توالی یابی پیروسکانسینگ و کاربردهای آن در علوم زیستی

علیرضا تاری‌نژاد* و صبا شرکت خبازی

تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

چکیده

تعیین توالی DNA از مهم‌ترین روش‌ها جهت شناسایی ترتیب نوکلئوتیدهاست. باتوجه به پیشرفت‌های چشمگیر در این زمینه، روش توالی‌یابی پیروسکانسینگ (Pyrosequencing) ابداع شده است که علاوه بر تعیین توالی DNA، کاربردهای متعددی نیز دارد. استفاده از این روش در علم پزشکی و زیست فناوری بویژه در زمینه چندشکلی های تک – نوکلئوتیدی (SNP)، شناسایی میکروب‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا، متیلاسیون DNA، شناسایی جهش در ژن‌های مهم درگیر در بیماری ها است. این روش، بر پایه سنتز است و سیستم آنزیمی استفاده شده در این روش شامل چهار آنزیم منحصر بفرد DNA Polymerase Klenow، ATP sulfurylase، Luciferase و Apyrase است. آزاد شدن نور حاصل از آنزیم لوسیفراز تعیین کننده نوع نوکلئوتید قرارگرفته در زنجیره DNA بوده، پیک‌های مربوط به هر نوکلئوتید در پیروگرم ظاهر می‌شود. آغازگر استفاده شده در این روش انعطاف‌پذیر بوده، همین ویژگی منحربفرد، منجر به کارایی بالای آن شده است. عدم استفاده از مواد پرهزینه، برخلاف دیگر روش‌های توالی‌یابی، از مزایای دیگر این روش محسوب می‌شود.

واژه های کلیدی: پیروسکانسینگ، متیلاسیون، چندشکلی تک – نوکلئوتیدی (SNP)، آنزیم کِلنو

* نویسنده مسئول: tarinejad@yahoo.com

مقدمه

انواع روش‌های توالی‌یابی DNA ابداع شده‌اند که در تشخیص بیماری‌ها، زیست فناوری و سیستم‌های زیستی به کار می‌روند. توالی‌یابی ژنگان (genome)، منجر به تشخیص چگونگی برهمکنش ژن‌ها با یکدیگر جهت رشد و حفاظت از کل موجود می‌شود. اطلاعات مربوط به گسترش سرطان، تشخیص بیماری‌های خاص نیز توسط این روش‌ها قابل ارزیابی است.

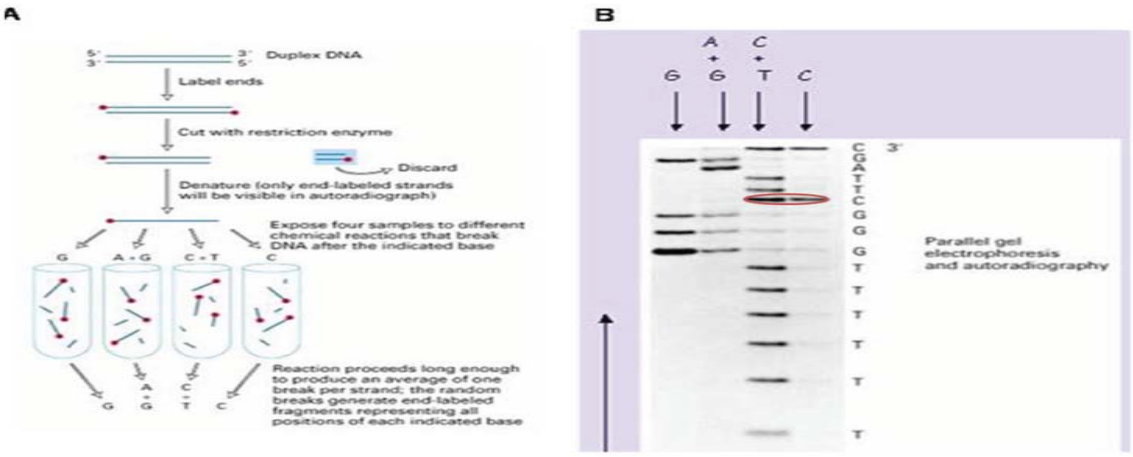
روش توالی یابی ماکسام–گیلبرت (Maxam-Gilbert) در سال ۱۹۷۰ اختراع شد که بر پایه تجزیهٔ شیمیایی است. چهار ماده شیمیایی استفاده شده در این روش شامل اسید فورمیک (برش از نوکلئوتید G+A)، دی متیل سولفات (برش از نوکلئوتید G)، هیدرازین (برش از نوکلئوتید C+T) و Nacl (برش از نوکلئوتید C) است. طی این واکنش، ابتدا DNA ژنگانی استخراج و پس از آن توسط آنزیم برشی برش یافته، سپس توسط p32 انتهای ۵ پریم دی ان آ نشان دار و در اثر گرما دو رشته از هم جدا می‌شوند (شکل ۱). قطعات جدا شده هر کدام به داخل ۴ لوله آزمایش ریخته می شوند که هر لوله آزمایش حاوی یک ماده شیمیایی است. در نهایت قطعات حاصل روی ژل الکتروفورز نمایان می‌شوند (۲).

