



Evaluation and Comparison of New Methods in HLA Typing

ARTICLE INFO

Article Type

Anatol Review

Authors

Ghafari N.¹ MSc,
Raesi M.¹ MSc,
Guity K.¹ MSc,
Daneshpour M.^{*1} PhD

How to cite this article

Ghafari N, Raesi M, Guity K, Daneshpour M. Evaluation and Comparison of New Methods in HLA Typing. Pathobiology Research. 2020;23(2):75-84.

ABSTRACT

The human leukocyte antigen (HLA) system has unique genetic and biochemical complexes, so it is important to determine the type of HLA in a clinical and laboratory process. In addition, to its application to assess the risk of various diseases, it also plays a vital role in organ transplants. The determination of HLA in patients requiring transplantation, in addition to the accuracy, also requires the speed of action. So that any delay and error in this work can endanger the patient's life. The need for a precise definition of the HLA type, along with improved speed and cost reduction, has led to the introduction of several methods for this test. Today, the introduction of a new generation of revolutionary sequencing has been carried out in genetic assessments. The HLA determination also uses this technique, and a variety of methods have been introduced for genetic HLA examination using a new generation of sequencing. In the present study, along with the review of traditional methods in HLA diagnosis, two of the most widely used techniques based on a new generation of sequencing methods, Thermal Sequencing method and Illumina Miseq method were evaluated.

Keywords Major Histocompatibility System (MHC); Human Leukocyte Antigen (HLA); Next Generation of Sequencing; Illumina Miseq; Thermal Sequence Detection

CITATION LINKS

[1] Association of HLA class I and II genes ... [2] Genetic and functional relationships ... [3] Genome-wide association studies ... [4] The HLA genomic loci map: expression ... [5] HIBAG-HLA genotype imputation ... [6] Nomenclature for factors of the HLA ... [7] IMGT/HLA ... [8] Relative predispositional effects ... [9] Genetics of ankylosing spondylitis ... [10] QUESTION 2: Is HLA typing for coeliac ... [11] Association of HLA-G 3'Untranslated region ... [12] Genetic heterogeneity within the ... [13] The amino acid variation within the ... [14] Narcolepsy-associated HLA class I alleles ... [15] Phenome-wide association study ... [16] Haplotype analysis of Apo AI-CIII-AIV ... [17] Haplotype frequency distribution for ... [18] Allele frequency distribution data for ... [19] The challenges, advantages and future ... [20] HLA haplotype mismatch transplants ... [21] Transplantation for severe combined ... [22] Revolution of DNA sequencing method from ... [23] 8q24. 3 and 11q25 chromosomal loci association ... [24] How to select the best available related ... [25] Advances in DNA sequencing ... [26] Frequencies of HLA-A, HLA-B, HLA-DR ... [27] Molecular analysis of HLA allele frequencies ... [28] HLA A* 02 allele frequencies and ... [29] Shedding a new light on the HLA ... [30] HLA DNA typing: Past, present ... [31] Histocompatibility typing-Mac is back ... [32] Analysis of enzymatically amplified β ... [33] HLA-DR typing by PCR amplification ... [34] Definitions of histocompatibility ... [35] HLA class I sequence-based ... [36] HLA haplotype mismatch transplants ... [37] Genotype and SNP calling from next ... [38] Clinical validation of NGS technology ... [39] Human leukocyte antigen typing: ... [40] Comparison of next-generation sequencing ... [41] 16th IHIW: Review of HLA typing by ... [42] Individual variation in the germline Ig ... [43] Comprehensive assessment of T-cell ... [44] Performance of Illumina Next Generation ... [45] Low-abundance drug-resistant viral variants ... [46] Prevalence and clinical significance ... [47] Next-generation sequencing technology reveals ... [48] High-resolution, high-throughput HLA genotyping ... [49] Rapid high-throughput human leukocyte ... [50] Rapid, scalable and highly automated HLA genotyping ... [51] A multi-site study using high-resolution HLA ... [52] A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode ... [53] Comparative analysis of human gut microbiota ... [54] High throughput HLA genotyping using 454 sequencing ...

