روش های توالی یابی ژنوم : انواع روش های تعیین توالی DNA و ژنوم در توالی یابی نسل اول

تعیین توالی چیست

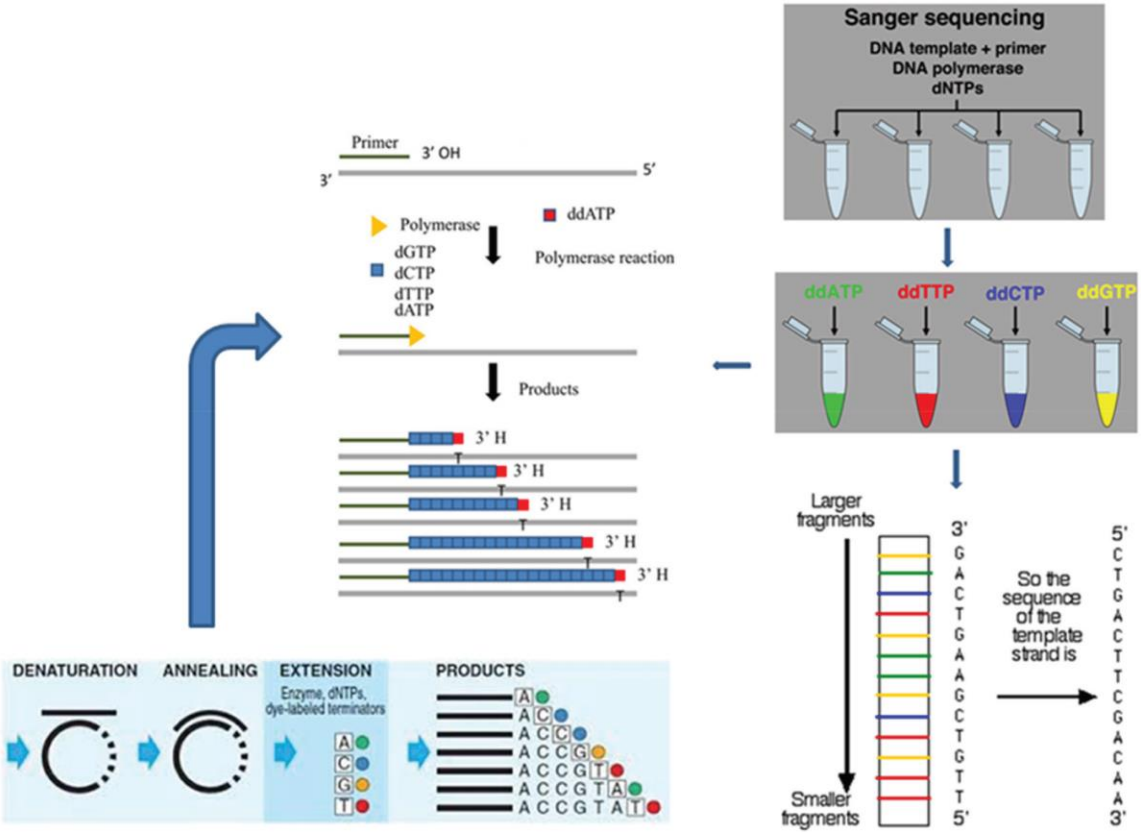
تعیین توالی DNA از مهم ترین تکنیکهای موجود در زمینه زیست شناسی مولکولی بوده که به موجب آن می توان ترتیب قرار گرفتن نوکلئوتیدها را در یک قطعه از DNA مشخص نمود. چندین روش مختلف جهت تعیین توالی DNA وجود دارد. در حال حاضر تعیین توالی DNA در زمینه تشخیص طبی و دیگر زمینه های پزشکی از جایگاه ویژهای برخوردار میباشد. امروزه با پیشرفتهای ایجاد شده در زمینه های نانو تکنولوژی و بیوانفورماتیک، روشهایی جهت افزایش سرعت و افزایش بازدهی در تعیین توالی DNA ابداع شده که این امر، امکان انجام پروژههای بزرگی از قبیل تعیین توالی ژنوم انسان را بصورت ارزان تر، دقیق تر و سریع تر فراهم آورده است.

