# توالی یابی نسل جدید و کاربرد آن در تشخیص بیماری‌های ژنتیک


• **نادیا پورمشیر**

**کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک**

• **فرزانه محمدی فارسانی**

**دانشجوی دکتری ژنتیک، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک**

• **دکتر صادق ولیان بروجنی**

**متخصص ژنتیک پزشکی، استاد ژنتیک، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک**

**svallian@sci.ui.ac.ir**



## چکیده

در دهه اخیر با ظهور تکنولوژی توالی یابی نسل جدید (Next Generation Sequencing, NGS)، توالی‌یابی ژن‌ها و تشخیص بیماری‌های ژنتیکی وارد عرصه جدیدی شده است. با استفاده از این تکنیک این امکان فراهم گردیده تا در خصوص تشخیص علت ژنتیکی بسیاری از بیماری‌ها و سندروم‌ها از جمله اختلالات و ناهنجاری‌های مادرزادی که قبلا بواسطه محدودیت‌های تکنیک‌های مورد استفاده تحت عنوان "با علل نامعلوم" بیان می‌گردید، مشخص شود. در واقع تکنولوژی NGS از یکسری روش‌ها متشکل از آماده سازی اولیه و قطعه قطعه کردن نمونه ژنوم مورد مطالعه، توالی یابی، تصویر برداری و مرئی سازی، سرهم کردن قطعات توالی یابی شده و آنالیز داده‌ها می‌باشد. از کاربردهای این روش نوین می‌توان به بهبود چشمگیر در تشخیص بیماری‌های ژنتیکی، تشخیص ژنتیکی پیش از لانه گزینی، فارماکوژنومیکس، اپی ژنتیک و شناسایی تنوعات ساختاری در ژنوم اشاره نمود. در این نوشتار ضمن معرفی تکنیک NGS، اهمیت و کاربرد روز افزون آن در تشخیص مولکولی بیماری‌های ژنتیکی به طور اجمالی بررسی می‌شود.



**واژه‌های کلیدی:** توالی یابی نسل جدید، تشخیص بیماری‌های ژنتیکی، تعیین توالی ژنوم


## مقدمه

در دهه ۱۹۷۰، سنگر و همکاران و همچنین ماکسام و گیلبرت روش‌هایی برای توالی یابی DNA توسط تکنیک‌های خاتمه زنجیره و تکه تکه شدن ارائه دادند. در این بین به سبب این‌که روش سنگر، نیاز به دست ورزی و استفاده کمتر از مواد شیمیایی سمی و رادیو ایزوتوپ نسبت به روش ماکسام و گیلبرت داشت، به عنوان روش تعیین توالی اصلی انتخاب شد و این امر علم زیست شناسی را متحول نمود (۱). اما وجود معایبی در روش‌های توالی یابی نسل اول از جمله محدودیت‌های داخلی در توان عملیاتی، مقیاس پذیری، سرعت و تفکیک پذیری و هزینه‌ها سبب کندشدن دسترسی محققان به اطلاعات اساسی مورد نیاز شده بود. لذا برای غلبه بر این موانع و همچنین نیاز رو به رشد به توالی یابی ژنوم فردی به صورت سریع، کم هزینه و دقیق لزوم تغییر از روش سنتی تعیین توالی سنگر به سمت استفاده از تکنولوژی جدید یا "توالی یابی نسل جدید[1] (NGS)" وجود داشت. این فن آوری اساسا رویکردی متفاوت در توالی یابی است که تا کنون منجر به کشفیات متعددی شده و تحولی بزرگ در علوم ژنومیک پدید آورده است.

1- Next Generation Sequencing




[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04 ]

این تکنیک همچنین به عنوان روش سنگر خودکار و یا توالی یابی انبوه موازی (MPS)[1] در سال ۲۰۰٤ معرفی شد (۲). در واقع این واقعیت که رمزگشایی ژنوم انسان سرنخ‌های مهمی درباره ژنتیک بیماری‌ها و همچنین توسعه پیشگیری تخصصی تر را فراهم می‌نماید، استراتژی‌های تشخیصی و درمانی را در دهه گذشته به طور گسترده‌ای معطوف استفاده از تعیین توالی و نقشه برداری ژنومی کرده است (۳).

## ۱-چگونگی عملکرد توالی یابی نسل جدید

نسل جدید توالی یابی سه بهبود عمده نسبت به نسل قبلی دارد: ۱) به جای نیاز به شبیه سازی باکتریایی قطعات DNA، مبتنی بر تهیه کتابخانه‌های NGS در یک سیستم مستقل از سلول می‌باشد، ۲) در آن میلیون‌ها واکنش توالی یابی به موازات هم انجام می‌شوند و ۳) خروجی تعیین توالی به طور مستقیم و بدون نیاز به الکتروفورز نمایان می‌شود (٤). به طور کلی این نوع توالی یابی در سه مرحله انجام می‌شود. در مرحله اول نمونه ژنومی (DNA یا cDNA[2]) به کتابخانه‌ای از قطعات کوچک تقسیم می‌شود و در ادامه آداپتورها (الیگونوکلئوتیدهای مصنوعی با توالی شناخته شده) بر انتهای این قطعات متصل خواهد شد. سپس این کتابخانه‌ها تکثیر شده تا برای توالی یابی آماده شوند (۵). مرحله دوم که تعیین توالی و تصویر برداری می‌باشد، بر مبنای ساخته شدن و تولید قطعات است و طی آن هر کدام از قطعات کتابخانه به عنوان یک واحد ژنومی الگو عمل کرده و رشته‌های جدیدی را ایجاد می‌کنند. در حال حاضر انواع مختلفی از تعیین توالی نسل جدید توسط کمپانی‌های ژنومیکس عرضه شده است. در جدول شماره ۱ تعدادی از روش‌های مزبور با روش سنگر مقایسه شده‌اند.

