مجله ایمنی زیستی
دوره ۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵

معرفی فن‌آوری نوین توالی‌یابی آر.ان.آ

وحید شریعتی، فریناز به فرجام*، امیر موسوی
استادیار پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
***دانشجوی دکتری پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران**
دانشیار پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

farinaz.cell88@gmail.com

چکیده

امروزه فناوری‌های توالی‌یابی با نتایج دقیق و راندمان بالا در علوم زیست شناسی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از روش‌های نسل بعدی توالی‌یابی، توالی‌یابی آر.ان.آ است که برای بررسی ترانسکریپتوم از آن استفاده می‌شود. این روش با به کارگیری فناوری‌های توالی‌یابی عمیق دی.ان.آ مکمل، سنجش فراوانی آر.ان.آ در سطح ژنومی را برای محققین میسر می‌سازد و دیدگاه ما را در ارتباط با پیچیدگی ژنوم یوکاریوت‌ها تغییر می‌دهد. پیشرفت‌های اخیر در روش‌های توالی‌یابی آر.ان.آ، خصوصیات کامل‌تری را از رونوشت‌های آر.ان.آ در مقایسه با سایر روش‌ها نشان می‌دهد. این پیشرفت‌ها شامل بهبود نقشه‌برداری جایگاه‌های شروع رونویسی، سنجش بیان اختصاصی یک رشته، بررسی اتصالات ژنی و تشخیص پیرایش‌های فرعی و ترکیب ایزوفرم‌ها می‌باشند. پیشرفت‌های مداوم در این فناوری، امکان توالی‌یابی مستقیم آر.ان.آ و دست‌یابی به توالی‌های مربوط به مولکول‌های آر.ان.آ با فراوانی پایین را نیز فراهم نموده است. در این مقاله مروری، به معرفی روش توالی‌یابی آر.ان.آ و کاربردهای آن پرداخته شده و به برخی پیشرفت‌های آن که به بسیاری از محدودیت‌های سایر روش‌ها غلبه می‌کند، اشاره خواهد شد.

کلمات کلیدی: توالی‌یابی آر.ان.آ، توالی‌یابی، ترانسکریپتوم، دی.ان.آ مکمل، رونوشت و نقشه‌برداری

مقدمه

ترانس‌کریپتوم، سری کامل رونوشت‌های یک سلول است که میزان این رونوشت‌ها برای مراحل خاص رشد و نموی و شرایط فیزیولوژیکی مهم می‌باشد. به گونه‌ای که درک مفهوم آن برای تفسیر عناصر عملکردی ژنوم و مشخص کردن ساختار مولکولی سلول‌ها و بافت‌ها، همچنین برای درک مراحل پیشرفت بیماری ضروری می‌باشد (۳۹).

اصطلاح توالی‌یابی دی.ان.آ، به روش‌های تعیین توالی برای مشخص کردن ترتیب بازهای نوکلئوتیدی در یک مولکول دی.ان.آ اشاره می‌کند. ورود این روش به عرصه زیست‌شناسی، باعث تسریع کشف و

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.2.4]

بررسی‌های بیولوژیکی شده است. به‌طوری که سرعت بالای توالی‌یابی دی.ان.آ با روش‌های جدید، ابزاری برای تعیین توالی کل ژنوم بسیاری از حیوانات، گیاهان، ژنوم‌های میکروبی و ژنوم انسانی در پروژه ژنوم انسان شده است (۹). پانزده سال بعد از کشف مولکول مارپیچ دی.ان.آ در سال ۱۹۵۳، اولین آزمایش‌های تعیین توالی آن انجام شد. اولین گزارش‌ها در سال ۱۹۷۵ توسط سنگر و کولسن با معرفی روش جمع و تفریق (Plus-minus) بر روی ژل اکریل آمید معرفی شد که این روش ۳۰ سال بعد نیز مورد استفاده قرار گرفت. کشف تری‌فسفات‌های دی‌داکسی نوکلئوتید در سال‌های بعد، عاملی برای جایگزینی این روش با روش توالی‌یابی سنگر در سال ۱۹۷۷ شد (۹ و۲۹).

پیشرفت در روش‌های ترانسکریپتوم ادامه پیدا کرد تا این که انواع مبتنی بر دورگه‌سازی (Hybridization-based approaches) بدست آمدند. براون و همکاران در سال ۱۹۹۵، سطح بیان ژن‌های شناخته شده را با استفاده از ریزآرایه دی.ان.آ مکمل لکه‌گذاری شده (Spotted cDNA microarray) مشخص نمودند. یکی دیگر از این روش‌ها، tiling array ارائه شده توسط شرکت Affymetrix بود که در سال ۲۰۰۲ با بررسی الگوی بیان کل ژنوم به حضور ژن‌های جدید و واریانت‌های پیرایش پی بردند. از ابتدای سال ۲۰۰۵ چندین متد جدید در آزمایشگاه جرج کرچ و 454 Life Sciences معرفی شد که تحولی در عرصه توالی‌یابی بود. همه این‌ها در دوره‌ای بعد از سنگر قرار دارند و به عنوان فن‌آوری‌های نسل بعدی توالی‌یابی (NGS) نامیده می‌شوند (۲۹و ۳۹).

فن‌آوری‌های متنوعی برای تفسیر و کمیت سنجی ترانسکریپتوم وجود دارد. اقدامات بر اساس دورگه‌سازی که با انکوباسیون دی.ان.آ مکمل نشاندار شده با فلورسانس با استفاده از ریزآرایه‌ها انجام می‌شود، دارای یکسری محدودیت‌هایی هستند. اول این‌که می‌بایستی از قبل اطلاعاتی در مورد ژنوم موجود داشته باشیم. از طرفی در این روش‌ها سطح زمینه به دلیل دورگه سازی‌های متقاطع بالا می‌باشد و همین عامل محدود شدن رنج پویای یافته‌ها می‌شود. برخلاف روش‌های ریزآرایه، اقدامات بر اساس توالی، به‌طور مستقیم توالی دی.ان.آ مکمل را مشخص می‌کنند. در ابتدا توالی‌یابی سنگر دی.ان.آ مکمل و یا کتابخانه توالی‌های کوتاه بیان یافته استفاده شد که نسبتا کارایی پایینی داشتند و گران بوده و به‌طور کلی کمی نبودند. روش‌های بر اساس برچسب (Tag-based approaches) مانند:

(SAGE: Serial analysis of gene expression) و (CAGE: Cap analysis of gene expression) و (MPSS: Massively parallel signature sequencing) برای غلبه بر این محدودیت‌ها پیشرفت کردند. اما اساس این روش‌ها نیز فن‌آوری گران قیمت توالی‌یابی سنگر می‌باشد. با این قطعات کوتاه، برچسب‌ها نمی‌توانند به صورت اختصاصی، ژنوم مرجع را نقشه برداری کنند. علاوه بر این، تنها بخشی از رونوشت آنالیز می‌شود و ایزوفرم‌ها از همدیگر تمییز نمی‌شوند (۳٤و ۳۹).

