****

**گام های بزرگ در تعیین توالی DNA**

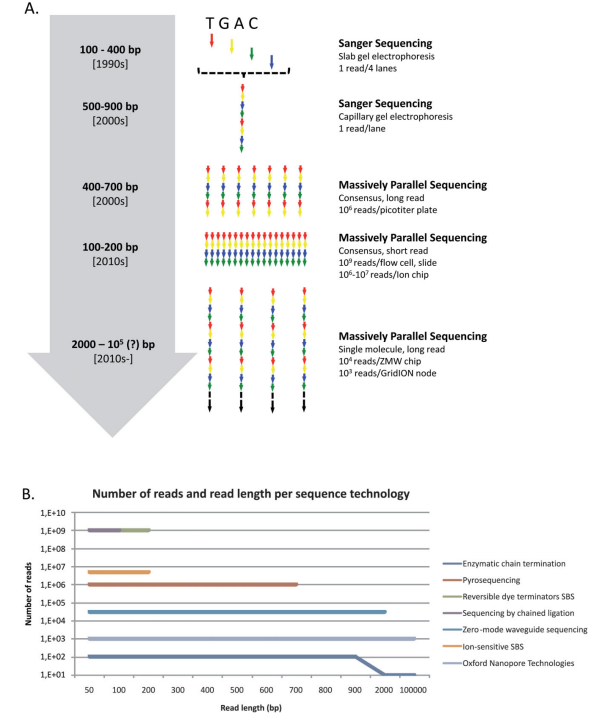
در سال­های اخیر پیشرفت­های فوق العاده­ای در توانایی ما برای تعیین سریع و کم هزینه توالی DNA توالی به وجود آمده است. این مساله تحولات بنیادین در زمینه­های ژنتیک و زیست شناسی ایجاد کرده که منجر به درک عمیق­تر از رویدادهای مولکولی در فرایندهای زیستی شده است. پیشرفت­های سریع تکنولوژیکی، فرصت­ها و کاربردهای تعیین توالی را به سرعت گسترش داده است و در عین حال چالش­هایی در مراحل پیشین تعیین توالی و در فرآیندهای پایین دستی بررسی و تجزیه و تحلیل این حجم انبوه از داده­های توالی تحمیل کرده است. به طور سنتی، تعیین توالی، به قطعات کوچک DNA برای حدود یک هزار پایه(مشتق شده از ژنوم ارگانیسم) بمنظور حفظ کیفیت توالی و دقت بالا برای خواندن طول­های بالاتر محدود شده است. اگر چه پیشرفت­های تکنولوژیکی بسیاری بوجود آمده است، روش­های تعیین توالی موازی که بطور تجاری در حال حاضر در دسترس هستند قادر به حل این مساله نیستند. روش تعیین توالی قادر به حل این مسئله نبوده است. با این حال، اعلان اخیر در تعیین توالی نانوحفره وعده از بین بردن این محدودیت خواندن طول را داده است، که امکان تعیین توالی قطعات سالم بزرگ­تر DNA را می­دهد. توانایی تعیین توالی DNA سالم با دقت بالا گامی بزرگ به سوی تسهیل تجزیه و تحلیل پایین دستی و افزایش قدرت تعیین توالی نسبت به امروز است. این بررسی برخی از پیشرفت­های فنی در تعیین توالی که مرزهای جدیدی را در ژنتیک باز کرده­اند پوشش می­دهد.

**کلمات کلیدی:** DNA ، ژنومیک، توالی نانوحفره، توالی موازی، توالی

**1. مقدمه**

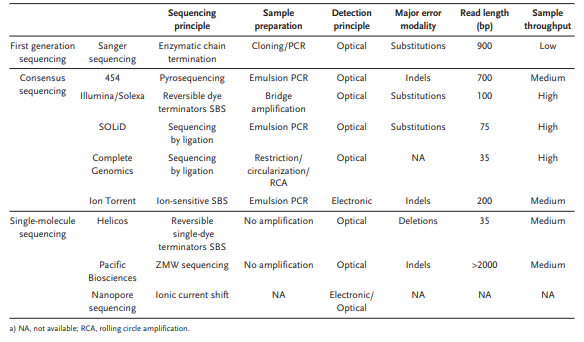
درک کامل زبان DNA نیاز به تعیین کامل ترتیب پایه­های ژنوم انسان (و یا دیگر موجودات مورد نظر) دارد. دستیابی به آن دانش، وعده بینش کامل­تر نسبت به تغییرات بیولوژیکی و علل بیماری­ها را می­دهد. در سپیده دم تعیین توالی، خواندن ترتیب چهار پایه DNA یک فرایند دست و پا گیر بود. تعیین توالی اگرچه هنوز به سختی، با معرفی روش تجزیه شیمیایی صنعتی توسط Maxam و Gilbert [1] و روش تعیین توالی زنجیره پایانی که توسط sanger ساخته شده بود[2] در پایان دهه 1970 ممکن شد. ثابت شد روش دوم مفید­تر است و روش غالب تعیین توالی DNA برای تقریبا سه دهه بود و پروژه ژنوم انسان (HGP) را به پیش برد، و هنوز هم توسط بسیاری به عنوان "استاندارد طلایی" در نظر گرفته می­شود. راه اندازی تجاری ابزارهای تعیین توالی موازی فشرده DNA در سال 2005 آغاز تغییر پارادایم طراحی شده توسط تکنیک­های جدید تعیین توالی DNA بود که به محققان برای پاسخ به سوالات جسورانه در آزمایشات وسیع ژنوم الهام بخشید. در سال­های اخیر رقبای جدید بسیاری در زمینه تعیین توالی موازی فشرده دیده می­شود. قابل ذکر است، روش­های تعیین توالی نوآورانه با استفاده از تک مولکول­های DNA و تشخیص بی­درنگ ظهور کرده­اند. در حال حاضر، این رویکردهای نواورانه در حال تکمیل پلتفرم­های تعیین توالی موجود است، اما پیش از آن، آنها مسیری طولانی برای جایگزین شدن با روش تعیین توالی موازی فشرده دارند.

فن آوری­های معمول تعیین توالی DNA و چالش های خود و محدودیت­هایشان، در زیر توضیح داده می­شود. خلاصه­ای از ویژگی­های هر یک از تکنولوژی­ها در جدول 1 ارائه شده است حالی که تعدادی از خوانش توالی­ها و خوانش طول در شکل 1 نشان داده شده است.



شکل 1. (A) تغییرات خواندن طول و درجه همسانی در فن­آوری­های تعیین توالی از دهه 1990 تا حالا. (B) تعداد خوانش و طول هر خوانش برای تکنولوژی توالی

جدول 1. بررسی اجمالی تکنیک­های تعیین توالی و مشخصاتشان



**2. توالی sanger – توالی خاتمه دهی زنجیره**

مهارت روش خاتمه­دهی زنجیره در استفاده از نوکلئوتیدهای خاتمه زنجیره، دیدئوکسی- نوکلئوتید است که فاقد یک گروه 3پریم هیدروکسیل است و بسط و گسترش بیشتر زنجیره DNA کپی شده را محدود می­کند. برای تعیین توالی اولیه sanger نیاز است فرآیند توالی به چهار واکنش جداگانه تقسیم شود. هر واکنش شامل یک الگوی تک رشته­ای ،DNA یک آغازگر DNA و یک پلیمراز DNA در حضور مخلوطی از چهار نوکلئوتید اصلاح نشده، که یکی از آنها نشانه گذاری شده، و یک نوع نوکلئوتید خاتمه زنجیره اصلاح شده است. قطعاتی با طول متفاوت پس از هیبریداسیون پرایمر و اکتنشن پلیمراز سنتز می­شوند و همه همان 5 پریمپایانی را دارند اما توسط یک نوکلئوتید خاتمه زنجیره به 3ختم می­شوند. اضافه کردن تنها بخشی از نوکلئوتید پایان­دار ترکیب تصادفی دیدئوکسی نوکلئوتیدها را تنها در بخش کوچکی از مولکول­ها تضمین می­کند. از آنجا که نوکلئوتیدهای خاتمه زنجیره مختلف در چهار واکنش توالی یابی استفاده می­شود، تمام ترکیبات خاتمه می­تواند تولید شود. الگوهای DNA محدود به 3 تولید شده پس از تغییر ماهیت بوسیله حرارت و تجزیه و تفکیک شدن توسط ژل الکتروفورز، فراورده­های هر چهار واکنش تعیین توالی موازی را ادامه می­دهد[2]. با استفاده از رادیواکتیو یا، اخیرا، بوسیله برچسب زنی با فلورسنت برای تجسم باندها دنباله­­ای از الگوهای DNA اصلی را قادر می­سازد تا با پیروی از ترتیب مهاجرت قطعات بزرگتر متوالی در ژل تعیین شود.

