مقاله مروری

مروری بر نسل دوم و سوم فناوری تعیین توالی DNA

فاطمه قربانی پارسا، محمد علی حسینپورفیضی*

گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۰۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۴/۲۷

چکیده

تعیین توالی DNA از مهم‌ترین دستاوردهای بشر محسوب می‌شود. امروزه روش‌های متفاوتی جهت تعیین توالی نوکلئوتیدها به کار می‌رود. آشنایی با این دانش از ارکان اجتناب‌ناپذیر پژوهش‌های مرتبط با علم زیست‌شناسی است. تعیین توالی نوکلئوتیدها در گرایش‌های پژوهشی و کاربردی گسترده مانند تشخیص بیماری، زیست‌فناوری، زیست‌شناسی جنایی و زیست‌شناسی سیستماتیک استفاده می‌شود که به‌طور چشمگیری پژوهش و کشفیات در این زمینه را سرعت بخشیده است.

تاکنون چندین نسل از فناوری تعیین توالی به وجود آمده که بر اساس ماهیت عملکرد و اطلاعات خروجی طبقه‌بندی می‌گردند. درحالی‌که روش تعیین توالی ختم زنجیره که توسط سنگر معرفی شد بیش از ۳۰ سال متداول بود و در پروژه ژنوم انسان نیز این روش استفاده شد اما در سال‌های اخیر تغییرات در فناوری تعیین توالی شتاب گسترده‌ای یافته است. در سال ۲۰۰۵ نخستین روش تعیین توالی نسل دوم معرفی شد که خروجی بسیار بالاتر و هزینه‌های فوق‌العاده کمتری نسبت به روش سنگر داشت و هم‌اکنون شاهد آغاز فعالیت نسل سوم فناوری تعیین توالی هستیم.

ازآنجاکه پژوهشگران علم ژنتیک در ایران نیز از این فناوری‌ها استفاده می‌نمایند و با توجه به نیاز به منابع فارسی قابل‌فهم در این زمینه، مؤلفان مقاله حاضر بر آن شدند تا به ترجمه و نگارش مجموعه‌ای از مقالات مروری در این زمینه بپردازند. مقاله حاضر به معرفی مختصر مرسوم‌ترین روش‌های تعیین توالی نسل دوم و سوم پرداخته است.

کلمات کلیدی: تعیین توالی DNA، تعیین توالی با توان عملیاتی بالا، نسل دوم فناوری تعیین توالی، نسل سوم فناوری تعیین توالی

مقدمه

اولین تعیین توالی‌های DNA در اوایل دهه ۱۹۷۰ توسط پژوهشگران با به‌کارگیری روش‌های بسیار مشکل بر اساس کروماتوگرافی ۲ بعدی به دست آمد. در همین دهه در سال ۱۹۷۳ گیلبرت و ماکسام روش برش شیمیایی را ابداع کردند که روشی پرزحمت و مبتنی بر استفاده از برش شیمیایی و مواد رادیواکتیو بود. سپس در سال ۱۹۷۷ سانگر و همکاران روش تعیین توالی ختم زنجیره را پیشنهاد نمودند (۳-۱). اساس این روش، تعیین توالی بازهای DNA بر مبنای ختم سنتز DNA در حال تکثیر با ورود ddNTPها در نقاط مختلف DNA و جداسازی قطعات کوچک DNA است. این روش به‌عنوان روش تعیین توالی سانگر نیز شناخته می‌شود (۴). روش سانگر نسبت به روش تعیین توالی ماکسام و گیلبرت نیازمندی کمتری به مواد شیمیایی سمی و رادیوایزوتوپ‌ها داشته و در حدود سی سال به‌عنوان روش تعیین توالی مرجع به کار رفته است. درنهایت با استفاده از این تکنیک در سال ۲۰۰۴ توالی کامل ژنوم انسان منتشر شد (۵). با توجه به اینکه پروژه ژنوم انسان (HGP) با صرف زمان و هزینه بسیار زیاد به نتیجه رسید، نیاز به تکنیک‌هایی ارزان‌تر و با توان عملیاتی بالاتر محسوس بود. هم‌زمان با انتشار توالی کامل ژنوم انسان در سال ۲۰۰۴ موسسه بین‌المللی تحقیقات ژنوم انسان (NHGRI) برنامه‌ای برای کاهش هزینه تعیین توالی به ۱۰۰۰ دلار امریکا طی ۱۰ سال را طراحی نمود که این برنامه محرک توسعه فناوری تعیین توالی نسل دوم (NGS) بود (روش سانگر به‌عنوان نسل اول فناوری تعیین توالی شناخته می‌شود) (۶). فناوری تعیین توالی نسل دوم نسبت به نسل اول سه پیشرفت عمده نشان می‌دهد که عبارت است از: اول برای آماده‌سازی قطعات جهت تعیین توالی به‌جای استفاده

*نویسنده مسئول: **محمد علی حسینپورفیضی**، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
Email: pourfeizi@eastp.ir

از سیستم کلونینگ باکتریایی از سیستم‌های خارج سلولی استفاده می‌شود. دوم به‌جای صدها واکنش، هزاران تا میلیون‌ها واکنش تعیین توالی به صوت هم‌زمان انجام می‌گردد. سوم نتایج خروجی حاصل از واکنش تعیین توالی به‌طور مستقیم و بدون نیاز به الکتروفورز شناسایی می‌شود (۷). به‌هرحال، روش‌های تعیین توالی نسل دوم مثل Illumina, 454 و Ion Torrent چندین محدودیت قابل‌توجه در فرایند تعیین توالی دارند که مهم‌ترین آن‌ها کوتاه بودن طول توالی خوانده‌شده و انحراف ناشی از فرایند تکثیر است که سبب محدود شدن امکان تعیین توالی کل ژنوم می‌گردد (۸).