اخیرا و در سال ۲۰۰۸ برای غلبه بر این محدودیت‌ها، روشی دیگر از نسل بعدی توالی‌یابی برای تفسیر ترانسکریپتوم حاصل شد. این روش که به عنوان نیرویی قوی برای تعیین ویژگی ترانسکریپتوم و

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.2.4]

آشکارسازی پیچیدگی آن و سنجش دقیق سطح رونوشت‌ها و ایزوفرم‌های آن در مقایسه با سایر روش‌ها به کار می‌رود، توالی‌یابی دی.ان.آ مکمل موازی (Massively parallel cDNA sequencing) و یا توالی‌یابی آر.ان.آ نامیده می‌شود (۲۱و ۳۹).

فن‌آوری توالی‌یابی آر.ان.آ و مزایای آن

فن‌آوری توالی‌یابی آر.ان.آ از روش‌های توالی‌یابی مهم و قابل‌توجهی که امروزه با سیستم‌های Illumina، Applied Biosystems و Roche 454 Life Science پیشرفت کرده است استفاده می‌کند. قبل از بیان مراحل کار فن‌آوری توالی‌یابی آر.ان.آ، اشاره کوتاهی به اساس کار این سیستم‌ها داریم:

توالی‌یابی Roche 454

یکی از روش‌های توالی‌یابی، از نسل بعدی توالی‌یابی که به صورت تجاری در دسترس است، در سال ۲۰۰۵ توسط مارگویلیز و همکاران و شرکت 454 Life Sciences توسعه پیدا کرد که بر اساس تکنیک pyrosequencing بود. این سیستم، توالی‌یابی کل ژنوم خرد شده بدون نیاز به کلون کردن در باکتری *اشرشیاکلی* و یا هر میزبان دیگر را امکان‌پذیر می‌کند (۳۰).

در این روش ابتدا دی.ان.آ به صورت تصادفی به قطعات کوتاهی تبدیل می‌شود و به توالی‌های پیوند دهنده (Adapters) متصل می‌شود. در مرحله بعدی به مولکول‌ها اجازه اتصال به قطعات موجود بر روی گلوله‌های ریز (Beads) را می‌دهند. در روش توالی‌یابی 454، تکثیر قطعات حاصله با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز امولسیونی (Emulsion PCR) صورت می‌گیرد که در آن قطعات در یک محلول دارای روغن حل می‌شوند و هر کدام از آن‌ها حکم یک واکنش را دارند. بیدهای موجود در ابعاد ماکرو و یا نانو هستند و به روش نانوفن‌آوری ساخته شده، دارای توالی‌هایی مکمل قطعات ما هستند. با گرم و سرد کردن‌های متوالی، واکنش تکثیر درون قطره‌های مربوطه انجام می‌گیرد. سپس مجموعه‌های بسیار وسیعی از این گلوله‌های ریز را بر روی PicoTiterPlate قرار می‌دهند به طوری که هر گلوله در داخل یک حفره قرار می‌گیرد. در مرحله بعدی گلوله‌های ریز آنزیمی اضافه می‌شوند. با انجام واکنش تکثیر و افزوده شدن هر نوکلئوتید، تصویر برداری با دوربین‌های خاصی صورت می‌گیرد. آنالیز سری تصاویر حاصله توالی قطعات را مشخص می‌کند (۹و ۲۷).

توالی‌یابی Illumina (Solexa)

یکی دیگر از فن‌آوری‌های نسل بعدی توالی‌یابی، در سال ۲۰۰۶ توالی‌یابی Illumina بود. تفاوت این روش با 454 در اساس کار تکثیر قطعات می‌باشد. در این فن‌آوری، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به صورت پل (Bridge PCR) انجام می‌گیرد. تکثیر بر روی صفحات جامدی صورت می‌گیرد که به صورت درجا و تصادفی، مکمل‌هایی برای آداپتور قطعات چسبیده شده است. قطعات پس از اتصال به توالی‌های مکمل خودشان بر روی صفحه می‌توانند با حرکت از جانب دیگر نیز به توالی دیگری بر روی صفحه متصل شوند و یک پل تشکیل دهند. گرم و سرد کردن‌های مکرر، باعث تکثیر قطعات می‌شود. در مرحله بعدی با دناتوره کردن دو رشته‌ای‌ها، تکثیر قطعات با افزودن نوکلئوتیدهای دارای نشان فلورسانس که انتهای ′۳

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.2.4]

آن‌ها بلوکه شده است انجام می‌گیرد و در هر مرحله اضافه شدن آن‌ها، بلوک برداشته شده و نور ساطع شده تصویربرداری می‌شود و با سنجش شدت نورهای حاصله، ردیف توالی‌ها مشخص می‌شود (۹و ۲۷).

توالی‌یابی ABI's SOLiD

اساس این روش شیمی اتصال-دو رگه‌سازی می‌باشد که در سال ۲۰۰۸ معرفی شد. در این روش اتصال پرایمر به نشانگرها و ساطع شدن نور حاصله توالی مربوطه را مشخص می‌کند. این واکنش دارای مراحل تکثیر نمی‌باشد. واکنش با استفاده از یک آنزیم لیگاز و اتصال قطعات و در نهایت ساطع شدن نور حاصله انجام می‌گیرد. قطعات دی.ان.آ برای این روش بر روی سطوح گلوله‌های ریز مغناتیسی با اندازه یک میکرونی تکثیر می‌شوند و امکان ایجاد سیگنال کافی در طول مراحل توالی‌یابی را فراهم می‌کند و سپس بر روی اسلایدهای فلوسل قرار می‌گیرند. توالی‌یابی بر اساس لیگاز، با اتصال یک پرایمر به توالی‌های مشترک بر روی قطعات تکثیر شده شروع می‌شود. سپس دی.ان.آ لیگاز، یک ۸ تایی نشاندار شده با فلورسانس خاصی را فراهم می‌کند که در آن بازهای چهارم و پنجم با گروه فلورسانس متصل شده، کد می‌شوند. هر مرحله اتصالی همراه با آشکارسازی فلورسانس همراه است. بعد از آن در یک مرحله بازسازی، بازها از ۸ تایی متصل که دارای گروه فلورسانس است، جدا می‌شوند و به صورت همزمان پرایمر برای دور بعدی واکنش اتصالی آماده می‌شود. در نهایت با کنار هم گذاشتن تصاویر حاصله، می‌توان به ترتیب توالی‌ها پی برد. این روش با دارا بودن توالی کوتاهی در حد ۳۰-۲۵ نوکلئوتید، می‌تواند ۳-۲ گیگا باز توالی را در هر دوره توالی‌یابی کند (۹و ۲۷).