چند پیشرفت در روش اصلی توسعه یافته توسط sanger بوجود آمده است. اینها عبارتند از: برچسب زنی خاتمه زنجیره نوکلئوتیدها با رنگهای فلورسنت طیفی مجزا که قادر می­سازد: هر لوله و خط تنها در گام­های تولید و شکستن قطعه مورد استفاده قرار گیرد [3، 4]؛ حذف نیاز به کست ژل با استفاده از الکتروفورز ژل مویرگی [5، 6]؛ و اتوماسیون پروتکل، که منجر به افزایش موازی­سازی، تکرارپذیری و توان عملیاتی می­شود[7]. توالی sanger هنوز به طور گسترده­ای امروز برای بسیاری از کاربردها، به خصوص اعتبارسنجی متغیرهای ژنتیکی و در مواردی که کیفیت بالای خوانش 300-900 پایه مورد نیاز است استفاده می­شود. با این حال، پیشرفت­های عمده­ای در تکنولوژی توالی در سال­های اخیر به روش توالی sanger منتسب نشده است، اما روش­های تعیین توالی موازی فشرده به سرعت در حال پدیدار شدن است.

**3. توالی موازی فشرده - توالی اجماع**

پلتفرم­های تعیین توالی که امروزه به طور گسترده­ای در تحقیقات ژنتیکی مورد استفاده قرار می­گیرند، پلتفرم­های تعیین توالی فشرده هستند. که ویژگی­های بسیاری از توالی sanger به ارث برده­اند مانند استفاده از پلیمرازها برای سنتز، نوکلئوتیدهای اصلاح شده و تشخیص فلورسنت. ویژگی­ دیگر این است که آنها نیاز به DNA دارند تا بطور کلونال تقویت شوند تا تشکیل یک الگوی اجماعی قبل از تعیین توالی را بدهند. این روش­های تعیین توالی به نام نسل بعدی تعیین توالی خوانده می­شوند، روش­های تعیین توالی با توان عملیاتی بالا، و یا نسل دوم تعیین توالی. با این حال، همچنانکه تکنولوژی­های تعیین توالی توسعه می­یابند، حفظ رجوع به فناوری­های تعیین توالی قدیمی و بدیع در حال ظهور متعلق به یک نسل خاص سخت است. بنابراین، بهتر است آنها را بر حسب برجسته­ترین ویژگی­های مشترکشان ، مانند روش­های تعیین توالی موازی فشرده و یا تک مولکولی گروه­بندی کنیم. در حال حاضر، پنج رقیب در زمینه فناوری­های تعیین توالی موازی فشرده وجود دارد، هر کدام با نقاط قوت و ضعف خاص. این­ها در ادامه توصیف و مورد بحث قرار گرفته­اند.

**3.1. تعیین توالی به روش پیرو**

Melamede در ابتدا مفهوم تعیین توالی با سنتز (SBS) را در سال 1985 در یک گزارش از تلاش­ها برای تشخیص رویداد ترکیب نوکلئوتید با اندازه­گیری جذب نوکلئوتید [8] را مطرح کرد. بی­خبر از یافته­های Melamede ، Nyrén رویکرد SBS دیگری را با استفاده از زیست­تابی به جای جذب در سال 1986 تصور کرد[9]، که منجر ( 12 سال پس از آزمایش دیگری) به معرفی pyro-sequencing شد[10]. فن­آوری pyrosequencing قادر به تکمیل توالی sanger بود و بیشتر توسط علوم زندگی 454، که توسط جاناتان روتبرگ پایه­گذاری شد، توسعه داده شد. در سال 2005، روتبرگ و همکارانش [11] اولین مقاله اثبات مفهومی را منتشر کردند که نشان داد رویکرد pyrosequencing در تعیین توالی موازی فشرده، بازده فوق العاده­ای در افزایش ظرفیت توالی، و در نتیجه دگرگونی روش تعیین توالی دارد.

در SBS، این رویداد است که تشخیص داده می­شود ترکیب نوکلئوتید با رشته های DNA در حال رشد است. همچنانکه نوکلئوتیدها توسط پلیمراز ترکیب می­شوند، پیرو فسفات (PPI) و پروتون­ها تولید می­شوند. در pyrosequencing، PPI در یک آبشار آنزیمی برای تولید یک انفجار نوری مورد استفاده قرار می­گیرد. PPI بوسیله سولفوریلاز ATP به ATP تبدیل می­شود، که سپس از آن برای تولید فوتون توسط لوسیفراز انزیم کرم شب تاب آنزیم استفاده می­شود، که یک سیگنال نوری متناسب با تعداد نوکلئوتیدهایی که گنجانیده شده است فراهم می­کند. چالش، تشخیص چشمک­های نور از هر الگوی DNA منحصر به فرد است هنگام تعیین توالی الگوهای متعدد به صورت موازی است. انفصال فضایی هر واکنش توالی بر روی مهره­های ته نشین شده در ته چاه کوچک بر روی یک صفحه picotiter به زیبایی این مشکل را حل کرد.

pyrosequencing موازی فشرده با قطعه قطعه شدن DNA و اتصال آداپتوری آغاز می شود. الگوهای تک رشته­ای DNA سپس بر روی دانه­ها محدود می­شوند و امولسیون PCR انجام می­شود، بطور کلونالی هر الگوی DNA در میکروراکتورهای آبی جدا شده با روغن تقویت می­شود. امولسیون سپس شکسته می­شود و دانه­های حامل DNA از دانه­های خالی در فرآیندی به نام غنی سازی از هم جدا می­شوند. دانه­های غنی در چاه­های کوچک در صفحه picotiter با پرایمر و پلیمراز DNA پلیمراز با هم ته­نشین می­شوند. در حالت ایده آل، تنها یکی از این دانه­ها برای هر چاه مناسب خواهد بود. دانه­های کوچکتر نیز اضافه می­شوند، که آنزیم­های مسئول تولید نور با استفاده از PPI را حمل می­کنند. نوکلئوتیدها پس از آن از روی زیر لایه در یک جریان آرام از محلول مورد استفاده در یک ترتیب از پیش تعیین شده عبور کرد، و چشمک­های نور در هر چاه متناظر با ترکیب ثبت شد. حذف کارآمد واکنش با محصولات، که در صورت عدم حذف می­تواند واکنش توالی را آشفته کند، توسط جریان آرام تسهیل می­شود. از این رو، الگوهای توالی DNA با اگاهی از محل آنها تعیین می­شود، منظور جریان نوکلئوتید و سوابق هر یک از فلش­های نور از هر چاه است[10-12]. اشکال عمده استفاده از این رویکرد، مشکلات در بسط توالی نوکلئوتیدهای یکسان (مناطق homopolymeric) طولانی­تر از حدود پنج نوکلئوتید با توجه به پاسخ غیرخطی نوری است که آن­ها تولید می­کنند[10].