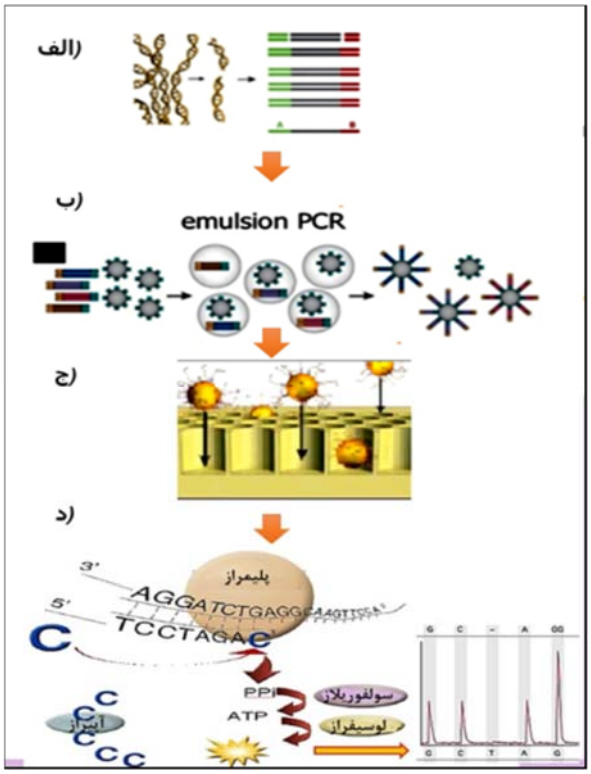
در مقابل فناوری تعیین توالی نسل سوم (TGS) با نگاهی متفاوت به فرایند تعیین توالی توانسته این محدودیت‌ها را مرتفع سازد (۹). تعیین توالی نسل سوم روی مولکول DNA منفرد انجام می‌شود و نیازی به انجام PCR برای آماده‌سازی نمونه ندارد. بعلاوه متوسط طول توالی خوانده‌شده ۸-۶ kbp است که بسیار بلندتر از طول توالی خوانده‌شده توسط روش‌های NGS است (۱۰) و درنهایت کاهش زمان و هزینه را در پی دارد (۱۱).

مقاله حاضر با توجه به معرفی روش‌های برش شیمیایی و ختم زنجیره در کتب و مقالات دیگر ترجیح داده به معرفی روش‌های تعیین توالی با توان عملیاتی بالا و مواردی که امروزه به‌صورت تجاری در دنیای ژنتیک کاربرد بیشتری دارد بپردازد. در همین راستا پلت فرم‌های Pyrosequencing ، SOLiD،Illumina، Ion Torrent،SMRT و فناوری Nanopore بررسی خواهد شد.

فناوری‌های تعیین توالی با توان عملیاتی بالا

الف- روش تعیین توالی Roche/454 pyrosequencing

۴۵۴ نخستین روش تعیین توالی نسل دوم است که در سال ۲۰۰۵ توسط شرکت 454 Life Science به بازار عرضه شد و بعدها شرکت Roche امتیاز آن را خریداری نمود (۷). در این شیوه ابتدا کتابخانه‌ای از قطعات DNA تهیه می‌شود. به این منظور رشته‌های DNA توسط فشار تنشی شکسته شده و به دو سوی آن‌ها سازگار دهنده عمومی متصل می‌گردد که یکی از آن‌ها دارای بیوتین است (۱۲). سپس قطعات DNA به مهره‌های ۲۸ میکرونی حاوی آغازگر توسط گرایش ذاتی بیوتین-استرپتاودین متصل شده و مرحله تکثیر با روش امولسیون PCR (emPCR) (در قطرات آب داخل محلول روغنی) انجام می‌شود. در ادامه مهره‌هایی که اکنون هرکدام حاوی هزاران کپی از یک قطعه اولیه هستند بر روی پلیتی که دارای میلیون‌ها چاهک با ابعاد پیکولیتری است وارد می‌شوند (۱۳). در هر چاهک علاوه بر یکی از مهره‌های یادشده، کمپلکس آنزیمی نیز قرار می‌گیرد. کمپلکس آنزیمی شامل لوسیفراز Luciferase, DNA پلیمراز (گرفته‌شده از باکتری Bacillus stearothermophilus)، ATP سولفوریلاز ATP sulfurylase و آپیراز apyrase است (۱۴). سپس مرحله تعیین توالی واقعی با ورود چهار نوع نوکلئوتید به‌صورت متوالی و با ترتیب مشخص انجام می‌گردد. به ازای هر پیروفسفات که با ورود نوکلئوتید جدید به زنجیره در حال سنتز آزاد می‌شود طی یک واکنش دومرحله‌ای نور منتشر شده و این نور توسط دوربین ثبت می‌شود. نوکلئوتیدهای اضافی توسط آنزیم آپیراز تجزیه می‌شوند (نشان داده شده در شکل ۱) (۱۵).



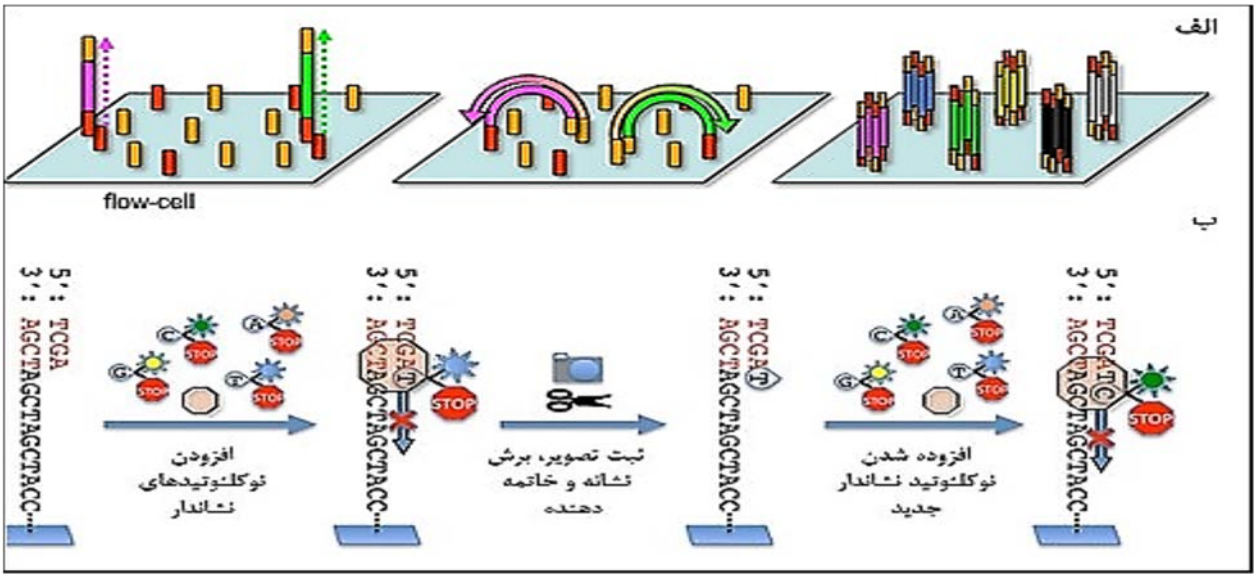
شکل۱- مراحل آماده‌سازی نمونه و انجام فرایند تعیین توالی به روش pyrosequencing. الف) اماده‌سازی کتابخانه ب) اتصال قطعات DNA به مهره‌ها و تکثیر با روش emPCR. ج) شکسته شدن امولسیون روغنی و ورود مهره‌ها به چاهک‌های پیکولیتری پلیت. د) طی واکنش‌های آنزیمی نور تولید می‌شود و با ثبت نور توسط دوربین، تعیین توالی صورت می‌گیرد.