¹Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Yaman Street, Velenjak, Tehran, Iran. Postal Code: 1985717413. Phone: +98 (21) 22432569 Fax: +98 (21) 22416264 daneshpour1388@gmail.com

Article History

Received: May 20, 2018
Accepted: June 17, 2020
ePublished: July 20, 2020

ارزیابی و مقایسه روش‌های نوین در تعیین سیستم سازگاری نسجی انسان

نسیم غفاری MSc

مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی غدد، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

مرضیه رئیس MSc

مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی غدد، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

کامران گیتی MSc

مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی غدد، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

مریم‌السادات دانشپور PhD

مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی غدد، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سیستم سازگاری نسجی انسان از نظر ژنتیکی و بروز بیوشیمیایی پیچیدگی‌های منحصربه‌فردی دارد که تعیین نوع آن را از منظر بالینی و آزمایشگاهی بسیار حائز اهمیت می‌کند. مهم‌ترین و شناخته‌شده‌ترین وظایف این سیستم مربوط به نقش حیاتی آن در پیوند اعضا است و علاوه بر آن نقش مهمی را در ارزیابی ریسک ابتلا به بیماری‌ها دارد. دقت و صحت دو مولفه حیاتی در تعیین آزمایشگاهی هاپلوتیپ‌های *HLA* در بیماران نیازمند پیوند است، به‌طوری که هر گونه تاخیر و خطا در این کار می‌تواند حیات بیمار را به خطر اندازد. نیاز به تعیین دقیق نوع *HLA* در کنار بهبود سرعت عمل و کاهش هزینه‌های انجام این ارزیابی سبب شده است تا روش‌های متعددی برای انجام این آزمایش معرفی شود. امروزه با معرفی نسل جدید تعیین توالی انقلابی در ارزیابی‌های ژنتیکی صورت گرفته است. تعیین هاپلوتیپ‌های *HLA* نیز از این تکنیک بهره‌مند است، به‌طوری که امروزه روش‌های متنوعی برای بررسی ژنتیکی *HLA* به کمک نسل جدید تعیین توالی معرفی شده‌اند. در مطالعه حاضر در کنار مرور روش‌های پیشین در تشخیص *HLA*، دو مورد از پرکاربردترین تکنیک‌ها براساس نسل جدید تعیین توالی تحت عنوان روش تعیین توالی حرارتی و روش ایلومینا MISEQ مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند.

کلیدواژه‌ها: سیستم سازگاری نسجی انسان، آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی، نسل جدید تعیین توالی، ایلومینا MISEQ، تعیین توالی حرارتی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۲۸

*نویسنده مسئول: daneshpour1388@gmail.com

مقدمه

روی سلول‌های هسته‌دار بدن هر شخص، آنتی‌ژن‌های خاصی وجود دارد که در پاسخ‌های ایمنی نقش دارند. گروهی از این آنتی‌ژن‌ها، در بین افراد مختلف یک جامعه تفاوت‌های زیادی دارند و می‌توانند باعث شناسایی سلول‌های خودی از غیر خودی شوند. در صورت انتقال سلول، بافت یا ارگان از یک فرد به فرد دیگر، سیستم ایمنی فرد دریافت‌کننده با شناسایی این آنتی‌ژن‌ها متوجه حضور سلول‌های غیر خودی می‌شود، نسبت به آنها واکنش