طول خوانش قابل مقایسه و افزایش ظرفیت رشته در مقایسه با توالی سنتی sanger تعیین توالی موازی فشرده با استفاده از pyrosequencing را برای توالی de novo، تعیین دوباره توالی ژنوم و مطالعات متاژنومیک ایده­ال کرده است[12]. جیمز واتسون، که به حل ساختار DNA کمک کرده است، ژنومش را در سال 2008 با استفاده از pyrosequencing تعیین توالی کرده بود[13]. مهمترین اثر این پلتفرم توالی را می­توان با مقایسه توالی ژنوم واتسون -تنها در دو ماه با هزینه 1 میلیون دلاری تکمیل شد [13] - با تلاش­های HGP، در زمان 11 سال و هزینه 3 میلیارد دلاری متوجه شد[14]. نقطه عطف دیگر با استفاده از pyrosequencing در تعیین توالی موازی فشرده کاری است که در ژنوم نئاندرتال توسط پابو و همکاران انجام شد[15]. به تازگی، طول خوانش پلتفرم از 450 پایه به 700 پایه توالی معمول sanger افزایش یافته است. تعیین توالی موازی فشرده با pyrosequencing بعلت افزایش توان عملیاتی بر توالی sanger بسیار برتری یافته است. با این حال، جامعه پژوهش به نظر می­رسید اشتهای سیری ناپذیری را برای داده­های توالی است توسعه داده است که به راحتی در مورد استفاده از زیست­تابش SBS راضی نمی­شدند.

**3.2.SBS نابودگر رنگ برگشت پذیر**

سود اساسی در توان عملیاتی تعیین توالی زمانی که دو سیستم تعیین توالی موازی فشرده برای مصارف تجاری در سال 2006 راه اندازی شد به دست آمد. این تکنولوژی مبتنی بر SBS با استفاده از رنگ پایان دهی نوکلئوتید برگشت­پذیر چهار طیفی است و برای اولین بار در سال 2001 توسط یک شرکت کوچک، Solexa [16، 17]، که بعدها توسط ILLUMINA ]18] به دست آمد تعیین شده بود.

SBS با استفاده از پایان دهی رنگ قابل برگشت با تکه تکه شدن DNA و اتصال آداپتورها آغاز می­شود. به جای استفاده از امولسیون PCR برای تفکیک فضایی هر الگوی DNA ، در رویکرد pyrosequencing تعیین توالی موازی فشرده، روش دیگری بکار گرفته می­شود. الگوهای DNA از طریق آداپتورها به یک سطح مسطح هیبریده می­شوند، جایی که که در آن هر الگوی DNA بطور کلونال توسط PCR فاز جامد تقویت می­شود، همچنین به عنوان تقویت پل شناخته می­شود. این، سطحی را با یک چگالی بالا از خوشه­های فضایی مجزا ایجاد می­کند، که هر خوشه شامل یک الگوی DNA منحصر به فرد است. این­ها در ابتدا با عبور پایان دهنده­های رنگ برگشت­پذیر چهار طیفی مجزا در یک جریان محلول بر روی سطح در حضور یک پلیمراز DNA تعیین توالی می­شوند. فقط گسترش­های تک پایه­ای با توجه به اصلاح پریم3 از نوکلئوتیدهای پایان دهی زنجیره ممکن است ، و هر خوشه شامل فقط یک نوع از نوکلئوتیدهاست، همچنانکه بوسیله الگوی DNA تشکیل دهنده خوشه دیکته شده است. پایه گنجانده شده در تمام خوشه­ها توسط تصویربرداری فلورسانس از سطح قبل از حذف شیمیایی رنگ و ترمیناتور شناسایی می­شود، پایه قابل گسترش که برای دور جدیدی از توالی آماده است تولید می­شود. رایج ترین خطاهای توالی تولید شده در SBS پایان دهی رنگ برگشت پذیر جانشینی­ها هستند [18، 19].

یکی از اشکالات عمده شیمی پایان دهی رنگ برگشت پذیر محدودیت در طول خواندن است، بطوریکه رسیدن به بهره وری 100٪ از اختلاط پایه­ها و شکافتگی در هر چرخه دشوار است. هنگامی که سیستم راه اندازی شد، کیفیت بالای خواندن طول تنها 30-36 پایه را نمایان کرد[18، 20]، که به طور چشمگیری کمتر از طول خواندن ارائه شده توسط هر دو توالی sanger و pyrosequencing برای تعیین توالی موازی فشرده بود. در واقع، آن حتی کمتر از طول خواندن روش "plus-minus" که در سال 1975 بوسیله سنگر و کولسون توسعه داده شد بود[21]، اما یک افزایش چشمگیر در خروجی داده­های توالی این اشکال را جبران کرد. پیشرفت­های قابل توجهی در هر دو زمینه طول خواندن و توان عملیاتی از زمان معرفیش به دست آمده است، که SBS پایان­دهی رنگ برگشت پذیر را قادر می سازد تبدیل به موفقترین پلتفرم تعیین توالی موازی فشرده شود. طول خواندن کوتاه در ابتدا استفاده از آن در اپلیکیشن­های اسمبلی بزرگ de novo را ممنوع کرد، اما آن را برای توالی مجدد و اپلیکیشن­های شمارش داده ، به عنوان مثال توالی ترنسکریپتومیس، RNA-SEQ و تعیین توالی قطعات DNA که در فعل و انفعالات پروتئین DNA درگیر هستند، ChIP-Seq مناسب کرده است[18]. بهبود در طول خواندن و توسعه الگوریتم­های اسمبلی de novo، مانند SOAP de novo [22] در حال حاضر استفاده از SBS پایان دهی رنگ برگشت پذیر را در اسمبلی de novo ژنوم پستانداران بزرگ، به عنوان مثال، ژنوم پاندا را امکان پذیر کرده است[23]. به تازگی، ILLUMINA سیستم سریعHiseq 2500 خود را ارائه کرده است که قادر به تعیین توالی ژنوم انسان در 27 ساعت، و فعال کردن طول خواندن اطلاعات تا 150 پایه از طریق چرخه­های زمانی کوتاه­تر توالی است.

**3.3. توالی بوسیله زنجیره لیگاسیون**

در طبیعت، لیگازهای DNA آنزیم­های ضروری برای تعمیر شکاف­ها و شکستگی­های DNA هستند و در واکنش­های ترمیم و همانندسازی DNA نقش دارند [24]. در سال 2005، Church and Shendure نشان داند که واکنشی که آن­ها کاتالیز می­کنند می­تواند برای توالی قطعات DNA کوتاه ساکن بر روی دانه­های به دام افتاده در ژل پلی آکریل آمید در فرآیندی به نام توالی polony استفاده شود ]25]. (SOLiD(Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection سومین پلتفرم تجاری توالی موازی فشرده ، بر اساس یک نسخه پیچیده تر از این روش، در سال 2007 به بازار 2007 آمده است[26].