pyrosequencing نسبت به روش تعیین توالی سانگر، دقت خوانش بیشتر و هزینه کمتری دارد، طول توالی خوانده‌شده در این روش در سال ۲۰۰۵ برابر ۱۵۰-۱۰۰ bp و خروجی آن به ازای یک دور اجرای فرایند ۲۰ Mb بود؛ اما در سال ۲۰۰۹

شرکت Roche با انجام تغییراتی توانست طول توالی خوانده‌شده را به bp ۱۰۰۰ و خروجی به ازای یک دور اجرای فرایند طی ۱۰ ساعت را به معادل G ۱۴ برساند (۱۳). با توجه به میزان خروجی و طول توالی خوانده‌شده، pyrosequencing روشی مناسب برای تعیین توالی ژنوم‌های کوچک مانند باکتری‌ها محسوب می‌شود (۱۱). از معایب این روش می‌توان به کاهش دقت در خوانش توالی‌های هموپلیمر بلندتر از پنج باز و زمان‌بر بودن، بخصوص طی مرحله emPCR اشاره کرد (۱۶). به هر صورت ازآنجاکه شرکت Roche اعلام کرده که بعد از سال ۲۰۱۶ دستگاه pyrosequencing را پشتیبانی نخواهد کرد به نظر می‌رسد که دوران فعالیت این دستگاه رو به پایان است (۱۷، ۱۸).

ب- روش تعیین توالی Illumina

شرکت Solexa در سال ۲۰۰۶ دستگاه تعیین توالی خود بانام Genome Analyzer II را معرفی نمود که سال بعد توسط شرکت Illumina امتیاز آن خریداری شد (۱۹). در این شیوه که نوعی تعیین توالی توسط سنتز است ابتدا مولکول DNA با فشار تنشی شکسته شده و به دو سوی قطعات، سازگاردهنده افزوده می‌شود. سپس این قطعات به آغازگرهای متصل به سطح اسلاید flow-cell وصل و تکثیر می‌گردند (flow-cell سطحی مستحکم است که آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی به‌صورت متراکم از طریق پیوندهای کووالان از انتهای ۵´ به آن متصل شده‌اند) (نشان داده شده در شکل ۲) (۲۰). مرحله تکثیر به روش bridge-PCR amplification انجام می‌شود. در این مرحله از هر قطعه حدود یک‌میلیون نسخه دو رشته‌ای حاصل می‌شود که در نواحی کوچک به‌صورت خوشه‌های متمرکز[1] قرار می‌گیرند (۲۱). تکثیر، شدت سیگنال موردنیاز برای تشخیص در مرحله تعیین توالی را تضمین می‌کند. پس از انجام این مرحله، خوشه‌ها واسرشت شده و به‌صورت تک‌رشته‌ای درمی‌آیند تا در مرحله بعد به کار روند. مرحله بعدی، مرحله اصلی تعیین توالی است طی این مرحله چهار نوع dNTP که هرکدام حامل یک نوع رنگ فلورسنت هستند (3´-O-azidomethyl- fluorescently labeled dNTPs) توسط DNA پلیمراز به رشته‌ای که با کمک آنزیم (linearization enzyme) تک رشته شده افزوده می‌شوند (۲۲). با ورود هر نوکلئوتید نشان‌دار چون انتهای ۳´ آن مسدود است واکنش برای لحظاتی متوقف‌شده، نوکلئوتیدهای اضافی از محیط شسته و در این زمان تصویر توسط دوربین ثبت می‌شود. سپس مسدودیت انتهای ۳´ با حذف رنگ فلورسنت برطرف شده و این روند (ورود نوکلئوتید نشان‌دار، شستشو، ثبت تصویر و برش



شکل۲- تعیین توالی به روش ایلومینا. الف) مرحله تکثیر با روش bridge PCR. قطعات DNA الگو (سبز و صورتی) با آغازگرهای متصل به سطح اسلاید جفت می‌شوند. DNA تازه سنتز شده برای اتصال با آغازگر مجاور خم‌شده و به‌صورت پل درمی‌آید. محصول تکثیر هر قطعه به شکل خوشه‌ای قرار می‌گیرد. ب) مرحله تعیین توالی روندی متوالی از ورود نوکلئوتید نشان‌دار، شستشو، ثبت تصویر، برش نشانه و ایجاد ۳´OH آزاد است. با آنالیز رنگ‌های ثبت‌شده تعیین توالی انجام می‌شود.

[1] - clusters

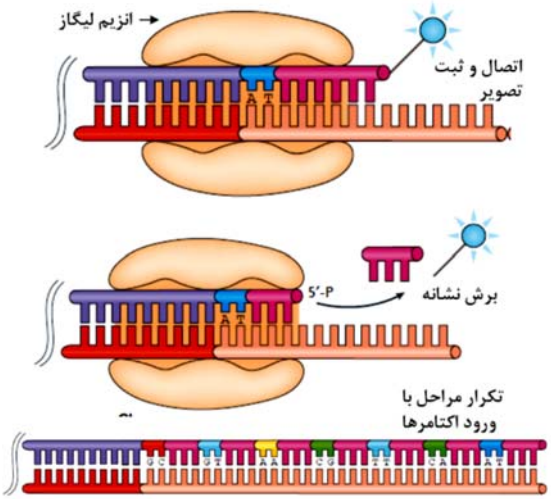
نشانه) تکرار می‌گردد (۲۳). ازآنجاکه خاتمه زنجیره در این روش مانند روش سانگر دائمی نیست و با برش رنگ فلورسنت ادامه واکنش از سر گرفته می‌شود این روش را cyclic reversible termination می‌نامند (۲۴، ۲۵).