توالی یابی Helicos

روش Helicos پلی‌فرم دیگری از نسل بعدی توالی‌یابی است که دارای اساسی مثل سه پلت فرم اصلی فوق می‌باشد، اما متکی به تکثیر کلونال نمی‌باشد. این روش، نسبتا گران قیمت است و از این‌رو در مقایسه با سه روش فوق کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۵).

از زمان معرفی سیستم Helicos، تلاش‌های بسیاری برای ایجاد فن‌آوری‌های توالی‌یابی کارآمد متکی بر تک مولکول‌ها صورت می‌گیرد که دیگر نیازی به مرحله تکثیر نباشد. مراحل کلی کار در روش Helicos به این صورت است که پس از شکافتن یک مولکول دی.ان.آ تکی به قطعاتی کوتاه که همراه دنباله‌های پلی A هستند، این قطعات به سطح فلوسل‌هایی متصل می‌شوند. اتصال قطعات به سطح فلوسل‌ها از طریق پلیTهای متصل شده به سطح فلوسل‌ها انجام می‌گیرد. زمانی که پلی‌مراز و باز نشاندار بر روی سطح جاری می‌شوند، شرکت نوکلئوتید در ساختار در حال تشکیل در مکان‌هایی که حالت مکمل بین نوکلئوتید اضافه شده و اولین موقعیت در قطعه متصل به سطح وجود دارد، انجام می‌گیرد. در مرحله بعدی بازهایی که وارد ساختار نشده‌اند، شستشو می‌شوند. سپس یک دوربین کل سطح قطعه را برای شناسایی بازهای جدیدی که اضافه شده‌اند، اسکن می‌کند. در مرحله بعدی، رنگ نشاندار که مهار کننده اتصال می‌باشد، جدا شده و چرخه دیگری از اضافه شدن نوکلئوتیدی جدید به

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.2.4]

همراه پلی مراز آغاز می‌شود و با تکرار این چرخه‌ها، کل توالی مشخص می‌شود (۱٤).

مراحل کار فن‌آوری توالی‌یابی آر.ان.آ

به طور کلی مراحل کار فن‌آوری توالی‌یابی آر.ان.آ به این صورت است که در مرحله اول آر.ان.آ استخراج شده با دو روش قطعه قطعه شدن آر.ان.آ و یا قطعه قطعه شدن دی.ان.آ مکمل، به کتابخانه‌ای از دی.ان.آ مکمل تبدیل می‌شود (شکل ۱). در روش اول، مولکول‌های آر.ان.آ ابتدا با ریزسازی و یا هیدرولیز به قطعات کوتاهی تبدیل می‌شوند و بعد به‌صورت دی.ان.آ مکمل در می‌آیند. اما در روش دوم ابتدا مولکول‌های آر.ان.آ به دی.ان.آ مکمل تبدیل می‌شوند و در مرحله بعدی با تیمار آنزیم تجزیه کننده دی.ان.آ و یا ریزسازی با صوت، به کتابخانه‌ای از دی.ان.آ مکمل تبدیل می‌شوند.

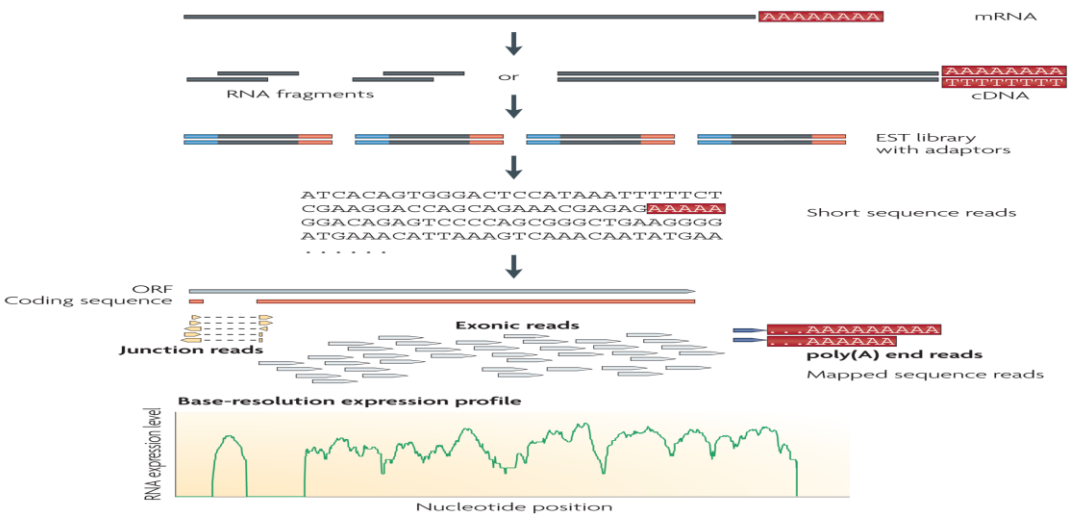
کتابخانه توالی‌های کوتاه بیان یافته با اتصال آداپتور به یک یا هر دو انتهای این دی.ان.آ مکمل‌ها بدست می‌آید. مرحله بعدی تعیین توالی قطعات حاصله توسط یکی از پلت‌فرم‌های چهار شرکت Illumina، Roche 454، Helicos BioSciences و Life Technology می‌باشد که هر مولکول با و یا بدون تکثیر با روشی با راندمان بالا توالی‌یابی می‌شود و قطعاتی کوتاه از یک انتها (توالی‌یابی یک طرفه: Single-end sequencing) و یا از هر دو انتها (توالی‌یابی دو طرفه: Paired-end sequencing) حاصل می‌شود. این قطعات بسته به روش توالی‌یابی که استفاده می شود، ٤۰۰-۳۰ جفت باز هستند.

مرحله آخر، هم‌ترازی، قطعات کوتاه توالی‌یابی شده بر روی ژنوم مرجع و یا رونوشت‌های آن می‌باشد و یا این که قطعات، بدون توالی ژنومی مرجع به صورت از نو (Denovo) کنار همدیگر قرار می‌گیرند. لازم به ذکر است که این توالی‌های کوتاه به سه دسته توالی‌های اگزونی (Exonic reads)، توالی‌های اتصالی (Junction reads) و یا توالی‌های انتهای پلی‌آدنینی (Poly(A) end-reads) تقسیم می‌شوند. این سه توالی، برای ایجاد یک پروفایل بیانی و یا یک نقشه رونویسی در مقیاس ژنومی به کار می‌روند که شامل ساختار رونویسی و یا سطح بیان هر ژن می‌باشد (۳۹).