در ابتدا، پلتفرم SOLiD بسیاری از پایه­های پلتفرم ILLUMINA را به همراه داشت، اما ارتقاء های اخیر در مقابلchemistry Hiseq2000، را عملکرد این ابزار را به طور قابل توجهی بالاتر از SOLiD برده است با این حال، در مراحل آماده سازی کتابخانه، پلتفرم SOLiD شبیه تعیین توالی فشرده موازی با pyrosequencing است. تقویت کلونال با استفاده از امولسیون PCR پس از ایجاد یک کتابخانه adaptor-ligated به دست می­آید. دانه­های غنی شده سپس روی اسلاید شیشه ای بطور تصادفی ته نشین شده با یک اصلاح 3 پریم به اهداف معرفی شده که پوشش دهنده دانه­ها هستند متصل شدند. در توالی­های بعدی با chained لیگاسیون، الیگومرهای هشت نوکلئوتید، اکتامرها، به عنوان پروب تشخیص به جای تک نوکلئوتید استفاده می­شود. هر اکتامر شامل دو پایه شناخته شده در انتهای 3 پریم است که با سه نوکلئوتید دژنره و سه نوکلئوتید دیگر که می­تواند با هر هر نوکلئوتید دیگری هیبرید شود، به نام نوکلئوتید یونیورسال شناخته می­شود. چهار رنگ بطور طیفی مجزا به کار گرفته می­شوند، که هر کدام توسط چهار اکتامر حمل می­شوند و یک مجموعه پروب متشکل از 16 اکتامر، تمام ترکیبات ممکن دو پایه شناخته شده را پوشش می­دهند. رنگ به انتهای 5 پریم هر اکتامر متصل می­شود. برای شروع چرخه توالی اول، دانه­های پوشش دهنده DNA با یک پرایمر توالی ، 16 پروب اکتامر و لیگاز انکوبات می­شوند. فقط یک پروب کاملا هیبرید شده به پرایمر توالی توسط لیگاز خواهد پیوست. پروب ها دو پایه اول را رمزگشایی می­کنند ، و سپس بطور شیمیایی شکافته خواهند شد تا اخرین سه پایه 5 پریم حذف شوند. این چرخه از هیبریداسیون و لیگاسیون پروب، تصویربرداری فلورسنت و شکافت شیمیایی ده بار تکرار می­شود برای تحقیق در مورد تمام پایه­های پنجم. قطعات ایجاد شده سپس از دانه­ها تهی می­شوند و یک دور لیگاسیون دوم با استفاده از توالی پرایمر انیلینگ یک پایه بالادست از قبلی انجام می­شود. از این رو، هر پایه به دو رنگ فراخوانی مرتبط است. به تدریج تغییر موقعیت پرایمر توالی و تکرار بستن دور لیگاسیون با استفاده از ده چرخه در هر بار منجر به فراخوانی رنگ می­شود، که می­تواند برای به دست آوردن یک دنباله خطی در فضای رنگ رمزگشایی شود. ترجمه از فضای رنگ به یک توالی نوکلئوتیدی عادی با بیشترین دقت بوسیله همترازی خوانش فضای رنگ به یک ژنوم مرجع فضای رنگ انجام می­شود. به عنوان یک نتیجه از همترازی فضای رنگ، اشتباهات می­تواند بطور موثری اصلاح شود از آنجایی که تنها ترکیبات رنگی خاصی مجاز است، تسهیل تمایز بین جانشینی نوکلئوتید، نمایانگر یک تغییر دو رنگه در نوکلئوتیدهای مجاور و اشتباهات توالی است [26-28]. رایج­ترین خطاها در تعیین توالی با زنجیره لیگاسیون قابل تعویض هستند [18].

Life Technologies به تازگی یک جایگزین برای مرحله پرزحمت اماده سازی کتابخانه امولسیون با یک تکنیک به نام wildfire ارائه کرده است که شبیه تقویت پل در پلت فرم ILLUMINA است که وعده کاهش زمان اماده سازی کتابخانه زمان آماده سازی و همچنین چگالی بالاتر روی سطح تراشه را می­دهد که توان عملیاتی بالاتر را ممکن می­سازد. سیستم SOLiD بهترین مورد برای پروژه­های تعیین توالی است که نیاز به نرخ خطای پایین [26]، تعیین توالی ترانسکریپتوم و شمارش برچسب­ها دارد، به عنوان مثال ChIP-Seq با توجه به طول خواندن کوتاهش، سیستم تصحیح خطا و خروجی انبوهی از داده ها [18] . رویکرد فضای رنگی بطور موثری خطاهای توالی را اشکار می­کند، اما ثابت شده است تجزیه و تحلیل داده­های پایین دستی دست و پا گیر است که منجر به توسعه چند ابزار اپن سورس مرتبط شده است [29]. با این حال، بهره برداری از واکنش لیگاسیون در توالی بدون استفاده از رویکرد فضای رنگی ممکن است .

**3.4. توالی با استفاده از لیگاسیون حذف زنجیره**

در سال 2010، Complete Genomics Inc یک مقاله چاپ کرد و قابلیتهایش در تعیین توالی کامل ژنوم انسان با استفاده از متد تعیین توالی با استفاده از روش به اشتراک گذاری چندین ویژگی با توالی polony را نشان داد[25، 30]. به جای فروش ابزارهای تعیین توالی، که تاکنون مدل کسب و کار غالب بوده است، شرکت خدمات برون سپاری برای تعیین توالی DNA انسان شامل آماده سازی کتابخانه، تعیین توالی و تجزیه و تحلیل عمومی را فراهم می­کند.

Complete Genomics تعیین توالی لیگاسیون حذف زنجیره را با استفاده از فن­آوری ترکیبی خود probe-anchor ligation (cPAL) انجام می­دهد. DNA برای تعیین توالی به 500 پایه خرد می­شود و چهار آداپتور به هر بخش از ژنومیک از طریق برش­های مکرر با آنزیم­های محدود و لیگاسیون درون مولکولی فرستاده می­شود. چرخه­های منتجه پس از آن در محلول به رول­های تک رشته­ای DNA تقویت می­شوند[31]، که نانوتوپ­های DNA نامیده می­شود، که متتشکل از نسخه­های مکرر چرخه­های اصلی است. نانوتوپ­های DNA سپس به طور تصادفی به نقاط دستور داده شده بر روی یک سطح مسطح متصل می­شوند. هر نقطه به اندازه کافی کوچک فقط شامل یک نانوتوپ DNA است. رویکرد Complete Genomics در تعیین توالی با لیگاسیون حذف زنجیره از یک پروب لنگری برای پیدا کردن موقعیت آداپتورها و پروب تشخیص شامل نه پایه (nonamers) و چهار رنگ استفاده می­کند. پروب لنگری و پروب تشخیص توسط هیبریداسیون و لیگاسیون متصل شده­اند تا یک پایه هر چرخه را رمزگشایی کنند. نانوتوپ­ها می­توانند رمزگشایی شوند، یک نوکلئوتید در هر لحظه، در هر دو طرف موقعیت آداپتور. به طور خلاصه، یک الیگونوکلئوتید لنگری با یکی از چهار آداپتور هیبرید می­شود، و چهار پروب، هر کدام حامل یک رنگ طیفی مجزا حمل می­کنند برای تحقیق از یک موقعیت پایه مجاور به آداپتور استفاده می­شود. رنگ به یک پایه شناخته شده در یک وضعیت خاص در پروب نونامر متصل می­شود در حالی که بقیه موقعیت­ها توسط نوکلئوتیدهای دژنره پر شده است. تغییر موقعیت پایه شناخته شده در پروب موقعیت­های 1-5 در الگوی DNA اجازه می­دهد تا در مجاورت آداپتور خوانده شوند. ایجاد یک پروب لنگری بسط یافته با لیگاسیون دو پروب لنگری اجازه می­دهد تا رمزگشایی از مواضع 6-10 مجاور آداپتور انجام شود. مجموعه لنگر- پروب پس از اشکارسازی فلورسنت هر هیبریداسیون و واکنش لیگاسیون تکمیل می­شود. این سیستم را بازنشانی می­کند. از این رو، هر فراخوانی پایه از زنجیره رها می­شود، در نتیجه کیفیت توالی بهبود می­یابد زیرا هر پایه رمزگشایی شده مستقل از کامل بودن چرخه­های قبلی است. کل پروسه سپس برای هر دو طرف هر سایت آداپتور تکرار می­شود، و در نتیجه 10-mers ها در خوانش 35 پایه-زوج- پایان ادغام می­شوند[30].