در این شیوه طول توالی خوانده‌شده به ۳۰۰ باز رسیده است و در خوانش توالی نواحی هموپلیمر عملکرد بهتری نسبت به روش pyrosequencing دارد (۱۷) اما مهم‌ترین نقطه‌ضعف آن همچنان محدودیت طول توالی خوانده‌شده است که ناشی از مزاحمت رنگ فلورسنت در فعالیت آنزیم پلیمراز بوده (۲۹) و سبب کاهش کارایی این شیوه در تعیین توالی de novo می‌گردد (۲۷).

در حال حاضر Illumina مجموعه‌ای از دستگاه‌های تعیین توالی را تولید کرده که برای عملکردهای متنوع (علاوه بر آنالیز توالی در آنالیز ترنسکریپوم و متیلاسیون) در سطوح مختلف (آزمایشگاه‌های بالینی و یا آزمایشگاه‌های تحقیقاتی) کاربرد دارند. رایج‌ترین پلت فرم‌های آن MiSeqها و HiSeqها هستند. MiSeqها برای آزمایشگاه‌های تشخیص طبی طراحی شده‌اند. این دستگاه‌ها سرعت عمل بالایی دارند و برای تعیین توالی ژنوم‌های کوچک مثل باکتری‌ها و بخش‌های خاص از ژنوم مناسب می‌باشند؛ اما HiSeqها در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی کاربرد دارند. ازجمله آن‌ها HiSeq 2500 است که طی ۶ روز ۱Tb اطلاعات فراهم می‌کند. به‌عبارت‌دیگر طی ۲۷ ساعت معادل ۳۰ برابر ژنوم انسان را می‌تواند تعیین توالی کند. یکی دیگر از نسخه‌های HiSeq که در اوایل سال ۲۰۱۴ معرفی شد HiSeq X Ten است که برای تعیین توالی کل ژنوم (WGS) کاربرد دارد. این نسخه از پلت فرم HiSeq طی ۳ روز ۱/۸Tb را تعیین توالی می‌کند که معادل ژنوم ۱۸۰۰۰ انسان با عمق۳۰۳ طی یک سال است (۲۴). شرکت Illumina مدعی است با پیشرفت‌های متنوعی که در سیستم نوری و flow cells این نسخه انجام داده توانسته به هدف‌گذاری NHGRI که هزینه ۱۰۰۰ دلار امریکا برای تعیین توالی ژنوم هر فرد بود دست پیدا کند (۲۸). این دستاورد می‌تواند تحولی در مطالعه ژنتیک جمعیت‌ها ایجاد نماید. بررسی توالی ژنوم در سطح جمعیت‌ها به درک اساس ژنتیکی سلامت و بیماری و نیز ایجاد ارتباط بین اطلاعات فنوتیپی و ژنومیک افراد کمک نموده و مفهوم پزشکی شخصی را به واقعیت نزدیک نموده است (۲۶).

ج- روش تعیین توالی SOLiD

فناوری SOLiD (Sequencing by Oligo Ligation Detection) توسط Applied Bioscience در پایان سال ۲۰۰۷ به‌صورت تجاری عرضه شد. در این روش ابتدا کتابخانه DNA تهیه شده و سپس تکثیر قطعات DNA روی دانه‌های پوشیده از آغازگر (مهره‌های پارامغناطیسی ۱μM) با روش emPCR انجام می‌شود (روش تهیه کتابخانه و تکثیر مشابه فناوری pyrosequencing است) (۲۶). سپس هرکدام از این مهره‌ها روی سطح شیشه‌ای (SOLiD flow cell) به‌صورت تصادفی توزیع‌شده و تعیین توالی توسط آنزیم لیگاز به‌جای پلیمراز (Sequencing-by-Ligation) انجام می‌شود. به این منظور ابتدا آغازگر عمومی به یکی از سازگاردهنده‌ها جفت شده و سپس کاوشگرهای فلورسنت ۸ نوکلئوتیدی[2] برای جفت شدن با قطعات حاصل از تکثیر در مجاورت آغازگر عمومی باهم رقابت می‌کنند. (به شکل ۳ مراجعه شود) کاوشگرهای الیگونوکلئوتید شامل جایگاه اتصال (اولین باز)، جایگاه برش (پنجمین باز) و ۴



شکل۳- تعیین توالی توسط روش SOLiD. کاوشگرهای الیگونوکلئوتیدی توسط لیگاز متصل و پس از ثبت تصویر بازهای انتهایی و نشانه فلورسنت متصل به آن حذف می‌شود؛ و این روند تا دو رشته شدن کل زنجیره ادامه می‌یابد سپس رشته تازه سنتز شده واسرشت و حذف‌شده و دور دیگری از فرایند با آغازگر کوتاه‌تر تکرار می‌شود.

