Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017

ABSTRACT

Introduction to Genetic Testing – Applications, Advantages and Disadvantages

Seyed Mehdi Hoseini, Fateme Montazeri, Ali Mohamad Foroughmand,* Mohamadreza Dehghani, Hamid Reza Ghadimi

Nowadays, the science of genetics and relevant issues have influenced various fields of science, particularly the fields of medical sciences (research and clinical field). Considering the high prevalence of hereditary and non- hereditary genetic disorders, especially in our country due to the relatively high prevalence of consanguineous marriages, application of genetic testing for diagnosis, treatment, prognosis, etc. is of considerable importance. However, evolution in the field of genetic testing is very fast and better introduction of different genetic tests can effectively help the scientific community to follow these extensive developments. In this paper, a brief introduction to different genetic tests based on their functional purposes will be provided. In the following, we will present a brief description of the processes, applications, advantages and disadvantages of some of the most commonly used genetic tests in both cytogenetics and molecular genetics fields. In the field of cytogenetics, karyotyping, flow cytometry, FISH, and CGH will be included and in the field of molecular genetics, PCR-based methods, multiplex PCR quantification such as MAPH / MLPA, microarrays and related technologies and next generation sequencing (NGS) will be discussed.

Key words: Genetic Testing; Karyotyping; Flow Cytometry; In Situ Hybridization, Fluorescence; Comparative Genomic Hybridization; PCR-Based Methods; Multiplex Polymerase Chain Reaction; Microarrays; Next Generation Sequencing

* Ali Mohammad Foroughmand, PhD
Genetic Department, Faculty of Science, Shahid Chamran university of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Email: aliforough12@yahoo.com
Submission Date: 18 Mar. 2014 • Acceptance Date: 18 May. 2014

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017

مقـاله مروری

معرفی تست‌های ژنتیکی کاربردها، مزایا و معایب

سید مهدی حسینی[۱]، فاطمه منتظری[۲،۳]، علی محمد فروغمند[۳*]، محمدرضا دهقانی[۳]، حمید رضا قدیمی[۴]

۱. گروه سلولی ملکولی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
۲. گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز
۳. آزمایشگاه ژنتیک، پژوهشکده علوم تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
۴. محقق پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیـده/ امـروزه علـم ژنتیـک و مباحـث پیرامون آن بطور گسـترده در علوم مختلـف و بویژه در حوزه علوم پزشـکی (تحقیقاتی و بالینـی) نفـوذ قابـل توجهـی داشـته اسـت. بـا توجه به شـیوع بالای بیـماری هـای ژنتیکی ارثـی و غیر ارثـی بویژه در کشـور ما که شـیوع ازدواج هـای فامیلـی نسـبتا بـالا می باشـد، کاربرد انواع تسـت های ژنتیکـی در زمینه های تشـخیص، درمان، پیـش آگهی و بسـیاری از حوزه های دیگر اهمیت بسـزایی یافته اسـت. با این وجود سـیر تحول در حوزه تسـت های ژنتیکی چنان سرعتی دارد کـه معرفـی هرچـه بیشـتر انواع تسـت های ژنتیکی می تواند کمک موثری برای همراه شـدن جامعه علمی کشـور بـا این تحولات گسـترده باشـد. ایـن مقالـه بـرآن اسـت تـا پس از معرفی مختصری از انواع تسـت هـای ژنتیکی بر اسـاس هدف کاربـردی آن ها، به معرفی فرایندها، کاربردها، معایب و مزایای برخی از پرکاربردترین تسـت های ژنتیکی در دو حوزه سـیتوژنتیک و ژنتیک ملکولی بپردازد. از جمله در حوزه سـیتوژنتیک به معرفی تسـتهای کاریوتایپینگ، فلوسـیتومتری، CGH، FISH و در حوزه ژنتیک ملکولی انـواع روش هـای مبتنـی بـر PCR، کمی سـازی PCR و PCR چندگانه مثـل MAPH/MLPA، انواع روش های مبتنی بر تکنولوژی ریزآرایـه (Microarray) و تکنیـک هـای نسـل جدید توالی یابی (NGS) پرداخته خواهد شـد.

واژگان کلیـدی: تست های ژنتیکی؛ کاریوتایپینگ؛ فلوسیتومتری؛ FISH؛ روش های مبتنی بر PCR؛ MLPA؛ ریزآرایه ها؛ CGH؛ NGS

مقـدمـه

تسـت هـای ژنتیکـی بـه تمـام روش هـا و تکنیـک هایـی گفتـه مـی شـوند کـه بـه شناسـایی اختـلالات ژنتیکـی کمـک مـی کننـد. هـدف ایـن تسـت ها فراهـم نمودن اطلاعـات کافی از توالی DNA اسـت تا بتـوان پـس از ارزیابـی آن جهـش هـا و واریانـت هـای درگیـر در یک اختـلال ژنتیکـی را کشـف کـرد. بعبـارت دیگـر بـه هـر نـوع آزمایش پزشـکی گفتـه مـی شـود که به تشـخیص هـر نـوع تغییر در سـاختار کرومـوزوم هـا، ژنهـا و پروتئین ها که منجر به نوعـی اختلال ژنتیکی مـی شـوند، مـی پـردازد. بـا توجـه بـه تعـداد بسـیار زیاد تسـت های ژنتیکـی و افزایـش روز افـزون آنهـا ارائه یک تقسـیم بندی اسـتاندارد و جامـع دشـوار اسـت از ایـنرو برخـی آنهـا را بـر اسـاس متودولوژی، برخـی براسـاس ژنهـای مـورد مطالعـه و گروهی نیز مبتنـی بر هدف انجـام ایـن تسـت هـا، آنهـا را دسـته بنـدی مـی کننـد. متـداول ترین تقسـیم بنـدی براسـاس هـدف انجـام تسـت هـا مـی باشـد.در ادامه یـک تقسـیم بنـدی کامـل از تسـت هـای ژنتیکـی بسـته بـه هـدف

* **علی محمد فروغمند،** PhD
گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز
پست الکترونیک: aliforough12@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲۷ تاریخ پـذیرش: ۹۳/۲/۲۸

(شـما می توانید برای مشـاهده تصاویربه صورت رنگی، مقاله را از وب سـایت ما بـه آدرس www.g3m.ir دانلود نمایید.)

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017

کاربـردی آنهـا ارائـه مـی گـردد. سـپس بـرای معرفی بهتر تسـت های ژنتیکـی آنهـا را مبتنـی بـر تکنیـک هـای بـکار رفتـه در آزمایـش (بـر اسـاس متودولـوژی) بـه دو گروه کلی سـیتوژنتیک و ملکولی تقسـیم کـرده و بـه سـیر تحولـی آنهـا از گذشـته تا حال مـی پردازیـم. در این رونـد اشـاره ای بـه کاربرد هر تسـت، مزایا و محدودیـت های آن نیز خواهد شـد.

انواع تست های ژنتیکی بر اساس هدف کاربردی آنها:

براسـاس تعریف کتابخانه ملی پزشـکی آمریکا تسـت های ژنتیکی را بـر اسـاس هـدف کاربـردی شـان می تـوان به گـروه های زیر تقسـیم کرد: (۱)

۱) تست های ژنتیکی تشخیصی[1]

این تسـت ها بر روی فرد بیمار برای شناسـایی جهش ها و تغییراتی کـه در DNA فـرد منجـر به یک اختلال ژنتیکی شـده اند، صورت می گیـرد. این تسـت ها جهـش در یک یا تعدادی ژن را بررسـی می کنند کـه قابلیـت بـه ارث رسـیدن را دارنـد. این گروه از تسـت هـا معمولاً بـه منظـور تایید یک تشـخیص در مـواردی که وجود بیـماری فقط بر اسـاس یکسری علائم و نشـانه های فیزیکی و ظاهری مشـخص شـده اسـت، بـکار می روند. تسـت های تشـخیصی می توانند قبـل از تولد و یـا در هـر دوره ای از زندگـی فرد انجام شـوند. نتایـج حاصل از این تسـت هـا مـی تواننـد به فـرد در زمینه تصمیـم گیری بـرای مدیریت و درمـان بیماری خـود کمک کنند.

۲) تست های ژنتیکی پیش گویانه[2]

ایـن گـروه از تسـت هـا بـرای شناسـایی جهـش هـای ژنـی مسـئول اختلالاتـی اسـتفاده مـی شـوند کـه علائـم آنهـا پـس از تولد یا سـنین بالاتـر زندگـی فـرد بـروز مـی یابند. به زبان سـاده این تسـت ها برای افـرادی پیشـنهاد می شـوند که یک یـا چند نفر از اقوامشـان مبتلا به بیـماری ژنتیکـی بـوده و احتـمال بـه ارث رسـیدن ژن معیـوب به فرد وجـود دارد بـا ایـن حال هنوز علائـم بیماری در او بروز نیافته اسـت. پـس هـدف ایـن تسـت ها شناسـایی جهـش هایی اسـت که ریسـک ابتـلا بـه یـک بیـماری (مثـل بسـیاری از سرطـان هـا) در آینـده را در فـرد مشـخص مـی سـازند. نتایـج ایـن تسـت هـا نیـز مـی= توانند به فـرد بـرای تصمیـم گیـری در مـورد مراقبـت هـای پزشـکی آتی کمک کنند.

۳) تست های ژنتیکی تعیین وضعیت حاملی[3]

برخـی از جهـش های ژنتیکی فقط هنگامیکه دو نسـخه از آن جهش وجـود داشـته باشـند باعـث بـروز علائـم بیـماری مـی شـوند. تسـت هـای حاملـی بـرای شناسـایی افـرادی کـه فقـط حامل یک نسـخه از چنیـن جهـش های ژنی هسـتند و بنابراین علائم بیـماری را بروز نمی دهنـد اسـتفاده مـی شـوند. این تسـت ها بـرای افرادی اسـتفاده می شـوند که یا دارای سـابقه خانوادگی یک اختلال ژنتیکی هسـتند و یا افرادیکـه از گـروه هـای قومیتـی خاصـی هسـتند که ریسـک ابتلا به یـک بیـماری ژنتیکـی در آنها بالا می باشـد. در این مـوارد چنانکه هر دو والـد از نظر ژن مفروضی تسـت شـوند میتـوان اطلاعاتی در مورد ریسـک ابتـلای فرزنـدان ایـن زوج در ابتـلا بـه یـک بیـماری ژنتیکـی بدسـت آورد. در واقـع این تسـت هـا جهش های ارثی را بررسـی می کننـد که وجود یک نسـخه از چنین جهش هایـی تاثیری روی افزایش ریسـک بیـماری در فرد ندارد، ولی ریسـک داشـتن فرزنـدی با بیماری ژنتیکـی مورد نظـر را افزایـش خواهد داد.

۴) تست های ژنتیکی سلول های سوماتیک[4]

ایـن گـروه از تسـت هـا به بررسـی سـلول ها یـا بافت هـای (معمولاً بافـت تومـوری) فـرد از نظر جهش هـای غیرارثی مـی پردازند. هدف از انجـام ایـن گونـه آزمایـش هـا معمـولاً تشـخیص دقیـق و یـا کمک بـه انتخـاب یـک درمان مناسـب بـرای یک سرطـان خاص می باشـد.

۵) تست های ژنتیکی پیش از کاشت[5]

شـامل تکنیـک هایـی اسـت کـه مـی تواننـد ریسـک داشـتن فرزندی بـا اختـلالات ژنتیکـی و کروموزومـی خـاص را کاهـش دهنـد. بـرای شناسـایی تغییـرات ژنتیکـی در جنیـن بوجـود آمده بـه کمک تکنیک هـای تولیدمثـل کمکی مثل لقاح مصنوعی اسـتفاده می شـوند. لقاح مصنوعـی شـامل برداشـتن سـلول هـای تخـم از تخمـدان یـک زن و بـارور سـاختن آن بـا سـلول های اسـپرم در بیـرون بدن می باشـد؛ که بـرای انجـام تسـت های ژنتیکـی پیش از کاشـت (PGD) تعـدادی از

1. Diagnostic testing for heritable mutations
2. Predictive and presymptomatic testing
3. Carrier testing for heritable mutations
4. Somatic cell genetic testing
5. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) / (PIGD)

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017

این سلول ها را قبل از کاشت از جنین جدا کرده واز نظر تغییرات ژنتیکی مورد ارزیابی قرار می دهند. در آخر فقط جنین هایی که فاقد اختلالات ژنتیکی باشند برای رشد در رحم زن کاشت می شوند.