امروزه تعیین توالی DNA جزء لاینفک علم مدرن به حساب می آید. بطوریکه از این تکنیک در زمینههای مختلف میکروبیولوژی از جمله ردیابی بیماریهای عفونی و مطالعه تنوع جوامع میکروبی استفاده میشود. روشهای متفاوتی جهت تعیین توالی DNA وجود دارد. این امر دانشمندان را قادر ساخته که به راحتی به مطالعه مستقیم ژنوم بپردازند اما هر کدام از این تکنیکها معایب و مزایای خاص خود را دارا می باشند.

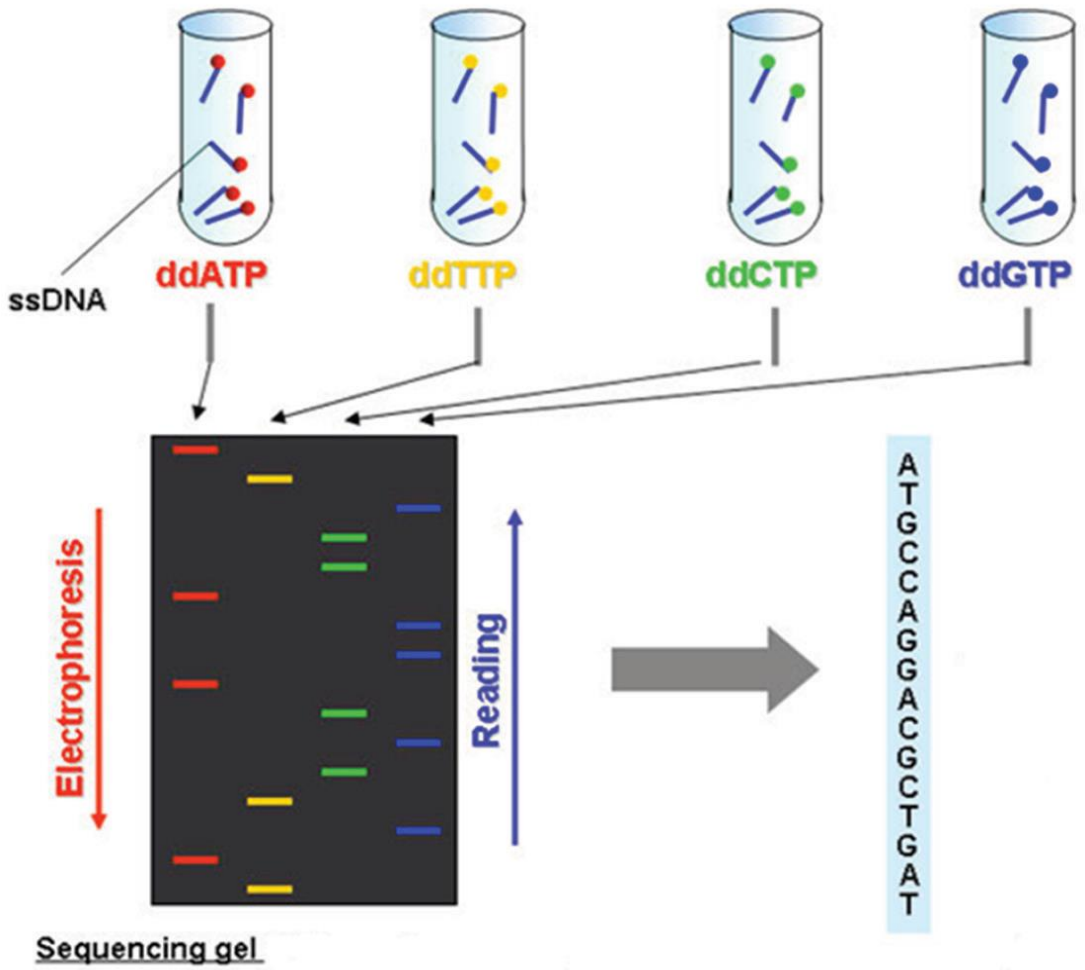
توالی یابی DNA به روش سنگر به چه صورت می باشد: آموزش تعیین توالی به روش سنگر سکونسینگ

