-bisulfite-seq.html>.

12- Voelkerding KV, Dames S, Durtschi JD. Next generation sequencing for clinical diagnostics-principles and application to targeted resequencing for hypertrophic cardiomyopathy: A paper from the 2009 william beaumont hospital symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn.* 2010;12(5):539-51.

13- Quail MA, Swerdlow H, Turner DJ. Improved protocols for the illumina genome analyzer sequencing system. *Curr Protoc Hum Genet.* 2009; Chapter 18: Unit 18.2.

14- Bronner IF, Quail MA, Turner DJ, Swerdlow H. Improved protocols for illumina sequencing. *Curr Protoc Hum Genet.* 2014;80:18.2.1-42.

15- Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: Comparison of ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics.* 2012;13:341.

16- Cuddapah S, Barski A, Cui K, Schones DE, Wang Z, Wei G, et al. Native chromatin preparation and illumina/solexa library construction. *Cold Spring Harb Protoc.* 2009;2009(6):pdb.prot5237.

17- Dames S, Durtschi J, Geiersbach K, Stephens J, Voelkerding KV. Comparison of the illumina genome analyzer and roche 454 GS FLX for resequencing of hypertrophic cardiomyopathy-associated genes. *J Biomol Tech.* 2010;21(2):73-80.

18- Smith DR, Quinlan AR, Peckham HE, Makowsky K, Tao W, Woolf B, et al. Rapid whole-genome mutational profiling using next-generation sequencing technologies. *Genome Res.* 2008;18(10):1638-42.

19- Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* 2008;24(3):133-41.

20- illumine. TruSeq™ DNA PCR-Free. [Internet] San Diego: illumine; 2013 [cited 2016 Jul 24]. Available from: [https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet\\_truseq\\_dna\\_pcr\\_free\\_sample\\_prep.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_truseq_dna_pcr_free_sample_prep.pdf)

## نتیجه‌گیری

تکنولوژی پیشرفته توالی‌یابی کل ژنوم، امکان تعیین تغییرات ساختاری ژن‌ها، بررسی‌های جامع تعداد نسخه ژن‌ها، شناسایی پلی‌مورفیسم و جهش‌های نقطه‌ای، بررسی بیان ژن‌ها، شناسایی جهش‌های کوچک و کاربردهای مختلف دیگر را امکان‌پذیر نموده است. مواردی همچون ناتوانی ذهنی و تاخیر تکاملی، ناشنوایی‌های ارثی، نابینایی‌های ارثی، بیماری‌های متابولیک ارثی، بیماری‌های سیستم اسکلتی و استخوانی، معلولیت‌های حرکتی، بیماری‌های سیستم اعصاب مرکزی، بیماری‌های ژنتیک پوست (ژنودرماتوزها)، بیماری‌های ژنتیکی قلب مثل آریتمی‌ها، سرطان‌های ارثی، بیماری‌های خونی و اختلالات انعقادی، اختلالات نقص ایمنی، بیماری‌های ژنتیک غدد درون‌ریز، بیماری‌های ژنتیک دستگاه گوارش، بیماری ژنتیک عملکرد و ساختار کلیه، بیماری‌های ژنتیک دستگاه تنفسی، اختلالات ژنتیک دستگاه تولید مثل، نازایی و ناباروری، بررسی‌های ژنتیک قبل از لانه‌گزینی، تعیین وضعیت ناقلین در زوج‌های خویشاوند قبل از ازدواج یا پس از بارداری و تعیین آسیب‌پذیری و تشخیص زودرس بیماری‌های قابل پیشگیری (سرطان‌ها، اختلالات قلبی و عروقی، حساسیت به داروها و غیره) از اختلالاتی هستند که به روش NGS و با بررسی تعدادی ژن یا کل ژنوم مورد بررسی قرار می‌گیرند. با این حال، این تکنولوژی نیازمند سیستم‌های پیشرفته بیوانفورماتیک پردازش سریع اطلاعات و قابلیت ذخیره‌سازی داده‌ها با حجم بالا و صرف هزینه‌های بسیار زیاد است. اگرچه بسیاری از موسسات توانایی خرید تجهیزات نسل جدید تعیین توالی را دارا هستند، اما توانایی تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌های بالینی را ندارند. لذا در این راستا آموزش و کسب مهارت در تفسیر داده‌ها امری حیاتی محسوب می‌شود.

**تشکر و قدردانی:** نگارندگان مقاله از حمایت‌های ریاست محترم پژوهشکده غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، جناب آقای دکتر عزیزی در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی دارند.

**تأییدیه اخلاقی:** موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

**تضاد منافع:** موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

**سهم نویسندگان:** مریم‌السادات دانشپور (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۲۰٪)؛ ساجده مسجودی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ نسیم غفاری (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ مرضیه رئیسی (نویسنده چهارم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ محمدصادق فلاح (نویسنده پنجم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۲۰٪)

**منابع مالی:** موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

## منابع

1- King RA, Rotter JI, Motulsky AG. The genetic basis of common diseases. Oxford: Oxford university press; 2002.

2- Daneshpour MS, Faam B, Mansournia MA, Hedayati M, Halalkhor S, Mesbah-Namin SA, et al. Haplotype analysis of Apo AI-CIII-AIV gene cluster and lipids level: Tehran Lipid and Glucose Study. *Endocrine.* 2012;41(1):103-10.

3- 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.