**جدول ۱. مقایسه انواع روش‌های تعیین توالی در توالی یابی نسل جدید**

| دستگاه | Pacbio | Ion Torrent | Illumina | SOLiD | sanger |
|---|---|---|---|---|---|
| روش | همانند سازی DNA Single-molecule in) (real-time | سیستم شناسایی نیمه رسانا | سنتز با رنگ‌های پایان دهنده ولی برگشت پذیر | اتصال و امولسیون PCR | خاتمه زنجیر |
| طول توالی شناسایی شونده | به طور متوسط 3Kbp | 200bp | 50-250bp | 50+35 یا 20+50 | 400-900bp |
| نوع جهش تشخیصی | درج یا حذف بازها | درج یا حذف بازها | جایگزینی بازها | جابجایی بازهای A-T | درج یا حذف بازها |
| دقت | ٪۸۷(در حالت read length) ٪۹۹(در حالت accuracy) | ٪۹۸ | ٪۹۸ | ٪۹۹/۹ | ٪۹۹/۹ |
| مجموعه توالی‌های شناسایی شده در هر اجرا | ۷۵۰۰۰-۳۵۰۰۰ | تا ۵ میلیون | تا ۳ میلیارد | ۱/۲ تا ۱/٤ میلیارد | N/A |
| زمان هر اجرا | ۳۰ دقیقه تا ۲ ساعت | ۲ ساعت | ۱ تا ۱۰روز (بسته به دستگاه توالی خوان و طول توالی) | ۱ تا ۲ هفته | ۲۰دقیقه تا ۳ ساعت |
| هزینه توالی یابی هر میلیون باز | ۲ دلار | ۱دلار | ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ دلار | ۰/۱۳ دلار | ۲٤۰۰ دلار |
| مزایا | خواندن بلند ترین توالی سرعت | تجهیزات ارزان تر سرعت | عملکرد خواندن توالی بالا، هزینه، دقت | هزینه کمتر برای خواندن هر باز | خواندن توالی به صورت تکی پرکاربرد برای بسیاری از نرم افزارها |
| معایب | عملکرد پایین در دقت بالا تجهیزات بسیار گران | خطاهای هموپلیمر | تجهیزات بسیار گران | آهسته تر از روش‌های دیگر، طولانی شدن زمان خواندن، طولانی شدن پلت فرم | هزینه‌های بالا غیر قابل انجام برای پروژه‌های توالی‌های بلند |

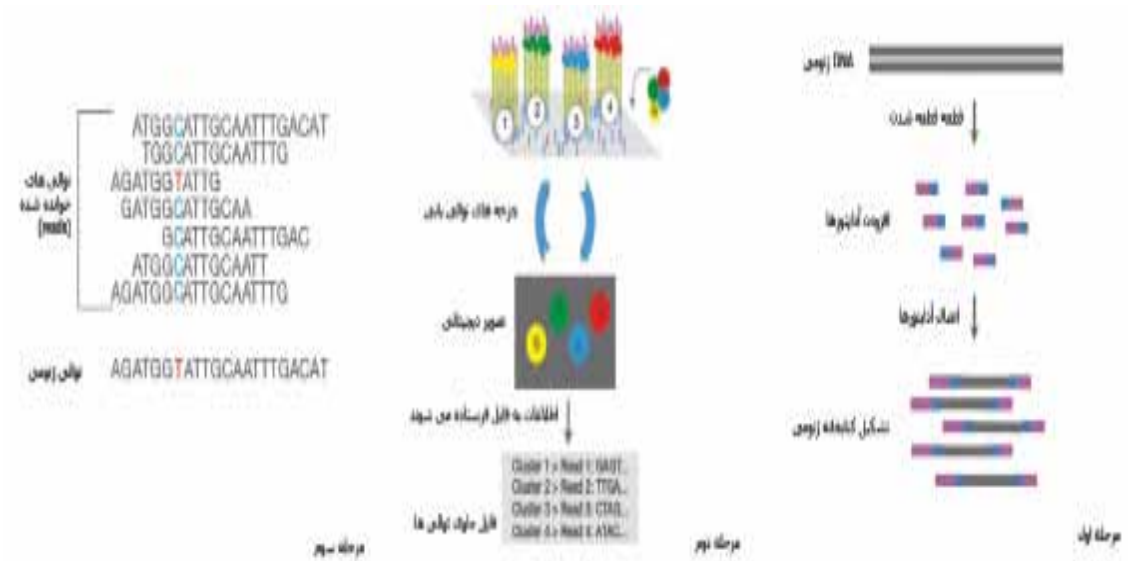
1- Massive Parallel Sequencing
2- Complementary DNA



[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04 ]

فرآیند توالی یابی طی یک چرخه شست و شو و مجاور شدن قطعات حاصله با مجموعه‌ای از نوکلئوتیدهای شناخته شده که به ترتیب توالی قرار می‌گیرند، دنبال می‌شود. در حالی که این نوکلئوتیدها به دنبال یکدیگر متصل می‌شوند تا دنباله‌ای را ایجاد کنند، توالی مذکور به صورت دیجیتالی ثبت شده که این مکانیسم شناسایی اطلاعات توالی بنا به نوع تکنیک می‌تواند براساس تغییرات pH و یا نور فلورسانس باشد (٦).

در مرحله سوم تحلیل داده‌ها صورت می‌پذیرد. داده‌های توالی خام باید تحت چند مرحله تجزیه و تحلیل قرار گیرند که این تجزیه و تحلیل داده‌ها شامل حذف توالی آداپتور و توالی‌های کم کیفیت، و نقشه برداری از داده‌ها با استفاده از یک ژنوم مرجع شناخته شده (توالی یابی مجدد) و یا در غیاب ژنوم مرجع (توالی یابی جدید) می‌باشند. تجزیه و تحلیل بعدی شامل طیف گسترده‌ای از ارزیابی‌های بیوانفورماتیکی از جمله تنوع ژنتیکی برای تشخیص SNP[1]ها و Indels[2] (درج یا حذف بازها)، تشخیص ژن جدید و یا عناصر تنظیمی، ارزیابی سطح بیان ژن، شناسایی جهش در سلولهای سوماتیک و جنسی را شامل شود که ممکن است به تشخیص بیماری ژنتیکی منجر گردد (٧). مراحل انجام تکنیک NGS در شکل ١ نشان داده شده است.