این تکنیک بواسطه سنگر و همکارانش در اواسط ۱۹۷۰ ابداع گردید. مبنای این تکنیک، استفاده از نوکلئوتیدهای ویژهای موسوم به (dideoxynucleotids) ddNTP s بوده که فاقد گروه OH بر روی کربن ۳ خود هستند و اگر در ساختار یک اسید نوکلئیک قرار گیرند این زنجیره دیگر بلندتر نخواهد شد. از این رو، به آنها نوکلئوتیدهای ختم دهنده برگشت ناپذیر نیز گفته میشود که بواسطه مواد رادیواکتیو (بطور عمده با ۳۵S) لیبل می شوند. این تکنیک نیازمند DNA تک رشته بعنوان الگو بوده که برای بدست آوردن آن، ابتدا DNA ژنومی را استخراج کرده و بواسطه تیمار با آنزیمهای محدودالاثر آن را قطعه قطعه میکنیم سپس از حاملینی (فاژ میدها) برای انتقال این قطعات به داخل میزبانهای باکتریایی استفاده کرده تا تعداد این قطعات همزمان با تکثیر میزبان افزایش یابد. فاژ میدها قادر به تکثیر DNA بصورت تک رشتهای میباشند. در نهایت، نمونه حاوی DNA تک رشته را به ۴ قسمت مساوی تقسیم کرده و به داخل چهار لوله آزمایش مختلف انتقال داده سپس کلیه مواد مورد نیاز برای همانندسازی نیز به داخل هر لوله اضافه می گردد. از طرفی در هر لوله علاوه بر نوکلئوتیدهای طبیعی (dNTP)، یک نوع ddNTP خاص نیز قرار داده میشود. از آنجاکه نوکلئوتیدهای طبیعی در مقادیر بیشتری نسبت به ddNTPها در این پروسه

حضور دارند و آنزیم پلیمراز، ddNTPها را بطور اتفاقی به زنجیره در حال ساخت اضافه میکند، در نتیجه در هر لوله آزمایش قطعاتی با اندازههای مختلف ایجاد می گردد که هر یک به ddNTP خاص آن لوله ختم شده است. در نهایت این قطعات بواسطه حرارت بصورت تک رشته ای تبدیل می شوند. سپس این قطعات بر روی ژل پلی اکریل آمید ران می گردند و از طریق اتو رادیوگراف بر روی ژل ظاهر می شوند. برای بدست آوردن توالی DNA، نوکلئوتیدهای ختم دهنده برگشت ناپذیر موجود در انتهای این قطعات از پایین به بالا خوانده میشود سپس مکمل آنها نوشته شده که مشابه با توالی قطعه مورد نظر میباشد در شکل ۱ و ۲ مراحل کار نشان داده شده است.



شکل -۱- تعیین توالی به روش سنگر (سنگر سکونسینگ)



شکل -۲- نحوه خواندن نوکلئوتیدها از روی ژل الکتروفورز

روش توالی یابی ماکسام گیلبرت برای تعیین توالی ژنوم و DNA: توضیح روش ماکسام گیلبرت

این تکنیک در سال ۱۹۷۷ توسط ماکسام و گیلبرت ابداع گردید. اساس کار این روش بر پایه هضم شیمیایی بوده و نیازی به پلیمریزاسیون قطعه مورد نظر نمی باشد. در این روش ابتدا به انتهای '۵، DNA دو رشته، یک گروه فسفات رادیو اکتیو (۳۲P اضافه می گردد. سپس با یک تیمار آنزیمی توسط یک آنزیم محدود الاثر یک انتهای این قطعه را بریده و DNA را حرارت میدهند تا تک رشتهای شود. سپس دو رشته را بواسطه الکتروفورز از یکدیگر جدا میکنند. در نهایت تنها رشتهای که یک انتهای آن با فسفات رادیواکتو لیبل شده است توسط اتو رادیوگراف ظاهر شده و از روی ژل تخلیص گشته و به داخل ۴ لوله آزمایش مختلف منتقل می گردد. سپس هر یک از نمونهها توسط یک ماده شیمیایی خاص تیمار میشود. واکنش به گونهای طراحی شده که قطعاتی با اندازههای

مختلف ایجاد می گردد. این قطعات در ژل الکتروفورز از یکدیگر جدا شده و سپس به ترتیب از پایین به سمت بالای ژل خوانده میشوند. تیمارهای شیمیایی شامل:

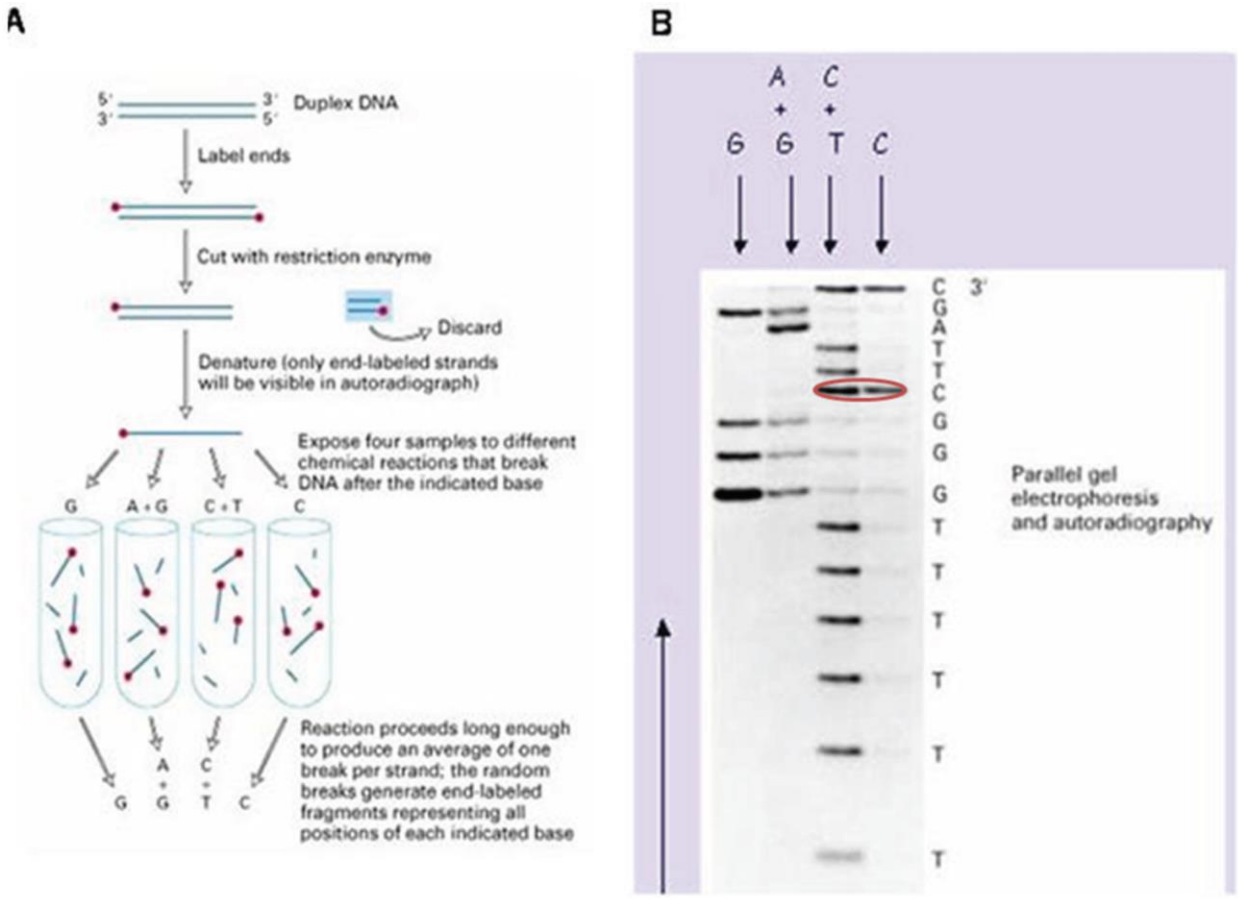
۱) اسید فرمیک ۶۰ درصد سبب شکسته شدن پیوندها از محل پورین ها می شود ((A+C،

۲) دی متیل سولفات سبب شکسته شدن پیوند از محل و می شود،

۳) هیدرازین سبب شکستن پیوند از محل بازهای پیریمیدین می شود (C+T)

و ۴) NaCl یک و نیم مولار سبب شکستن پیوند از باز C می گردد.

نمایی از این تکنیک در شکل شماره ۳ نشان داده شده است.



شکل-۳- تعیین توالی به روش ماکسام – گیلبرت