۶) تست های ژنتیکی پیش از تولد[6]

تست هایی که به بررسی و شناسایی تغییراتی در ژن ها یا کروموزوم های جنین قبل از بدنیا آمدن می پردازند. این نوع تست ها در مواردیکه احتمال بالایی از وجود اختلالات کروموزومی یا ژنتیکی در جنین وجود داشته باشد پیشنهاد می شوند.در برخی موارد این تست ها می توانند ابهامات و استرس زوجین را کاهش داده و به آنها کمک کنند تا تصمیم درستی درمورد حاملگی فعلی یا بعدی اتخاذ نمایند. البته باید توجه داشت این تست ها قادر نیستند همه اختلالات ارثی و یا نقایص تولد را شناسایی نمایند.

۷) تست های ژنتیکی پس از تولد[7]

تست هایی که بلافاصله پس از تولد و طی دوران نوزادی انجام شده و هدف آنها شناسایی اختلالات ژنتیکی است که می توانند در اوایل زندگی درمان شوند. در حال حاضر تست هایی مثل بررسی از نظر فنیل کتونوریا[8] و هیپوتیروئیدیسم مادرزادی[9] جزء تست‌های رایج پس از تولد محسوب می شوند.

۸) تست های ژنتیک دارویی[10]

این گروه از تست ها برای بررسی یک واریانت ژنتیکی که روی چگونگی و روش متابولیز شدن یک دارو اثر می گذارد، انجام می-شوند. این واریانت ها ممکن است شامل تغییراتی در سلول های سوماتیک و یا لایه زایا باشند. در واقع مشخص شده است که افراد با واریانت های مختلف واکنش های متفاوتی نسبت به یک نوع دارو یا درمان نشان میدهد و با دانستن نوع واریانت بیمار پزشک می تواند بهترین درمان را انتخاب کند یا اینکه صلاح بداند مصرف یک دارو میتواند خطراتی برای بیمار داشته باشد.

مثال یک: هایپرترمی بدخیم (MH)[11] ، نوعی عارضه شدید و نادر متعاقب بیهوشی محسوب می شود. MH نوعی بیماری ارثی با توارث اتوزومی غالب است.MH از نظر ژنتیکی یک اختلال هتروژن با واریانت های مختلف در چندین ژن متفاوت می باشد که روی آسیب پذیری افراد یک خانواده نسبت به بیهوشی تاثیر می گذارد. دانستن واریانت فردیکه افراد خانواده وی پس از بیهوشی مبتلا به MH می شوند برای پزشک اهمیت دارد.

مثال دو: آباکاویر[12] دارویی است که در درمان ایدز مصرف می شود. واکنش های حساسیتی شدید نسبت به این دارو به شدت وابسته به وجود الل HLA-B*5701 می باشد. تست غربالگری HLA-B*5701 برای مبتلایان به بیماری ایدز و به جهت کاهش خطر چنین واکنش های شدید حساسیتی توصیه می گردد.

تست های ژنتیک دارویی عمدتاً به دو دسته تسیم می شوند: ۱) تست هایی که هدفشان تعیین دز مناسب یک دارو با توجه به نوع واریانت های ژنتیکی است. ۲) تست هایی که هدف مشخص کردن این امر است که آیا تجویز دارویی مفروض برای یک بیماری ژنتیکی که بیمار واریانت ژنتیکی خاصی را دارد مفید خواهد بود یا خیر.

۹) تست های ژنتیکی تعیین هویت[13]

در این تست ها از توالی DNA برای شناسایی هویت یک فرد با اهداف قانونی استفاده می شود. برخلاف تست های قبلی این تست ها برای شناسایی جهش های ژنی مرتبط با بیماری های ژنتیکی استفاده نمی شوند. این نوع تست ها را برای شناسایی هویت یک جانی، قربانیان یک فاجعه و برای اثبات یا رد ظن نسبت به یک مجرم و یا برای اثبات وجود رابطه زیستی بین افراد (تعیین هویت یا شناسایی والدین یک فرد) بکار می برند (۱،۲).

تست های ژنتیکی را از نظر متدولوژی به سه دسته تقسیم می کنند (۱):

۱. تست های ژنتیک کروموزومی[14] (سیتوژنتیک): تست هایی که به مطالعه کل کروموزوم یا توالی نسبتاً بلندی از DNA پرداخته تا هرگونه تغییرات بزرگ ژنتیکی مثل حذف یا وجود نسخه اضافی

6. Prenatal testing
7. Newborn screening
8. phenylketonuria
9. congenital hypothyroidism
10. Pharmacogenetic testing
11. Malignant hyperthermia (MH)
12. Abacavir
13. Forensic testing
14. Chromosomal genetic tests

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017

از یک کرووزوم کامل را که می توانند علت یک اختلال ژنتیکی باشند شناسایی نمایند.

۲. تست های ژنتیک مولکولی[15] : این تست ها به مطالعه یک ژن منفرد یا یک توالی کوتاه از DNA پرداخته تا واریانت ها و جهش هایی که ممکن است منجر به یک اختلال ژنتیکی شوند را شناسایی نمایند.

۳. تست های ژنتیک بیوشیمیایی[16]**:** به مطالعه مقدار یا سطح فعالیت پروئین ها می پردازند که می توانند نشاندهنده تغییری در DNA باشند که منجر به یک اختلال ژنتیکی شده باشند.

I.تکنیک های سیتوژنتیک و سیتوژنتیک ملکولی

سیتوژنتیک شامل مطالعه ساختارهای سلولی با تمرکز بیشتر بر روی تغییرات تعدادی و ساختاری کروموزوم ها می باشد. آغاز به کار مطالعات سیتوژنتیک به دهه ۱۹۵۰ برمی گردد که برای اولین بار و به کمک این مطالعات مشخص شد ژنوم انسان شامل ۴۶ عدد کروموزوم می باشد. مطالعات سیتوژنتیک را می توان به روش های سنتی مانند کاریوتایپینگ و فلوسیتومتری و روش های مدرن (سیتوژنتیک ملکولی) مانند دورگه سازی فلوئورسانت درجا (FISH)[17] و دورگه سازی ژنومی مقایسه ای (CGH)[18] تقسیم کرد که در ادامه به معرفی آنها خواهیم پرداخت.

۱. کاریوتایپینگ

نخستین روشی که امکان بررسی تغییرات کروموزوم هارا فراهم نموده، تهیه کاریوتایپ (سیتوژنتیک سنتی[19]) بود که درسال ۱۹۵۶معرفی شد.به کمك این روش بسیاری ازناهنجاری های تعدادی و نیز ارتباط تغییرات تعدادکروموزوم ها با برخی بیماری‌ها شناسایی شدند. از جمله میتوان به شناسایی سندرم داون[20]، پاتو[21]، ادوارد[22] و ترنر[23]و همچنین شناسایی برخی حذف های انتهایی مانند حذف بازوی کوتاه کروموزوم ۵، عامل سندرم صدای گربه[24] و یا حذف بازوی کوتاه کروموزوم ۴، عامل سندرم ولف-هیرشورن[25] اشاره کرد. اگرچه نیازبه سلولهای تقسیم شونده (برای بدست آوردن گستره های متافازی مناسب) و قدرت تفکیك پایین (در حد ۲۰ تا ۳۰ مگاباز) و عدم شناسایی بسیاری ازتغییرات کوچك ساختارکروموزوم ها ازعمده ضعف های این روش بود؛ ابداع روشهای گوناگون نواربندی باتفکیك بالا بسیاری از این ضعف ها را مرتفع ساختند. با ابداع روش های نواربندی- کروموزومی، در دهه ۷۰ میلادی افزون برتغییرات تعدادی، امکان مطالعه بسیاری ازتغییرات ساختاری کروموزوم ها (با قدرت تفکیک ۵ تا ۱۰ مگاباز) نیزفراهم آمد. از جمله کاربردهای استفاده از روش های جدید نواربندی در آن زمان می توان شناسایی سندرم WAGR[26] و جاکوبسون[27] را ذکر نمود (۳,۴).

یک آنالیز کروموزومی (متافازی) شامل (۴۵۰ تا۵۵۰ باند) استاندارد برای تشخیص بسیاری از اختلالات کروموزومی بخصوص ناهنجاریهای تعدادی مثل تریزومی ها یا مونوزومی ها مناسب است. یک تست حساس تر، high-resolution banding، کروموزوم ها را در پرومتافاز و با قدرت تفکیک بیشتر (در حد ۳ تا ۵ مگاباز) بررسی می کند و اجازه مشاهده باندهای بیشتری (۵۵۰ تا۸۵۰ باند) را نسبت به کاریوتایپ استاندارد می دهد. این تکنیک با بهبود قدرت تفکیک کاریوتایپ سنتی امکان شناسایی اختلالات ساختاری[28] کروموزومی مانند مضاعف شدگی ها[29]، جابه جایی ها[30] و حذف های درونی و یا انتهایی[31] را افزایش داد و منجر به کشف اولین سندرم های ناشی از ریزحذف های کروموزومی مانند پرادر-ویلی[32]، دی جرج[33] و اسمیت-مگنیس[34] گردید. در بیشتر مراکز ۷ تا ۱۴ روز برای کاریوتایپ استاندارد و بیش از ۳ هفته برای high-resolution banding زمان لازم است و این نیز یکی از معایب این تکنیک در مواردی است که نیاز به تشخیص سریع اختلالات می باشد (۵,۶).

کروموزوم ها را می توان از منابع مختلفی شامل لیمفوسیت های خون محیطی، خون بند ناف، فیبروبلاست های پوست،

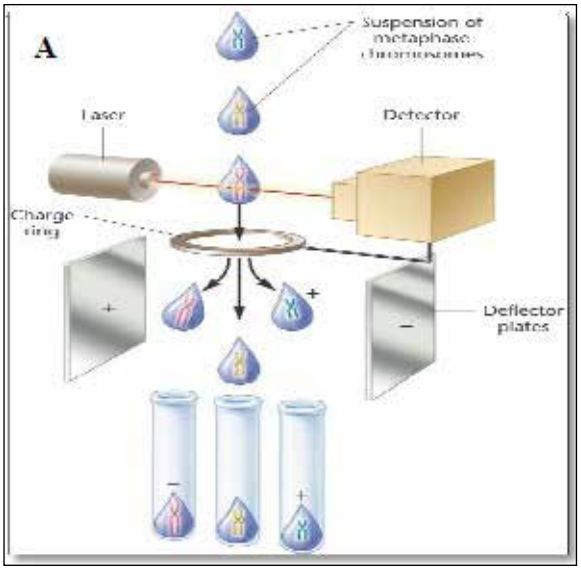
15. Molecular genetic tests
16. Biochemical genetic tests
17. Fluorescent in situ hybridization (FISH)
18. Comparative Genomic Hybridization (CGH)
19. Conventional Cytogenetic
20. Down's syndrome
21. Patau's syndrome
22. Edward's syndrome
23. Ullrich-Turner's syndrome
24. cri du chat syndrome
25. Wolf-Hirschhorn's syndrome
26. Wilms tumor-Aniridia-Genitourinary anomalies-mental Retardation syndrome
27. Jacobsen's syndrome
28. Structural Chromosome Disorders
29. Duplications
30. Translocations
31. Interstitial or terminal deletions
32. Prader-Willi
33. DiGeorge
34. Smith-Magenis

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017

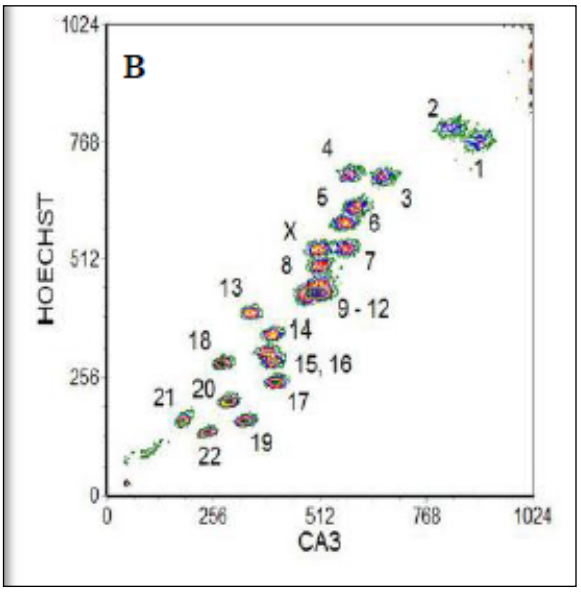
مایع آمنیوتیک، پرزهای کوریونی و مغز استخوان همراه با خون محیطی بدست آورد و مورد آنالیز قرار داد. سلول های مایع آمنیوتیک، اولین و مناسب ترین منبع برای آنالیزهای کروموزومی پیش از تولد محسوب می شوند. آمنیوسنتز بطور روتین در هفته‌های ۱۵ تا ۱۶ جنینی انجام می شود. به هر حال ۱ تا ۳ هفته مراحل کشت و برداشت سلول های مایع آمنیوتیک طول می کشد تا کروموزوم‌ها برای آنالیز آماده شوند. نمونه گیری از پرزهای کوریونی معمولاً بین هفته های ۱۰ تا ۱۲ جنینی و بصورت تهیه بیوپسی (trans cervically یا trans abdominally) از ناحیه پرز مانند پرده کوریونی صورت می گیرد. این نتایج معمولاً طی ۱۰ تا ۱۴ روز آماده می شود. مزیت اصلی استفاده از نمونه پرزهای کوریونی در مقایسه با آمنیوسنتز که در سه ماهه دوم انجام می شود این است که نتایج خیلی زودتر و در مراحل اولیه بارداری گزارش می‌شوند. اخیراً در کارهایی که در زمینه لقاح مصنوعی (IVF) انجام می شود، تشخیص قبل از کاشت اختلالات کروموزومی و نقائص تک ژنی امکان پذیر می باشد. تشخیص ژنتیکی قبل از کاشت، شامل آنالیز کروموزومی و بررسی جهش های بلاستومر حاصل از IVF می باشد (۷،۸).