دلایلی که Complete Genomics در حال نگه داشتن پلتفرم توالی آنها در خانه هستند، حداقل بطور جزئی، مربوط به چالش قابل توجه نقشه برداری و مونتاژ ژنوم انسان بسیار تکراری با استفاده از خوانش 35-پایه-زوج- پایان کوتاه و نسبتا خواستار اماده سازی کتابخانه cPAL است. ILLUMINA به ابتکار Complete Genomics با تعیین توالی کامل ژنوم انسان به عنوان یک سرویس با استفاده از شیمی پایان دهی رنگ بازگشت پذیر پاسخ داده است. آن باقی می­ماند تا دیده شود ایا بیشترین تعیین توالی در بیمارستان­ها و مراکز تعیین توالی انجام خواهد شد، و یا به شرکت های تعیین توالی برون سپاری خواهد شد.

**SBS 3.5. حساس یونی**

تمام پلتفرم­های تعیین توالی موازی فشرده تاکنون از اشکارساز نوری برای کشف یک توالی DNA. استفاده می­کنند. تبادل تشخیص نوری با تشخیص الکتریکی به طور بالقوه چندین مزیت دارد چرا که این امر از نیاز به نوکلئوتید اصلاح شده، اپتیک گران و اکتساب وقت گیر و پردازش مقادیر زیادی از داده­های تصویر فلورسنت جلوگیری می­کند. از این رو، آن وعده تعیین توالی ارزان تر، کارآمدی فضایی و سرعت بیشتر را می­دهد. پورمند و همکارانش [32] یک روش SBS تشخیص الکتریکی در سال 2006 ارائه کردند، که نشان می­دهد که رویدادهای سنتز DNA را می­توان با استفاده از آشفتگی بار الکتریکی با استفاده از یک تقویت کننده ولتاژ جهشی، شناسایی کرد. در سال 2010، روتبرگ و همکارانش [33] یک پلتفرم ابتکاری تعیین توالی بر اساس کار پورمند و همکارانش [34]، از جریان یونی که متکی بر سیگنال­های الکتریکی به جای فلورسنت برای بدست آوردن اطلاعات توالی استفاده کردند.

این فرایند بسیار شبیه به ان چیزی است که قبل از آن توسط روتبرگ و همکاران برای تعیین توالی موازی فشرده با pyrosequencing توسعه یافته است. این شامل استفاده از همان مراحل آماده­سازی کتابخانه، با یک کتابخانه قطعه adaptor-ligated است، که بطور کلونال بر روی دانه­ها با استفاده از روش PCR امولسیون تقویت می­شود.یک پلیمراز DNA برای ترکیب نوکلئوتیدها روی یک الگوی DNA پرایم شده با یک جریان از پیش تعیین شده از نوکلئوتیدها استفاده می­شود. با این حال، تمرکز از PPI به دیگر محصول ترکیب نوکلئوتید، یون هیدروژن تغییر می­یابد. دانه­های غنی شده از امولسیون PCR در چاه­های کوچک روی تراشه یونی ته نشین می­شوند (هر یک مجهز به یک سنسور است که قادر به تشخیص پروتون آزاد است). همچنانکه پلیمراز DNA نوکلئوتید را به الگویDNA اضافه می­کند، یونهای هیدروژن ازاد می­شوند، و در نتیجه تغییر مکان پروتون ازاد است توسط سنسور تشخیص داده شده و به یک سیگنال الکتریکی تبدیل می­شود. تراشه یونی که مبتنی بر فنآوری است که به طور گسترده برای ساخت مدارهای مجتمع استفاده می شود ، تولید کم هزینه، و در مقیاس بزرگ را تسهیل می­کند و باید مقیاس پذیری عالی را اعطا کند. با این حال، به مانند تعیین توالی موازی فشرده با pyrosequencing ، نواحی homopolymeric منجر به افزایش حذف و الحاق، با توجه به پاسخ­ الکتریکی غیرخطی بر ترکیب بیش از پنج نوکلئوتید می­شود[33].

تعیین توالی ژنوم گوردون مور [33] نشان داد که ممکن است، اما شاید استفاده از سیستم جریان یونی برای تعیین مجدد توالی پستانداران بزرگ قابل توصیه نباشد. سیستم جریان یونی دارای یک زمان اجرای سریع 2 ساعته است اما هنگامی که راه اندازی شد از نظر توان عملیاتی و طول خوانده شده شبیه pyrosequencing برای تعیین توالی موازی فشرده بود. ان نظر می­رسد برای تعیین مجدد توالی de novo و تعیین توالی ژنوم باکتریایی و یا نواحی مورد هدف مناسب ژنوم موجودات پیچیده­تر مناسب باشد. شیوع اخیر تولید شیگا توکسین از باکتری اشرشیاکلی یک نمونه عالی از ارزش یک پلتفرم تعیین توالی با خروجی نسبتا کم ولی با زمان اجرای سریع توالی هنگام نظارت بر شیوع پاتوژن [35، 36] مهیا کرد. جانشین جریان یونی به نام پروتون یون شناخته می­شود، که برنامه ریزی شده تا در سال 2012 منتشر شود، و مبتنی بر همان شیمی سلف خود است اما انتظار می­رود که دارای حدود 60 برابر چاه بیشتر روی تراشه پروتون یونش باشد. این افزایش عظیم در توان باید تعیین توالی ژنوم یک انسان در عرض چند ساعت از توالی را ممکن کند.

**3.6. موضوعات جاری در تعیین توالی موازی فشرده**

روش­های تعیین توالی موازی فشرده از نظر بیوشیمی توالی کاملا متنوع هستند، اما آن­ها بسیاری از ویژگی­های مشترک را به اشتراک می­گذارند. مراحل آماده سازی کتابخانه­شان با تکه تکه شدن تصادفی DNA که با لیگاسیون آداپتورهای پلتفرم خاص در پایان هر قطعه آغاز می­شود. این آداپتورها سپس در تکثیر قطعه بر روی یک سطح جامد توسط پلیمراز استفاده می­شود، به جز در تقویت cPAL است، که در محلول انجام می­شود. محصولات تقویت بصورت فضایی در یک آرایه قبل از تعیین توالی خوشه بندی می­شوند. روند تعیین توالی خودش با سری­های خودکار هماهنگ بیوشیمیایی کنترل شده با انزیم و مراحل اکتساب داده با تصویربرداری فلورسنت انجام می­شود. تنها اجدیدترین سیستم، جریان یونی، بر اساس تغییرات مکانی پروتون ازاد، قادر به اشکارسازی الکتریکی است. همه این پلتفرم­ها همچنین قابلیت خواندن هر دو به پایان یک قطعه DNA را دارند که تعیین توالی paired-end نامیده می­شود. این ویژگی در حل نواحی تکراری در ژنوم وتعیین کیفیت ترانسکریپت ایزوفرم در RNA-SEQ سودمند است.

گام محدود کننده نرخ در روند تعیین توالی به طور سنتی واکنش تعیین توالی بوده است. با این حال، تغییر نسبت به پایان HGP اغاز شده است در حالیکه ظرفیت ابزارهای تعیین توالی شروع به تجاوز از نرخی کرده است که در آن نمونه­های جدید برای تعیین توالی می­تواند اماده شود. ابزارهای فعلی تعیین توالی چندین برابر بیشتر داده نسبت به توالی سانگر معمولی تولیذ می­کنند، که مراحل محدود کننده سرعت را به آماده سازی کتابخانه و تجزیه و تحلیل داده ها شیفت می­دهد. چالش، حفظ روند آماده سازی نمونه، واکنش تعیین توالی و تجزیه و تحلیل داده­های متعادل شده است. از این رو، اتوماسیون آماده سازی کتابخانه و مراحل کنترل کیفیت نقش حیاتی در حفظ سرعت با افزایش قدرت عملیاتی تعیین توالی ایفا می­کند. طول­های خواندن عموما کوتاه همراه مقدار زیادی از داده­هایی که باید تجزیه و تحلیل شوند و دقت خام کاهش یافته، در مقایسه با توالی سانگر، چالش­های بسیاری در تجزیه و تحلیل داده های پایین دستی [18]معرفی کرده است. با این حال، توسعه الگوریتم­های جدید متناسب با انواع جدیدی از داده­های تولید شده و استفاده از خوشه­های ابر رایانه برای تجزیه و تحلیل داده­ها برخی از این چالش­ها را کاهش داده است.