نشان می‌دهد و سلول‌های غیر خودی را از بدن حذف می‌کند. به همین دلیل این آنتی‌ژن‌ها را در موجودات مختلف، آنتی‌ژن‌های اصلی بافتی و در انسان، آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی (*HLA*) می‌نامند. ژن‌های کدکننده *HLA*، با طول ۵ مگابافت باز روی بازوی کوتاه کروموزوم ۶ (۶p) انسان قرار دارند (شکل ۱). این منطقه یکی از متراکم‌ترین مناطق ژنی در ژنوم انسان به حساب می‌آید^[1, 2]، به‌طوری که علاوه بر کدکردن آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی، بیش از ۴۰۰ ژن مهم در فرآیند ایمنی بدن را نیز کد می‌کند و از این لحاظ نقش بسیار مهمی در سیستم ایمنی بدن دارد^[3]. همچنین این منطقه ژنی نقش مهمی در استعداد افراد در ابتلا به بیماری‌های مختلف، چگونگی پاسخ به عوارض جانبی داروها و همچنین موفقیت یا رد پیوند اعضا دارد^[4].

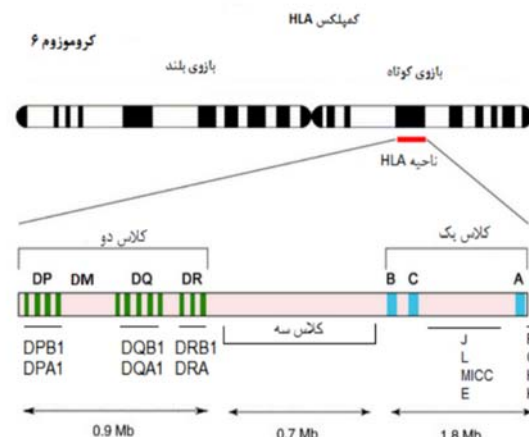
مولکول *HLA* در شناسایی انواع بسیاری از میکروب‌ها در سیستم ایمنی نقش دارد^[5]. ژن‌های *HLA* جزء گروه‌های ژنی هستند که در ژنوم انسان پلی‌مورفیسم‌های بسیار زیادی دارند، بنابراین قادر به ارایه طیف گسترده‌ای از پپتیدها هستند^[1]. *HLA* از سه گروه ژنی تشکیل شده است. ناحیه کلاس I شامل ژن‌های *HLA-A*، *HLA-B* و *HLA-C*، کلاسیک و *HLA-E*، *HLA-F* و *HLA-G* غیر کلاسیک است. ناحیه کلاس II شامل ژن‌های *HLA-DP*، *HLA-DQ* و *HLA-DR* کلاسیک و *HLA-DM* و *HLA-DO* غیر کلاسیک است. ناحیه کلاس III شامل ژن‌هایی برای اجزای کمپلمان است. هر کدام از این نواحی ژنی واجد تعداد بسیاری الل است. بیشترین گوناگونی *HLA* مربوط به انواع *A*، *B*، *C*، *DRB1* و *DQB1* است^[6, 7]. همراهی الل‌های خاصی از این ناحیه در استعداد ابتلا به انواع بیماری‌ها مشخص شده است. از این رو تعیین توالی الل‌های آنتی‌ژن لکوسیت کلاسیک انسانی یک ابزار حایز اهمیت در تجزیه و تحلیل بیماری‌ها است^[5]. توارث انواع الل‌های *HLA* با ژن بسیاری از بیماری‌ها و به‌خصوص بیماری‌های خودایمنی نظیر دیابت نوع I و اسپوندیلیت آنکیلوزان، بیماری سلیاک، لوپوس، میاستنی گراویس، سندرم شوگرن، حمله خواب و بسیاری دیگر در ارتباط است^[8-14]. بیش از ۱۶۰ فنوتیپ مربوط به بیماری‌های مختلف، از منطقه *HLA* واقع در کروموزوم ۶ با روش‌های GWAS نقشه‌برداری شده است. همچنین مطالعات جدید، رویکرد مطالعه گسترده فنوتیپی (GWAS) را به‌عنوان روشی جدید برای کشف بیماری‌های مرتبط با SNP، توصیف و اهمیت کراس- فنوتیپ ناحیه *HLA* در سلامت و بیماری انسان را تایید کرده است^[15-18]. بنابراین در این راستا، بررسی‌های متعددی بر روی واریانت‌های متنوع *HLA* انجام شده است^[19]. نیاز به تعیین دقیق نوع *HLA*، در کنار بهبود سرعت عمل و کاهش هزینه‌های انجام این ارزیابی سبب شده است تا روش‌های متعددی برای انجام این آزمایش معرفی شود. در مطالعه حاضر در کنار مرور روش‌های سنتی در تشخیص *HLA* تازه‌ترین روش‌های معرفی‌شده نیز ارزیابی خواهند شد.