۲. فلوسیتومتری

این تکنیک در ابتدا برای مطالعه و جداسازی جمعیت های سلولی



شکل ۱(A): طرحی شماتیک از چگونگی تفکیک کروموزوم ها توسط فلوسیتومتری



شکل ۱(B): نمودار نشاندهنده اندازه هر کروموزوم بر اساس شدت رنگ ساطع شده (برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه شود)[۳۶]

خاص در مخلوطی از انواع مختلف سلول ها استفاده می شد. در فلوسیتومتری از یک رنگ فلوئورسانت برای نشاندار کردن جمعیت های سلولی هدف استفاده می شود. بطور خلاصه سلول های منفرد و مجزا در مخلوط مورد مطالعه، ضمن عبور از میان بخش های مختلف دستگاه فلوسیتومتری تحت تاثیر نور تابش شده از منبع لیزر دستگاه قرار گرفته تا در نهایت بر اساس اندازه و شکل از هم تفکیک گردند. در واقع سلول های نشاندار شده با فلوئورسانت بر اساس اندازه و شدت سیگنال فلوئورسانت طی فرایندی بنام تفکیک سلولی ناشی از فلوئورسانت (FACS)[۳۵] در تیوب های مجزا تفکیک می شوند. چندی بعد محققان از این تکنیک برای جدا ساختن کروموزوم های انسانی استفاده کردند. در این روش سوسپانسیونی از سلول های میتوزی (که کروموزوم های آن در متافاز متوقف شده اند) تهیه کرده و غشای سیتوپلاسمی آنها را پاره کرده تا کروموزوم های متافازی رها شوند. کروموزوم ها را با دو رنگ فلوئورسانت مختلف یکی هوخست ۳۳۲۶۹ [۳۷] (به جفت بازهای A-T متصل میشود) و دیگری کرومومایسین A [۳۸] (به جفت بازهای C-G متصل میشود) نشاندار می کنیم. سپس میتوان طی فرایند FACS همه کروموزوم های نشاندار

35. Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)
36. http://flowbook.denovosoftware.com/Flow_Book/Chapter_10%3A_Some_Other_Applications
37. Hoechst 33269

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017

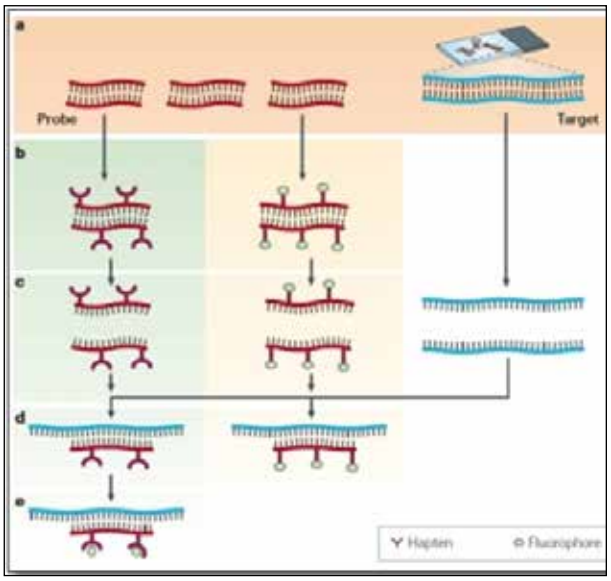
شـده انسـانی بجـز کرومـوزوم هـای ۹، ۱۰، ۱۱ و۱۲ را بطـور جداگانه تفکیـک نمـود. این روش را میتوان برای شناسـایی یکـسری از تغییرات تعـدادی و سـاختاری کرومـوزوم ها نیز بکار برد. بطـور کلی محتوای بـازی هـر یـک از کرومـوزوم هـا مفـروض و مشـخص اسـت. بدیهـی اسـت کـه با افزایـش اندازه کرومـوزوم ها تعدادبازهـای A-T و C-G و در نتیجـه شـدت جـذب رنگهـای هوخسـت و کروموماییسـین نیـز فزایـش خواهـد یافـت. برای مثـال کروموزوم ۲۱ کـه از همه کوچکتر اسـت کمتریـن شـدت رنـگ و در مقابل کرومـوزوم هـای ۱ و ۲ که از بقیـه بزرگترنـد بیشـترین شـدت رنگ را نشـان خواهنـد داد (۹،۱۰).

بـا وجـود تحولاتـی کـه تـا ایـن زمـان در تکنیـک هـای سـیتوژنتیک سـنتی بـرای بهبـود معایـب آنهـا رخ داده بـود همچنـان تکنیک های موجـود بسـیار زمـان بـر بـوده و قـدرت تفکیـک پائینـی داشـتند و امـکان شناسـایی بسـیاری از تغییـرات کوچـک در کرومـوزوم هـا وجـود نداشـت. در ایـن زمان بـا اختراع تکنیک PCR و توانایی سـنتز الیگونوکلئوتیدهـای فلوئورسـانت ، سـیتوژنتیک ملکولی پـا به عرصه تسـت هـای تشـخیصی اختـلالات ژنتیکـی نهـاد. از جملـه FISH و CGH کـه بـا کمک هیبریداسـیون در جـای پروبهای فلوئورسـانت به نواحی هدف امکان شناسـایی بسـیاری از تغییرات خیلی جزئی ژنوم را در زمانـی بسـیار کوتاهـتر از روش هـای قبلـی فراهـم نمودنـد.

۳. هیبرید سازی فلوئورسانت درجا (FISH)

در سـال ۱۹۷۷ نخسـتین شناسـایی فلوئورسنت وابسـته به آنتی بادی اسـیدهای نوکلئیـک بدسـت آمـد. درسـال ۱۹۸۰ نخسـتین شناسـایی در جـا[۳۹] بکمـک نشـانگرهای فلوئورسـانت صورت گرفـت. زمانی که انتهـای ۳پریـمRNA به طور مسـتقیم با فلوروفور نشـاندار شـد و به عنـوان یـک پـروپ بـرای توالی هـای خـاص DNA به کار گرفته شـد. هیبریـد سـازی فلوئورسـانت درجـا (FISH)،در ایـن سـال بعنوان یک تکنیک اسـتانداردمعرفی شـدکه آغازی برای سیتوژنتیك مولکولی بود (۱۱،۱۲).

FISH روشـی اسـت کـه طـی آن نمونـه بصـورت همـراه و یـا جـدای از پروبهـای DNA کنـترل بـا کرومـوزوم هـای متافـازی هیبریـد شـده تـا انواعـی از اختـلالات تعـدادی و سـاختاری شناسـایی شـود. واژه فلوئورسـانت بـه معنـای سـاطع شـدن نـور از از یک ملکـول فلوئرفر پـس ازتحریـک آن مـی باشـد، و In Situ اشـاره بـه این حقیقـت دارد



شـکل ۲: طرحـی شـماتیک از مراحل کلـی انجام فرایند دورگه سـازی فلوئورسـانت درجـا (FISH) بـه دو روش مسـتقیم و غیـر مسـتقیم (۱۳)

کـه ایـن متـد بـا کروموزوم، سـلول یـا بافتی انجام می شـود کـه روی یـک اسـلاید میکروسـکوپی تثبیـت شـده اسـت. هـدف ایـن تکنیـک پیـدا کـردن توالی هـای RNA یـا DNA در کروموزوم هـای متافازی، سـلول هـای اینترفـازی و قطعـات بافتـی اسـت و از پـروپ هـای فلوئورسـنتی اسـتفاده مـی کند که تنها بـه بخش هایـی از کروموزوم متصل می‌شـوند. ورود این تکنیک به سـیتوژنتیک منجر به شناسـایی علـت بسـیاری از سـندرم هـای ناشـی از ریزحـذف ها[۴۰]مثـل سـندرم ویلیام-بـرن[۴۱] و ریزحـذف ۱p۳۶ شـد و همچنین اولین سـندرم ناشـی از ریـز مضاعـف شـدگی هـا[۴۲] در ناحیـه 22q11.2 نیـز شناسـایی گردیـد(۱۲،۱۳).

مراحـل انجـام ایـن تکنیـک FISH (شـکل ۲) بطـور خلاصـه شـامل پیـش تیـمار سـلول هـای تثبیـت شـده روی لام بـا محلول هـای نمکی و چنـد دترجنـت بـرای حـذف پس زمینـه اضافی و نفوذپذیر سـاختن سـلول هـا سـپس واسرشـت کـردن دو رشـته DNA هـم پـروپ و هم کرومـوزوم بـه طـوری کـه آنهـا بتوانند بـه همدیگر متصل شـوند. در مرحلـه بعـد پـروپ بـر روی اسـلاید قـرار داده مـی شـود و یک لامل

38. Chromomycin A
39. In Situ Detection
40. Microdeletions
41. Williams- Beuren syndrome
42. Microduplication syndrome

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017

شیشه ای بر روی آن گذاشته می شود. برای جلوگیری از تبخیر آن لبه های لامل با چسب مهرو موم می شود. سپس اسلاید در انکوباتور (۳۷ درجه سانتیگراد) در مدت یک شب قرار داده می شود تا پروپ ها با جایگاه های مکمل خود روی کروموزوم هدف هیبرید شوند. در طول شب، DNA پروپ توالی هدف خود را در کروموزوم خاص جستجو می کند و به آن متصل می شود. روز بعد لامل برداشته می شود و اسلاید در محلول دترجنت یا نمک شسته می شود تا هر پروپی که به کروموزوم متصل نشده است برداشته شود. در آخر یک رنگ فلوئورسنت متمایز[43] به اسلاید اضافه می شود تا کل کروموزوم ها رنگ بگیرند. به طوری که آنها با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت قابل مشاهده و آنالیز شوند. رنگ هایی که بطور معمول برای رنگ آمیزی کروموزوم های متافازی یا هسته های اینترفازی استفاده می شوند عبارتند از پروپیدیوم یدید (PI)[44] و دی آمیدینو فنیل ایندو (DAPI)[45] که بسته به رنگ کاوشگرهای بکار گرفته شده رنگی که تمایز بیشتری ایجاد کند مورد استفاده قرار می گیرد (۱۳,۱۴).

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود، دو روش کلی برای برچسب دار کردن پروپ ها وجود دارد. در روش مستقیم رنگ فلوئورسنت یا فلوئوروکروم به طور مستقیم به پروپ متصل می‌گردد ولی در روش غیرمستقیم یک مولکول هاپتن به نوکلئوتیدهای خاصی از پروپ متصل می شود و محل اتصال فلوئوروکروم را به پروپ مشخص می کند. پس در این روش از یک عامل کمکی استفاده می شود و نمی گذاریم نشان دار به طور مستقیم به پروپ متصل شود (۱۳). در این تکنیک معمولاً چهار نوع کاوشگر مختلف از نظر محل اتصال آنها وجود دارند و توالی هایی از DNA که در تهیه هریک از انواع کاوشگرها استفاده می شوند نیز متفاوت است.