**4. تعیین توالی موازی فشرده – تعیین توالی تک مولکولی**

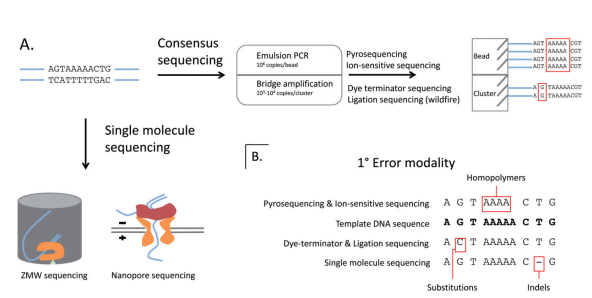
تغیین توالی اجماع موازی فشرده به تکنولوژی غالب در تعیین توالی تبدیل شده است، اما روش­های دیگر که از تقویت الگوهای پیشین DNA برای تعیین توالی پرهیز می­کنند ظهور کرده­اند. هدف از این فنآوری­ها تعیین توالی با تک مولکول DNA و ترجیحا در بصورت بلادرنگ است. مزایای بالقوه استفاده از تعیین توالی تک مولکولی عبارتند از: مقادیر حداقل DNA ورودی مورد نیاز؛ حذف بایاس تقویت؛ سنتز اسنکرون؛ زمان چرخش سریع؛ و ظرفیت بررسی ویژگی­های تک مولکول­های DNA است. یک مقایسه از تعیین توالی اجماعی و تعیین توالی تک مولکولی، و همچنین رایج ترین اشتباهات برای هر یک از تکنولوژی­های تعیین توالی در شکل 2 نشان داده شده است.

**SBS 4.1. ترمیناتور تک رنگ برگشت پذیر**

Helicos Biosciences اولین تعیین توالی تک مولکولی DNA را در سال 2008 به نام سیستم Helicos معرفی کرد[37]. این سیستم از نوکلئوتیدهای پایان دهی زنجیره برگشت پذیر لیبل گذاری شده در یک رویکرد SBS با DNA بیحرکت بر روی یک سطح مسطح استفاده می­کند[38، 39]. از این رو، بسیاری از ویژگی­ها را با توالی اجماعی موازی فشرده در برپایی، بیوشیمی، توالی زمان اجرا و توان به اشتراک می­گذارد. آن در اولین توالی تک مولکولی ژنوم انسان در سال 2009 استفاده شد[40] و می­تواند برای تقویت توالی RNA استفاده شود[41]. با این حال، پلتفرم از سال 2008 است در بازار بوده است و به نظر می­رسد در حال مبارزه در رقابتی شدید است. دلایلش احتمالا در نرخ خطای خواندن خام بالای آن (> 5٪) و طول کوتاه خواندن (~ 32 پایه) است[42].

**4.2. تعیین توالی موجبر حالت صفر با پلیمراز تثبیت شده**

Pacific Biosciences اولین پلتفرم توالی SBS تک مولکولی بلادرنگ را در یک مقاله در Science در سال 2009 ارائه کرد. پلتفرم شامل چندین ویژگی ابتکاری جالب ، از جمله تثبیت پلیمراز DNA به جای DNA، مونیتورینگ بلادرنگ روند سنتز و طول خواندن بالقوه چند هزار پایه­ای DNA بود [43]. تقریبا 100 زپتو لیتری فراهم می­کند که کاهش نویز پس زمینه، موازی سازی، و مونیتورینگ پلیمریزاسیون DNA تک مولکولی را امکان پذیر می­کند. قالب DNA مجاز به انتشار در ZMV در حضور پرایمر و نوکلئوتیدها با برچسب­های فلورسنت متصل به زنجیره فسفات است. پلیمراز DNA روی قالب DNA چفت می­شود و شروع به ترکیب نوکلئوتیدهای مجزای برچسب گذاری شده می­کند. تعیین توالی DNA با ثبت هر رویداد ترکیب نوکلئوتیدی دیکته شده توسط قالب دی ان ای انجام می­شود. نوکلئوتیدهایی که در حال ترکیب هستند نسبت به نوکلئوتیدهایی که آزادانه انتشار می­یابند برای مدت طولانی­تری در حجم ردیابی نوری باقی می­مانند، که جداسازی نویز پس زمینه تولید شده توسط غلظت بالای نوکلئوتیدهای برچسب­گذاری شده از رویدادهای ترکیب نوکلئوتیدهای واقعی را تسهیل می­کند. برچسب متصل به زنجیره فسفات در طول فرایند طویل سازی جدا می­شود. پلیمرازها به صورت تصادفی در میان ZMW ها بی­حرکت می­شوند­، که منجر می­شود تنها یک سوم از آن­ها توسط تک پلیمراز اشغال شوند. بقیه ZMW ها یا خالی و یا حاوی دو یا چند پلیمراز هستند، که به طور چشمگیری ظرفیت بالقوه آرایه ZMW را کاهش می­دهد. توالی SMRT نرخ نرخ خطای بالایی دارد، عمدتا به دلیل شکست در شناسایی تمام پیوستگی­های منجر به جهش‌های رخنه‌ای یا حذفی است [42, 43].



شکل 2. (A) مقایسه تعداد مولکول­های DNA مورد نیاز برای تولید یک پاسخ پایه در تعیین توالی اجماعی و تعیین توالی تک مولکولی. (B) شایع­ترین نوع اشتباهات در تکنولوژی تعیین توالی.

توالی SMRT دارای چندین ویژگی جالب است که می­تواند مورد سوء استفاده قرار گیرد. یک قالب دایره می­تواند مورد استفاده قرار گیرد، که دستیابی به یک توالی اجماعی با کیفیت بالا را با اجازه دادن به پلیمراز برای گذرهای متعدد در امتداد قالب DNA یکسان ممکن می­سازد [45]. طول خواندن فیزیکی می­تواند با خاموش کردن لیزر مورد استفاده برای درخشان کردن ZMW ها در فواصل از پیش تعیین شده گسترش یابد، که subreads هایی از بخش­های یکسان از ژنومیک در فرآیندی به نام توالی strobe تولید می­کند[46]. یکی از ویژگی­های واقعا جدید قابلیت ضبط اطلاعات جنبشی با مشاهده فعالیت یک آنزیم غیرفعال بصورت بلادرنگ است. این، ردیابی تغییرات شیمیایی در پایه­ها مانند متیلاسیون [47]، و مشاهده سینتیک ترجمه با استفاده از tRNA های برچسب گذاری شده و بیحرکت سازی ریبوزوم به جای پلیمراز در ZMW را ممکن می­سازد [48]. رویکرد تعیین توالی SMRT دارای پتانسیل بسیار زیادی با ویژگی­های منحصر به فرد و اجرای واکنش تعیین توالی سریعی دارد، اما از نرخ خطای خام بیش از 10٪ رنج می­برد، که عمدتا به دلیل  جهش‌های رخنه‌ای یا حذفی ، و خروجی نسبتا کم است که مانع استفاده از آن در بسیاری از کاربردها می­شود. توالی تک مولکولی بلادرنگ (SMRT) متکی بر فرایند تثبیت پلیمرازDNA از طریق یک ارتباط بیوتین- استرپتاویدین در پایین یک نانوساختار است که موجبر حالت صفر (ZMW) نامیده می­شود[44]. این ساختار مهم است، زیرا یک فضای مشاهدات نوری محدود

**4.3. تعیین توالی نانوحفره**

در سال 1996، دیمر و همکاران نشان دادند که تک رشته DNA (1.1-1.3 نانومتر؛ [49]) و یا مولکول­های RNA می­تواند از طریق یک کانال یونی در یک لایه دوتایی لیپیدی توسط میدان الکتریکی تحریک شود[50]. این مقاله استناد شده قبلا اصول اساسی روش تعیین توالی نانوحفره را تعیین کرده است. برای تعیین توالی، DNA با مونیتورینگ یک جریان الکتریکی همچنانکه DNA از طریق یک نانوحفره (یک کانال با قطر 1-10 نانومتر) که در یک غشا عبور می­کرد رمزگشایی می­شد، که می توانست به صورت nanofabricated باشد یا توسط یک پروتئین مهندسی شده ایجاد شود. تعیین توالی نانوحفره به طور بالقوه می­تواند آماده سازی نمونه حداقلی، بازخوانی الکتریکی یا فلورسنت و خواندن طول چند هزار پایه­ای از مولکول­های تکی DNA بصورت بلادرنگ را پیشنهاد دهد[42، 51].