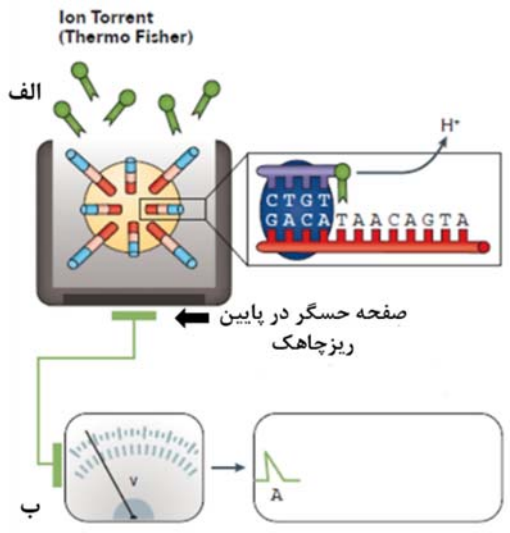
رنگ فلورسنت مختلف (متصل به آخرین باز) هستند. ازآنجاکه دو باز ابتدایی معین کننده نوع رنگ فلورسنت متصل به کاوشگر بوده و به‌صورت هم‌زمان دو نوکلئوتید را مورد بررسی قرار

[2] - Octamer Oligonucleotide Probes

می‌دهند کاوشگرها به‌عنوان di-base probes شناخته می‌شوند (۳۰). با جفت شدن کاوشگرهای الیگونوکلئوتیدی به رشته الگو سیگنال فلورسنت ثبت شده و توسط برش شیمیایی بین پنجمین و ششمین نوکلئوتید کاوشگر سیگنال حذف می‌گردد. پس از برش، کاوشگر اکتامر دیگری متصل شده و چرخه اتصال جدیدی شکل می‌گیرد. با این روند از هر گروه پنج‌تایی دو باز ابتدایی آن شناسایی می‌شود و درنهایت کل قطعه به‌صورت دو رشته‌ای درمی‌آید. سپس رشته تازه سنتز شده و آغازگر عمومی از رشته DNA اولیه جدا شده و آغازگر عمومی جدیدی که به‌اندازه یک نوکلئوتید از آغازگر مرحله قبل کوتاه‌تر است (n - 1) اضافه می‌گردد. برای تعیین توالی کل بازها این فرایند پنج بار با پنج آغازگر عمومی تکرار می‌شود (آغازگرهایی با اندازه n تا n-4 به کار می‌رود) (۲۱). در این روش هر نوکلئوتید موجود در هر یک از قطعات دو بار، در دو واکنش اتصال مستقل شناسایی می‌شود و درنتیجه میزان صحت تعیین توالی به ٪۹۹/۹۹ ~ می‌رسد که مهم‌ترین مزیت این فناوری محسوب می‌شود (۲۴)؛ اما اساسی‌ترین عامل محدودکننده کوتاه بودن طول توالی خوانده‌شده است که حتی در جدیدترین نسخه‌های بهسازی شده نیز حداکثر به ۷۵ نوکلئوتید می‌رسد (۳۱).

د- روش تعیین توالی نیمه‌رسانا Ion Torrent

دستگاه تعیین توالی نیمه‌رسانا Ion Torrent در سال ۲۰۱۰ در فرم رومیزی آن به نام Personal Genome Machine (PGM) توسط Life Technologies به‌صورت تجاری عرضه شد. مراحل آماده‌سازی نمونه و تعیین توالی مشابه روش Roche/454 pyrosequencing است. از emPCR برای تکثیر قطعات حاوی سازگار دهنده متصل به مهره‌ها استفاده شده و سپس مهره‌ها در ریزچاهک‌ها توزیع می‌شوند. در ریزچاهک‌ها تعیین توالی توسط سنتز رخ می‌دهد اما برخلاف pyrosequencing که از واکنش‌های نوری برای تعیین توالی استفاده می‌شود در این روش تغییرات pH ناشی از آزاد شدن یون‌های هیدروژن هنگام پلیمریزه شدن DNA بررسی می‌گردد. تغییرات pH توسط صفحات حسگر که در پایین ریزچاهک‌ها قرار گرفته‌اند شناسایی و به‌صورت تغییر ولتاژ ثبت می‌شوند (نشان داده شده در شکل ۴) (۳۲). در این شیوه نیز انواع نوکلئوتیدهای T–A–C–G به‌صورت پی‌درپی به واکنش افزوده می‌شوند و به‌این‌ترتیب امکان شناسایی نوع نوکلئوتید افزوده‌شده با علائم ولتاژی فراهم می‌گردد (۲۵). Ion Torrent با حذف نیازمندی به مواد فلورسنت و دوربین سبب شده در کنار افزایش سرعت، هزینه‌ها کمتر و ابعاد دستگاه کوچک‌تر شود. در مورد هموپلیمرها متناسب با



شکل ۴- تعیین توالی نیمه‌رسانا. الف) تعیین توالی داخل ریزچاهک انجام می‌شود. dNTP به زنجیره در حال رشد اضافه و یون هیدروژن آزاد می‌گردد. ب) صفحه حسگر تغییر pH را شناسایی و به‌صورت تغییر ولتاژ ثبت می‌نماید.

تعداد نوکلئوتیدهای رشته الگو، شدت سیگنال افزایش می‌یابد؛ اما این ارتباط خطی نیست و امکان تشخیص صحیح در مورد توالی‌های بلندتر از شش بازی کم می‌شود (۲۹).

در ادامه Ion Torrent دومین دستگاه تعیین توالی خود به نام Ion Proton را در سال ۲۰۱۲ عرضه کرد که میزان خروجی آن نسبت به PGM افزایش چشمگیری نشان می‌داد. این دو پلت فرم با توجه به میزان خروجی برای اهداف تحقیقاتی متفاوت کارایی دارند. خروجی PGM برابر ۱Gb در مدت ۳-۲ ساعت است و در مورد Ion Proton برابر ۱۰ Gb در مدت‌زمان ۸-۲ ساعت است. با این حساب PGM برای تعیین توالی بخش‌های خاص از ژنوم و Ion Proton برای تعیین توالی کل ژنوم کاربرد دارد (۱۸).

ه- روش تعیین توالی SMRT

فناوری SMRT (Single Molecular Real Time) از روش‌های تعیین توالی نسل سوم است که توسط Pacific Bioscience (کانادا) در سال ۲۰۱۰ به‌صورت تجاری عرضه شد (۸).