**شکل ١. شمای کلی از مراحل انجام توالی یابی نسل جدید**

مرحله اول تشکیل کتابخانه ژنومی، مرحله دوم تعیین توالی و تصویربرداری بر مبنای سنتز و مرحله سوم تجزیه و تحلیل داده ها.

1- Single Nucleotide Polymorphism
2- Small insertion/deletions

[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04 ]

## ۲-انواع توالی یابی‌های نسل جدید

از زمان ابداع و معرفی توالی یابی نسل جدید تاکنون پیشرفت‌های زیادی در خصوص کارایی، سرعت و بازده روش مزبور صورت گرفته که منجر به معرفی انواعی از این روش شده است.

### ۳-۱- توالی یابی کل ژنوم[1] (WGS)

در این روش کل توالی ژنومی یک موجود (ژنوم هسته‌ای به همراه DNA میتوکندریایی در سلول‌های جانوری و DNA کلروپلاست در سلول‌های گیاهی) توالی یابی می‌گردد. در این حالت حدود هزاران ژن فعال و نیز هزاران توالی خاموش به طور همزمان بررسی می‌شوند. روش WGS با پوشش دهی ۹۸/۵ درصدی توالی‌های کد کننده، یکی از کارآمدترین روش‌ها برای شناسایی جهش‌های ژنتیکی است. مطالعه همبستگی ژنوم[2] (GWAS) بر مبنای ریز ارائه از جمله پرکاربردترین روش‌های تشخیص جهش‌های مرتبط با بیماری‌هایی می‌باشد که در آن حدود ٤ میلیون مارکر در هر نمونه مورد بررسی قرار می‌گیرد. با این حال این رقم در مقابل شناسایی همزمان ۳/۲ میلیارد جفت باز در روش WGS عدد کوچکی محسوب می‌شود (۸).

### ۳-۲- توالی یابی اگزومی[3] (WES)

در حال حاضر، ماهیت درصد کمی از توالی ژنوم انسان مشخص شده است (<۱۰٪) و اطلاعات بالینی محدودی را می‌توان بلافاصله از توالی ژنوم کامل یک بیمار به دست آورد. بنابراین، برای محققان بالینی مقرون به صرفه تر است که فقط توالی اگزونی (۲٪ از ژنوم نواحی رمزگذار پروتئین و یا اگزون است)، مندلیوم (نواحی مربوط به ۲۹۹۳ ژن کد کننده بیماری‌های شناخته شده) و یا قطعات ژنی بیماری زا را برای غربالگری جهش مربوطه در تشخیص و درمان بیماری هدف قرار دهند. از این روش می‌توان برای تشخیص مولکولی اختلالات مرتبط با گروهی از ژن‌ها استفاده نمود. بدین منظور، نیاز است تا ژن هدف برای جلوگیری از دخالت سایر نواحی باقی مانده از ژنوم، تا ده‌ها یا هزاران بار بیشتر از میزان آن در ژنوم غنی شود (۹ و ۱۰).

توالی یابی کل اگزون‌های ژنوم (اگزوم) در تشخیص‌های بالینی بسیار ارزشمند است و دیدی جامع از آرایش ژنتیکی یک بیماری ارائه می‌دهد. با جود آن که اگزون‌ها تنها ۲٪ از کل ژنوم را به خود اختصاص داده‌اند، اما در حدود ۸۵٪ از جهش‌های مولکول DNA که مسبب بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی در انسان است را شامل می‌شوند (۱۱). در واقع تعیین توالی اگزومی که اخیرا وارد تحقیقات ژنتیک پزشکی شده است، تا به حال نقش بیش از هزاران ژن را در اختلالات مندلی مشخص کرده است و این آمار به سرعت در حال رشد است (۱۲).

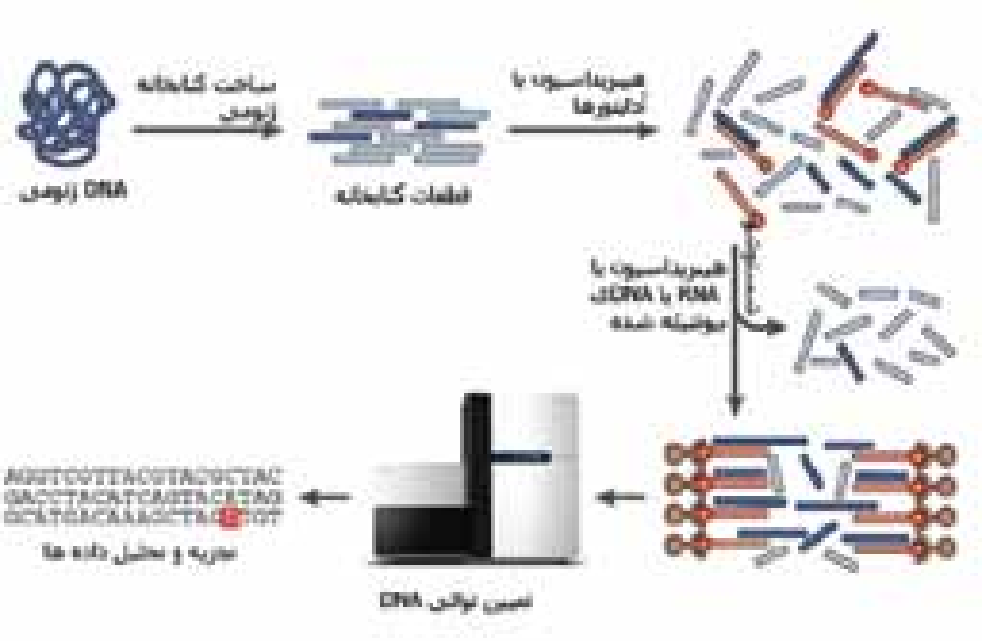
## مراحل توالی یابی اگزومی

نحوه انجام توالی یابی اگزومی بدین صورت است که در ابتدا DNA ژنومی به صورت تصادفی قطعه قطعه شده و سپس آداپتورها به کتابخانه حاصله متصل می‌شوند. سپس کتابخانه برای توالی‌های اگزونی غنی شده و در مرحله بعد، قطعات با RNA یا DNA بیوتینیله شده هیبرید شده و به دنبال آن تعیین توالی به صورت گسترده Massive Parallel Sequencing, MPS انجام گرفته و در نهایت داده‌های حاصله، تجزیه و تحلیل، نقشه برداری، تنظیم و خوانده می‌شوند (شکل ۲) (۱۳).