اگر چه این فن‌آوری هنوز در مسیر پیشرفت قرار دارد، اما در مقایسه با سایر روش‌ها، دارای مزایای زیادی می‌باشد. اول این که این فن‌آوری محدود به شناسایی رونوشت‌های توالی‌های ژنومی موجود نمی‌باشد و همین ویژگی آن برای ارگانیسم‌هایی که به صورت غیرمدل هستند و هنوز توالی ژنومی آن‌ها شناسایی نشده است، بسیار اهمیت دارد. ثانیا با این روش می‌توان مرزهای رونویسی و جایگاه‌های شروع رونویسی ((Transcription start sites (TSS) را با دقت یک نوکلئوتید شناسایی کرد. علاوه بر این توالی‌یابی آر.ان.آ، در شناسایی تنوع توالی‌ها مثل پلی‌مورفیسم در مناطق رونویسی شده نقش تعیین کننده دارد. با این روش شناسایی حوادث پیرایش متناوب و رونوشت‌های ترکیب ژنی (Gene fusion) که در بیماری‌هایی مثل سرطان بسیار مهم می‌باشند، بهبود یافته است (۲۰و ۳۹).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.2.4]



شکل۱- مراحل یک آزمایش معمول توالی‌یابی آر.ان.آ تبدیل آر.ان.آ به دی.ان.آ مکمل و افزودن آداپتور، ایجاد توالی‌کوتاه بیان یافته با سیستم‌های توالی‌یابی، هم‌ترازی آن‌ها روی ژنوم یا رونوشت و در نهایت ایجاد یک پروفایل بیانی برای بررسی کمی بیان ژن

چندین پیشرفت در فن آوری توالی‌یابی آر.ان.آ

۱- ترسیم جایگاه‌های شروع رونویسی

مشخص کردن جایگاه‌های شروع رونویسی با دقت یک نوکلئوتید برای مشخص کردن کامل محصولات آر.ان.آ و شناسایی مناطق پروموتری تنظیم کننده بیان هر رونوشت ضروری می‌باشد. یکی از اقدامات موجود برای این منظور که از روش سنگر توسعه پیدا کرده روش CAGE است (۳۲). این روش دی.ان.آ مکمل‌های کلون شده حاصل از آر.ان.آ را توالی‌یابی می‌کند که دارای انتهای ′۵ دست نخورده‌ای هستند (برای مثال دارای کلاهک در انتهای ′۵ خود می‌باشند). این روش گرچه مهم و سودمند می‌باشد، ولی به میزان زیادی آر.ان.آ نیاز دارد و توالی‌های کوتاهی در حد تقریبا ۲۰ نوکلئوتید ایجاد می‌کند.

برطرف کردن این محدودیت‌ها با سازگاری این روش با توالی‌یابی آر.ان.آ اتفاق افتاد و منجر به شناسایی پیچیدگی‌های غیرقابل پیش‌بینی توزیع جایگاه‌های شروع رونویسی در طول ژنوم و حوالی پروموتر شد. از جمله فن‌آوری‌های ترکیب این دو روش می‌توان deepCAGE (۳۷)، (PEAT: Paired end analysis of transcription start sites) (آنالیز از دو انتهای جایگاه‌های شروع رونویسی) nanoCAGE (۱۷)، (CAGE کم مقدار) و CAGEscan (توالی جفت برای ترکیب انتهای ′۵ CAGE با توالی‌های پایین دست) (۲۵) را نام برد.

ترسیم جایگاه شروع رونویسی با میزان کمتر از ۱۰ نانوگرم با NonoCAGE امکان‌پذیر می‌شود که این عمل را با استفاده از استراتژی‌های تکثیری متنوعی انجام می‌دهد. دو روش PEAT و nonoCAGE با توالی‌یابی از هر دو انتها، پیوستگی جایگاه‌های شروع رونویسی با مناطق پایین‌دست را برآورد می‌کنند. علاوه بر این، در تسهیل ارتباط جایگاه‌های شروع رونویسی با رونوشت‌های خاص نیز نقش دارند (۲۱).

۲- توالی‌یابی آر.ان.آ یک رشته خاص (Strand specific RNA seq)

مطالعات ترانسکریپتوم در گونه‌های مختلف حضور

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.2.4]

فراگیری از حوادث رونویسی رشته بی‌معنی (Antisense) را نشان می‌دهد. امروزه مشخص شده است که رونوشت‌های بی‌معنی، دارای عملکرد هستند و نقش‌های متنوعی در جایگاه‌های فیزیولوژیکی و بیماری دارند (۵).

در طول سنتز دی.ان.آ مکمل رشته اول، به خاطر عملکرد دی.ان.آ پلی‌مراز وابسته به دی.ان.آ، رشته دوم نیز به صورت محصول مصنوعی تولید می‌شود. برای سنتز رشته بی‌معنی و توالی‌یابی آن، استراتژی‌هایی توسعه پیدا کرده است که اطلاعات اختصاصی یک رشته را ایجاد می‌کنند. اولی با اتصال آداپتورهایی به انتهای آر.ان.آها و یا مولکول‌های دی.ان.آ مکمل تک رشته‌ای در جهت از قبل تعیین شده می‌باشد. جهت آداپتورهای استفاده شده به عنوان نقاط مرجع برای به دست آوردن اطلاعات رشته مربوط مورد استفاده قرار می‌گیرد. دومی توالی‌یابی مستقیم محصولات دی.ان.آ مکمل تک رشته‌ای ایجاد شده است. نهایتا سومی نشاندار کردن شیمیایی محصولات سنتز شده دی.ان.آ مکمل رشته دوم و یا آر.ان.آ به صورت انتخابی می‌باشد (۸ و۲٤). این استراتژی‌ها در بررسی‌های ترانسکریپتوم شامل ترسیم جایگاه‌های ترجمه آر.ان.آها (برای مثال محل اتصال پلی‌زوم‌ها) و شناسایی آر.ان.آهای مرتبط با پروموترهای خاص بسیار مفید می‌باشند (۲۱).

۳- مشخص کردن الگوهای پیرایش فرعی

اهمیت الگوهای پیرایش فرعی در رشد و نمو مشخص می‌باشد. از طرفی ٦۰-۱۵ درصد جهش‌های عامل بیماری، به دلیل پیرایش فرعی است. از این‌رو آشنایی با مجموعه کامل حوادث پیرایش و درک این که چگونه این الگوهای متغیر در رشد و نمو، تمایز سلولی و بیماری انسانی نقش دارند، بسیار حیاتی است (۱۸و ۳۸). پیرایش در انسان‌ها، به دلیل وجود بیش از ۹۵ درصد ژن‌های چند اگزونی که پیرایش فرعی در آن‌ها اتفاق می‌افتد و وجود تقریبی ۱۱۰۰۰۰ جایگاه پیرایش جدید در هر بافت، حائز اهمیت است (۲).