قبل از اینکه تعیین توالی با نانوحفره­ها بتواند به طور کامل استفاده قرار گیرد، چندین مشکل باید حل شود. نانوحفره­ها بیش از حد طولانی هستند تا تفکیک تک پایه­ای ارائه کنند همچنانکه چند نوکلئوتید در منفذ، در هر تغییری در جریان الکتریکی شرکت می­کنند. علاوه بر این، سرعت بالای انتقال DNA از طریق نانوحفره­ها اندازه گیری­های الکتریکی را مشکل می­کند، که تفسیر سیگنال شناسایی نوکلئوتید را دشوار می­کند[42]. با این حال، راه حل­هایی برای این مشکلات ارائه شده است. آی بی ام در حال توسعه یک ماتریس نانو حفره است ، که شبیه ترانزیستوری با لایه­های متناوب از فلز و ماده دی الکتریک است. شبیه سازی نشان می­دهد که تعدیل جریان در این "ترانزیستور" می­تواند سرعت انتقال DNA را کنترل کند[52]. با این حال، نیاز است این اثر بطور تجربی تایید شود و یک دستگاه پتانسیل هنوز برای دستیابی به وضوح تک پایه­ای نیاز است [42،52]. Genia یک شرکت تعیین توالی نانوحفره با استفاده از لایه دوگانه لیپیدی با تک نانوحفره متصل به سنسور روی یک مدار مجتمع است. هدف آنها رسیدن به یک تراشه حاوی حدودا 1 میلیون از چنین سنسورهایی برای راه اندازی تجاری سیستمشان است که برای سال 2013 برنامه ریزی شده است. با این حال، هیچ گزارشی از غیر فروشندگان وجود ندارد که سیستم GENIA را آزمایش کرده باشند. یکی دیگر از بازیگران تجاری که برای رسیدن به تعیین توالی نانوحفره تلاش می­کند Oxford Nanopore Technologiesاست. آنها در حال حاضر دو استراتژی برای تعیین توالی DNA دارند: تعیین توالی رشته­ای و اگزونوکلئاز. توالی اگزونوکلئاز یک α همولیزین اصلاح شده با یک اگزونوکلئاز متصل است، که در داخل یک غشاء سینتتیک با مقاومت بالا الکترونیکی واقع شده است. اگزونوکلئاز تک نوکلئوتید را می­شکافد و آنها را در میان منافذ تغذیه می­کند. هر تک نوکلئوتید می­تواند از طریق سیگنال الکتریکی متمایزی تشخیص داده شود همچنانکه آنها بطور گذرا به مولکول سیکلودکسترین در هنگام عبور از میان منافذ متصل می­شوند[53]. تعیین توالی رشته­ای متکی بر پلیمراز است که (یا دیگر آنزیم اصلاح DNA) DNA تک رشته­ای را در داخل منافذ تغذیه می­کند و سیگنال الکتریکی از سه را ردیابی می­کند، برای مثال، پایه­هایی که با یک منطقه خاص از منفذ پروتئین تعامل دارند.

به تازگی، Oxford Nanopore Technologies توانایی خود برای تعیین توالی کل 48000 پایه ژنوم لامبدا روی هر دو رشته سنس و آنتی­سنس با استفاده از روش تعیین توالی رشته­ای را اعلان کرد. تجاری سازی شیمی nanopore-based sensing بر روی یک پلتفرم با پایه الکترونیک، GridION، و ابزارهای قابل حمل یکبار مصرف برای سنجش الکترونیکی تک مولکول، Min-ION ، برای 2012 برنامه ریزی شده است. Oxford Nanopore Technologies ادعای دقت رقابتی و طول خواندن فوق العاده طولانی داده­های تک مولکولی را دارد، که ژنوم کامل انسان را در 15 دقیقه با استفاده از GridIONs های متعدد ارائه خواهد کرد. خیلی زود است بگوییم که آیا Oxford Nanopore Technologies می­تواند به طور کامل بر روی این وعده بماند و آزمون اسید برای تکنیک تعیین توالی ارزیابی از ازمونگر اولیه خواهد بود. با این حال، اگر وعده دقت رقابتی و خواندن فوق العاده طولانی صادق باشد است باعث تغییر دیگر پارادایم­ها در زمینه تعیین توالی می­شود.

**5. چشم انداز آینده**

تکنولوژی­های تعیین توالی پیشرفت­های سریعی در سال­های اخیر داشته­اند و هیچ نشانه­ای از کاهش پیشرفت وجود ندارد. این مساله عدم تعادلی بین تعیین توالی برای هرse و دیگر روش­های درگیر، در هر دو مراحل بالادستی و پایین دستی، به عنوان مثال آماده سازی نمونه و تجزیه و تحلیل داده­ها و ذخیره­سازی ایجاد کرده است. بارکدگذاری نمونه­ها به همراه اتوماسیون مراحل پیش از تعیین توالی پتانسیل این را دارد که در بسیاری از مسائل مربوط به فرآیند بالادستی استفاده شود. چالش واقعی در مراحل پایین دستی تجزیه و تحلیل داده­های توالی،حمل و ذخیره­سازی است. ذخیره سازی طولانی مدت داده­های توالی و تجزیه و تحلیل­های بعدی دست و پا گیر و گران است، بنابراین، در آینده، ممکن است تجدید تعیین توالی نمونه­ها ارزان­تر و آسان­تر باشد چنانچه اطلاعاتی مورد نیاز باشد. البته، چالش­های متعددی وجود دارد که در واکنش­های تعیین توالی واقعی باقی می­ماند. دو تا از ضروری­ترین موارد، طول خواندن و کیفیت خواندن دنباله است که وضوح تکرارهای مرسوم و نواحی تکثیر شده را ممکن می­سازد. در حال حاضر، پلتفرم­های تعیین توالی موازی فشرده و تک مولکولی مکمل هستند، و هیچ تکنولوژی بتنهایی برای تمام کاربردها بهترین گزینه نیست. بنابراین باید دید کدام تکنولوژی منجر به تغییر اتی در پارادایم تعیین توالی خواهد شد.

توالی به طور سنتی برای مراکز تحقیقاتی بزرگ با بودجه بسیار خوب محفوظ است، اما هزینه برای هر پایه توالی در طول پایان HGP شروع به کاهش کرده است. سرعت کاهش هزینه­ها حتی با راه­اندازی و متعاقب آن تکامل ابزارهای تعیین توالی موازی فشرده بنظر می­رسد در سال­های اخیر بیشتر شتاب گرفته است.

دموکراتیزه کردن تعیین توالی از افزایش مداوم و قابل ملاحظه تعداد کاربردها و تحلیل­هایی که شامل داده­های توالی است مشهود است. امروزه تعیین توالی در عرصه­های گوناگون، مانند پزشکی قانونی، کشاورزی، تولید سوخت­های زیستی، دیرین­شناسی، اهلی، و داروسازی کاربرد دارد. این انقلاب در حال وقوع وعده آوردن تعیین توالی به تقریبا هر جنبه­ای از زندگی را می­دهد.