1- Whole Genome Sequencing
2- Genome-Wide Association
3- Whole Exome Sequencing



[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04 ]



**شکل ۲. مراحل انجام توالی یابی اگزومی**

## کاربرد توالی یابی اگزومی

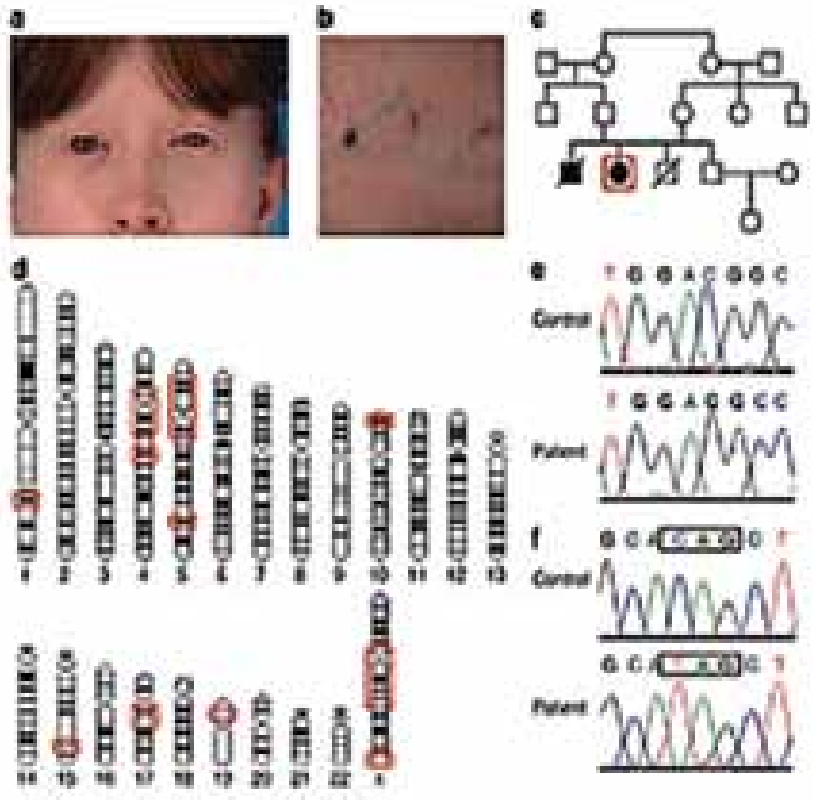
مـواردی که در آن توالی یابی اگزومی توصیه می‌شـود عبارتنـد از: ۱) فنوتیپ‌هـای هتروژن (حالتـی که در آن جهـش در ژن‌های متعـدد به تظاهـرات بالینی یکسـان منجر می‌شـود، مانند عقب ماندگی ذهنی، تاخیر در رشد، کوتاهی قد، کاردیومیوپاتی، ناشنوایی، اختلالات متابولیک، بدشکلی‌های پیچیده، بیماری‌های عضلانی، نابینایی ارثی، بیماری‌هـای قلبـی- عروقـی و ...، ۲) فنوتیپ‌های کاملا نامشـخص و یا مجموعه‌ای از علائم که تشخیص افتراقی را با مشـکل مواجه می‌کند و ۳) ژن‌هـای بزرگ نظیر ژن دیستروفین (۸).

در شـکل ۳ بـه عنـوان مثال تشـخیص بیمـاری زالی (آلبینیسـم) با روش توالی یابی اگزومی نشـان داده شـده است. همانگونه که در شـکل قسمت a و b دیده می‌شود، علائم مشـاهده شـده در فرد مراجعه کننده مشابه فنوتیپ معمـول بیماران مبتلا به آلبینیسـم نـوع ٤ است و لذا این بیمـاری برای فرد تشـخیص داده می‌شـود. شـجره نامه فـرد مذکور نیز در بخش c نشـان داده شـده است. نقاط نشاندار شده در آیدیوگرام قسمت d، نشان دهنده نواحی هموزیگوت در ژنوم این فرد هستند که با استفاده از روش آنالیز ارائه پلی مورفیسـم‌های تک نوکلئوتیدی[1] شناسایی شـدند. پس از این مرحله، نواحـی هموزیگوت به روش توالـی یابی اگزومی مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت دو جهش عامل بیماری آلبینیسم نوع ٤ در این فرد شناسایی شـد. قسمت e کروماتوگرام حاصل از توالی یابی اگزومی را برای ژن SLC45A2 و قسمت f کروماتوگرام حاصل از توالی یابی اگزومی را برای ژن C6PC3 نشان می‌دهد که فـرد برای هر دو حاوی جهش هموزیگوت است. این مثـال اهمیت تکنیک NGS برای تائید صحت تشـخیص بیماری را به خوبی به نشان می‌دهد (۸).