این روش بر اساسِ فرآیند طبیعی همانندسازی DNA (sequencing by synthesis) طراحی‌شده که امکان

مشاهده سنتز DNA هنگام وقوع واکنش آنزیمی را امکان‌پذیر می‌سازد. در این روش تعیین توالی درون چاهک‌هایی به نام zero-mode waveguides (ZMWs) با قطر ۱۰ nm انجام می‌شود (۳۳). در کف چاهک‌های ZMW آنزیم DNAپلیمراز و رشته الگو تثبیت‌شده و سنتز DNA در این ناحیه صورت می‌گیرد. ZMW انرژی ساطع‌شده از لیزر را به‌صورت دقیق در ناحیه‌ای که DNAپلیمراز قرار گرفته متمرکز کرده و به‌این‌ترتیب منطقه تشخیص به ناحیه بسیار کوچکی محدود می‌شود. زمانی که نوکلئوتید نشان‌دار به جایگاه فعال DNA پلیمراز متصل می‌گردد سرعت حرکت کاهش‌یافته و فرصت شناسایی نشانه فلورسنت ایجاد می‌شود. نوآوری کلیدی که در این فناوری انجام شده نشاندارسازی فسفات گامای نوکلئوتیدها (به‌جای باز) با مواد فلورسنت است که ضمن ورود نوکلئوتید به رشته در حال سنتز فلوروفور همراه پیروفسفات آزادشده و درنتیجه هیچ‌گونه ممانعت فضایی برای طول رشته در حال ساخت ایجاد نمی‌کند و همین امر سبب افزایش طول توالی خوانده‌شده می‌گردد. همچنین شناسایی فلوروفور آزادشده به ناحیه‌ای بسیار کوچک در کف چاهک‌ها محدود می‌شود (توسط متمرکز کردن نور لیزر) بنابراین حضور مخلوطی از نوکلئوتیدهای نشان‌دار هنگام انجام واکنش بلامانع بوده و سنتز رشته جدید به‌صورت فرایندی پیوسته دنبال می‌گردد (۳۴).

تعیین توالی بر اساس این روش دارای مزایای زیر است:

۱- امکان تجزیه‌وتحلیل منحصربه‌فرد تک مولکول DNA و عدم نیاز به انجام PCR در مرحله آماده‌سازی نمونه که سبب کاهش انحرافات و اشتباه‌های ناشی از PCR می‌شود.

۲- طول توالی خوانده‌شده بلندتر از ۱۰۰۰ جفت باز است که امکانِ تعیین نقش ژنی و سرهم کردن اطلاعات توالی موردنظر را تسهیل می‌کند.

۳- نتیجه تعیین توالی می‌تواند در یک روز آماده شود (۲۲).

PacBio RS II تنها دستگاه تجاری در دسترس از این نوع فناوری است که در آن ۱۵۰ هزار چاهک ZMWs در هر SMRT cell تعبیه شده است. میانگین طول توالی خوانده‌شده با این دستگاه >14 kb است اما در برخی موارد ایزوله طول خوانش ممکن است به 60 kb نیز برسد. علیرغم مزیت‌هایی همچون بلندی توالی خوانده‌شده که فرایند سرهم کردن توالی‌ها را ساده می‌کند و عدم نیاز به تکثیر نمونه اولیه و نیز تعیین توالی در زمان واقعی، اما همچنان بازدهی پایین‌تر و هزینه‌های بالاتر این روش در مقایسه با فناوری نسل دوم از اشکالات مهم این شیوه است (۱۸). همچنین نرخ خطا در این شیوه حدود ۱۱ تا ۱۴٪ است که برای کاهش آن بایستی رشته الگو چندین بار خوانده شود (۳۵).

و- روش تعیین توالی Nanopore

از دیگر روش‌های تعیین توالی نسل سوم، فناوری Nanopore است (۲۴). این سیستم شامل نانوحفره‌هایی است که روی غشا (زیستی یا مصنوعی) قرار گرفته‌اند و غشا در محلول نمکی غوطه‌ور شده است. به کار انداختن جریان الکتریکی در این سیستم سبب هدایت یون‌ها از نانوحفره‌ها در جهت شیب غلظت می‌گردد (۳۶). ورود مولکول DNA به نانوحفره در برابر جریان عبوری یون‌ها مقاومتی ایجاد می‌کند که منجر به تغییر شدت‌جریان عبوری از منافذ می‌گردد و این تغییر شدت‌جریان برای هر یک از انواع نوکلئوتیدها برحسب اندازه و شکل فضایی متفاوت و قابل‌سنجش توسط دستگاه Nanopore است. با اندازه‌گیری این تغییرات امکان تعیین توالی DNA فراهم می‌گردد (۳۷).

فناوری تعیین توالی Nanopore مزیت‌هایی بر NGS دارد:

۱- طول توالی خوانده‌شده به‌طور متوسط بیشتر از ۵ kb است.

۲- نیازی به مواد فلورسنت جهت شناسایی بازها وجود ندارد.

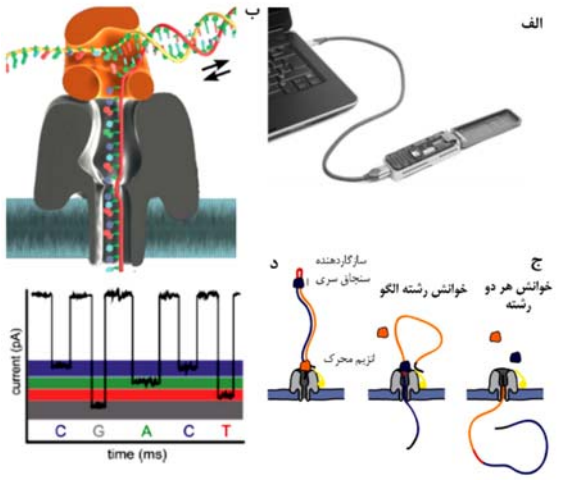
۳- در این روش به‌جز استفاده از اگزونوکلئاز جهت تک رشته سازی و یا جداسازی نوکلئوتیدها حین عبور از نانومنفذها نیازمندی دیگری به آنزیم وجود ندارد. چنین شرایطی به این مفهوم است که روش Nanopore حساسیت کمتری به درجه حرارت طی واکنش تعیین توالی داشته و نتایج قابل‌اعتمادتری از آن حاصل می‌شود.

۴- ازآنجاکه تعیین توالی در این شیوه روی مولکول DNA تک رشته انجام می‌شود و هیچ‌گونه همانندسازی رخ نمی‌دهد بنابراین نیازی به مراحل کلونینگ و امپلیفیکاسیون نبوده و زمان آماده‌سازی نمونه نیز به میزان قابل‌توجهی کاهش می‌یابد (۲۹).