روش توالی یابی سنگر در سال ۱۹۷۷ اختراع شد. این روش بر پایه خاتمه سنتز زنجیره است که در آن از نوکلئوتیدهای معیوب استفاده شده است. نوکلئوتیدهای معیوب فلوئورسنت در قسمت $3'$ گروه OH خود را از دست داده‌اند. بنابراین زمانی که در رشته مقابل قرار گیرند، مانع ادامه سنتز می شوند. در این روش ابتدا DNA ژنگانی استخراج و سپس توسط آنزیم های گزین بر برش یافته و برای تکثیر و ایجاد قطعات تک رشته‌ای، این قطعات به داخل فاژها کلون می‌شود. قطعات حاصل به ۴ قسمت تقسیم شده و در ۴ لوله آزمایش مختلف منتقل می شوند. در نهایت با اضافه کردن مواد مورد نیاز، PCR انجام می‌شود که پس از آن قطعات بر روی ژل الکتروفورز کوچ می کنند (شکل ۲ الف و ب). هر قطعه حاصل از PCR به یکی از نوکلئوتیدهای نشاندار ختم می‌شد که توسط دستگاه اتورادیوگراف قابل تشخیص است (۳).

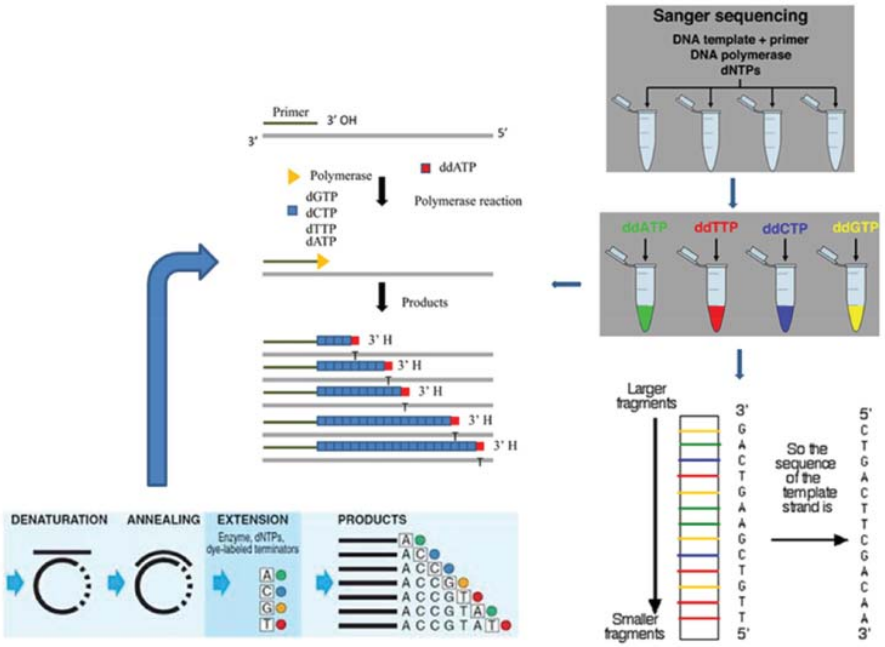
روش پیروسکانسینگ (Pyrosequencing):

پیروسکانسینگ یک روش توالی یابی DNA در زمان واقعی است. این واکنش، یک روش آنزیمی است به این مفهوم که از چهار آنزیم مختلف در آن استفاده شده است. این روش اولین بار توسط مصطفی رونقی و Pal Nyren

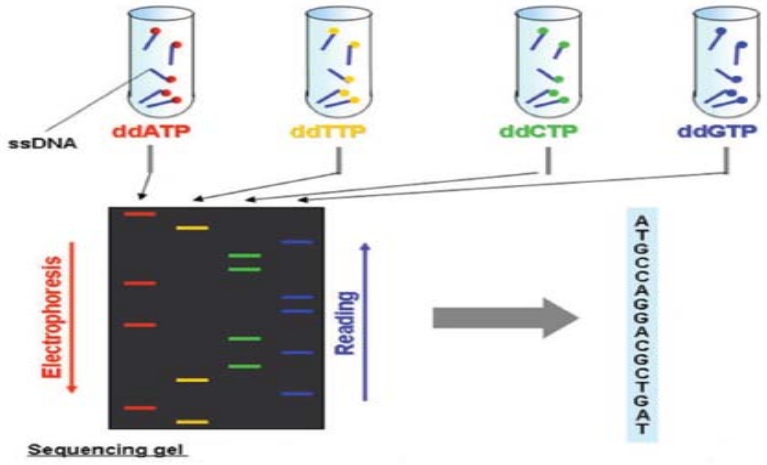
در سال ۱۹۹۰ ابداع شده است. در روش پیروسکانسینگ علاوه بر آنزیم‌های مطرح شده، از آدنوزین فسفوسولفات، DNA الگو، پرایمر و D-lusiferin استفاده شده است. روش کار برای انجام روش پروسکانسینگ بر این اساس است که ابتدا DNA ژنگانی استخراج شده، و سپس توسط آنزیم های گزین بر به قطعات 300-500bps تبدیل می‌شوند. سپس از آداپتور که انتهای $5'$ آن بیوتینه‌دار شده جهت اتصال به قطعات استفاده می‌شود. به دنبال آن، جداسازی دو رشته DNA از هم صورت می‌گیرد. قطعات حاصله به بیدهای پوشیده شده با استرپتوآویدین (Streptoavidin) (قطعات حاوی بیوتین در یک انتها) متصل شده و عمل PCR بر روی آنها انجام می گیرد. قطعات حاصل از PCR نیز از هم جدا شده و برای انجام پیروسکانسنگ آماده می‌شوند (۴).



شکل۱- توالی یابی به روش ماکسام-گیلبرت



شکل۲- توالی یابی به روش سنگر (الف)



شکل ۲- نمایش قطعات بر روی ژل الکتروفورز در توالی یابی سنگر(ب)

در این روش از انواع مختلف پرایمرها جهت تکثیر DNA استفاده شده است که خصوصیات منحصر بفردی دارند (۵).