1- SNP array



[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04 ]



**شکل ۳. کاربرد کلینیکی توالی یابی اگزومی در تشخیص دو جهش ایجادکننده بیماری آلبینیسم نوع ٤**

## انواع روش‌های توالی یابی اگزومی

برای شناسایی جهش‌های مرتبط با بیماری‌های ژنتیک بر اساس توالی یابی اگزومی حداقل شش روش معرفی شده است (شکل ٤). در روش اول که روش پیوستگی[1] نامیده می‌شود، تمامی افراد مبتلای خانواده تعیین توالی شده و از لحاظ تنوعات مشابه مورد بررسی قرار می‌گیرند. به علاوه می‌توان محتوای اگزونی اعضای غیر مبتلا را نیز تعیین توالی نموده و به این ترتیب تنوعات غیربیماری زا را شناسایی نمود. برای مثال خواهر و برادری که هر دو مبتلا هستند، دارای ۵۰ درصد مشابهت DNA می‌باشند و دانستن این موضوع سبب می‌شود که بخشی از تغییرات جهشی (واریانت های) مشکوک حذف شوند (با مشخص نمودن واریانت‌های مشترک و غیرمشترک). در روش دوم که مبتنی بر هموزیگوسیتی[2] است، فرض بر این است که فرد مبتلا به بیماری مغلوب، واریانت‌های جهش دار خود را از هر دو والد دریافت کرده است. بنابراین واریانت‌هایی دنبال می‌شوند که در والدین به صورت هتروزیگوت و در فرد مبتلا به صورت هموزیگوت هستند (١٤).

در روش بعدی که استراتژی دو ضربه[3] نامیده می‌شود زمانی استفاده می‌شود که تنها یک فرد در دسترس است و دیگر اعضای خانواده حضور ندارند و تصور می‌رود بیماری حالت مغلوب دارد. در این حالت می‌توان توالی یابی

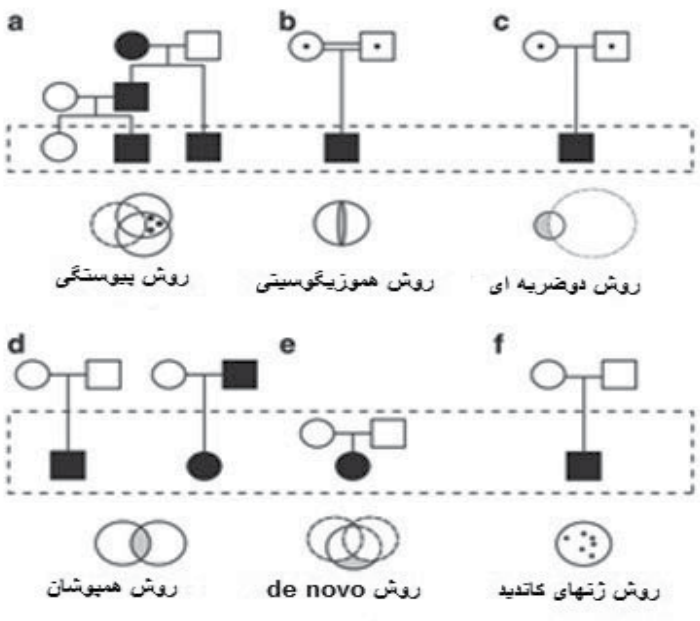
1- Linkage strategy
2- Homozygosity strategy
3- Double-hit strategy



[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04 ]

اگزومی انجام داده و در نتایج حاصل به دنبال واریانت‌های هموزیگـوت و یا واریانت‌هـای هتروزیگوت مرکب[1] بود. روش چهـارم کـه استراتژی همپوشـان[2] نامیده می‌شـود، زمانی مـورد استفاده قرار می‌گیرد کـه چندین فرد مبتلای غیر خویشـاوند با فنوتیپ یکسـان مراجعه می‌نمایند. این روش بـه خصوص در مـورد بیماری‌هایی که حالت غالب دارنـد مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مواردی که بیماری به شـدت هتروژن است و نیز در مواردی که بیماری به شدت تک گیر است، روش پنجم که استراتژی de novo نامیده می‌شـود مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این حالت به دنبال واریانت‌هـای جدید در مجموعه اطلاعات حاصل از توالی یابی اگزومی فرد هستیم.

در نهایـت روش ششـم کـه استراتـژی مبتنـی بـر ژن‌هـای کاندید نامیده می‌شـود، بـه دنبـال واریانت‌های شـناخته شـده از بیمـاری در نتیجـه تعییـن توالـی فرد می‌باشیم (١٤).




**شکل ٤. روش‌های شناسایی جهش‌های مرتبط با بیماری بر اساس WES**

(a) روش پیوستگـی کـه در آن تمامـی افـراد مبتلای خانواده تعیین توالی شـده و از لحاظ تنوعات مشابه مورد بررسی قرار می‌گیرنـد. (b) روش مبتنی بر هموزیگوسیتی کـه در آن فـرض بـر این است کـه فرد مبتلا بـه بیماری مغلـوب، واریانت‌هـای جهش دار خـود را از هر دو والد دریافـت کرده اسـت. (c) استراتـژی دو ضربه، این روش زمانی استفاده می‌شـود که تنها یـک فرد در دسترس است و دیگـر اعضای خانـواده حضور ندارنـد و تصور می‌رود بیماری حالت مغلوب دارد. (d) استراتژی همپوشـان، این روش زمانـی مـورد استفاده قرار می‌گیرد کـه چندین فرد مبتلای غیرخویشـاوند با فنوتیپ یکسان مراجعه می‌نمایند. (e) استراتـژی de novo؛ در ایـن حالـت بـه دنبـال واریانت‌های جدید در مجموعه اطلاعات حاصل از WES فرد هسـتیم. (f) استراتژی مبتنی بـر ژن‌های کاندید که در

1- Compound Heterozygous Variants
2- Overlap Strategy

[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04 ]

آن به دنبال واریانت‌های شناخته شده از بیماری در نتیجه تعیین توالی فرد می‌باشیم.

لازم به ذکر است که با وجود این که تعیین توالی اگزوم همه نواحی کد کننده پروتئین در ژنوم انسان را پوشش می‌دهد، این روش در تشخیص جهش‌های دخیل در وراثت سه آللی، اثرات اپی ژنتیکی، تغییرات تعداد کپی و برخی نقاط کور ژنوم مانند مناطق بسیار تکراری و مناطق غنی از GC دارای محدودیت‌هایی است (۸).