***I*. پروپ هایی که به لکوس خاصی[46] متصل می شوند.**

معمولاً در این گروه، کاوشگرها به قطعات کوچک و اختصاصی از یک کروموزوم متصل میشوند و به همین دلیل به آنها کاوشگرهای شناساگر لکوس های اختصاصی[47] (*LSI*) نیز گفته میشود. این کاوشگرها بیشتر در شناسایی سندرم های ناشی از ریزحذف ها و ریز مضاعف شدگی ها و نیز بسیاری از انکوژن ها کاربرد دارند. کاوشگرهای اختصاصی لکوس نواحی غیر تکراری *DNA* که معمولاً کد کننده یک ژن خاص هستند را هدف قرار می دهند.

***II*. پروپ هایی که به توالی های تکراری سانترومریک متصل می‌شوند.**

در تهیه کاوشگرهای گروه دوم (سانترومریک)، توالی های تکراری *DNA* آلفا ساتلایت که عاری از نواحی کد کننده ژن بوده و پلی مورفیک نیز هستند مورد استفاده قرار می گیرند. افراد مختلف تعداد واریانت های متفاوتی از این توالی ها را دارند. اکثریت این توالی ها یکسان بوده با این حال حدود ۲ تا ۳ ٪ از توالی ها در کروموزوم های مختلف متفاوت بوده که از این نواحی برای طراحی کاوشگرهای اختصاصی هر کروموزوم استفاده می شود. به استثنای کروموزوم های ۲۱ و ۱۳ و همچنین ۲۲ و ۱۴ که بدلیل همولوژی زیادی که در توالی های تکراری آلفا ساتلایت سانترومرشان وجود دارد نمی توان از کاوشگرهای سانترومریک برای ردیابی شان استفاده کرد. این کاوشگرها را معمولاً بعنوان نشانگر کروموزومی و یا شناسایی آنیوپلوئیدی ها استفاده می کنند.

***III*. پروپ هایی که به نواحی تلومریک متصل می شوند.**

برای طراحی کاوشگرهای گروه سوم (تلومریک و ساب تلومریک) نواحی نزدیک به تلومرهای (انتهای) هر کروموزوم که حاوی توالی های تکراری و اختصاصی هر کروموزوم می باشد را هدف قرار می دهند. این کاوشگرها را برای مشخص ساختن انتهای کروموزوم ها به منظور شناسایی حذفهای انتهایی، شناسایی جابه جایی های مخفی و همچنین در نقشه برداری ژنها و یافتن یک لکوس خاص روی یک کروموزوم خاص بکار گرفته می شوند.

***IV*. پروپ هایی که کل کروموزوم را رنگ آمیزی می کنند.**

کاوشگرهایی که کل کروموزوم[49] (*WCP*) را رنگ می کنند همچنین بنام کاوشگرهای رنگ کننده[50] مرسوم هستند. این کاوشگرها چندین ناحیه شامل لکوس های منحصر و توالی های تکراری را هدف قرار میدهند و در کنار هم بنظر می رسد کل کروموزوم رنگ گرفته است. این گروه از کاوشگرهای را معمولاً برای استفاده بر روی گستره های متافازی بکار می برند زیرا در سلول های اینترفازی ترکیب در همی از رنگها را میدهد که به هیچ عنوان قابل آنالیز نمی‌باشند. بهترین راه برای شناسایی بسیاری از اختلالات

43. Counter stain
44. Propidium Iodide (PI)
45. Diamidino-2-phenylindole (DAPI)
46. Unique sequence probes
47. Locus-Specific Identifier probes (LSI)
48. Cryptic translocations
49. Whole chromosome probes (WCP)
50. Painting Probes

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017

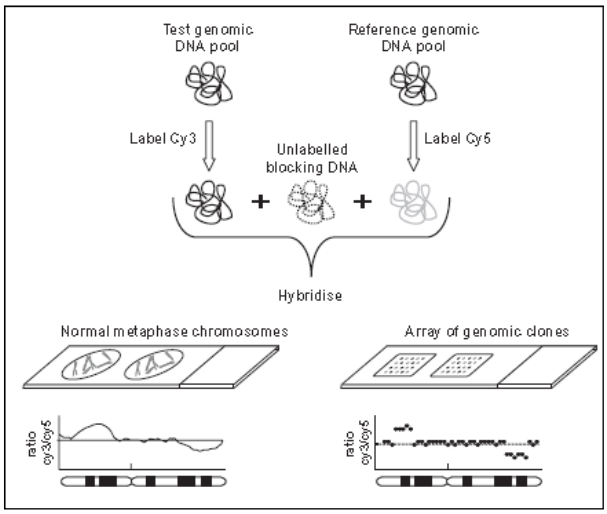
کروموزومی است که توسط سایر تکنیک ها قابل شناسایی نمی باشند.

بسته به اینکه از چه نوع کاوشگرهایی و با چه هدفی استفاده شود، امروزه انواع مختلفی از FISH معرفی شده است و همچنان نیز بر تعدادآن افزوده می شود. یکی از انواع آن فیش چندگانه[51] است که در آن کاوشگرهایی با رنگ های مختلف به طور همزمان برای ردیابی چند ژن مختلف استفاده می شود. در این زمان با کمک تکنیک فلوسیتومتری که امکان جداسازی کروموزوم های انسان بصورت تک به تک را فراهم ساخته بود و همچنین با استفاده از اطلاعات بدست آمده از پروژه ژنوم انسانی که توالی کامل همه کروموزوم ها را در اختیار دانشمندان قرار داد، متخصصان سیتوژنتیک توانستند مجموعه ای از ۲۴ کاوشگر مختلف را طراحی کرده که هریک از کروموزوم ها را با رنگی متفاوت متمایز سازد. این تکنیک قدرتمند (با قدرت تفکیک ۱ تا ۲ مگاباز) با بکارگیری این ۲۴ کاوشگر بر روی یک گستره متافازی امکان ردیابی همزمان همه کروموزوم ها را فراهم کرده است. این تکنیک را هم با اصطلاح مولتیپلکس فیش(M-FISH) و هم با عنوان اسکای فیش (SKY)(کاریوتایپ طیفی)[52] می شناسند. از کاربردهای این تکنیک شناسایی بازآرایی های بین کروموزومی[53] وبسیاری از درج ها، حذف ها و معکوس شدگی ها و همچنین آنیوپلوئیدی ها می‌باشد. از آنجا که در این تکنیک هر کروموزوم رنگ خاص خود را دارد یافتن جابجایی ها از طریق ردیابی رنگها بسیار سریعتر و با دقت بیشتری صورت میگیرد. SKY قادر به شناسایی مضاعف شدگی های روی یک کروموزوم نیست زیرا رنگی که این ناحیه می گیرد با نواحی کناری مشابه بوده و تفکیک آن را دشوار می سازد. با وجود مزایای ذکر شده یکی از عمده ترین محدودیت های تکنیک های مبتنی بر FISH هزینه های بالای تجهیزات و کاوشگرهای مورد استفاده است. این فن قدرت تفکیك خوبی (در حد ۴۰ تا ۲۵۰ کیلوباز) دارد اما به اطلاعات قبلی در مورد توالی نیاز دارد، همچنین زمان بر بوده و کل ژنوم را اسکرین نمی کند. همچنین در SKY نیاز به یک گستره کروموزومی نوعی محدودیت محسوب می شود (۱۷-۱۴).

۴. تکنیک دورگه سازی ژنومی مقایسه ای (CGH)

بیش از یک دهه است که فن دورگه سازی ژنومی مقایسه ای (CGH) به طور وسیع جهت بررسی تغییرات تعداد کپیDNA در یک موقعیت کروموزومی به کار می رود. CGH اولین بار درسال ۱۹۹۹ توسط کالیونیمی[54] و همکارانش معرفی شد (۱۸). فرایند تکنیک به این‌صورت است که ابتدا یک گستره ی متافازی با کاریوتایپ نرمال تهیه می شود (DNA تثبیت شده روی اسلاید DNAهدف نام دارد). سپس با DAPI جهت قابل تفکیک بودن کروموزوم ها از هم رنگ می شود. در ادامه DNA فرد بیمار (نمونه) و فرد سالم (مرجع) استخراج می شود و توسط Nick Translation با دو فلوروکروم متفاوت نشان دار می شوند. مقدار برابری از DNA مرجع و نمونه با هم و با DNAکنترل غیر نشان دار (جهت پوشاندن نواحی تکراری) مخلوط وبر روی گستره ی متافازی نرمال هیبرید می شود.

پس از شستشو، با میکروسکوپ فلوئورسانس ، تفاوت نسبت رنگ (شدت فلورسنت) نمونه به مرجع در امتداد کروموزوم ها بررسی می شود. سرانجام نسبت شدت فلوئورسانس نمونه به مرجع در امتداد هر کروموزوم به یک پروفایل کمی تبدیل می شود که تفاوت های تعداد کپی را نشان می دهد (شکل۳). مزیت اصلی این تکنیک، بررسی کل ژنوم در یک آزمایش و شناسایی هرگونه بدست آوردن[55] یا از دست دادن[56] ناحیه ای از ژنوم با سرعت و کارایی بالاست، اما قدرت تفکیك کمی دارد (در حد ۱۰ مگاباز



شکل ۳: نمایش شماتیک تکنیک دورگه سازی ژنومی مقایسه ای (CGH) (۱۸)

51. multiplex-FISH (M-FISH)
52. Spectral karyotyping (SKY)
53. Interchromosomal rearrangements
54. Kalioniemi

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017

که مشابه قدرت تفکیک روش های سنتی سیتوژنتیک است) (۲۰-۱۸). این تکنیک مقدمه ای بود بر ایجاد یک تکنیک بسیار قوی تر، با قدرت تفکیک خیلی زیاد بنام فن آرایه ی دورگه سازی ژنومی مقایسه ای(aCGH)[۵۷] که بدلیل بکارگیری آرایه ای از توالی های نرمالDNA بجای گستره کروموزومی بیشتر آن را در حوزه تکنیک های تشخیصی ملکولی قرار میدهند که در بخش دوم به آن می پردازیم.

II. تکنیک های ژنتیک ملکولی

امروزه تست های تشخیصی ملکولی بعنوان ابزار مناسبی در شناسایی، مانیتور و هدف قرار دادن بیماری های انسانی، حیوانی و گیاهی شناخته شده است. با قاطعیت می توان گفت اختراع PCR نقطه عطفی در سیر تحولی تکنیک های ژنتیک ملکولی بود. با اختراع PCR رویکردهای جدیدی در اختیار محققان و کادر درمانی برای تلاش در جهت بهبود کیفیت زندگی و افزایش طول عمر انسان قرار گرفت. گزارشات حاکی از این است که در دهه گذشته کاربرد تست های تشخیصی ملکولی سالانه ۱۱٪ افزایش نشان داده و پیش بینی می شود تا سال ۲۰۱۵ تحول چشمگیری در این حوزه مشاهده شود. در ادامه به معرفی برخی از متداول ترین و جدیدترین تکنیک های مبتنی بر DNA در تست های تشخیصی ملکولی می پردازیم.

۱. واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)[۵۸]

واکنش زنجیره ای پلیمرازی (PCR) اساس بیولوژی مولکولی مدرن در سرتاسر جهان است. معرفی این تکنیک توسط کری مولیس و مایکل اسمیت در سال ۱۹۹۳ باعث شد تا آنها جایزه نوبل شیمی را از آن خود کنند. یکی از کاربردهای PCR، مقایسه مقدار اولیه DNA و mRNA در بین دو یا چند نمونه است. در صورتی که هر دو نمونه با کارایی یکسانی در حین PCR تکثیر شوند، نمونه ای که پس از تکثیر، مقدار بیشتری ازDNAرا نشان میدهد، قبل از تکثیر نیز مقدار بیشتری از آن DNA را داشته است. به عبارتی هر توالی متناسب با مقدار اولیه اش در نمونه تکثیر می یابد. این منجر به تکامل متدهای رایج برای تعیین کمیت مقدار ژن و بیان ژن موسوم به PCR کمی و PCR نیمه کمی گشته است که در ادامه برخی از آنها را معرفی خواهیم کرد.