۱) دمای پرایمرها باید بالای $۵۰^{\circ}C$ باشد و نباید حتی به اندازه $1-2^{\circ}C$ باهم اختلاف داشته باشند.

۲) از نواحی CpG در طراحی پرایمر استفاده نشود.

۳) برای افزایش حساسیت و اختصاصیت می‌توان از پرایمرهای داخلی‌تر استفاده کرد.

۴) انتهای $3'$ پرایمرها باید به نوکلئوتید T ختم شود.

۵) محصول PCR باید بین ۴۰۰-۲۰۰ نوکلئوتید باشد.

واکنش آنزیمی روش پیروسکانسینگ به روش زیر است:

1) $(DNA)_n$ + dNTP $\longrightarrow$ $(DNA)_{n+1} + PP_i$ (آنزیم مسئول این واکنش DNA Polymerase klenow)

2) PP_i + APS $\longrightarrow$ ATP + SO_4^{2-} (آنزیم مسئول این واکنش ATP Sulfurylase)

3) Luciferase + D-luciferin + ATP $\longrightarrow$ Luciferase-luciferin + AMP + PP_i

4) Luciferase-luciferin + AMP + O_2 $\longrightarrow$ Luciferase + oxyluciferin + AMP + CO_2 + light

5) ATP $\longrightarrow$ AMP + $2P_i$ (آنزیم مسئول این واکنش Apyrase)

6) dNTP $\longrightarrow$ dNMP + $2P_i$ (آنزیم مسئول این واکنش Apyrase)

در واکنش اول، به DNA موردنظر برای توالی‌یابی طی واکنش PCR، نوکلئوتیدها پشت سر هم اضافه می‌شوند. در صورت مکمل بودن آنها، پیروفسفات تولید می‌شود. در واکنش دوم پیروفسفات تولید شده همراه با آدنوزین فسفوسولفات، ضروری برای انجام عمل ATP Sulfurylase ، با هم واکنش داده و تولید ATP می‌کند. در واکنش سوم و چهارم، آنزیم لوسیفراز همراه با سوبستراهای ATP و D-luciferin ، ATP تولید شده را به نور تبدیل می کند. مراحل ۵ و ۶ مکانیسم عمل آنزیم آپیراز را نشان می دهد که طی آن، هر گونه ATP اضافی تولید شده و dNTP مصرف نشده در واکنش را حذف می‌کند (۶).

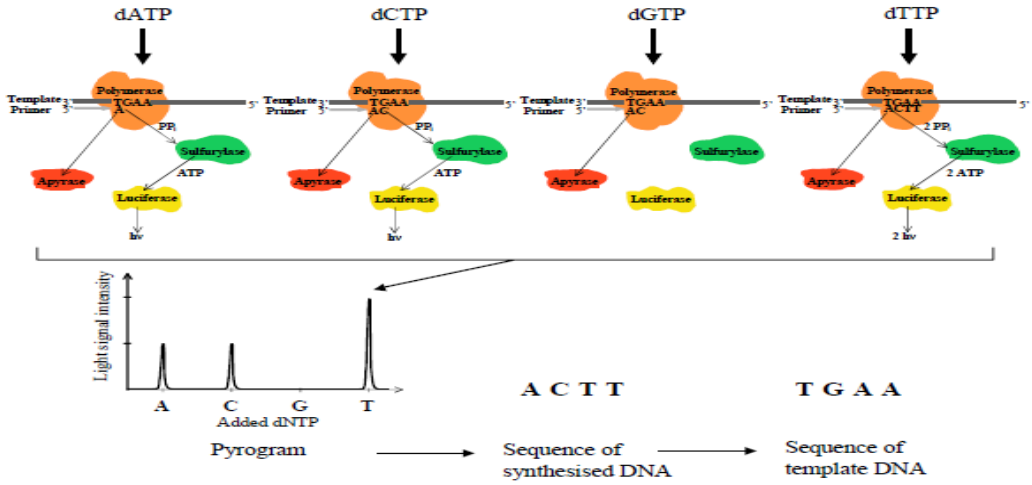
مزایای این روش عبارت اند از:

عدم نیاز به استفاده از برچسب‌های خاص و گرانقیمت، شناسایی در زمان واقعی، روش سریع و قابل اعتماد، پردازش چندین نمونه همزمان باهم، توانایی توالی‌یابی قطعات کوتاه DNA، کشف جهش‌های شناخته نشده.

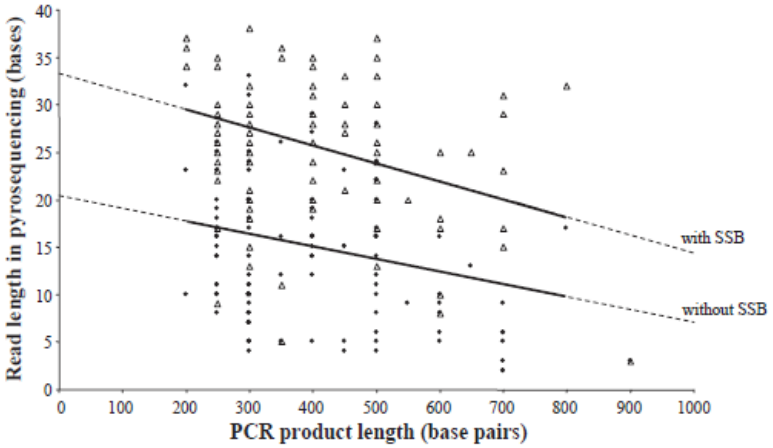
در روش پیروسکانسینگ از ۴ آنزیم با نام های DNA Polymerase klenow، ATP Sulfurylase، Luciferase و