در حال حاضر دو مسیر اصلی برای تعیین توالی توسط Nanopore دنبال می‌گردد اول استفاده از غشاهای زیستی و دوم غشاهای مصنوعی (۳۸).

Oxford Nanopore Technologies (ONT) ازجمله شرکت‌هایی است که بر تعیین توالی DNA توسط فناوری Nanopore بر اساس غشاهای زیستی تمرکز نموده است.

MinION نخستین دستگاه تعیین توالی DNA با فناوری Nanopore است که توسط ONT در اوایل سال ۲۰۱۴ به‌صورت تجاری عرضه شد (۳۹). دستگاهی قابل‌حمل با ابعادی معادل یک



شکل۵- فناوری تعیین توالی Nanopore. الف) دستگاه تعیین توالی MinION ONTsمتصل شده به لپ‌تاپ. ب) نانوحفره درون غشا تعبیه و در محلول نمکی غوطه‌ور شده است. ج) مولکول DNA از هر دو سمت به سازگاردهنده متصل شده و به‌صورت تک رشته از منافذ عبور می‌نماید. د) عبور نوکلئوتیدها از منافذ سبب تغییر شدت‌جریان یون‌ها شده و با ثبت این تغییرات (برحسب پیکوآمپر بر هزارم ثانیه) امکان تمایز انواع نوکلئوتیدها فراهم می‌گردد.

USB که قیمت آن حدود ۹۰۰ دلار است (نشان داده شده در شکل ۵) (۳۷). در این شیوه طی مرحله آماده‌سازی کتابخانه، مولکول DNA دو رشته به‌صورت قطعه‌قطعه درآمده و به هر دو انتهای قطعات، سازگاردهنده متصل می‌گردد. یکی از این سازگاردهنده‌ها آنزیم جلوبرنده و دیگری الیگونوکلئوتید سنجاق سری است. آنزیم جلوبرنده امکان عبور مولکول DNA از منافذ به‌صورت تک رشته را فراهم می‌کند و سازگار دهنده سنجاق سری مانند یک گیره عمل کرده و کمک می‌کند که پس از باز شدن پیوندهای هیدروژنی دو رشته به‌صورت دنبال هم قرار گرفته و امکان تعیین توالی هر دو رشته DNA فراهم شود (۱۸) و میزان صحت فرایند تعیین توالی افزایش یابد (۴۰)؛ اما نرخ خطای این دستگاه حدود ۱۲٪ است. ONT در سال ۲۰۱۵ اعلام کرد به‌منظور افزایش بازدهی و دقت MkII را جایگزین MinION می‌نماید (۴۱).

با در نظر گرفتن نرخ خطای بالا و بازدهی پایین فناوری Nanopore بعید به نظر می‌رسد که این شیوه به‌زودی بتواند بر روش‌های تعیین توالی کنونی پیشی گیرد؛ اما مجموعه‌ای از مزیت‌ها مانند سرعت، طول توالی خوانده‌شده، ابعاد و قیمت دستگاه می‌تواند در آینده آن را به روشی مطلوب تبدیل نماید (۴۲).

بحث و نتیجه گیری

ظهور فناوری‌های تعیین توالی با توان عملیاتی بالا (HTS) محققان را قادر به مطالعه سیستم‌های بیولوژیکی در سطحی نموده که پیش‌ازاین هرگز امکان‌پذیر نبوده است (۴۳). درحالی‌که نسل اول تعیین توالی بیش از ۳۰ سال متداول بود و همچنان به‌عنوان روش استاندارد طلایی در نظر گرفته می‌شود (۱۱) در سال‌های اخیر تغییرات در شیوه‌های تعیین توالی شتاب گسترده‌ای یافته است. نسل‌های جدید فناوری تعیین توالی هیچ‌یک به‌صورت کامل جایگزین شیوه‌های قبلی نمی‌شوند و درواقع روش‌های مختلف برحسب هدف بررسی امکان درک کامل و همه‌جانبه ژنوم را فراهم می‌نمایند (۳۷). دانشمندان درصددند فناوری‌های جدیدی برای کاهش هزینه و زمان در کنار افزایش دقت و طول توالی خوانده‌شده ارائه دهند. با پیشرفت این فناوری‌ها تعداد فزاینده‌ای از روش‌های آماده‌سازی نمونه و ابزارهای تجزیه‌وتحلیل اطلاعات پدیدار گشته که دارای کاربردهای مختلف در علوم زیستی هستند. به‌این‌ترتیب HTS به فناوری کلیدی در علوم پایه تبدیل‌شده است. به نظر می‌رسد با کاهش هزینه‌ها و زمان در آینده نزدیک شیوه‌های متنوع فناوری تعیین توالی به ابزارهای کاربردی، متداول و استاندارد آزمایشگاه‌های بالینی تبدیل شده (۴۴) و به‌عنوان روش انتخابی برای غربالگری انواع مختلف سرطان‌ها، شناسایی سریع میکروب‌های بیماری‌زا (۳۱) و یا تشخیص پیش از تولد ناهنجاری‌های کروموزومی با روش‌های غیرتهاجمی (با استفاده از سلول‌های جنینی موجود در سیستم گردش خون مادری) (۱۸) درآیند.