پیشرفت در فن‌آوری‌های توالی‌یابی کنونی، تعیین توالی قطعات بلندتر، ترسیم و مکان‌یابی توالی‌های کوتاه بر روی اگزون‌های با پیرایش فرعی را امکان پذیر می‌سازد. در این فن‌آوری‌ها، توالی‌ها به چندین قطعه تقسیم می‌شوند و هر قطعه به صورت مستقل بر روی ژنوم هم‌تراز می‌شود. علاوه بر این روش‌هایی که با استفاده از توالی‌های دو طرفه انجام می‌گیرند، ما را قادر می‌سازند که بتوانیم اطلاعات حاصل از دو نقطه در یک رونوشت را با حدس فاصله بین توالی‌ها تعیین توالی کنیم. در نتیجه امکان جستجوی الگوهای پیرایش بدون نیاز به دانش قبلی در مورد شرح رونوشت ایجاد می‌شود (۱و ۲۱،۳٦).

٤- روش‌های هدفدار با استفاده از توالی‌یابی آر.ان.آ

علی رغم توانایی‌های در حال پیشرفت نسل بعدی، توالی‌یابی در ارتباط با ویژگی‌های عملکردی و کاهش هزینه‌ها برای هر داده حاصله، دست‌یابی به توالی‌یابی قطعات برای کاربردهای بالینی دارای هزینه گزافی است. از جمله این کاربردها می‌توان مشخص کردن رونوشت‌های دارای فراوانی پایین (برای مثال آلل‌های رونوشت‌هایی که دارای بیان افتراقی هستند) را نام برد. در این موارد می‌بایستی زیر گروه رونوشت مورد نظر غنی‌سازی شود تا با رسیدن به فراوانی بالایی از

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.2.4]

آن، بتوان توالی‌یابی را انجام داد (۱۵).

استراتژی‌های غنی سازی هدف (Target-enrichment strategies) برای توالی‌یابی مجدد دی.ان.آ ژنومی پیشرفت کرده‌اند. بسیاری از این فن‌آوری‌ها برای به دام‌اندازی اگزون‌های ژنوم مورد استفاده قرار می‌گیرند که بسیاری از جهش‌های عامل بیماری با احتمال بالا در ترانسکریپتوم کد کننده پروتئین رخ می‌دهند. تغییرات در استراتژی‌های غنی‌سازی دی.ان.آ ژنومی، منجر به توسعه روش توالی‌یابی آر.ان.آ هدفدار برای توالی خاصی شده است. فن‌آوری توالی‌یابی آر.ان.آ هدفدار برای شناسایی رونوشت‌های ترکیبی (۱۱)، بیان اختصاصی الل، جهش‌ها (٤٠) و حوادث ویرایش آر.ان.آ (RNA-editing) (۱۲) در یک زیر گروه رونوشت‌ها کاربرد دارد (۲۱).

٥- توالی یابی آر.ان.آهای کوچک

تاثیر فن‌آوری توالی‌یابی آر.ان.آ در ارتباط با کشف آر.ان.آهای کوچک و مشخص کردن خصوصیات آن‌ها بسیار قابل توجه است (٦). در بسیاری از مطالعات، برای کشف این آر.ان.آها از روش pyrosequencing استفاده شد (۲٦و ۲۸). اما امروزه با استفاده از سایر روش‌های با کارایی بالای نسل بعدی توالی‌یابی و با بررسی کل ژنوم، گونه‌های زیادی از آر.ان.آهای کوچک شناسایی شده است (۳۳).

استراتژی‌های آماده‌سازی نمونه برای آر.ان.آهای بلندتر (بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید)، برای آر.ان.آهای کوچک مناسب نمی‌باشد. در این روش‌ها با رونویسی معکوس، دی.ان.آ مکمل حاصل می‌شود و توالی‌یابی می‌شود. در مورد آر.ان.آهای کوچک، دی.ان.آهای مکمل حاصله با این روش‌ها بسیار کوتاه بوده و کارآیی لازم برای توالی‌یابی و هم‌ترازی را ندارند. به همین دلیل می‌بایستی استراتژی‌های آماده سازی نمونه دچار تغییر شوند (۲۱). از این‌رو، یکی از محدودیت‌های روش‌های بر مبنای توالی‌یابی آر.ان.آ که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرد، عدم توانایی آن در بیان دقیق مقدار کمّی و فراوانی این آر.ان.آها می‌باشد که با احتمال بالا به دلیل خطاهای انجام شده در طول مراحل آماده‌سازی است (۱۰).

٦- توالی‌یابی مستقیم آر.ان.آ

سنتز دی.ان.آ مکمل و سایر مراحلی که برای آماده‌سازی نمونه‌های آر.ان.آ به منظور توالی‌یابی انجام می‌گیرد، برخی کاربردهای توالی‌یابی آر.ان.آ را محدود می‌کند. برای مثال در مورد توالی‌یابی آر.ان.آ که برای یک رشته خاص صورت می‌گیرد، همان‌طور که گفته شد، دی.ان.آ مکمل رشته دوم به صورت محصول مصنوعی نادرست ایجاد می‌شود. کتابخانه‌های اختصاصی یک رشته، برای جلوگیری از این مشکل ساخته می‌شوند، اما به دلیل استفاده از اتصالات آر.ان.آ – آر.ان.آ، کار پر زحمتی می‌باشند. محدودیت دیگر در ارتباط با تغییر الگو (Template switching) است که در زمان سنتز دی.ان.آ مکمل ممکن است دی.ان.آ مکمل در حال سنتز و ناقص از رشته آر.ان.آ الگوی خودش جدا شود و به یک رشته الگوی دیگر متصل شود که دارای توالی مشابه با الگوی اصلی می‌باشد و دی.ان.آهای مکمل کایمرا را به وجود آورد (۳و ۱۳). تغییر الگو باعث بروز مشکلاتی در ارتباط با تشخیص مرزهای اگزون-اینترون و رونوشت‌های کایمرای واقعی می‌شود.