Apyrase استفاده شده است. در ابتدا با اضافه کردن نوکلئوتید A، چنانچه در توالی الگو مدنظر نوکلئوتید T وجود داشته باشد به آن متصل شده، بر اثر اتصال، پیروفسفات آزاد می‌شود. پیرو فسفات تولید شده توسط ATP Sulfurylase و APS به ATP تبدیل می‌شود. در نهایت ATP طی دو واکنش مختلف توسط آنزیم لوسیفراز به نور تبدیل می‌شود. ظاهر شدن نور نمایانگر اتصال نوکلئوتید صحیح در زنجیره است که به صورت پیک در شکل پایین نشان داده شده است. چنانچه مکمل نوکلئوتیدی در زنجیره نباشد، ATP و در نتیجه نور تولید نمی کند و پیک توسط Pyrogram ظاهر نمی‌شود. در این تصویر نوکلئوتید G به این صورت است که آنزیم آپیراز در نهایت آن را از واکنش حذف می‌کند (شکل ۳). بعد از به دست آوردن نقشه Pyrogram، مکمل توالی به دست آمده، توالی الگو مورد نظر است (۶).

ایراد روش پیروسکانسینگ مدت خوانش کم آن است. برای بهبود آن، حین روش PCR به مواد واکنش SSB (Single Strand Binding Protein) اضافه شده و مورد استفاده قرار گرفته است. شکل ۴ آنالیز اجرایی طول قطعات حاصل از PCR و ارتباط آن با مدت خوانش پیروسکانسینگ را نشان می‌دهد. به این مفهوم که برای افزایش مدت خوانش در پیروسکانسینگ از SSB استفاده شده است.



شکل ۳- طرح واره ای از روش پیروسکانسینگ و سیستم آنزیمی دخیل در آن



شکل۴- آنالیز اجرایی پیروسکانسینگ توسط SSB

SSB همان پروتئین متصل شونده به DNA تک رشته‌ای است که از تخریب و تشکیل ساختارهای ثانویه آن جلوگیری کرده و منجر به افزایش مدت خوانش آن توسط پیروسکانسینگ می‌شود. اشکال مثلث مانند نمونه‌های همراه با SSB و اشکال دایره مانند نمونه‌های بدون SSB را نشان می‌دهند (۶).

کاربردهای روش پیروسکانسینگ

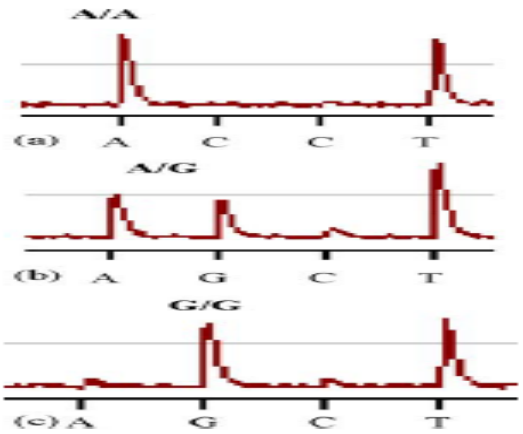
۱) کشف چند شکلی های تک - نوکلئوتیدی (SNP= Single Nucleotide Polymorphism): SNP در ۳ فرد مختلف نشان داده شده است (شکل۵). فرد هوموزیگوس A/A یک پیک مشاهده شده است (شکل 5A)؛ فرد هتروزیگوس A/G ۲ پیک مشاهده شده است (شکل 5B). فرد هوموزیگوس G/G، ۱ پیک مشاهده شده است (شکل 5C). همانطور که مشاهده می‌شود از طریق آنالیز SNP می‌توان به ژنتیک فرد موردنظر پی برد (۷).

۲) شناسایی میکروبهای عوامل بیماری‌زا و غیربیماری‌زا: این روش قادر به شناسایی میکروب‌های متنوع است. برای شناسایی میکروب‌های مختلف (شکل۶)، آغازگر رفت و برگشت بر اساس ابتدا و انتهای توالی 16srRNA میکروب‌ها طراحی شده که در تمامی میکروب‌ها این نواحی حفاظت‌شده است. تنها قسمت میانی این توالی در بین میکروب‌های مختلف متفاوت است و باعث تمایز آنها از همدیگر می‌شود. پیروسکانسینگ بر اساس آغازگر F و R قادر به توالی‌یابی قسمت میانی توالی 16srRNA می‌باشد که منجر به تمایز میکروب‌های مختلف می‌شود (۸).

۳) آنالیز متیلاسیون DNA: متیلاسیون DNA یک مکانیسم اپی‌ژنتیکی درگیر در انتقال گروه متیل به C5 در نوکلئوتید سیتوزین و تبدیل آن به متیل سیتوزین است. متیلاسیون، با به کارگیری پروتئین‌های درگیر در بیان ژن و یا با جلوگیری از اتصال عوامل رونویسی به DNA بیان ژن را تنظیم می‌کند. بررسی متیلاسیون DNA، اهداف درمانی ممکن از جمله درمان اختلالات روانپزشکی را فراهم می‌آورد (۱۱) . طبق این روش، متیلاسیون در ۸ جایگاه مختلف شناسایی شده است و درصد متیلاسیون گزارش شده نیز در بالای هر جایگاه مشخص شده است. در شکل ۷ توالی مورد نظر جهت آنالیز نشان داده شده است که بر این اساس حروف Y نشان‌دهنده عدم تبدیل نوکلئوتید C به U (اصطلاحا متیله شده) طی عمل بی‌سولفیت مدیفیکاسیون هستند. تنها نوکلئوتید سیتوزین متیله نشده با رنگ زرد نشان داده شده است که طی عمل بی‌سولفیت به U تبدیل شده که در مرحله PCR به باز T مبدل شده و پیک توسط پیروسکانسینگ برای آن نشان داده شده است.