تشکر و قدردانی

از اساتید گروه ژنتیک دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز که در گردآوری، تصحیح و جمع‌بندی اطلاعات ما را یاری نمودند سپاس‌گزاریم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1977; 74(2):560-4.
2. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. Journal of molecular biology. 1975; 94(3):441-8.
3. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74(12):5463-7.
4. Gilbert W, Maxam A. The nucleotide sequence of the lac operator. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1973;70(12):3581-4.
5. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature. 2004;431(7011):931-45.
6. Schloss JA. How to get genomes at one ten-thousandth the cost. Nature biotechnology. 2008;26(10):1113.
7. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, *et al*. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature. 2005; 437(7057):376-80.
8. Roberts RJ, Carneiro MO, Schatz MC. The advantages of SMRT sequencing. Genome biology. 2013;14(7):1.
9. Wang Y, Yang Q, Wang Z. The evolution of nanopore sequencing. Frontiers in genetics. 2015;5: 449-469.
10. Timp W, Mirsaidov UM, Wang D, Comer J, Aksimentiev A, Timp G. Nanopore sequencing: electrical measurements of the code of life. IEEE transactions on nanotechnology. 2010;9(3):281-94.
11. Ari Ş, Arikan M. Next-Generation Sequencing: Advantages, Disadvantages, and Future. Plant Omics: Trends and Applications.2016;1: 109-135.
12. Anderson MW, Schrijver I. Next generation DNA sequencing and the future of genomic medicine. Genes. 2010;1(1):38-69.
13. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. Trends in genetics. 2014;30(9):418-26.
14. Mutz KO, Heilkenbrinker A, Lönne M, Walter JG, Stahl F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. Current opinion in biotechnology. 2013;24(1):22-30.
15. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. Nature biotechnology. 2008;26(10):1135-45.
16. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. Genomics. 2016;107(1):1-8.
17. Buermans HP, Den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: advances and applications. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2014;1842(10):1932-41.
18. Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-throughput sequencing technologies. Molecular cell. 2015; 58(4):586-97.
19. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, *et al*. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature. 2008; 456(7218):53-9.
20. Koboldt DC, Larson DE, Chen K, Ding L, Wilson RK. Massively parallel sequencing approaches for characterization of structural variation. Genomic Structural Variants: Methods and Protocols. 2012; 838:369-84.
21. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2008;9:387-402.
22. Guo J, Xu N, Li Z, Zhang S, Wu J, Kim DH, *et al*. Four-color DNA sequencing with 3′-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008; 105(27):9145-50.
23. Dohm JC, Lottaz C, Borodina T, Himmelbauer H. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. Nucleic acids research. 2008; 36(16):1-10
24. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, *et al*. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2012; 251364:1-11.
25. Morey M, Fernández-Marmiesse A, Castiñeiras D, Fraga JM, Couce ML, Cocho JA. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. Molecular genetics and metabolism. 2013; 110(1):3-24.
26. Harismendy O, Ng PC, Strausberg RL, Wang X, Stockwell TB, Beeson KY, *et al*. Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. Genome biology. 2009; 10(3):1.
27. Chen F, Dong M, Ge M, Zhu L, Ren L, Liu G,et al. The history and advances of reversible terminators used in new generations of sequencing technology. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2013 11(1):34–40.
28. Sheridan C. Illumina claims [dollar] 1,000 genome win. *Nature Biotechnology. 2014;* **32**:115.
29. Clarke J, Wu HC, Jayasinghe L, Patel A, Reid S, Bayley H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. Nature nanotechnology.2009;4(4):265-70.
30. Pu D, Chen J, Bai Y, Tu J, Xie H, Wang W, Xiao P, Lu Z. Sequencing-by-ligation using oligonucleotide probes with 3′-thio-deoxyinosine. Journal of biomedical nanotechnology. 2014;10(5):751-9.
31. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nature Reviews Genetics. 2016;17(6):333-51.
32. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, *et al*. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature. 2011; 475(7356):348-52.

33. Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. Human molecular genetics. 2010;19(R2):R227-40.
34. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, *et al*. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. Science. 2009;323(5910):133-8.
35. Carneiro MO, Russ C, Ross MG, Gabriel SB, Nusbaum C, DePristo MA. Pacific biosciences sequencing technology for genotyping and variation discovery in human data. BMC genomics. 2012; 13(1):375-382.
36. Stoloff DH, Wanunu M. Recent trends in nanopores for biotechnology. Current opinion in biotechnology. 2013; 24(4):699-704.
37. McGinn S, Gut IG. DNA sequencing–spanning the generations. New biotechnology. 2013; 30(4):366-72.
38. Schneider GF, Dekker C. DNA sequencing with nanopores. Nature biotechnology. 2012; 30(4):326-8.
39. Ashton PM, Nair S, Dallman T, Rubino S, Rabsch W, Mwaigwisya S, *et al*. MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. Nature biotechnology. 2015; 33(3):296-300.
40. Quick J, Quinlan AR, Loman NJ. Erratum: A reference bacterial genome dataset generated on the MinIONTM portable single-molecule nanopore sequencer. GigaScience. 2015; 4(1):4-6.
41. Bleidorn C. Third generation sequencing: technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research.Systematics and Biodiversity. 2016; 14(1):1-8.
42. Mosher JJ, Bowman B, Bernberg EL, Shevchenko O, Kan J, Korlach J, *et al*. Improved performance of the PacBio SMRT technology for 16S rDNA sequencing. Journal of microbiological methods. 2014; 104:59-60.
43. Weber-Lehmann J, Schilling E, Gradl G, Richter DC, Wiehler J, Rolf B. Finding the needle in the haystack: differentiating “identical” twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. Forensic Science International: Genetics. 2014;9:42-6.
44. Ku CS, Roukos DH. From next-generation sequencing to nanopore sequencing technology: paving the way
to personalized genomic medicine. Expert review of medical devices. 2013;10(1):1-6.

Review Article

An Overview of the Second and Third-Generation of DNA Sequencing Technologies

Ghorbani Parsa F, Hossein Pour Feizi MA*

Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: 22 Jan 2017 Accepted: 18 Jul 2017

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 in a molecule of nucleic acid. Knowledge of DNA sequences has become indispensable for the basic biological researches. Nucleotides sequence determination is used in numerous applied fields such as diagnostics, biotechnology, forensic biology and biological systematics. The advent of DNA sequencing has significantly accelerated biological researches and discoveries.

There are several generations of DNA sequencing technologies that can be well characterized through their nature and the kind of output they provide. Dideoxy terminator sequencing developed by Sanger dominated for 30 years and was the workhorse used for the Human Genome Project. In 2005 the first 2nd generation sequencer was presented with an output orders of magnitude higher than Sanger sequencing and dramatically decreased cost. We are now at the dawn of the 3rd generation of sequencing systems.

Researchers in the field of genetics in Iran use this technology in their studies, but unfortunately our literature lacks proper Persian language resources. This review briefly describes the current high-throughput nucleotide sequencing platforms commercially available.

Key Words: DNA sequencing, High Throughput Nucleotide Sequencing, second generation sequencing, third generation sequencing

***Corresponding Author: MohammadAli Hossein Pour Feizi,** Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
E-mail: pourfeizi@eastp.ir

Journal of Fasa University of Medical Sciences 7 (2018): 428-437