**۳-۳- توالی یابی هدفمند[1]**

گرچه امروزه توالی یابی کل ژنوم و توالی یابی اگزونی به راحتی قابل انجام هستند، اما در بسیاری از موارد بیماری توالی یابی هدفمند ارجحیت پیدا می‌کند. چرا که توالی‌یابی هدفمند از لحاظ زمانی و هزینه مقرون به صرفه بوده و نواحی بیشتری از نقاط ژنومی مدنظر را پوشش می‌دهد. بر این اساس پانل‌های (مجموعه های) اختصاصی هزاران ناحیه ژنومی که نقاط داغ جهش در بیماری‌های مختلف هستند طراحی شده‌اند. این پانل‌ها تنها یک ناحیه خاص ژنومی را تحت پوشش قرار می‌دهند. به علاوه پانل‌ها را می‌توان براساس نیاز محقق یا پزشک به طور اختصاصی طراحی کرد و مورد استفاده قرار داد. امروزه برای بررسی بیماری‌های متعدد مانند انواع بیماری‌های متابولیک از جمله بیماری‌های ذخیره لیزوزومی، رتینوپیگمنتوزوم، ناشنوایی غیرسندرومی، میوکاردیوپاتی‌ها و انواع سرطان، پانل‌های اختصاصی طراحی شده است (۸). روز به روز لیست پانل‌ها در حال گسترش است و در حال حاضر تقریبا برای تمامی ژن‌ها و بیماری‌های شناخته شده ژنتیکی حداقل یک پانل ژنی معرفی شده و در دسترس می‌باشد.

**۴-۳- توالی یابی RNA**

با توجه به این‌که توالی یابی کل RNA سلولی (رونوشت‌های سلولی) امکان تصویریابی از محتوای ژنی سلول را به خوبی فراهم می‌نماید، از اهمیت کاربردی بالایی برخوردار است. در توالی یابی RNA، قبل از ساخت کتابخانه NGS، کل محتوای RNA سلول خارج شده و به cDNA تبدیل می‌شود. این روش در واقع برای mRNA، RNAهای کوچک، RNAهای غیرکدشونده و یا میکرو RNAها قابل انجام است (۸).

**۵-۳- توالی یابی DNA میتوکندریایی**

تعداد تکرارهای DNA میتوکندریایی بسیار متغیر بوده و گمان بر این است که این امر با وقوع اختلالات بسیاری از جمله سرطان در ارتباط باشد. روش‌های سنتی شمارش این تعداد تکرارها اکثرا با PCR همراه بوده، اما اخیرا تکنیک‌های جدیدی بر پایه روش‌های توالی یابی تعداد تکرارهای mtDNA[2] و همچنین تهیه پروفایل بیانی، ایجاد و گسترش یافته‌اند. در این راستا ارزیابی محتویات mtDNA توسط توالی یابی اگزوم برای تشخیص دقیق اختلالات میتوکندریایی به کار برده شده است. علاوه بر این، توالی یابی DNAمیتوکندریایی توسط روش‌های نوین می‌تواند اطلاعات سودمندی را در مورد ارتباط جهش‌های mtDNA با پروفایل بیانی ژن در مسیرهای سلولی سنتز mtDNA و تاثیرگذاری مستقیم و یا غیر مستقیم داروهای ضدسرطان در اختیار محققان قرار دهد (۱۵).

## ٤-کاربرد توالی یابی نسل جدید

تکنیک NGS را می‌توان برای هر ارگانیسم از جمله باکتری ها، گیاهان، حیوانات، انسان و غیره استفاده نمود. منبع DNA می‌تواند DNA ژنومی (در تعیین توالی ژنوم)، DNA مکمل (توالی یابی RNA)- (DNA متیله برای توالی یابی اپی ژنتیک)، یا توالی خاصی از DNA، مانند محل‌های اتصال عوامل رونویسی[3] (توالی یابی ChIP) باشد (۱٦). این روش به طور گسترده‌ای مورد بررسی و به طور فزاینده‌ای در بسیاری از زمینه‌های تحقیقاتی اعمال می‌شود (۱۷). در ادامه تعدادی از کاربردهای این تکنیک در زمینه‌های مختلف مورد بررسی قرار می‌گیرند.

1- Targeted sequencing
2- Mitochondrial DNA
3- Chromatin Immunoprecipitation Sequencing



[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04 ]

### ٤-١- شناسایی جهش‌های مرتبط با بیماری‌های ژنتیکی

روش NGS به طور کلی می‌تواند برای توالی یابی ژن‌های بسیار بزرگ و همچنین ژن‌های کوچک تر بیماری‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد و تمام نواحی اگزونی و توالی‌های همراه آن را پوشش دهند. این پوشش دهی گسترده حساسیت تشخیص جهش را بیش از روش‌های فعلی، که اغلب از روش غربالگری مانند SSCP[1] استفاده می‌شد، بهبود داده است. در حال حاضر اختلالات تک ژنی بسیاری توسط روش مذکور توالی یابی و شناسایی شده‌اند. از جمله این موارد می‌توان به انواع ناشنوایی، نابینایی، بیماری‌های ارثی پوست، بیماری‌های قلبی – عروقی و غیره اشاره نمود. با این حال ظرفیت این سیستم برای توالی‌یابی بسیاری از ژن‌ها به صورت تکی بسیار بالا و به نظر می‌رسد تقریبا نامحدود باشد (١٨).