**References**

[1] Maxam, A. M., Gilbert, W., A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977, 74, 560–564.

[2] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., DNA sequencing with chainterminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977, 74, 5463– 5467.

[3] Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P. et al., Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. Nature 1986, 321, 674–679.

[4] Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W. et al., A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. Science 1987, 238, 336–341.

[5] Cohen, A. S., Najarian, D. R., Paulus, A., Guttman, A. et al., Rapid separation and purification of oligonucleotides by high-performance capillary gel electrophoresis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 9660–9663.

[6] Luckey, J. A., Drossman, H., Kostichka, A. J., Mead, D. A. et al., High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis. Nucleic Acids Res. 1990, 18, 4417–4421.

[7] Karger, B. L., Guttman, A., DNA sequencing by CE. Electrophoresis 2009, 30 Suppl 1, S196–202.

[8] Melamede, R. J., Automatable process for sequencing nucleotide. US Patent 4863849, 1985.

[9] Nyren, P., The history of pyrosequencing. Methods Mol. Biol. 2007, 373, 1–14.

[10] Ronaghi, M., Uhlen, M., Nyren, P., A sequencing method based on real-time pyrophosphate. Science 1998, 281, 363–365.

[11] Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S. et al., Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 2005, 437, 376–380.

[12] Rothberg, J. M., Leamon, J. H., The development and impact of 454 sequencing. Nat. Biotechnol. 2008, 26, 1117–1124.

[13] Wheeler, D. A., Srinivasan, M., Egholm, M., Shen, Y. et al., The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. Nature 2008, 452, 872–876.

[14] Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C. et al., Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001, 409, 860–921.

[15] Green, R. E., Krause, J., Briggs, A. W., Maricic, T. et al., A draft sequence of the Neandertal genome. Science 2010, 328, 710–722.

[16] Bennett, S. T., Barnes, C., Cox, A., Davies, L., Brown, C., Toward the $1000 human genome. Pharmacogenomics 2005, 6, 373–382.

[17] Balasubramanian, S., Bentley, D., Polynucleotide arrays and their use in sequencing. Patent WO 01/157248, 2001.

[18] Shendure, J., Ji, H., Next-generation DNA sequencing. Nat. Biotechnol. 2008, 26, 1135–1145.

[19] Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P. et al., Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature 2008, 456, 53–59.

[20] Bentley, D. R., Whole-genome re-sequencing. Curr. Opin. Genet. Dev. 2006, 16, 545–552.

[21] Sanger, F., Coulson, A. R., A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J. Mol. Biol. 1975, 94, 441–448.

[22] Li, R., Zhu, H., Ruan, J., Qian, W. et al., De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. Genome Res. 2010, 20, 265–272.

[23] Li, R., Fan, W., Tian, G., Zhu, H. et al., The sequence and de novo assembly of the giant panda genome. Nature 2010, 463, 311–317.

[24] Lehnman, I. R., DNA Ligase: Structure, mechanism, and function. Science 1974, 186, 790–797.

[25] Shendure, J., Porreca, G. J., Reppas, N. B., Lin, X. et al., Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. Science 2005, 309, 1728–1732.

[26] Metzker, M. L., Sequencing technologies – the next generation. Nat. Rev. Genet. 2010, 11, 31–46.

[27] McKernan, K. J., Peckham, H. E., Costa, G. L., McLaughlin, S. F. et al., Sequence and structural variation in a human genome uncovered by short-read, massively parallel ligation sequencing using two-base encoding. Genome Res. 2009, 19, 1527–1541.

[28] Valouev, A., Ichikawa, J., Tonthat, T., Stuart, J. et al., A high-resolution, nucleosome position map of C. elegans reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. Genome Res. 2008, 18, 1051–1063.

[29] Bao, S., Jiang, R., Kwan, W., Wang, B. et al., Evaluation of next-generation sequencing software in mapping and assembly. J. Hum. Genet. 2011, 56, 406–414.

[30] Drmanac, R., Sparks, A. B., Callow, M. J., Halpern, A. L. et al., Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. Science 2010, 327, 78–81.

[31] Fire, A., Xu, S. Q., Rolling replication of short DNA circles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92, 4641–4645.

[32] Pourmand, N., Karhanek, M., Persson, H. H. J., Webb, C. D. et al., Direct electrical detection of DNA synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103, 6466–6470.

[33] Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J. et al., An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature 475, 348–352.

[34] Toumazou, C., Premanode, B., Shepherd, L., Signal processing circuit comprising ion sensitive field effect transistor and method of monitoring a property of a fluid, DNA Electronics, US Patent 20080265985, 2008.

[35] Mellmann, A., Harmsen, D., Cummings, C. A., Zentz, E. B. et al., Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic Escherichia coli O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. PLoS ONE 2011, 6, e22751.

[36] Rohde, H., Qin, J., Cui, Y., Li, D. et al., Open-source genomic analysis of shiga-toxin-producing E. coli O104:H4. N. Engl. J. Med. 2011, 365, 718–724.

[37] Efcavitch, J. W., Thompson, J. F., Single-molecule DNA analysis. Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif) 2010, 3, 109–128.

[38] Harris, T. D., Buzby, P. R., Babcock, H., Beer, E. et al., Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. Science 2008, 320, 106–109.

[39] Bowers, J., Mitchell, J., Beer, E., Buzby, P. R. et al., Virtual terminator nucleotides for next-generation DNA sequencing. Nat. Methods 2009, 6, 593–595.

[40] Pushkarev, D., Neff, N. F., Quake, S. R., Single-molecule sequencing of an individual human genome. Nat. Biotechnol. 2009, 27, 847–850.

[41] Ozsolak, F., Platt, A. R., Jones, D. R., Reifenberger, J. G. et al., Direct RNA sequencing. Nature 2009, 461, 814–818.

[42] Schadt, E. E., Turner, S., Kasarskis, A., A window into third-generation sequencing. Hum. Mol. Genet. 2010, 19, R227–240.

[43] Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K. et al., Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. Science 2009, 323, 133–138.

[44] Korlach, J., Bjornson, K. P., Chaudhuri, B. P., Cicero, R. L. et al., Realtime DNA sequencing from single polymerase molecules. Methods Enzymol. 2010, 472, 431–455.

[45] Travers, K. J., Chin, C.-S., Rank, D. R., Eid, J. S., Turner, S. W., A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection. Nucleic Acids Res. 2010, 38, e159.

[46] Lo, C., Bashir, A., Bansal, V., Bafna, V., Strobe sequence design for haplotype assembly. BMC Bioinformatics 2011, 12, S24.

[47] Flusberg, B. A., Webster, D. R., Lee, J. H., Travers, K. J. et al., Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. Nat. Methods 2010, 7, 461–465.

[48] Uemura, S., Aitken, C. E., Korlach, J., Flusberg, B. A. et al., Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution. Nature 2010, 464, 1012–1017.

[49] Mandelkern, M., Elias, J. G., Eden, D., Crothers, D. M., The dimensions of DNA in solution. J. Mol. Biol. 1981, 152, 153–161.

[50] Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D., Deamer, D. W., Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93, 13770–13773.

[51] Branton, D., Deamer, D. W., Marziali, A., Bayley, H. et al., The potential and challenges of nanopore sequencing. Nat. Biotechnol. 2008, 26, 1146–1153.

[52] Luan, B., Peng, H., Polonsky, S., Rossnagel, S. et al., Base-by-base ratcheting of single stranded DNA through a solid-state nanopore. Phys. Rev. Lett. 2010, 104, 238103.

[53] Clarke, J., Wu, H.-C., Jayasinghe, L., Patel, A. et al., Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. Nat. Nanotechnol. 2009, 4, 265–270.