به طور کلی PCR شامل ۳ مرحله است: **الف) فاز نمایی**[۵۹]؛ در این مرحله به دلیل فراوان بودن اجزا و ترکیبات واکنش، واکنش، کارایی ۱۰۰٪ دارد. پس از هر چرخه ۲ برابر شدن محصولات صورت می‌گیرد. ب) **فاز خطی**[۶۰]؛ پس از مصرف شدن ترکیبات واکنش و کاهش مواد، واکنش تکثیر کند شده، دو برابر شدن محصولات PCR در انتهای هر چرخه رخ نمی دهد. به عبارتی تکثیر از حالت نمایی به صورت خطی می شود. حتی در طول این فاز مقدار تکثیر نمونه های تکراری به علت تفاوت در مقدار ترکیبات و مواد موجود در واکنش و تفاوت در تجمع محصولات دچار تغییر و تفاوت می شود. ج) **فاز سکون**[۶۱]؛ سرانجام به دلیل تمام شدن ترکیبات واکنش، واکنش متوقف شده، هیچ محصولی ساخته نمی‌شود و اگر محصولات PCR برای مدت زمان طولانی در این مرحله به حال خود رها شود، شروع به تجزیه شدن می‌نمایند(۲۱).

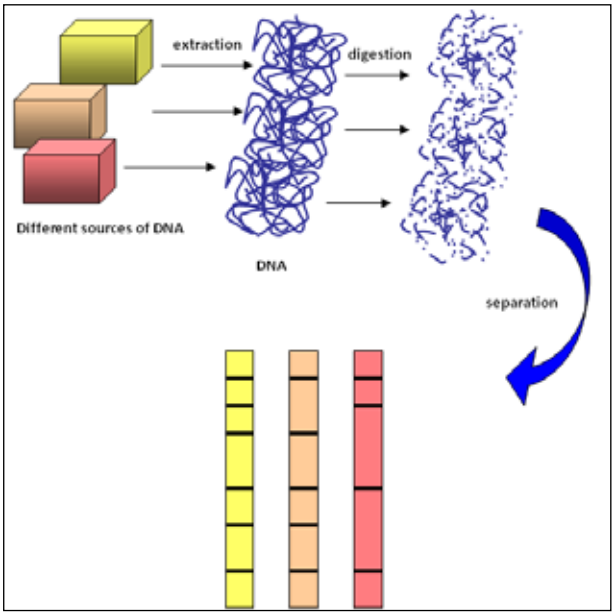
در ادامه برای مرئی سازی، محصول واکنش را روی ژل برده تا با روش های الکتروفورتیک باندهای مختلف تکثیر شده را جداسازی نماییم. براساس شدت باند مشاهده شده پس از تصویربرداری با دستگاه ژل داکیومنتیشن می توان به وجود یا عدم وجود توالی مورد نظر در نمونه مورد بررسی پی برد. این روش بسیار زمان بر بوده و بیشتر برای مطالعات کیفی بکار می روند و حساسیت بالایی ندارد. در سالهای بعد همزمان با پیشرفتهایی در حوزه بیوانفورماتیک، بهبود روشهای الکتروفورتیک و کشف آنزیم های پلیمراز و هضم کننده کاراتر کیفیت و حساسیت تکنیک های مبتنی بر PCR افزایش یافته و در نتیجه کاربرد آن در حوزه های مختلف افزایش یافت که در ادامه برخی از آنها را معرفی می‌کنیم.

۲. PCR و پلی مورفیسم قطعات طولی محدود(PCR-RFLP)[۶۲]

امروزه یکی از روش های استاندارد در شناسایی پلی مورفیسم ها (توالی های چند شکلی) تکنیک PCR-RFLP است. این روش مبتنی بر هضم الگو توسط اندونوکلئازهای اختصاصی بوده که هریک جایگاه های شناسایی و برش خاص خود را دارند. بیشترین کاربرد این تکنیک بررسی واریانت های کروموزومی و نقشه

55. Gain
56. Loss
57. array Comparative Genomic Hybridization(aCGH)
58. Polymerase Chain Reaction (PCR)
59. Exponential
60. Linear
61. Plateau
62. Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP)

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017



شکل ۴: دیاگرامی شماتیک از تکنیک PCR-RFLP ، برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه شود (۲۴).

برداری از پلی مورفیسم های مرتبط با بیماری هاست. اولین گزارش قطعی از کاربرد PCR در تشخیص های ملکولی مربوط به استفاده از تکنیک PCR-RFLP برای شناسایی کم خونی سیکل سل می باشد. علیرغم زمان بر بودن این متود هنوز هم در مطالعاتی که در آنها انتخاب بکمک نشانگر انجام می شود، مثل تستهای تشخیصی میکروبیولوژی مورد استفاده قرار می گیرد (۲۲،۲۳).

همانطور که در شکل ۴ می بینید پس از استخراج DNA از نمونه های مختلف و تکثیر کردن توالی مورد نظر به کمک PCR، آنها را تحت تاثیر آنزیم های محدودالاثر اختصاصی قرار داده و محصولات هضم آنزیمی هر نمونه را در چاهک جداگانه ای اکتروفورز می کنیم. بدلیل تفاوت در محل قرار گیری جایگاه های شناسایی و برش آنزیم های مورد استفاده در نمونه های مختلف، محصول هضم آنزیمی هر نمونه حاوی تعداد متفاوتی از قطعات با طول های متفاوت می باشد. با تفسیر مناسب باندهای بدست آمده روی ژل میتوان پلی مورفیسم های مختلفی را شناسایی و ارتباط آنها با بیماری یا دارویی خاص مورد مطالعه قرار داد. به مرور شاهد ایجاد تکنیک های مکمل PCR-RFLP شدیم که برخی حتی امروزه جایگزین روش اولیه شدند و هدف همه این تغییرات افزایش سرعت و دقت در شناسایی پلی مورفیسم های می باشد. از جمله میتوان AFLP[۶۳]، CAPS[۶۴] و ASO[۶۵] را نام برد (۲۴).

۳. تکثیر تصادفی قطعات چند شکلی (RAPD)[۶۶]

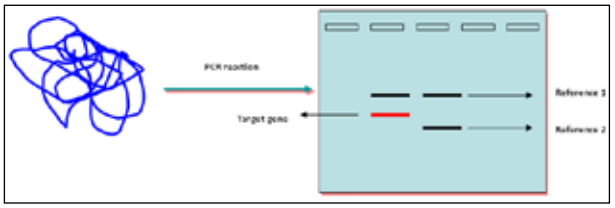
تغییر و اصلاح دیگری که منجر به کشف تکنیک وابسته به PCR جدیدی شد، مبتنی بر تکثیر تصادفی یا رندوم DNA است که اولین بار توسط ویلیام وهمکارانش در دهه ۱۹۹۰ معرفی گردید. این تکنیک را به اختصار RAPD-PCR می نامند. در این روش از یک پرایمر غیر اختصاصی به طول ۱۲-۸ یا (۱۵-۵) نوکلئوتید برای واکنش PCR استفاده می شود. پس از الکتروفورز محصول PCR در نمونه های مختلف برای هر نمونه یک پروفایل نسبتاً منحصربه فردی بدست می آید که می توان از آن برای شناسایی سریع بسیاری از پاتوژن های باکتریایی استفاده کرد. از نقاط قوت این تکنیک این است که برای بدست آوردن پروفایل RAPD نیاز به داشتن اطلاعات قبلی از توالی DNA مورد نظر نیست و این مزیت باعث کاربرد گسترده این تکنیک در تست-های میکروبیولوژیک شده است. با وجود راحتی، ارزان بودن و سرعت بالای این تکنیک، قدرت تفکیک و حساسیت آن در مقایسه با بسیاری از روش های هدفمند PCR کمتر می باشد.پس از این بیشتر تکنیک‌ها به سمت کمی سازی و بدست آوردن معیارهایی برای بیان تعداد نسخه اولیه یا میزان بیان ژن در شرایط مختلف می پردازند (۲۴).

۴. تکنیک PCR تمایزی دوگانه (ddPCR)

تکنیک PCR تمایزی (dPCR)[۶۷] و PCR تمایزی دوگانه (ddPCR)[۶۸] روش های تشخیصی ارزشمندی هستند که توسط آنها می توان نسبت تعداد رونوشت ژن های مختلف را بصورت کمی تعیین کرد. این روش بطور فوق العاده ای برای تخمین حذف و مضاعف شدگی ژن ها در بافت های سرطانی مفید است. در PCR تمایزی یا dPCR یک رونوشت ژنی منفرد (به عنوان مثال β-گلوبین یا HBB) به عنوان ژن مرجع[۶۹] و ژن مورد نظر (که می تواند یک پروتوانکوژن باشد) را در یک لوله مشترک بطور همزمان تحت

63. Amplified Fragment Length Polymorphism
64. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
65. Allele Specific Oligonucleotide probes
66. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR)
67. Differential PCR
68. double differential PCR (ddPCR)

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017



شکل ۵: دیاگرامی شماتیک از تکنیک ddPCR ، برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه شود (۲۴).

PCR قرار می دهند. در انتها دو محصول از PCR بدست می‌آید که می توان با روش های کمی سازی معیاری کمی از تعداد رونوشت آنها بدست آورد.

نهایتا اطلاعاتی در مورد نسبت کمی قطعات ژنی تکثیر شده توسط PCR بدست می آید که به این نسبت بار ژن[۷۰] یا AGCN[۷۱] گفته می شود و نشان دهنده میانگین تعداد رونوشت ژن مورد نظر (مثلا پروتوانکوژن ها در نمونه های سرطانی) نسبت به تعداد رونوشت ژن مرجع در سلول می باشد. در سلول های نرمال این نسبت را یک در نظر می گیرند (AGCN=1). حال اگر در نمونه های مورد بررسی نسبت کمتر از یک بدست آمد (AGCN<1) نشان دهنده حذف، و اگر نسبت بیشتر از یک بدست آمد (AGCN>1) حاکی از مضاعف شدگی در آنها می باشد. در روش PCR تمایزی دوگانه یا ddPCR همین فرآیند را با دو ژن مرجع انجام می دهند. برای ژن مرجع دوم می توان به عنوان مثال از ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD)[۷۲] استفاده کرد. نسبت ۱:۱ بدست آمده برای دو ژن مرجع نشان دهنده عملکرد مناسب پرایمرهای استفاده شده و غلظت مطلوب آنها در آزمایش بوده است (شکل ۵). مزیت دیگر این روش نسبت به dPCR این است که نسبت ۱:۱ دو ژن مرجع را می توان برای تایید صحت نتایج حاصل از کمی سازی بکار برد (۲۵,۲۶).

۵. واکنش زنجیره ای پلیمرازی در زمان واقعی

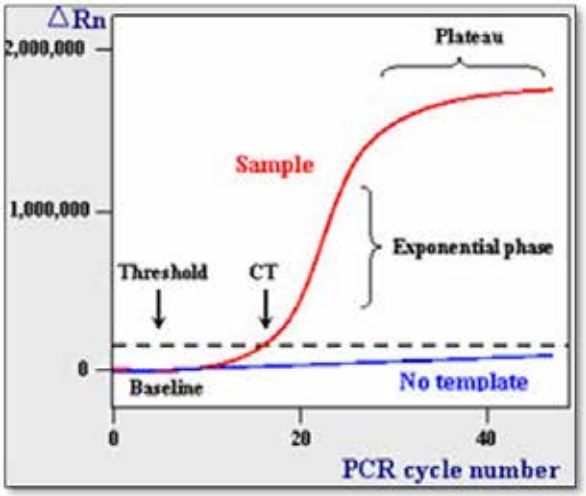
واکنش زنجیره پلیمرازی در زمان واقعی[۷۳]که واکنش زنجیره پلیمرازی حرکتی[۷۴] (KPCR) یا واکنش زنجیری پلیمرازی کمی[۷۵](QPCR) نیز نامیده می شود، یک روش آزمایشگاهی بر اساس PCR است که برای تکثیر و تعیین کمی مولکول DNA یا mRNAبه طور همزمان به کار می رود. این تکنیک مشابه PCR ساده است. با این تفاوت که قادر است تکثیر یک توالی هدف را در حین انجام واکنش و در مراحل اولیه واکنش یعنی در فاز نمایی و زمانی که تکثیر توالی هدف بسیار کارا است با استفاده از تکنولوژی فلوئورسانت اندازه گیری کند. یعنی در حین انجام PCR، با افزایش تعداد کپی های ژن هدف ناشی از تکثیر، نور فلوئورسانت ساطع شده از نشانگرهای فلوئورسانت افزایش می یابد که این افزایش توسط دتکتور اندازه گیری و محاسبه شده و به یک مقدار عددی تبدیل می شود. این امکان پس از ورود نسل جدیدی از ترموسایکلرها با سیستم فلورومتری که اجازه پایش پیوسته خاصیت فلوئورسانس محصول PCR در زمان جمع شدن را می‌دهد، فراهم شد.