### ٤-٢- تشخیص و درمان سرطان

در حال حاضر انواع مختلفی از جهش‌هایی سوماتیکی تقریبا در تمامی سرطان‌ها ظاهر می‌شوند. تکنیک MPS می‌تواند به طور همزمان اطلاعات تغییرات تعداد کپی، جهش‌های متوالی و همجوشی ژن‌ها را در هر نقطه از ژنوم که در ارتباط با پیشرفت بدخیمی است، ارائه کند. در عین حال، برخلاف روش ریز ارائه‌ها این تکنیک محدودیتی برای ارزیابی تغییرات و انحرافات بزرگ ندارد. استفاده بالینی از توالی یابی موازی انبوه، راهی برای شناسایی علل بسیاری از بیماری‌هایی با علت ناشناخته را از طریق غربالگری همزمان هزاران نفر از نظر جایگاه جهش‌های بیماری زا و با تعیین توالی نمونه‌های بیولوژیکی برای بررسی ژنومی عوامل عفونی جدید فراهم می‌کند. علاوه‌بر ارائه این قابلیت‌های تشخیصی کاملا جدید، این نوع توالی‌یابی ممکن است در آینده جایگزین ارائه‌ها و توالی یابی سانگر در برنامه‌های کاربردی بالینی که در حال حاضر استفاده می‌شود، باشد. سرطان یک بیماری بسیار هتروژن است و سلول‌های مختلفی در یک تومور دیده می‌شوند. ممکن است جهش اصلی که مسبب بدخیمی است تنها در بخش کوچکی از ژنوم سلول دیده شود. بنابراین تشخیص آن نیاز به دقت و تمرکز بالایی دارد که روش‌های قبلی قادر به چنین تشخیصی نیستند. با این حال تکنیک NGS می تواند تغییرات ژنتیکی مرتبط با سرطان که تنها در کسر کوچکی از سلول‌های آزمایش شده رخ می‌دهند را با دقت بالایی اندازه گیری نماید. این امر به دلیل انبوه سازی مستقل و تعیین توالی میلیون‌ها قطعه DNA مختلف از هر نمونه است که امکان تشخیص دقیق توالی نادر را محقق می‌نماید (١٩).

### ٤-٣- تشخیص ژنتیکی پیش از لانه گزینی

به منظور تشخیص ژنتیکی پیش از لانه گزینی (PGD)[2] روش‌های متفاوتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. که از جمله آن‌ها می‌توان به مواردی که در ادامه ذکر می‌شود اشاره کرد: ١) تکنیک FISH[3] یا دورگه سازی درجا توسط پروب‌های خاص برای تشخیص آنیوپلوئیدی که بیشتر برای تشخیص ناهنجاری‌های شناخته شده کروموزومی در اوایل دوران جنینی به کار برده می‌شود. ٢) روش CGH[4] یا همان هیبریداسیون ژنومی مقایسه‌ای که روند تشخیصی آن به صورت مقایسه بین DNA جنین و DNA طبیعی می‌باشد. اما معایبی چون محدودیت زمانی تشخیص، عدم پوشش پروتکل‌های قوی برای کل ژنوم و یا وجود پروتکل‌های ضعیف IVF[5] برای بیوپسی و انجماد را نیز در بر دارد، ٣) ارائه‌های CGH[6] نیز به عنوان تکنولوژی بهبود یافته برای تشخیص عدم تعادل کروموزومی توسعه یافته است و ٤) روش غربالگری

1- Single-Strand Conformation Polymorphism
2- Preimplantation Genetic Diagnosis
3- Fluorescent In Situ Hybridization
4- Comparative Genomic Hybridization
5- In Vitro Fertilization
6- CGH array

[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04 ]

کروموزومی جامع (CCS)[1] که همراه با PCR برای تشخیص دقیق تر آنیوپلوئیدی‌ها انجام می‌شود. این در حالی است که توالی یابی نسل جدید امکان تشخیص کروموزومی به صورت جامع و گسترده را فراهم می‌سازد. امروزه از NGS برای شناسایی آنیوپلوئیدی و بازآرایی‌های کروموزومی نامتعادل پس از نمونه برداری از بلاستوسیست استفاده می‌شود. نمونه برداری از بلاستوسیست به صورت همزمان چندین سلول را مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌دهد و محدویت وجود توالی‌های پراکنده که منجر به تشخیص ضعیف در PGD می‌شوند را در بر نخواهد داشت (۲۰).

**٤-٤- کاربرد در فارماکوژنومیکس**

واکنش‌های دارویی ناخواسته یکی از علل اصلی مرگ و میر در بیماری‌ها و سرطان می‌باشند. اگرچه عوامل بسیاری در این امر دخیل اند اما تنوع ژنتیکی نقش کلیدی در واکنش نامطلوب به دارو و یا در قدرت تاثیر دارو بر بیماری و درمان آن بازی می‌کند. تعیین توالی به روش NGS، امکان شناسایی انواع مارکرهای ژنتیکی دخیل در پاسخ به دارو را تنها در یک آزمون می‌دهد که این امر منجر به درمان صحیحی با دارو می‌شود. این روش به ویژه برای افراد مسن و افراد با بیماری‌های مزمن که باید بسیاری از داروها را به صورت همزمان مصرف کنند، حائز اهمیت است (۱۷).

**٤-٥- کاربرد در اپی ژنتیک**

تغییرات اپی ژنتیک اصولا تغییرات سوماتیک در ژنوم می‌باشند به این معنی که پس از لقاح و در طول رشد جنین و در ادامه آن پس از تولد رخ می‌دهند. مشخص شده که این تغییرات ارتباط مستقیمی با پیشرفت برخی از سرطان‌ها و اختلالات مادرزادی مانند سندرم سودوهیپوپاراتیروئیدیسم، سندرم بک‌ویت ویدمن و سندرم راسل سیلور و غیره دارند. سنجش‌های بالینی معمول می‌توانند تغییرات اپی ژنتیک در ژن‌های فرد را نشان دهد، اما توالی یابی نسل جدید سنجش گسترده‌ای از تغییرات اپی‌ژنتیک که به عنوان علل بیماری خاص شناخته شده اند را امکان‌پذیر ساخته است. برای مثال، تعیین توالی بیسولفیت اخیرا با این روش برای بررسی الگوهای متیلاسیون در سراسر ژنوم در سرطان خون انجام شده است. همچنین تغییرات هیستونی نیز با استفاده از روش توالی یابی CHiP به کار گرفته شده است(۱۸).