یک اختلاف برای *HLA-A*، *B*، *C*، یا *DRB1* با افزایش خطر عوارض پس از پیوند همراه است. به نظر می‌رسد که عدم تطابق *HLA-DQB1* بهتر تحمل می‌شود و برخی از اختلافات *HLA-C* و *DRB1* به‌طور بالقوه کمتر ایمنونژن هستند. به احتمال زیاد تعیین توالی *HLA* توسط روش تعیین توالی نسل بعدی NGS با تغییر تطبیق الگوریتم و آرایه اطلاعات توالی کامل در تمام جایگاه‌های *HLA* بسیار کارآمد و سریع خواهد بود، به‌طوری که تمامی ال‌ها به‌طور همزمان قابل بررسی هستند [22, 23]. در جوامع اروپایی، یک اهداکننده همسان ۱۰/۱۰ می‌تواند برای حداقل ۵۰٪ بیماران پیدا شود و ۳۰-۲۰٪ بیماران دیگر ممکن است یک اهداکننده همسان ۹/۱۰ داشته باشند [24]. تعداد ال‌های شناخته‌شده برای *HLA* همچنان رو به افزایش است و این روند پیشرفت، حتی بیشتر از توان آزمایشگاه‌هایی است که انجام آزمایش سازگاری بافتی را با استفاده گسترده‌تر از روش تعیین توالی با بالا انجام می‌دهند [25]. انتخاب اهداکننده غیر خویشاوند نیازمند به صرف وقت زیاد برای شناخت و هزینه و برنامه‌ریزی در روند اهدا است. همچنین از آنجایی که در دستیابی به *HLA* کاملاً همسان بین دهنده و گیرنده محدودیت وجود دارد [6]، بنابراین توالی‌یابی *HLA* در جمعیت‌های گوناگون مانند عربستان، ایران و هند با دستیابی به انواع ال‌های ناشناخته، امری حیاتی به حساب می‌آید. به‌دلیل وجود تنوع الی تعیین نوع *HLA*، نیازمند تعیین توالی گسترده آنتی‌ژن با استفاده از روش‌های تعیین توالی‌یابی جدید است تا افزایش خطر تشخیص نادرست توسط تکنیک سروتایپینگ را کاهش دهد [26-28].

روش‌های سنتی در تعیین *HLA*

به‌طور کلی تست *HLA*-تایپینگ به چندین روش همچون روش‌های سرولوژیکی، روش فلوسیتومتریک، روش‌های مولکولی بر مبنای PCR (همچون SSP PCR، RFLP و غیره) انجام می‌گیرد. در گذشته تعیین توالی *HLA* با دو روش سرولوژی با استفاده از آنتی‌سرم و MLC انجام می‌شد و پس از آن روش‌های دقیق‌تر تایپینگ *HLA* مبتنی بر DNA (DNA-based HLA typing) با استفاده از تکنیک‌های مولکولی مانند SSP، SSOP، SBT و RSCA توسعه یافتند و در حال حاضر همچنان از آنها استفاده می‌شود [29]. روش‌های سنتی در تعیین *HLA* به شرح زیر هستند:

- ۱- تعیین *HLA* گیرنده و دهنده (*HLA*-تایپینگ): در این روش آل‌های *HLA* شناسایی و آزمایش به کمک روش‌های سرولوژیکی و یا مولکولی انجام و نوع DNA تعیین می‌شود.
- ۲- بررسی سطح آنتی‌بادی علیه *HLA* در فرد گیرنده پیوند: این آزمایش برای آگاهی از حضور آنتی‌بادی‌هایی که ممکن است علیه بافت پیوندشده واکنش نشان دهند، انجام می‌گیرد. این آنتی‌بادی‌ها ممکن است قبلاً در اثر مواجهه با آنتی‌ژن‌های غیر خودی ناشی از تزریق خون، حاملگی یا پیوند عضو ایجاد شده باشند. وجود چنین آنتی‌بادی‌هایی اهمیت بسیاری دارد. به علاوه



شکل ۱) موقعیت مکانی ژن‌های کلاسیک *ALH* بر روی کروموزوم ۶ انسانی

نقش تعیین *HLA* در پیوند اعضا

طی مرحله میوز، منطقه *HLA* دستخوش کراسینگ‌اور نمی‌شود (به‌جز در موارد نادر) و فرد یک هاپلوتایپ *HLA* از مادر و دیگری را از پدر به ارث می‌برد. اگر A/B و C/D چهار هاپلوتایپ والدین باشند، فرزندان می‌توانند A/C، B/C، A/D یا B/D باشند. بنابراین والد و فرزند با هم نیمه‌سازگار هستند، به این معنی که گیرنده و دهنده ژنتیکی، یک هاپلوتایپ *HLA* را به اشتراک می‌گذارند. البته والد و فرزند در هاپلوتایپ‌های دیگر ناسازگار هستند. تفاوت در این آنتی‌ژن‌های *HLA* در خویشاوندان نزدیک کمتر است. هر چه افراد قرابت ژنتیکی بیشتری با هم داشته باشند، این آنتی‌ژن‌ها در آنها به هم شبیه‌تر هستند. از این رو خویشاوندان، یک دهنده نیمه‌سازگار محسوب می‌شوند. پلی‌مورفیسم‌های *HLA* کلاسیک اصلی‌ترین مانع در پیوند سلول‌های بنیادی خونساز (HSCT) به حساب می‌آیند [18, 19]. بهترین شرایط برای پیوند، همسان‌بودن ژنتیکی *HLA* در خویشاوندان است. با این حال به‌دلیل آنکه ۷۰٪ بیماران نیاز به اهداکنندگان غیرخویشاوند با *HLA* همسان دارند، توجه به منبع جایگزین امری ضروری است [20]. یک دهنده پیوند بزرگسال مناسب غیرخویشاوند، کسی است که *HLA* همسان در سطح ال (*HLA-A*، *B*، *C*، *DRB1* و *C*) با فرد گیرنده داشته باشد [21].

در بحث آنتی‌ژن *HLA*، با درنظرگرفتن پنج جایگاه *HLA* (شامل *DRB1*، *A*، *B*، *C*، *DQB1*) یک دهنده نیمه‌سازگار باید حداقل نیمی از آنتی‌ژن‌های *HLA* را به اشتراک بگذارد [20]. درجه عدم تطبیق *HLA* میان پذیرنده و دهنده پیوند یک جز از الگوریتم تخصیص پیوند است. مولکول‌های غیر سازگار *HLA* منجر به پس‌زدن پیوند و بیماری پیوند بر علیه میزبان می‌شوند. بنابراین دو مشکل اصلی پیوند نیمه‌سازگار، واکنش ایمنولوژیک میزبان علیه پیوند HVG و دیگری پیوند علیه میزبان GVHD است [21].