این روش قادر به آشکار سازی و نیز اندازه-گیری یک یا تعداد بیشتری توالی های ویژه در نمونه DNA می باشد. این روش در سال ۱۹۹۲ برای نخستین بار و توسط هیگوچی[۷۶] و همکاران معرفی گردید (۲۷,۲۸).برای انجام PCR در زمان واقعی از دستگاه Real Time PCR Thermal Cycler استفاده می شود. این دستگاه قادر به تکثیر محصولات PCR و همچنین آنالیز داده‌های بدست آمده بطور همزمان می‌باشد. برای انجام این دو کار، ماشین Real Time PCR با فلئومترها و نمایشگرهایی که هم توانایی تحریک فلئوروکروم و هم توانایی تشخیص نور ساطع شده را دارند، ترکیب شده است. مدل های متفاوتی از Thermal Cycler وجود دارد. ساده ترین آنها ماشین تک کاناله کم هزینه برای تشخیص سایبرگرین یعنی Bio-Rad DNA Engine Optic است. علاوه بر آنها ماشین های ABI Sequence DeteCt ion و Light Cycler و یک ماشین چندکاناله پیچیده شامل Real-Time PCR System from Applied Biosystem ۷۵۰۰ می باشد (۲۱).

نتایج یک واکنش Real Time PCR به فرم یک گرافی می باشد که در این گراف تعداد چرخه های PCR (محور X) در مقابل افزایش فلوئورسانت (محور Y) نشان داده می شود. این منجر به رسم منحنی تکثیر می شود. خط افقی روی منحنی نشان دهنده یک حد آستانه است (شکل۶). خط آستانه سطحی از تشخیص یا نقطه ای است که در این نقطه شدت فلوئورسانت ساطع شده به بالاتر از حد پایه می رسد.

70. Gene load
71. Average Gene Copy Number (AGCN)
72. Superoxide dismutase
73. Real Time PCR
74. Kinetic PCR
75. Quantitative PCR
76. Higuchi

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017



شکل ۶: مراحل مختلف تکثیر، خط آستانه و سیکل آستانه یک گرافReal Time PCR مشخص شده است.

برای تعیین مقدار آستانه نخست باید مقدار سیگنال فلوئورسانت پایه شناسایی شود. در طول ۳ تا ۱۵ چرخه اول، میانگین مقدار فلوئورسانت ساطع شده به عنوان اساس محاسبه مقدار پایه محسوب می شود. مقدار آستانه در ۳ انحراف استاندارد بالای مقدار متوسط فلوئورسانت پایه تعیین می‌شود. این خط آستانه در طول فاز لگاریتمی واکنش قرار دارد.

چرخه ای که در آن چرخه سیگنال فلوئورسانت (یا منحنی تکثیر) به این حد آستانه می رسد و بالاتر از سطح پایه قرار می گیرد به عنوان Ct معروف است. از Ct برای اندازه گیری تفاوت میزان DNA یا mRNA بین نمونه ها استفاده می شود. مقدار Ct نشان دهنده مقدار اولیه کپی ژن هدف در نمونه مورد نظر است. هر چه مقدار Ct نمونه ای کمتر باشد، نشان دهنده مقدار آغازی DNAیا mRNA بیشتر در آن نمونه است. در یک واکنش ۱۰۰٪ کارا، محصولات در هر چرخه دو برابر شده، در نتیجه تفاوت در مقدار Ct بین نمونه های متفاوت با تفاوت در مقدار آغازی توالی هدف مرتبط است. تفاوت در مقدار اولیه DNA هدف در بین ۲ نمونه در صورت یکسان بودن کارایی تکثیر در هر دو نمونه از معادله زیر بدست می آید:

تفاوت مقدار توالی هدف بین دو نمونه=$2^{(Ct\,1-Ct\,2)}$

Ct_1 نمونه اول= Ct / Ct_2 نمونه دوم=

در صورتی که دلتا Ct معادل ۱ باشد، یعنی تفاوت دو برابری در مقدار آغازی توالی هدف بین دو نمونه وجود دارد.

نمونه ای با مقدار Ct کمتر دارای مقدار آغازی توالی هدف بیشتری است. زیرا در صورتی که در نمونه ای مقدار اولیه کپی های ژن هدف افزایش یابد، افزایش در نور فلوئورسانت ساطع شده در طی واکنش PCR زودتر رخ می دهد و منحنی زودتر و در چرخه کمتری به حد آستانه می رسد و Ct آن نمونه کمتر می شود(۲۱). تعیین کمیت DNA یا RNA توسط Real Time PCR به دو صورت است:

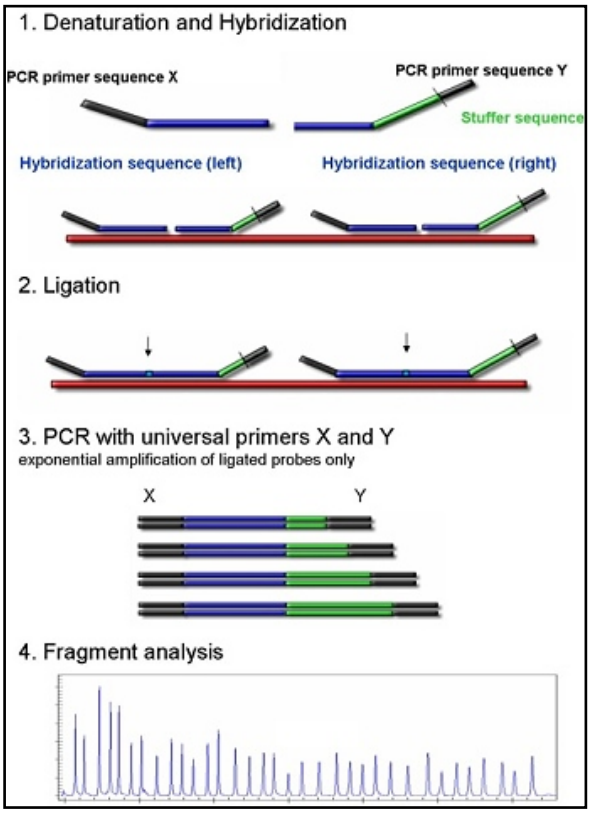
کمی سازی مطلق[77]: در این نوع تعیین کمیت از یک DNA استاندارد استفاده می شود. استاندارد DNA همان توالی ژن هدف است. یک سری رقت از این DNA استاندارد تهیه شده و هر رقت توسط پرایمرهای اختصاصی ژن هدف تکثیر می شود. منحنی تکثیر هر رقت رسم شده و Ct هر رقت محاسبه می گردد. سپس منحنی استاندارد (Ct هر رقت در مقابل غلظت یا تعداد کپی هر رقت) رسم می گردد. سپس هر نمونه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن هدف PCR می شود. Ct ژن هدف در هر نمونه محاسبه می گردد. این Ct با منحنی استاندارد مقایسه شده و از روی منحنی استاندارد غلظت یا تعداد کپی ژن هدف محاسبه می‌شود. از طرف دیگر به دلیل متفاوت بودن جرم بافتهای مختلف، تفاوت در تعداد سلولهای هر بافت، مقدار و ماهیت DNA استخراج شده متفاوت است. پس برای نرمالیزه نمودن تعیین کمیت ژن هدف در هر نمونه از یک ژن کنترل استفاده می گردد.

کمی سازی نسبی[78]: در این نوع از تعیین کمیت مقدار ژن یا مقدار بیان ژن در نمونه بیمار در مقایسه با نمونه نرمال و به صورت نسبی بیان می شود. در این حالت نیز به دلیل متفاوت بودن مقدار DNA استخراج شده از نمونه های مختلف، نتایج مربوط به ژن هدف اغلب با یک ژن کنترل نرمالیزه می گردد. ژن کنترلی که در Real Time PCR استفاده می شود، ژنی است که در شرایط مختلف و در بافت های مختلف ثابت و بدون تغییر باشد. در بررسی بیان ژن از ژن های خانه دار به عنوان ژن کنترل استفاده می گردد. این ژن ها معمولا شامل آلبومین، گلیسرآلدهید فسفات دهیدروژناز، بتا اکتین، بتاگلوبین، یوبی کویتین، توبولین و ... می باشند (۲۱,۲۹).

۶.روشهای مبتنی بر PCR چند تایی

77. Absolute quantization
78. Relative quantization

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017



شکل ۷: مراحل مختلف تکنیک MLPA را میتوان به ۴ مرحله تقسیم کرد: ۱) واسرشت شدن DNA و سپس هیبرید پروبها به توالیهای هدف؛ ۲) واکنشهای مربوط به اتصال دو نصفه پروب به یکدیگر؛ ۳) تکثیرهایPCR به کمک پرایمرهای عمومی؛ ۴) تفکیک محصولاتPCR با الکتروفورز و آنالیز داده ها (۳۰)

در روش هیبرید سازی کاوشگر تکثیرشونده چندتایی[۷۹](MAPH)، تعداد زیادی (۴۰ تا ۵۰ توالی) توالی هدف ویژه کمی سازی می گردند.MAPH از کاوشگرهای اختصاصی استفاده میکندکه با توالیهای اسیدنوکلئیکی ویژه از DNA ژنومی تثبیت شده روی غشا، هیبرید می شوند .سپس غشا را شسته تا کاوشگرهای متصل نشده حذف گردند کاوشگرهایی که اتصال اختصاصی یافته اند بطور نسبی حاکی از تعداد کپی هدفشان می باشد. در آخر کاوشگرها از غشا جدا شده و با استفاده از یك جفت پرایمر (universal) تکثیرمی گردد و یك فرآورده تکثیری با اندازه منحصر به فرد ایجاد می کند .تعداد نسخه توالی های هدف، پس از الکتروفورز و مقایسه نسبی باندها قابل ارزیابی می باشد .اگرچه MAPHدرتشخیص حذف ها و مضاعف شدگی ها بسیار قابل اعتماد است، استفاده از آن دشواراست. این روش نیازمند لکه گذاری نمونه هایDNA برروی قطعه های کوچك فیلترنایلونی، مرحله پیش ازدورگه سازی، دورگه سازی، چندین مرحله شستشوی فیلترها، انتقال فیلترها به لوله هایPCR ، دو مرحله PCR چندتایی (مولتیپلکس PCR) وسرانجام آنالیز فرآورده های PCR است(۳۰,۳۱).

درسال ۲۰۰۲، اسکوتن[۸۰] و همکارانش درهلند روشی جدید و کارامد باعنوان تکثیر کاوشگر وابسته به الحاق چندتایی[۸۱] (MLPA) مشابه با MAPH ابداع نمودندکه جزییات آن درپی میآید. روشی باکارآیی بالااست که برای مشخص کردن تعداد نسخه های ۴۰ تا ۵۰ توالی DNA ژنومی در یك واکنش که برمبنای DNA چندتایی می باشد، توسعه یافته است. قطعه های تکثیری حاصل ازMLPA ، بین ۱۰۰تا ۵۰۰ نوکلئوتید طول دارند که قابل جداسازی وکمی سازی به وسیله الکتروفورز موئینه هستند.MLPA را می توان بر روی تا۹۶ نمونه به طورهمزمان انجام داد و به نتایج آن در دو روز دست یافت.