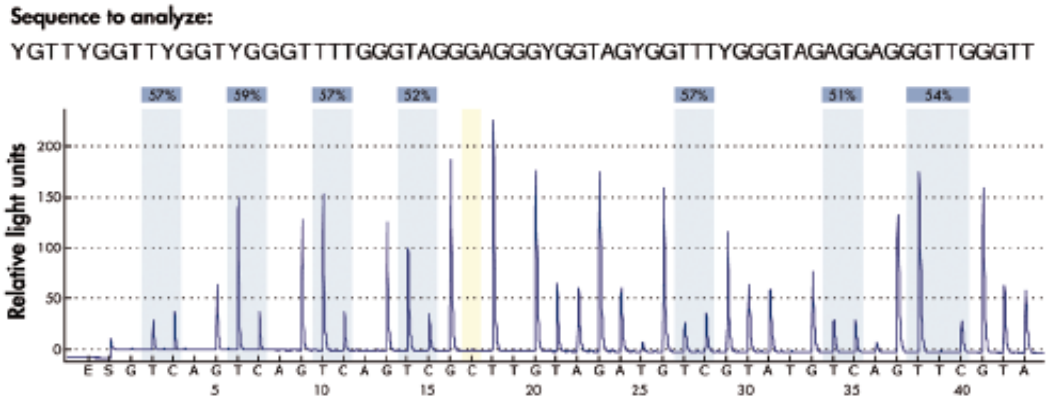
نمایش دآمیناسیون سیتوزین توسط تغییرات بی سولفات در شکل ۸ نشان داده شده است که طی آن سیتوزین غیر متیله شده با روش bisulphite conversion به باز U تبدیل و C متیله شده تبدیل نمی‌شود (شکل 8a). شکل 8b واکنش انجام گرفته در توالی DNA متیله شده تحت bisulphite conversion را نشان می‌دهد؛ و واکنش پایینی توالی دی ان آ غیر متیله شده را نشان می‌دهد. C* نشان دهنده سیتوزین متیله شده می‌باشد که طی عمل PCR، U به T تبدیل می‌شود و C بدون تغییر باقی می‌ماند (۹).

تبدیل باز سیتوزین غیر متیله شده به باز یوراسیل یا به اصطلاح Bisulphite conversion، طی ۳ مرحله انجام می‌شود. در مرحله اول آماده سازی DNA با استفاده از bisulphite DNA lysis buffer و قراردادن در انکوباتور به مدت ۱ ساعت در ۳۷°C صورت می‌گیرد. در مرحله دوم جداسازی دو رشته DNA با استفاده از NaOH و قرار دادن در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۱۵ دقیقه و سپس به مدت ۲ ساعت در ۹۰°C (heat block) انجام می‌شود و سریعا به روی یخ منتقل می‌شود.