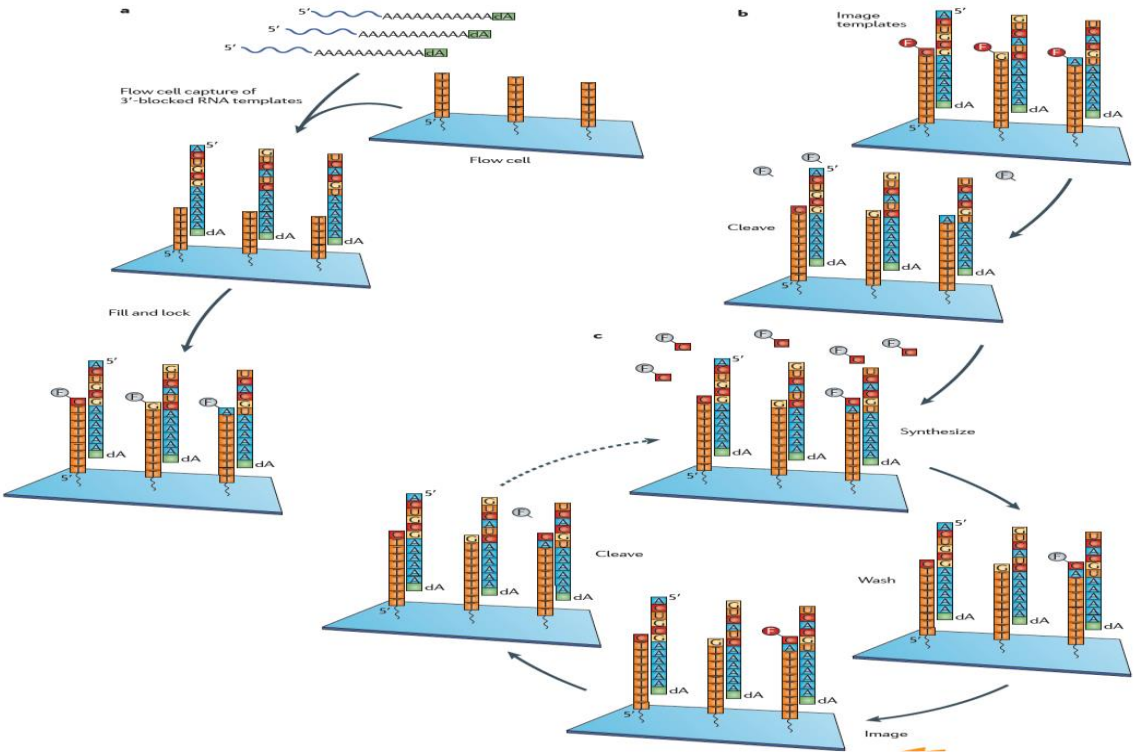
این محدودیت‌ها با به وجود آمدن فن‌آوری توالی‌یابی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.2.4]

و آنالیز مستقیم آر.ان.آ برطرف شد که اخیرا و برای اولین بار با توالی‌یابی تک مولکولی Helicos توسعه پیدا کرد (۲۱و ۲۳) (شکل۲). این روش مبتنی بر دورگه‌سازی چند فمتومول از الگوهای آر.ان.آ که انتهای ′۳ آن‌ها پلی‌آدنیله شده است با سطوح توالی‌یابی دارای پلی تیمین در کانال‌هایی می‌باشد. این روش می‌تواند آر.ان.آهای دارای پلی‌آدنین را از آر.ان.آ کل یا عصاره سلولی جدا کرده و توالی‌یابی کند (۲۲).

این فن‌آوری مزایایی نسبت به بقیه روش‌ها نشان می‌دهد که باعث پیشرفت و توسعه استفاده ازروش توالی‌یابی آر.ان.آ می‌شود. توالی‌یابی مستقیم آر.ان.آ به مقدار آر.ان.آ کمی در حد چند فمتومول نیاز دارد که این مزیت در مورد نمونه‌هایی که به صورت بایگانی هستند و برای نگه‌داری طولانی مدت در فرمالین و پارافین تثبیت شده‌اند و ژنوم استخراجی از آن‌ها به صورت سالم نیست و همچنین برای گونه‌های آر.ان.آ کوتاه بسیار حائز اهمیت می‌باشد که به راحتی تبدیل به دی.ان.آ مکمل نمی‌شوند. علاوه بر این آماده سازی نمونه در این روش نسبتا ساده است (۲۱).



شکل۲– توالی‌یابی مستقیم آر.ان.آ با روش Helicos a): اتصال آر.ان.آ پلی‌آدنیله به توالی‌های پلی تیمیدین روی سطح و انجام مکانیسم ‘Fill-and-lock’: مرحله fill با تیمیدین طبیعی و پلی‌مراز و مرحله lock با نوکلئوتیدهای فلورسانس b) : عکس‌برداری برای مشخص کردن موقعیت دقیق الگو و برش شیمیایی اتصال رنگ و نوکلئوتید و آماده کردن الگو برای ورود نوکلئوتید بعدی c): انکوباسیون سطح با یک نوکلئوتید نشاندار و فلورسانس و ادامه مراحل برش و شستشو

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.2.4]

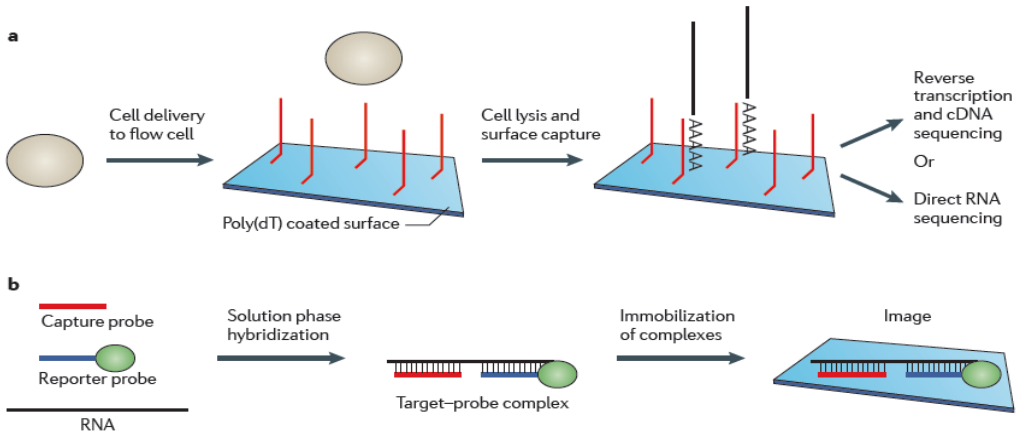
۷- توالی‌یابی نمونه‌های آر.ان.آ با فراوانی پایین

نمونه‌های بیولوژیکی (مثل بافت یا مایعات بدن) دارای ترکیب پیچیده‌ای از انواع سلول‌ها هستند که می‌بایستی برای بررسی، با روش‌های خاصی منتخب و مورد مطالعه قرار گیرند. در این میان، آنالیز نمونه‌های آر.ان.آ با فراوانی پایین، نیاز به چندین مرحله تکثیر دارد تا ماده ژنتیکی لازم برای توالی‌یابی حاصل شود که ممکن است صحت این توالی‌ها حفظ نشود (٤و ١٩). برای برطرف کردن این محدودیت‌ها، توالی‌یابی بر اساس توالی‌یابی آر.ان.آ مطرح شد که روشی جدید است.