بهترین استاندارد، تعیین توالی ال‌های لوکوس‌های *HLA-A*، *B*، *C*، *DRB1* و *DQB1* با وضوح بالا است (۱۰/۱۰ همسان). تنها

تا زمان پیداشدن اهداکننده مناسب، تست آنتی‌بادی‌ها باید همچنان تکرار شود، چراکه ممکن است آنتی‌بادی‌های جدید در بیمار ایجاد شوند. به علاوه پس از انجام پیوند نیز باید برای شناسایی آنتی‌بادی‌های جدید آزمایش تکرار شود.

۳- کراس‌مچ لنفوسیت‌ها: در این تست پس از انتخاب اهداکننده احتمالی، آزمایش بین خون گیرنده و لنفوسیت‌های دهنده انجام می‌شود. مشاهده واکنش و مثبت‌شدن نتیجه آزمایش نشان‌دهنده عدم سازگاری بین آن دو است.

۴- تعیین HLA توسط روش‌های مولکولی: این روش‌ها با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام می‌شود. به کمک این روش می‌توان از نمونه‌هایی با حجم کمتر استفاده کرد و در حداقل زمان ممکن و با ضریب خطایی به مراتب پایین‌تر به جواب صحیح رسید.

در یک دیدگاه کلی، پس از اینکه ژن HLA برای اولین بار از طریق کلون‌سازی مولکولی (کلون DNA مکمل مربوط به BHLA-) جدا شد، هزاران آلل شناسایی و اطلاعات مربوط به توالی تمام ال‌های شناخته‌شده در پایگاه اطلاعاتی HLA/IMGT ذخیره شد. این تنوع الی گسترده، توالی‌یابی HLA با وضوح بالا را به چالش کشیده است [30]. اولین تلاش‌ها در توالی‌یابی HLA، در سال ۱۹۸۷ شامل آنالیز RFLP بود. این رویکرد با محدودیت‌های بسیاری همراه بود و در بهترین حالت به‌عنوان جایگزینی برای توالی‌یابی سرولوژی محسوب می‌شود [31]. با توسعه PCR در سال ۱۹۸۵، تکثیر اگزون‌های پلی‌مورفیک ژن‌های کلاس I و کلاس II مربوط به HLA و همچنین تجزیه و تحلیل توالی‌ها با استفاده از پروب هیبرید توالی خاص الیگونوکلوئیدی (SSO) محقق شد. با این حال این روش برای توالی‌هایی با تنوع ژنتیکی بالا به‌دلیل نیاز آن به تعداد زیادی از پروب‌ها و واکنش هیبریداسیون جداگانه بسیار وقت‌گیر و پرهزینه بود [32]. وجود پروب‌های ساکن در غشاها و بعدها در بیدها به همراه مجموعه‌ای از پرایمرها برای SSP، منجر به ایجاد مجموعه‌ای برای شناخت توالی HLA شد که به‌طور کلی آنالیز ژل الکتروفورز برای ارزیابی محصولات خاص SSP PCR مورد استفاده قرار گرفت [33]. طبق معیارهای کنونی، تعیین توالی SSO و SSP هنوز هم دارای وضوح پایین در تعیین توالی HLA است [34]. یک رویکرد در توالی‌یابی با وضوح بالا، تکثیر و توالی‌یابی مستقیم (SBT) از اگزون مربوطه است. تا چند سال پیش، توالی‌یابی سانگر امکان توالی‌یابی با وضوح بالا را فراهم می‌کرد اما با همین روش بسیار قوی در بسیاری از موارد، تعیین توالی ژنوم یک مساله مبهم باقی می‌ماند [35]. امروزه نسل جدید تعیین توالی به‌عنوان روشی اقتصادی جایگزین روش توالی‌یابی سانگر در آزمایشگاه‌های تعیین توالی HLA شده است [36]. تعیین توالی با توان عملیاتی بالا (نسل جدید تعیین توالی) در مقایسه با روش‌های سنتی قادر به انجام تعداد زیادی از واکنش تعیین توالی کلونال به موازات یکدیگر است [37]. امروزه متد نسل جدید