**٤-٦- شناسایی تنوعات ساختاری در ژنوم (SVs)**

تنوعات ساختاری (SVs)[2]، شامل تنوعات تعداد تکرار (CNVs)[3]، واژگونی و یا سایر بازآرایی‌های کروموزومی می‌شود که سبب تغییر در تعداد تکرارها نمی‌شوند. شایع ترین CNV، پلی مورفیسم‌ها هستند. اما انواع بیماری زای آن‌ها امروزه به عنوان یکی از علل اصلی عقب ماندگی ذهنی و برخی دیگر از نقایص در هنگام تولد محسوب می‌شوند. برتری NGS در این زمینه نسبت به سایر روش‌های قبلی مثل هیبریداسیون ژنومی ارائه‌ها این است که این نسل از تکنولوژی می‌تواند هر دو نوع از بازآرایی‌های متعادل و نامتعادل را شناسایی کند. وضوح بسیار بالاتر و همبستگی بیشتر ژنوتیپ- فنوتیپ از دیگر مزایای این روش نسبت به سایر روش‌ها می‌باشد (۱۷).

**۵- مزایا و چالش‌های توالی یابی نسل جدید**

علاوه بر کاربردهای این نسل از توالی یابی که ذکر شد، می‌توان به ویژگی‌هایی از جمله پوشش دهی بالا (عمق پوشش دهی 99x)، نیاز به میزان کم از نمونه ژنومی (50ng)، توالی یابی تک مرحله ای، مقیاس پذیری بسیار بالا، کمی سازی خاصیت RNA با کیفیت بسیار بالا، پروتکل‌های آماده سازی نمونه سریع و مستقیم و کاهش زمان و هزینه‌ها اشاره نمود. این در حالی است که این روش چالش‌هایی نیز در پیش رو دارد که بزرگترین آن، تجزیه و تحلیل داده‌ها می‌باشد که در سطح آزمایش‌های تحقیقاتی قابل انجام بوده اما در سطح بالینی هنوز نیاز به تسریع استفاده از این داده‌ها و ترجمه جفت بازهای توالی در برنامه‌های کاربردی بالینی است. چالش بعدی، زیر ساخت‌های محاسباتی می‌باشد. در واقع مقدار داده‌های اولیه در سیستم‌های NGS از ظرفیت محاسباتی ترین سیستم‌ها نیز پیشی گرفته‌اند. چالش بحث برانگیز دیگر، مسائل حقوقی و اخلاقی این روش می‌باشد. پیامدهای قانونی و اخلاقی تعیین توالی بسیار زیاد است و تاکنون به طور کامل به آن پرداخته نشده است. به اشتراک‌گذاری اطلاعات ژنتیکی فرد با کارفرمایان و شرکت‌های بیمه آینده نگر ممکن است منجر به تبعیض مبتنی بر اطلاعات ژنتیکی شود که می‌تواند پیامدهای قانونی داشته باشد (۱۹).

1- Comprehensive Chromosome Screening
2- Structural Variations
3- Copy Number Variants



[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04 ]

## References


1- Berglund EC, Kiialainen A, Syvänen AC. )2011( Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics. Investigative Genetics. 24;2(1):1.

2- Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Gu Y. (2012) A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC genomics. 24;13(1):1.

3- Metzker ML. (2010) Sequencing technologies-the next generation. Nature reviews genetics. 1;11(1):31-46.

4- Grada A, Weinbrecht K. (2013) Next-generation sequencing: methodology and application. Journal of Investigative Dermatology.31;133(8):1-4.

5- Lohmann K, Klein C. (2014) Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. Neurotherapeutics. 1;11(4):699-707.

6- Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, Huff CD, Shannon PT, Jabs EW, Nickerson DA, Shendure J. (2010) Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. Nature genetics. 1;42(1):30-5.

7- Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. (2012) Disease gene identification strategies for exome sequencing. European Journal of Human Genetics. 1;20(5):490-7.

8- Dinwiddie DL, Smith LD, Miller NA, Atherton AM, Farrow EG, Strenk ME, Soden SE, Saunders CJ, Kingsmore SF. (2013) Diagnosis of mitochondrial disorders by concomitant next-generation sequencing of the exome and mitochondrial genome. Genomics. 30;102(3):148-56.

9- van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. (2014) Ten years of next-generation sequencing technology. Trends in genetics. 30;30(9):418-26.

10- Zhang W, Cui H, Wong LJ. (2012) Application of next generation sequencing to molecular diagnosis of inherited diseases. In Chemical Diagnostics (pp. 19-45). Springer Berlin Heidelberg.

11- Rabbani B, Mahdieh N, Hosomichi K, Nakaoka H, Inoue I. (2012) Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. Journal of human genetics. 1;57(10):621-32.

12- Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. (2014) The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. Journal of human genetics. 1;59(1):5-15.

13- Rizzo JM, Buck MJ. (2012) Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. Cancer prevention research. 1;5(7):887-900.

14- Yin X, Tan K, Vajta G, Jiang H, Tan Y, Zhang C, Chen F, Chen S, Zhang C, Pan X, Gong C. (2013) Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophectoderm cells of human blastocysts. Biology of reproduction.1;88(3):69.

15- Martín J, Cervero A, Mir P, Martinez JA, Pellicer A, Simón C. (2013) The impact of next-generation sequencing technology on preimplantation genetic diagnosis and screening. Fertility and sterility. 15;99(4):1054-61.

16- Lyon GJ, Jiang T, Van Wijk R, Wang W, Bodily PM, Xing J, Tian L, Robison RJ, Clement M, Lin Y, Zhang P. (2011) Exome sequencing and unrelated findings in the context of complex disease research: ethical and clinical implications. Discovery medicine. 12(62):41.

17- Meaburn E, Schulz R. (2012) Next generation sequencing in epigenetics: insights and challenges. InSeminars in cell & developmental biology 30, 23, 2, 92-199).

18- Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. (2013) Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. Cancer letters. 1;340(2):284-95.

19- Desai AN, Jere A. (2012) Next-generation sequencing: ready for the clinics?. Clinical genetics. 1;81(6):503-10.

20- Fontanges Q, De Mendonca R, Salmon I, Le Mercier M, D›Haene N. (2016) Clinical Application of Targeted Next Generation Sequencing for Colorectal Cancers. Int J Mol Sci.16;17(12).


[ Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04 ]