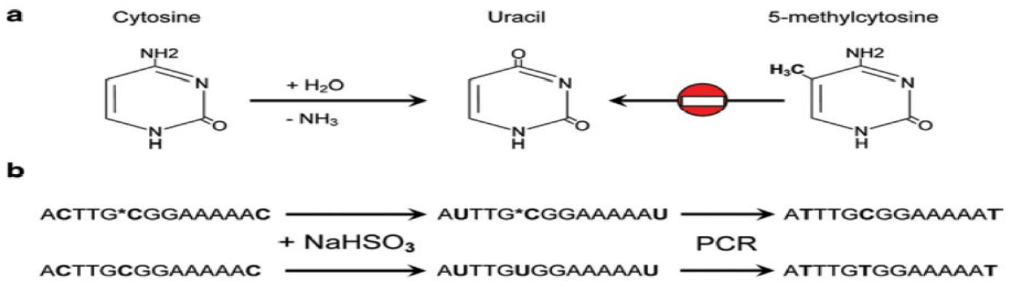


شکل۵- نمایش اطلاعات Pyrogram SNPs به دست آمده از طریق پیروسکانسینگ

شکل۶- شناسایی نوع باکتری توسط توالی‌یابی پیروسکانسینگ



شکل ۷- آنالیز متیلاسیون توسط پیروکانسینگ در ۸ جایگاه CpG



شکل ۸- نمایش Bisulphite conversion

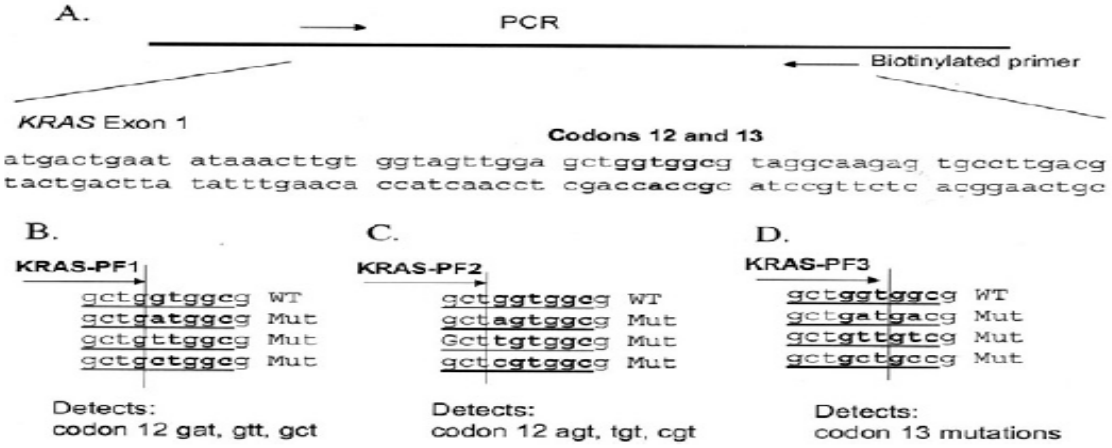
سانتریفیوژ لوله‌ها به مدت ۱۰ ثانیه جهت ته نشینی DNA انجام می‌گیرد. مرحله سوم شامل اضافه کردن سولفات با استفاده از دو محلول Quinol و سدیم بی‌سولفات و اضافه کردن روغن معدنی است، پس از این مرحله نمونه‌ها را spin کرده و فاز پایینی برداشته می شود. در این مرحله نیز با اضافه کردن MQ_2^HO و عبور دادن از ستون، SDS اضافه شده در مرحله اول حذف می‌شود. برای حذف سولفات اضافه شده، از آمونیوم استات و اتانول استفاده شده و سپس محلول به دست آمده را برای انجام PCR (با اضافه کردن TE) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده می-شود (۱۰).

۴) شناسایی جهش ها: جهش تغییر در توالی نوکلئوتیدی DNA رمزگذار پروتئین هاست که می تواند توالی اسیدآمینه پروتئینها و یا نواحی غیررمزگذار DNA مؤثر در تغییر بیان ژن را تغییر می‌دهد. هر گونه تغییر در توالی DNA که منجر به تأثیر غیرعادی در مسیرهای زیستی شود، می‌تواند یکی از عوامل بیماری‌زا تعیین جهش نقش حیاتی در تشخیص‌های ژنتیکی (پیش و پس از تولد) دارد. به عنوان مثال جهش در ژن *BRCA1* منجر به سرطان سینه می‌شود (۱۲). اگزون شماره ۱ ژن **KRAS** توسط PCR تکثیر شده، شامل شماره ۱۲ و ۱۳ است که با آغازگر R بیوتینه دار شده است (شکل9A). آغازگر PF1 پیرو سکانسینگ می‌تواند جهش‌های عمومی کدون ۱۲ را شناسایی کند (شکل9B). آغازگر PF2 می تواند باقی جهش‌های کدون ۱۲ را شناسایی کند (شکل9C). آغازگر PF3 (شکل9D) می‌تواند جهش‌های کدون شماره ۱۳ را شناسایی کند (۱۳).

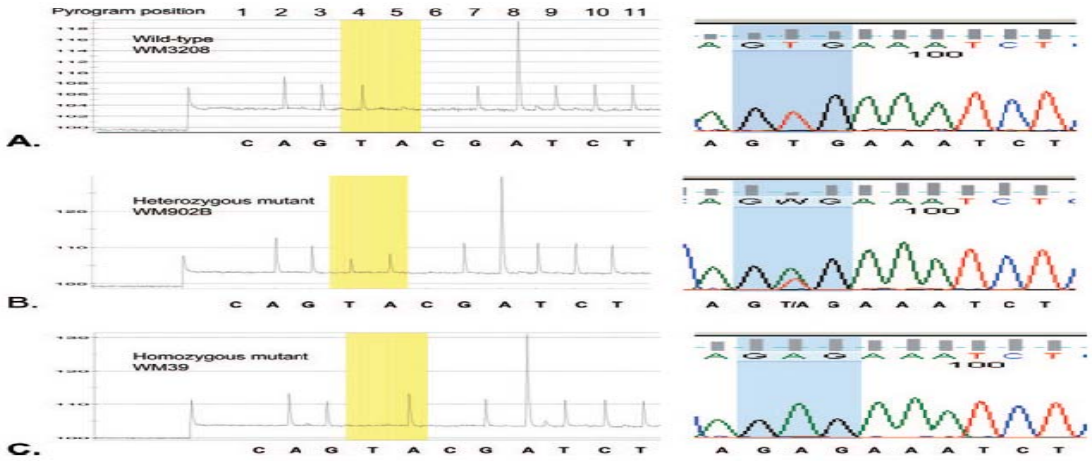
انواع دیگر جهش‌ها نیز توسط روش پیروسکانسینگ قابل شناسایی است. شکل ۱۰ تعیین جهش 7600E در ژن *BRAF* را نشان می‌دهد که منجر به بیماری ملانوما (سرطان پوستی) می‌شود. تصویر A پیروگرم مربوط به WT ژن *BRAF*، تصویر B پیروگرم مربوط به جهش هتروزیگوس در ژن *BRAF*، تصویر C پیروگرم مربوط به جهش هوموزیگوس ژن مربوطه را نشان می‌دهد. در جهش هتروزیگوتی به جای پیک برای نوکلئوتید T، به A و T و در جهش هوموزیگوسی دو پیک برای T توسط پیروسکانسینگ گزارش شده است (۱۴).

۵) شناسایی ژنوتیپ ویروس: ویروس HPV (Human Papillomavirus) یا زگیل تناسلی، نوعی عفونت است که از راه آمیزش جنسی بین افراد منتقل می‌شود و تا کنون تقریبا ۲۰۰ نوع از آن شناخته شده است. بیش از ۹۹٪ سرطان‌های بدخیم رحم نیز توسط این ویروس ایجاد می‌شود (۱۵). در شکل ۱۰ دو نوع ویروس HPV، بدون استفاده از SSB و با استفاده از SSB ، شناسایی شده‌اند و منظم بودن پیکها به وضوح قابل رؤیت است. شکل a شناسایی ویروس HPV-72 و شکل b ویروس HPV-31 توسط روش پیروسکانسینگ را نشان می‌دهد (۱).