در این روش از بیش از ۴۰ کاوشگر استفاده می شود که هر یک اختصاصی یک توالی متفاوتی (عمدتاً نواحی اگزونی را هدف قرار میدهند) از DNAمی باشد. هر کاوشگر از دو نصفه کاوشگر ۵ پریم و ۳ پریم تشکیل شده و هر یک از نصفه کاوشگرها شامل یک توالی اختصاصی هدف و یک توالی پرایمر عمومی می باشد. این متود امکان تکثیر همزمان همه کاوشگرها را طی یک واکنش DNA فراهم می سازد. همچنین هر نصفه کاوشگر حاوی قطعاتی تصادفی با طول های متغیر هستند تا امکان تفاوت اندازه مورد نیاز برای تفکیک باندها پس از الکتروفورز را فراهم نمایند(۳۰,۳۱). درخلالPCR نمونه DNA هدف تکثیر نمی شود، بلکه پروب های MLPA که مکمل DNA هدف هستند و با آن هیبرید میشوند، تکثیر می گردند. این روش حساستر از MAPH بوده و استفاده از آن آسانتر است. افزون براین، برخلاف MAPH در MLPA بی‌جنبش سازی نمونه ها ی اسید نوکلئیك و حذف پروبهای اضافی لازم نیست. با وجود آنکه دو روش فوق الذکر دارای اصول اولیه یکسان و نتایج مشابهی هستند ولی تفاوت هایی در مزایا و معایب آنها وجود دارد. از جمله اینکه مرحله تهیه پروب برای MAPH خیلی

79. Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH)
80. Schouten
81. Multiplex Ligation-dependent Probe amplification (MLPA)

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017

ساده تر از تولید پروب برای تکنیک MLPA است (که نیازمند کلونینگ به کمک M۱۳ می باشد). اما محدودیت پروب های MAPH این است که ذاتاً قابل تکثیر بوده و دارای ریسک آلودگی بیشتری نسبت به پروب های MLPA می باشد که فقط پس از مرحله اتصال تکثیر می گردند. بعلاوه مرحله شستشو در تکنیک MAPH که برای حذف پروب های متصل نشده صورت می گیرد نیز احتمال آلودگی را بالا می برد. تکنیک MLPA در فاز کاملاً مایع پیش می رود و بنابراین امکان انجام خودکار تعداد زیادی نمونه را فراهم کرده است؛ که این مسئله کارایی آن را نسبت به MAPH افزایش داده است. تفاوت دیگر این دو تکنیک مقدار نمونه DNA مورد نیاز است بطوریکه، MAPH نیازمند ۱μg نمونه DNA است درحالیکه تکنیک MLPA با تنها ۲۰ng نمونه DNA جواب می دهد؛ البته در برخی مطالعات وجود ۱۰۰-۲۰۰ng از نمونه DNA برای دستیابی به نتایج مطلوب ضروری گزارش شده است (شکل ۷) (۳۳-۳۱).

۷.ریز آرایه ها و تکنولوژی های مرتبط[۸۲]

تکنولوژی ریزآرایه روشی بسیار قدرتمند برای بررسی بیان هزاران ژن بصورت همزمان و شناسایی هزاران واکنش پروتئینی می باشد. این تکنولوژی دو زیرمجموعه عمده شامل "ریزآرایهDNA" و "ریزآرایه پروتئین" را شامل می شود. با استفاده ازریزآرایه DNA بررسی بیان هزاران ژن به صورت همزمان فراهم می شود . اهداف اینگونه تحلیل های ژنی عبارتند از ۱) چگونگی تاثیر بیان هر ژن منفرد بر بیان ژنهای دیگر ۲) چگونگی بیان ژن درسلول های سالم و بیمار. اولین بار این رویکرد ریزآرایهDNA یا DNAchip برای شناسایی قطعات ویژه ای از DNA در بین انبوهی از توالی های DNA ناشناخته مورد استفاده قرار گرفت. در واقع تکنولوژی ریزآرایه شکل تکامل یافته ای از تکنیک ساترن بلاتینگ[۸۳] است که در آن قطعات DNA به سطح یک سوبسترا متصل شده و با یک قطعه مشخص از DNA به عنوان شناساگر[۸۴] مورد شناسایی قرار می گیرد. پس از آن از این روش برای شناسایی RNA نیز استفاده شد، بطوریکه امکان شناسایی یک RNA خاص را در بین ترانسکریپتوم[۸۵] سلول فراهم کرد (۳۴).

ریزآرایه ها به دو صورت وجود دارند:

۱- نوع سنتی آن که ارای فاز- جامد[۸۶] می باشد حاوی مجموعه‌ای از نقاط میکروسکوپی است که هر یک شامل هزاران توالی شناساگر مشابه است که به سطح جامدی از جنس شیشه، پلاستیک و یا بیوچیپ های سیلیکونی متصل می شوند.

۲- نوع دیگر آن که بید آرایه ها[۸۷] گفته می شود حاوی مجموعه ای از ذرات پلی استیرن میکروسکوپی است که هر یک از آنها دارای یک نوع شناساگر ویژه به همراه نسبتی از دو یا چندین رنگ مختلف که نشانگر آن شناساگر ویژه هستند، می باشند. این رنگ ها با رنگ های متصل به توالی های هدف تداخلی ایجاد نمی کنند (۳۴).

برای تهیه ریزآرایه باید طبق مراحل زیر عمل کرد: ۱) نمونه گیری ۲) خالص سازی نمونه و جداسازی mRNA ها ۳) انجام رونویسی معکوس و تهیهcDNA ۴) متصل کردن cDNA به رنگهای فلوئورسنت مانند CY۳ ۵) ریختن محلول برروی سطح ریزارایه که ازقبل توسط توالیهای ژن مورد نظر پوشیده شده است، مدتی صبر میکنیم تا هیبریداسیون میان cDNA ها و توالیهای سطح ریزاری انجام گیرد ۶) شستشو ۷) بررسی وپردازش داده ها (شکل ۸).

اساس این روش بر هیبریداسیون بین نمونه های DNA مورد بررسی و مجموعه ای از قطعات DNA که بصورت نقاط میکروسکوپی به یک سطح جامد متصل هستند، می باشد. هر یک از این نقاط میکروسکوپی حاوی چندین پیکومول از یک توالی ویژه DNA است که به عنوان شناساگر عمل می کنند. توالی هدف معمولا به یک نورتاب شیمیایی[۸۸]، فلوروفور و یا نقره متصل شده و هیبریداسیون بین هدف- شناساگر باعث شناسایی و تعیین مقدار نسبی آن می شود. هرچه جفت بازهای بیشتری باهم مکمل شوند، پیوند هیدروژنی قوی تر می باشد. چنین اتصالی دراثرشستشو از بین نمی رود درحالی که اتصالهای ضعیف، که جفت بازهای کمتری را به اشتراك می گذارند، با شستشو از سیستم حذف می شوند. میزان شدت وقدرت سیگنال نهایی وابسته به میزان نمونه هایی است که باتوالی های روی سطح، اتصال قوی برقرارکرده اند.به علت فراهم کردن چندین هزار شناساگر در یک ریزآرایه، از این تکنیک می توان جهت بررسی سطح بیان چندین ژن بطور همزمان و یا

82. Microarrays and related technologies
83. Southern blotting
84. Prob
85. Transcriptome
86. Solid-phase array
87. Bead array
88. Chemiluminescence

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017

تعیین ژنوتیپ چندین ناحیه در طول ژنوم استفاده کرد. از این رو ریزآرایه بطور چشمگیری باعث افزایش سرعت تحقیقات در بخش های مختلف بیولوژی و پزشکی شده است.

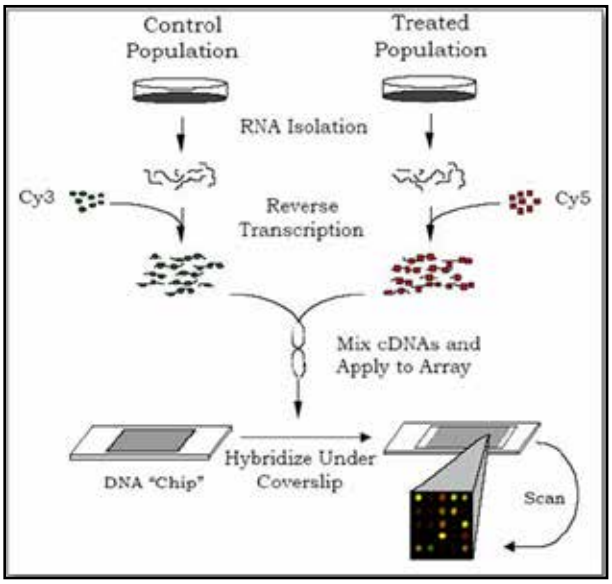
برخی از کاربردهای مهم ریزآرایه DNA عبارتند از:

۱)بررسی بیان ژن وتغییرات آن در اثرعواملی مانند درمان، عوامل بیماری زا، آسیب سلول و غیره ...؛

۲) ریزآرایه ی دورگه سازی ژنومی مقایسه ای(array CGH)، تعیین محتوای ژنوم موجودات زنده ومقایسه آنها با یکدیگر بر روی ریزآرایه های تهیه شده؛

۳) شناسایی چندشکلی های تك نوکلئوتیدی به کمک ریزآرایه های چند شکلی تک نوکلئوتیدی[۸۹] (SNP array)؛ (۳۶-۳۴).

دورگه سازی ژنومی مقایسه ای ریزآرایه (Array- CGH) نیز قادر به شناسایی حذف‌ها ودوتاشدگی ها می باشد. این فن شامل دورگه سازی DNA بیمار ومرجع باقطعه های کوتاه DNA متصل به اسلایدهای شیشه ای است. توالی های هدف DNA با استفاده از دستگاه هایی روی لامهای میکروسکوپ لکه گذاری می شوند تا یك ریزآرایه تولید شود که هر DNA هدف روی آن دارای موقعیت منحصربه فردی است. پس ازدورگه سازی وشستشو (برای برداشتنDNA متصل نشده)، سطح نسبی فلئورسانس با



شکل ۸: طرحی شماتیک از مراحل کار با ریزآرایه ها (برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه شود)[۹۰]

استفاده ازنرم افزار رایانها اندازه گیری می شود این روش سریع بوده و قابلیت خودکاری وقدرت تفکیك بالایی (حدود 100Kb) دارد و همچنین قادر است بطور همزمان نسبت به ارزیابی کامل ژنوم مورد استفاده قرار گیرد .یکی ازمحدودیتهای آرایه CGH درتشخیص‌های پیش ازتولد، تفسیر نتایج به ویژه درمواردی است که علایم بالینی یك تغییر کروموزومی ویژه به طور دقیق مشخص نیست. از دیگر محدودیت های این تکنیک تشخیص اختلالات ساختاری کروموزومی مرتبط با بازآرایی های متعادل[۹۱] و تا حدودی تشخیص دقیق اختلالات موزائیسم می باشد. همچنین این فن قادر به شناسایی نوارایی های متعادل نیست. به علاوه بی تعادلی های تعداد کپی را نسبت به دیگر توالی های همان ژنوم می سنجد و نمی تواند پلی پلوئیدی را نشان دهد. از مزایای فن aCGH، بازده و قدرت تفکیك بالا،امکان اتوماسیون فرایند ، نیاز به زمان اندک ، نیاز به مقدار نمونه ی کم ، قابلیت نشان دادن موزائیسم ها، نشان دادن بی تعادلی های پیش بینی نشده از مزایای این فن می باشد (۳۷,۳۸).

کشف ژن بیماری، شناسایی تغییرات ژنوم سوماتیک در سرطان، شناسایی پلی مورفیسم های جمعیت انسانی، مطالعات تکاملی، کشف سندروم های جدید، تشخیص پیش از تولد، از کاربردهای این فن هستند. این کاریوتایپ مولکولی جهت کشف ژن بیماری های تک ژنی که مکانیسم بیماریزایی شان ناکارامدی هاپلوئیدی است ، کاربردی است.البته تغییرات باید اندازه قابل تشخیص با تکنیک به کار رفته را داشته باشند (۳۹,۴۰).

روش ریزآرایه های چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP array) جهت شناسایی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی یا SNPها بکار می‌رود. SNPها رایج ترین شکل تنوع در ژنوم هستند. به عنوان مثال بیش از ۵۰ میلیون SNP در ژنوم انسان شناسایی شده است. از آنجایی که SNPها در طول تکامل و در جمعیت های مختلف حفظ شده اند، نقشه SNPها به عنوان نشانگرهای ژنوتیپی بسیار خوبی بکار می روند. مهمترین کاربرد این تکنیک در تعیین حساسیت بیماری[۹۲] و طراحی داروهای اختصاصی برای هر فرد می‌باشد. روش آنالیز پیوستگی ژنها بر پایه SNP[۹۳] در نقشه برداری لکوس های بیماری و در تعیین ژنهای حساس به بیماری در افراد

89. Single Nucleotide Polymorphism Array (SNP Array)
90. http://people.uwec.edu/piercech/tox/techniques.htm
91. Balanced Rearrangements
92. disease susceptibility

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017

مختلف مورد استفاده قرار می گیرد. استفاده از نقشه های SNP همراه با انجام SNP array می تواند در شناسایی بیماری-های ژنتیکی که دارای صفات فنوتیپی پیچیده ای هستند، کمک کننده باشد. در واقع SNP ها در تشخیص حذف ها و اضافه شدگی ها در ژنوم استفاده می شوند. این مطالعات درزمینه های مختلفی می توانند موثر باشند مانند: تعیین ژنوتیپ، اندازه گیری احتمال ابتلابه برخی از بیماری ها،تخمین جهش های سلولهای زایا و جهش های سوماتیك درسرطان، آنالیزهای پیوستگی ژنتیکی، تعیین کاهش چند تخمی بودن و بسیاری از موارد دیگر (۴۳-۴۱).