در این فن آوری دو روش وجود دارد. روش اول برمبنای استفاده از پرایمرهای دارای پلی‌تیمین بر روی سطوح رونویسی است که ام.آر.ان.آهای پلی‌آدنینی را از عصاره سلولی انتخاب کرده و با سنتز تک رشته‌ای دی.ان.آ مکمل بر روی سطح توالی‌یابی را انجام می‌دهد (شکل ۳a). روش‌های بر مبنای دورگه‌سازی نیز برای کار با آر.ان.آهای با فراوانی پایین مورد استفاده قرار می‌گیرند که مبتنی بر ایجاد نشانگرهای اختصاصی هدف است (شکل ۳b). در این روش مخلوط نشانگرها با نمونه‌های آر.ان.آ موجود در محلول دو رگه می‌شوند. از دو نشانگر مورد استفاده در این روش، یکی نشانگر تسخیری (Capture probe) است که شامل یک توالی اختصاصی هدف برای اتصال به آن و یکسری تغییراتی که باعث تثبیت هدف بر روی سطح می‌شود. نشانگر دوم گزارشگر (Reporter probe) است که دارای توالی برای اتصال در جایگاه دیگری از هدف و یک ماده فلورسانس می‌باشد. بعد از این مرحله، تصویربرداری برای تشخیص و شمارش رونوشت‌ها صورت می‌گیرد (۷و ۲۱). با این سیستم می‌توان ١٦٣٨٤ رونوشت را به صورت خود به خودی شناسایی کرد. این روش تقریبا ۱۰۰ نانوگرم آر.ان.آ یا ۵۰۰۰-۲۰۰۰ سلول نیاز دارد اما بهینه‌سازی دو رگه‌سازی با نشانگر و مراحل تثبیت در سطح ممکن است باعث کاهش میزان آر.ان.آ ورودی هم بشود (۲۱).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-13]

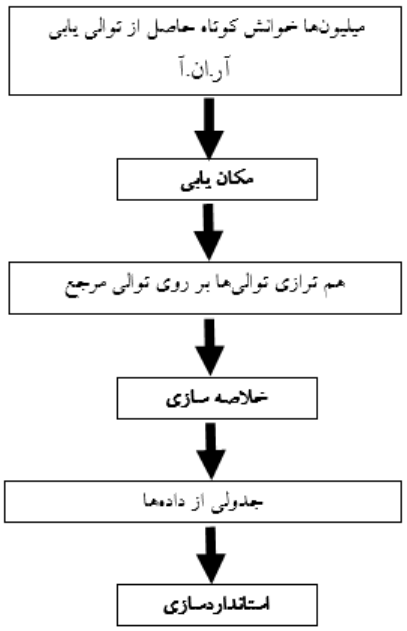
[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.2.4]



شکل۳- فن‌آوری‌هایی برای بررسی بیان ژنی در تک سلولی‌ها یا دارای فراوانی پایین a): انتقال سلول به سطح پوشیده از پلی‌تیمین و لیز سلولی، اتصال رونوشت‌های دارای پلی آدنین به سطح و توالی‌یابی آن‌ها b) : استفاده از دو پروب: پروب تسخیری با یک ناحیه مکمل برای اتصال به هدف و یک ناحیه برای اتصال به سطح و تثبیت آن، پروب گزارشگر دارای توالی مکمل ناحیه‌ای دیگر در هدف و یک بارکد فلورسانس برای شناسایی

آنالیز داده‌های حاصل از توالی‌یابی آر.ان.آ

بررسی‌های توالی‌یابی آر.ان.آ نیز مثل هر فن‌آوری دیگری در نهایت بانک داده‌ای وسیع و پیچیده‌ای نتیجه می‌دهد که تجزیه و تحلیل داده‌ها که همان توالی‌های کوتاه حاصله می‌باشند، برای رسیدن به نتایج دقیق، به اصول و روش‌های خاصی نیازمند است که با نرم افزارهای پیشرفته‌ای امکان‌پذیر می‌شود (۲۰و ۳۱). در طرح کلی توالی‌یابی آر.ان.آ، ابتدا مکان‌یابی توالی‌های حاصله بر روی ژنوم یا رونوشت صورت می‌گیرد (Mapping). در مرحله‌ی دوم، توالی‌های نقشه‌یابی شده برای هر نمونه، بسته به هدف مورد آزمایش در سطح ژنی، اگزونی و یا سطح رونویسی خلاصه می‌شوند (Summarizing). در نهایت اطلاعات خلاصه شده در ارتباط با تست‌های آماری استانداردسازی می‌شوند (Normalizing) و لیستی طبقه‌بندی شده از ژن‌ها، با در نظر گرفتن احتمال آماری وقوع تصادفی آن‌ها (P-values) به وجود می‌آید. استانداردسازی، امکان مقایسه دقیق سطوح بیانی بین نمونه‌ها را امکان‌پذیر می‌کند (۱۰و ۳۷).



شکل٤- مروری بر مراحل آنالیز داده‌های حاصل از توالی‌یابی آر.ان.آ

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.2.4]

نتیجه‌گیری

فن‌آوری توالی‌یابی آر.ان.آ و پیشرفت‌های اخیر آن، ابزاری قدرتمند برای محققین فراهم می‌کند که بتوانند به فهرست کاملی از رونوشت‌های مشتق شده از ژنوم همه موجودات از ارگانیسم‌های ساده تک سلولی تا سلول‌های پیچیده پستانداران، همچنین در بافت‌های سالم وبیمار دست یابند. علاوه بر این توانایی ما را برای کار کردن با آر.ان.آهای کم مقدار استخراج شده از بافت‌های تثبیت شده در پارافین یا فرمالین و یا گونه‌های آر.ان.آ موجود در تک سلولی‌ها، بالا می‌برد. با درک کاملی از همه رونوشت‌ها با این روش می‌توان به مسیرهای بیولوژیکی که در شرایط فیزیولوژیکی متفاوت فعال هستند، پی برد. پیشرفت‌های فن‌آوری توالی‌یابی آر.ان.آ، توانایی ما را برای استفاده از سنجش آر.ان.آهای موجود در تشخیص‌های بالینی بالا می‌برد که از جمله آن‌ها می‌توان به آر.ان.آهای جنینی یا سلول‌های توموری در حال گردش اشاره نمود. به‌طور کلی، این فن‌آوری‌های جدید، برآورد سریع‌تر شیوع بیماری و یا جایگاه‌های دچار جهش را امکان‌پذیر می‌کنند.

فهرست منابع

References

1- Ameur A, Wetterbom, A., Feuk, L. and Gyllensten, U. (2010). Global and unbiased detection of splice junctions from RNA-seq data. Genome Biol. 11: R34.