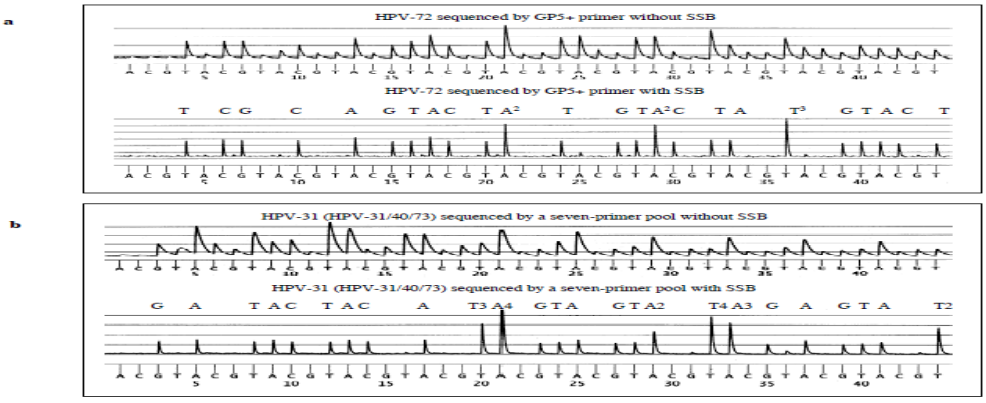
نرم‌افزارهای مختلفی جهت طراحی پرایمر برای روش پیروسکانسینگ تعبیه شده‌اند که در شکل ۱۲ یکی از آنها شرح داده شده است.



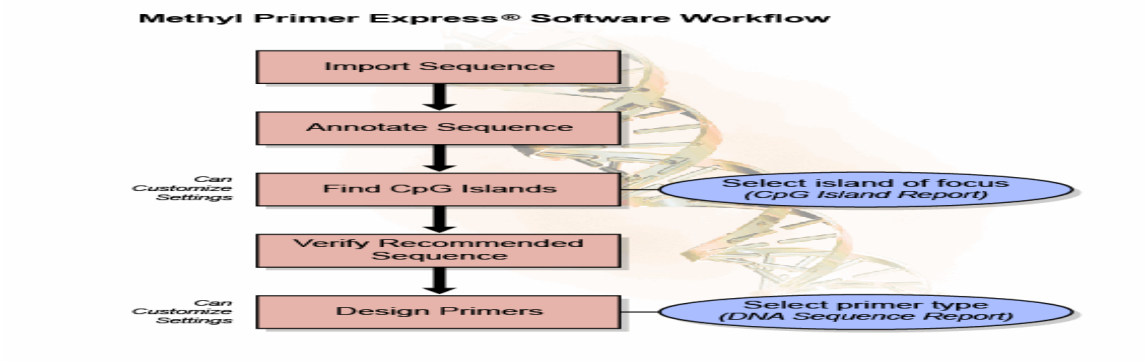
شکل۹- نحوه شناسایی جهش ها در ژن **KRAS** توسط پیروسکانسینگ



شکل ۱۰- شناسایی جهش 7600E در ژن *BRAF*



شکل۱۱- شناسایی ژنوتیپ ویروسی توسط روش پیروسکانسینگ



شکل ۱۲- نرم‌افزار جهت طراحی پرایمر برای روش پیروسکانسینگ

طبق این نرم‌افزار، ابتدا توالی DNA مدنظر را وارد کرده، سپس بر اساس نقطه آغاز رونویسی یا کدون شروع ترجمه، توالی موردنظرannotate می‌شود. سپس از نرم‌افزار خواسته می‌شود تا جزایر CPG را برای محقق پیدا کند.

پس از یافتن نواحی، در صورت صحیح بودن دکمه تأیید را زده و بر اساس نوع آنالیز، نوع آغازگر انتخاب می‌شود تا آغازگر مورد نظر طراحی شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به پیشرفت‌هایی که در زمینه توالی‌یابی صورت گرفته، امید بر این است که ایرادهای این روش از نظر اندازه قطعات برای خوانش برطرف شده و برای ژنگان های بزرگ‌تر نیز کارا باشد. همچنین از این روش می‌توان در انتقال ژن و بیوتکنولوژی بهره برد. بدین طریق که بعد از انتقال ژن به فرد یا گیاه مورد نظر، تغییرات اپی‌ژنتیکی بررسی شده و مورد ارزیابی قرار گیرند.

منابع

۱- فرد ط، راد ع، ساعتیان، مینو، عارفیان. مطالعه ارتباط بین پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) با سرطان پستان در بیماران ایرانی. فصلنامه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران. ۲۰۱۳. ۲۳(۲):۱۲۰-۶.

۲- یزدی ابراهیم. مبانی ژنتیک ملکولی(ویرایش ۲). انتشارات اطلاعات. ۱۳۷۷. ۵۹۲ صفحه.

۳- یزدی صمدی بهمن و ولیزاده مصطفی. ژنتیک از دیدگاه ملکولی(ترجمه). انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۹۳. ۲۴۷ صفحه.

4-Sabbaghi A, Soleimani M. An Overview of DNA Sequencing Methods (First Generation, Second Generation and Third Generation). Paramedical Sciences and Military Health. 2016;11(2):48-60.