۸.تکنولوژی های نسل جدید توالی یابی[۹۴] (NGS)

روش توالی یابی اتومات شده سانگر (همان روش تجزیه شیمیایی) را امروزه به عنوان تکنولوژی توالی یابی نسل اول[۹۵] می شناسند و روشهای پیشرفته تر را توالی یابی نسل جدید (NGS) می‌نامند که معمولاً به دو گروه نسل دوم و نسل سوم تقسیم می شوند. روشهای توالی یابی نسل چهارم هم که هنوز در اول راه هستند از تکنولوژی نانو و توالی یابی به کمک اگزونوکلئازها بهره برده و هنوز کارایی آنها ارزیابی نشده است. در واقع تکنولوژی های توالی یابی نسل جدید ترکیب متنوعی از انواع روش های آماده سازی اولیه نمونه، توالی یابی، تصویر برداری یا مرئی سازی، روشهای قطعه قطعه کردن ژنوم مورد مطالعه، سرهم کردن قطعات توالی یابی شده و آنالیز داده ها می باشد. تکنولوژی را بر اساس الگویی که برای توالی یابی استفاده می شود به دو دسته تقسیم می کنند:

۱) الگوهای تکثیر شده بصورت کلنی؛ که برای تکثیرشان از روش PCR در مایع و یا روش های تکثیر بر روی سطوح جامد استفاده می شود؛

۲) الگوهایی که بصورت تک ملکول مورد استفاده قرار می گیرند. متداول ترین روشهای توالی یابی مورد استفاده هم شامل ماکسام گیلبرت و سایر روشهای شیمیایی، روش سانگر و سایر روشهای آنزیمی، پیروسکوئنسینگ و توالی یابی تک ملکول به کمک اگزونوکلئاز ها می باشد. توسعه و پیشرفت روز افزون دانش پزشکی و همچنین استفاده از تکنولوژی های تشخیصی جدید در این رشته در زمینه ژنتیک پزشکی -بویژه پس از تکمیل پروژه ژنوم انسانی- باعث پیشرفت سریع دانش ژنتیک در زمینه روش های جدید توالی یابی گردید که منجر به ظهور نسل جدید توالی یابی ژنومی یا NGS گردید. از کاربردهای این تکنولوژی پیشرفته در سطح ژنوم (توالی یابی de novo، توالی یابی مجدد کل ژنوم، بررسی های جامع تمام SNPها ، تغییرات ساختاری و تغییر در تعداد نسخه ژنها، شناسایی چند شکلی ها و جهشهای نقطه ای)، در سطح ترنسکریپتوم (بررسی بیان ژنها، شناسایی جهش های سماتیک و شناسایی پردازش جایگزین، تعیین پروفایل بیان small RNA)، در سطح اپی ژنوم (تعیین فاکتورهای رونویسی و جایگاه های هدف مستقیم آنها، پروفایل ژنومی اصلاحات مربوط به هیستونها، الگوهای متیلاسیون DNA و پروفایل موقعیت قرارگیری نوکلئوزومها) و در سطح متاژنوم (بررسی اثرات محیط و پاتوژنها را بر ژنوم انسان) می توان نام برد (۴۷- ۴۵).

نتیجه گیری

همانطور که از مقاله پیش رو و کثرت متون نوشته شده با رویکردهای متفاوت پیرامون انواع تست های ژنتیکی مشخص است، علم ژنتیک روز به روز گسترده تر شده و نفوذ بیشتری در حوزه های علمی مختلف و بویژه در علوم پزشکی در هر دو عرصه تحقیقاتی و بالینی پیدا می کند. امروزه تست های ژنتیکی مختلف در عرصه بالینی و در حوزه های تشخیص، درمان، پیش آگهی و بسیاری از دیگر موارد اهمیت بسزایی یافته است.

مسلم است با این تحول سریع تستهای ژنتیکی و کاربردی شدن این تستها در حوزه های مختلف معرفی هرچه بیشتر آنها از دیدگاه های مختلف و همچنین اشاره به معایب و مزایای هریک میتواند به جامعه علمی، اساتید و دانشجویان کمک کند تا با دیدی باز و در جای مناسب از این تکنیک ها و تست ها برای رسیدن به اهداف تشخیصی، درمانی و تحقیقاتی خود در زمینه های علمی مختلف استفاده نمایند. از این رو در این مقاله سعی بر آن شد تا به اختصار به معرفی تکنیکی کاربردی ترین تستهای ژنتیکی در دو حیطه سیتوژنتیک و ژنتیک ملکولی پرداخته و در کنار تشریح مکانیسم عمل و کاربردهای آنها بویژه در علوم پزشکی به برخی از مزایا و معایب هریک نیز اشاره شود. -

93. SNP map
94. Next generation sequencing
95. first-generation' technology

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017

منـابع/ References

1. Help Me Understand Genetics - Genetic Testing (Handbook).http://ghr.nlm.nih.gov.U.S. National Library of Medicine. National Institutes of Health Department of Health & Human Services. Published August 26, 2013.
2. Medical Genetic Testing. Information for health professionals. April 2010. www.nhmrc.gov.au. NHMRC Publication reference: E99.
3. Trask BJ. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. Nat Rev Genet 2002; 3: 769-778.
4. Yunis JJ. Mid-prophase human chromosomes: the attainment of 2000 bands. Hum Genet 1981; 56 (3): 293–298.
5. Yunis JJ. High resolution of human chromosomes. Sci 1976; 191(4233): 1268-1270.
6. Cremer T, Landegent J, Bruckner A, et al. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. Hum Genet 1986; 74 (4): 346-352.
7. Brambati B, Tului L. Chorionic villus sampling and amniocentesis. Curr Opin Obstet Gynecol 2005; 17 (2): 197–201.
8. Kearns WG, Pen R, Graham J, et al. Preimplantation genetic diagnosis and screening. SeminReprod Med 2005; 23 (4): 336 –347.
9. Carrano AV. Measurement and purification of human chromosomes by flow cytometry and sorting. Proceedings of the National Academy of Sciences 1979; 76 (3): 1382–1384.
10. Heidi Chial. Cytogenetic Methods and Disease: Flow Cytometry, CGH, and FISH. Nat Edu 2008; 1(1).
11. RaapAK. Overview of Fluorescence In Situ Hybridization Techniques for Molecular Cytogenetics.Current Protocols in Cytometry 1997; 8.1.1-8.1.6.
12. Levsky J, Mand Singer RH. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. J Cell Sci 2003; 116: 2833-2838.
13. O'Connor C. Fluorescence in situ hybridization (FISH). Nat Edu 2008; 1 (1):171.
14. Liehr T, Claussen U. Multicolor-FISH approaches for the characterization of human chromosomes in clinical genetics and tumor cytogenetics. Curr Genomics 2002; 3 (3): 213-235.
15. Madon PF, Athalye AS, Sanghavi K, Parikh FR. Microdeletion Syndromes Detected by FISH –73 Positive from 374 Cases. Int J Hum Genet 2010; 10(1-3): 15-20.
16. Knight SJ, Flint J. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. J Med Genet 2000; 37 (6): 401-409.
17. Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, et al. Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. Genet Med 2003; 5: 28-34.
18. Snijders AM, Pinkel D and Albertson DG. Current status and future prospects of array-based comparative genomic hybridisation. Briefings in functional genomics and proteomics 2003; 2(1): 37-45.
19. Vissers L, Veltman JA, Kessel G. and Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. Hum Mol Gene 2005; 14: 215-223.
20. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Sci 1992; 258 (5083): 818-821.
21. Fraga D, Meulia T, Fenster S. Enzymatic Reactions; Real-Time PCR. Current Protocols Essential Laboratory Techniques 2008; 10.3.1-10.3.33.
22. Rasmussen HB. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. Institute of Biological Psychiatry, Mental Health Centre Sct. Hans, Copenhagen University Hospitals, Roskilde, Denmark. www.intechopen.com.

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017

References /منـابع

23. Saiki RK, Schaff S, Faloona F, Mullis KB, Erlich HA, Arnhem N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Sci 1985; 230(4732): 1350-1354.
24. Nucleic acid techniques in molecular diagnosis of human diseases and pathogens. Intercollegiate Faculty of Biotechnology UG&MUG 2011.
25. Brandt, B., Beckmann, A., Roetger, A., Gebhardt, F. Double- and competitive-differential PCR for gene dosage quantitation. Methods Mol Med 2001; 39: 347-56.
26. BielawskiK, Zaczek A, LisowskaU, Dybikowska A, Kowalska A and Falkiewicz B. The suitability of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis. Int j Mol Med 2001; 18: 573-578.
27. Pusterla N, Madigan JE, Leutenegger CM. Real time polymerase chain reaction: A novel molecular diagnostic tool for equine infections disease. Journal of Veterinary Internal Medicine 2006; 200: 3-12.
28. Vanguilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. Biotech 2008; 44 (5): 619-626.
29. Dorak MT. Real Time PCR. Taylor and Francis group 2007; 130-200.
30. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. "Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification". Nucleic Acids Res 2002; 30 (12): e57.
31. Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: New Techniques for Detection of Gene Deletions. Hum Mutat 2004; 23 (5): 413-419.
32. Mademont-Soler I, Morales C, Soler A, et al. MLPA: A prenatal diagnostic tool for the study of congenital heart defects? Gene 2012; 500 (1): 151–154.
33. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. Int J Mol Sci 2012; 13 (3): 3245-3276.
34. Maskos U, Southern EM.Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesized in situ. Nucleic Acids Res 1992; 20(7): 1679-84.
35. Adomas A, Heller G, Olson A, et al. "Comparative analysis of transcript abundance in Pinussylvestris after challenge with a saprotrophic, pathogenic or mutualistic fungus". Tree Physiol 2008; 28 (6): 885-897.
36. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, et al. "Genome-wide analysis of DNAcopy-number changes using cDNA microarrays".Nat Genet 1999; 23(1): 41-46.
37. Shinawi M and Heung SW. The array CGH and its clinical applications. Drug Discovery Today 2008; 13(17/18),760-770.
38. Garnis C, Coe BP, Lam SL, MacAulay C and Lam WL. High-resolution array CGH increases heterogeneity tolerance in the analysis of clinical samples. Genomics 2005; 85 (6): 790-793.
39. Davies JJ, Wilson IM and Lam WL. Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. Chrom. Res 2005; 13 (4): 237–248.
40. Lockwood WW, Chari1 R, Chi1 B and Lam WL. Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. Europ J Hum Gene 2006; 14 (2): 139-148.
41. Hehir-Kwa J, Egmont-Petersen M, Janssen I, Smeets D, Geurts van Kessel, A, Veltman J. "Genome-wide copy number profiling on high-density BAC, SNP and oligonucleotide microarrays: a platform comparison based on statistical power analysis" DNA Research 2007; 14:1-11. Link:http://dnaresearch.oxfordjournals.org/cgi/content/full/14/1/1
42. John S, Shephard N, Liu G, et al. "Whole-Genome scan, in a complex disease, using 11,245 single-nucleotide polymorphism: comparison with microsat-

ellites." American Journal of Human Genetics 2004; 75(1):54-64.

43. Mei R, Galipeau PC, Prass C, et al. "Genome-wide detection of allelic imbalance using human SNPs and high-density DNA arrays." Genome Research 2000; 10:1126-1137.
44. Schaid DJ, Guenther JC, Christensen GB, et al. "Comparison of Microsatellites Versus Single Nucleotide Polymorphisms by a Genome Linkage Screen for Prostate Cancer Susceptibility Loci", American J Hum Genet 2004; 75 (6): 948-65.
45. AymanGrada and Kate Weinbrecht. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. JInvest Dermato 2013; 133: e11.
46. MeldrumC, DoyleMA, Tothill RW. Next-Generation Sequencing for Cancer Diagnostics: a Practical Perspective. ClinBiochem Rev 2011; 32 (4):177-195.
47. MillerFA, HayeemsRZ, BytautasJP, et al. Testing personalized medicine: patient and physicianexpectations of next-generation genomic sequencingin late-stage cancer care. Europ J Hum Genet 2013; 17: 1-5.

Downloaded from g3m.ir at 11:48 +0330 on Wednesday March 15th 2017