2- Carninci P. (2009) Is sequencing enlightenment ending the dark age of the transcriptome? Nature Methods. 6:711–3.

3- Cocquet J, Chong, A., Zhang, G. and Veitia, R. A. (2006). Reverse transcriptase template switching and false alternative transcripts. Genomics. 88:127–31.

4- Dafforn A., et al. (2004) Linear mRNA amplification from as little as 5 ng total RNA for global gene expression analysis. Biotechniques. 37:854–7

5- Faghihi M.A. and Wahlestedt C. (2009). Regulatory roles of natural antisense transcripts. Nature Rev Mol Cell Biol. 10:637–43.

6- Ghildiyal M. and Zamore P. D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. Nature Rev Genet. 10:94–108.

7- Geiss G.K., et al. (2008). Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. Nature Biotech. 26:317–25.

8- He Y, Vogelstein, B., Velculescu, V. E., Papadopoulos, N. and Kinzler, K. W. (2008). The antisense transcriptomes of human cells. Science. 322:1855–7.

9- Hutchison CA. (2007). DNA sequencing: bench to bedside and beyond. Nucleic Acids Res. 35(18):6227-37.

10- Kapranov P., et al. (2010). New class of gene-termini-associated human RNAs suggests a novel RNA copying mechanism. Nature. 466:642–6.

11- Levin J.Z., et al. (2009). Targeted next-generation sequencing of a cancer transcriptome enhances detection of sequence variants and novel fusion transcripts. Genome Biol. 10: R115.

12- Li J.B., et al. (2009). Genome-wide identification of human RNA editing sites by parallel DNA capturing and sequencing. Science 324:1210–3.

13- Mader R.M., et al. (2001). Reverse transcriptase template switching during reverse transcriptase-

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.2.4]

polymerase chain reaction: artificial generation of deletions in ribonucleotide reductase mRNA. mRNA J Lab Clin Med. 137:422–8.

14- Masoudi-Nejad A, Narimani Z and Hosseinkhan N. (2013). Emergence of Next-Generation Sequencing. Next Generation Sequencing and Sequence Assembly: Springer. p. 11-39.

15- Metzker M.L. (2010). Sequencing technologies — the next generation. Nature Rev Genet. 11:31–46.

16- Mortazavi A. Williams B., McCue K., Schaeffer L. and Wold B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nat Methods. 5:621-8.

17- Ni T., et al. (2010). A paired-end sequencing strategy to map the complex landscape of transcription initiation. Nature Methods. 7:521–7.

18- Nilsen T.W., Graveley B.R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. Nature. 463:457–63.

19- Nygaard V. and Hovig E. (2006). Options available for profiling small samples: a review of sample amplification technology when combined with microarray profiling. Nucleic Acids Res. 34:996–1014.

20- Oshlack A., Robinson M.D. and Young M.D. (2010). From RNA-seq reads to differential expression results. Genome Biology.11:220.

21- Ozsolak F. and Milos P.M. (2011). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. Nat Rev Genet. 11:87-98.

22- Ozsolak F., et al. (2009). Direct RNA sequencing. Nature. 461:814–8

23- Ozsolak F., et al. (2010). Comprehensive polyadenylation site maps in yeast and human reveal pervasive alternative polyadenylation. Cell. 143:1018–29.

24- Parkhomchuk D., et al. (2009). Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA. Nucleic Acids Res. 37: e123.

25- Plessy C., et al. (2010). Linking promoters to functional transcripts in small samples with nanoCAGE and CAGEscan. Nature Methods. 7: 528–34.

26- Rajagopalan R, Vaucheret, H., Trejo, J. and Bartel, D. P. (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. Genes Dev. 20:3407–25.

27- Reinert and Huson D.H. (2007). bioinformatics Support for Genome-Sequencing Projects. Wiley-VCH Verlag. 25; 1-56.

28- Ruby J.G., et al. (2006). Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in C. elegans. Cell. 127:1193–207.

29- Schuster S.C. (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. Nature methods. 5:16-18.

30- Shariati J.V., Tavakol E., Pietrella M., Giovanni G., Pagnotta M.A. and Porceddu E. (2014). Comparative Transcriptome Analysis Using 454 Pyrosequencing in Two Bread Wheat Genotypes Under Non-Stressed and Water Stressed Conditions. BMC Genomics (In Press).

31- Shendure J. and Ji H. (2008). Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol. 26:1135-45.

32- Shiraki T., et al. (2003). Cap analysis gene expression for high- throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage. Proc Natl Acad Sci USA. 100:15776–81.

33- Taft R.J., et al. (2009). Tiny RNAs associated with transcription start sites in animals. Nature Genet. 41:572–8.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.2.4]

34- Tavakol E. and Shariati J.V. (2014). An introduction to next generation sequencing. Mutation. p. 11-23.

35- Taylor KH. Shi H. and Caldwell CW. (2010). Next generation sequencing: advances in characterizing the methylome. Genes. 1:143-65.

36- Trapnell C. Pachter L. and Salzberg S. (2009). L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-seq. Bioinformatics. 25:1105–11.

37- Valen E., et al. (2009). Genome-wide detection and analysis of hippocampus core promoters using DeepCAGE. Genome Res. 19: 255–65

38- Wang G.S. and Cooper T. A. (2007). Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. Nature Rev Genet. 8:749–61.

39- Wang Z., Gerstein M. and Snyder M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet. 10(1):57-63.

40- Zhang K., et al. (2009). Digital RNA allelotyping reveals tissue- specific and allele-specific gene expression in human. Nature Methods. 6:613–8.

An introduction to RNA sequencing

Vahid Shariati, Farinaz Behfarjam*, Amir Mousavi
Assistant Professor of National Institute of Genetics and Biotechnology, Tehran, Iran
*Ph.D. Student of National Institute of Genetics and Biotechnology, Tehran, Iran
Associate Professor of National Institute of Genetics and Biotechnology, Tehran, Iran

farinaz.cell88@gmail.com

Abstract
High-throughput sequencing technologies are now in common use in biology. RNA-seq is one of the next generation sequencing that applies for transcriptome profiling. This method with deep sequencing of complementary DNA allows researchers to measure RNA abundance on a genome-wide scale and alter our view of the extent and complexity of eukaryotic transcriptomes. Recently, several developments in RNA-seq methods have provided an even more complete characterization of RNA transcripts than other methods. These developments include improvements in transcription start site mapping, strand-specific measurements, gene fusion detection and detection of alternative splicing events and isoforms. Ongoing developments of this technology get possible of direct RNA sequencing and profiling low-quantity RNA samples. In this review article will be introduced RNA-seq technology and implied some developments that overcome limitation of other methods.
Keywords: RNA-seq, sequencing, transcriptome, cDNA, transcript and mapping

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.2.4]