5-Fernandez-Fernandez A, Esteller M. DNA Methylation Analysis by Bisulfite Sequencing (BS)(PROT34). The EPIGENOME Network of Excellence, Madrid, Spain. 2007.

6-Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. Clinica chimica acta. 2006;363(1):83-94.

7-Langaee T, Ronaghi M. Genetic variation analyses by Pyrosequencing. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2005;573(1):96-102.

8-Cummings PJ, Ahmed R, Durocher JA, Jessen A, Vardi T, Obom KM. Pyrosequencing for microbial identification and characterization. Journ of visualized experiments: JoVE. 2013(78).

9-Delaney C, Garg SK, Yung R. Analysis of DNA methylation by pyrosequencing. Immunosenescence: Methods and Protocols. 2015:249-64.

10-Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. Nature protocols. 2006;1(5):2353-64.

11-Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology. 2013;38(1):23.

12-Mahdieh N, Rabbani B. An overview of mutation detection methods in genetic disorders. Iranian journal of pediatrics. 2013;23(4):375.

13-Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, et al. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. The Journal of molecular diagnostics. 2005;7.۲۱-۴۱۳:(۳)

14-Spittle C, Ward MR, Nathanson KL, Gimotty PA, Rappaport E, Brose MS, et al. Application of a BRAF pyrosequencing assay for mutation detection and copy number analysis in malignant melanoma. The Journal of molecular diagnostics. 2007;9(4):464-71

15-Gharizadeh B. Method development and applications of Pyrosequencing technology: Bioteknologi; 2003.

Pyrosequencing and its application in biological science

Tarinejad A.R. and Sherkat Khabazi S.

Dept. of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran.

Abstract

DNA sequencing is one of the most important techniques in determining for sequences of nucleic acids. Regarding remarkable advances in the field, pyrosequencing technique was invented, with several applications in addition to determining the sequence of DNA. The

technique is applied use of this in medical sciences and biotechnology, especially in the field of single nucleotide polymorphism (SNP), the identification of pathogenic and non-infectious microbes, DNA methylation, the identification of mutations in the major disease genes. This technique is based on synthesis and the enzyme system used in this method consists of four unique DNA Polymerase Klenow, ATP sulfurylase, Luciferase and Apyrase enzymes. Releasing of light produced by the enzyme luciferase determines the type of nucleotide present in the DNA chain, and the peaks of each nucleotide appear in the Pyrogram. The primer used in this method is flexible, and this unique feature has led to its high performance.Without using expensive materials, incontracontrast the other sequencing methods, is another advantage of this method.

Key words: Pyrosequencing, Methylation, Single Nucleotide Polymorphism (SNP), klenow enzyme

اهمیت روش DNA barcoding در مطالعات بیماری شناسی گیاهی

فایقه اطمینانی* و ادیبه اطمینانی

سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان

چکیده

یکی از روش های متداول در شناسایی موجودات بهره گیری از قطعات کوچک و استاندارد DNA است، که به آن در اصطلاح DNA barcoding اطلاق می شود، زیرا مانند یک برچسب بارکد برای هر تاکسون عمل می کند. این روش به دلیل اهمیت و در عین حال سادگی، مورد توجه بسیاری از پژوهشگران علم رده بندی و آرایه شناسی (taxonomy)، بوم شناسان، زیست شناسان، اکولوژیست‌ها قرار گرفته است و تعداد مطالعات مرتبط با آن در حال افزایش است. وجود تنوع زیاد در بین موجودات و اهمیت برخی از آنها مانند حشرات و میکروارگانیسم ها از دیدگاه اقتصادی، همه گیری شناسی و کشاورزی موجب شده تا بارکد گذاری آنها اهمیت ویژه ای پیدا کند، هرچند انتقاداتی هم بر آن وارد است، در این مقاله تلاش شده است، برخی از مزایا و چالش های مرتبط با این روش مورد بحث و بررسی قرار گیرد.

واژه های کلیدی: باکتری، قارچ، ویروس، نماتود، barcoding

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: Faegheh.Etminani@yahoo.com

مقدمه

در گذشته بیشتر مطالعات آرایه شناسان معطوف به خصوصیات شکل شناختی موجودات بوده است به همین دلیل تنها متخصصانی مانند آرایه شناسان می توانستند آرایه ها را به درستی شناسایی کنند. بر این اساس تنها با افزایش علاقه مندی به تنوع زیستی در بین رشته های بوم شناسی، زیست شناسی تکاملی، کشاورزی و غیره شناسایی درست و دقیق گونه ها اهمیت پیدا کرد. اما به دلیل تعداد کم متخصصان برای شناسایی گونه‌ها این امر به خوبی انجام نمی پذیرفت. بنابراین استفاده از روش های ژنتیکی و بهره گیری از روش های مولکولی مورد توجه قرار گرفت (Jinbo et al., 2011). یکی دیگر از مزایای استفاده از روش های مولکولی در قیاس با روش های شکل شناختی وجود روش و زبان مشترک است که امکان شناسایی دقیق تر گونه را در قیاس با روش های شکل شناختی توسط افراد مختلفی فراهم می کند.

DNA Barcoding روش استفاده از یک یا چند توالی کوتاه ژنی که از اختصاصیت کافی برای شناسایی برخوردار است، اطلاق می‌شود و به عنوان یک ابزار مفید در آرایه شناسی و شناسایی گونه‌ها معرفی می‌شود. این روش اطلاعات کاملی را از گونه های منفرد، صرف نظر از خصوصیات ریختی و یا خصوصیات مراحل رشدی در اختیار قرار می دهد.

در واقع DNA barcoding یک روش استاندارد است که