تعیین توالی با کاهش ابهامات و هزینه‌ها و ارایه اطلاعات جزئی، بیشتر بر روی ژن HLA که قبلاً سکانس نشده است به‌عنوان متدی معتبر شناخته شده است. همچنین اعتبارسنجی بالینی نسل جدید تعیین توالی موضوع مورد بحث در بسیاری از آزمایشگاه‌ها است. توالی‌یابی مناطق جدیدی از ژن HLA نیازمند به‌کارگیری دانش ژنتیک در تعیین توالی دقیق HLA است [38]. توسعه فناوری‌های نسل جدید تعیین توالی نسبتاً سریع و پلتفرم‌های آن به‌سرعت در حال تغییر است [39]. در حال حاضر، سه سیستم عامل اصلی در این خصوص وجود دارند که سیستم Roche 454 که برای اولین بار برای تعیین توالی HLA معرفی شد [30]، سیستم ایلومینا که به‌طور گسترده به غیر از HLA برای کاربردهای non-HLA هم مورد استفاده قرار می‌گیرد [40] و سیستم Ion Torrent که از همه جدیدتر است [41].

بسیاری از روش‌های مولکولی که به‌طور گسترده در HLA- تایپینگ مورد استفاده قرار می‌گیرند در ایالات متحده براساس استانداردهای سازگاری بافتی و روش‌های ایمونوژنتیک مشخص و تعیین می‌شوند. این روش‌ها معمولاً به‌صورت یک روش تایپینگ براساس روش‌های مولکولی مبتنی بر استفاده از اسید نوکلئیک یا DNA هستند. اساساً این روش‌ها می‌توانند به روش هیبریداسیون الیگونوکلوئیدها با توالی ویژه و یا روش‌های آمپلی‌فیکاسیون اسیدنوکلئیک به‌صورت روش‌های پرایمینگ با توالی خاص و یا تایپینگ مبتنی بر توالی انجام شوند.

روش‌های HLA- تایپینگ و فرمت‌های مرتبط با آن و همچنین اختصارات مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

بدون شک در آینده تکنیک توالی‌یابی جدید اجازه خواهد داد که تعیین توالی اگزون‌های کلاس I مربوط به HLA و کلاس II مقرون به‌صرفه‌تر، سریع‌تر و البته به‌صورت خودکار انجام شود. در چند سال اخیر شکاف‌های اطلاعاتی در HLA/IMGT، مانند فقدان توالی اگزون یا اینترون برای تمام ال‌ها در لوکوس HLA کلاسیک تکمیل خواهد شد و به‌طور کلی انتظار می‌رود بتوان توالی‌های طولانی‌تر را با دقت بالاتر توالی‌یابی کرد [42، 43].

نتایج حاصل از نسل جدید تعیین توالی به‌صورت داده‌های با توان بسیار بالا هستند. روش‌های جدید شرایط دستیابی به حجم بالایی از داده‌ها را نسبت به نتایج حاصل از تعیین توالی با روش‌هایی همچون سانگر امکان‌پذیر می‌کند. پلتفرم‌های متنوعی از نسل جدید تعیین توالی برای HLA- تایپینگ وجود دارند که مهم‌ترین آنها شامل سیستم‌های Roche 454، ایلومینا و آنالیزکننده‌های ژنومی مثل Ion torrent، GMP، BI SOLDER هستند (جدول ۲). در همه این سیستم‌ها به‌جز Ion Torrent یک مجموعه از توالی‌های تکثیرشده به‌صورت منطقه‌ای از مولکول‌های الگوی اولیه به‌صورت polony مورد نیاز است تا نسبت سیگنال اصلی به نویز افزایش یابد، چراکه این سیستم‌ها چندان نسبت به ردیابی اضافه‌شدن یک جفت باز به مولکول DNA اولیه حساس نیستند.

جدول ۱) مقایسه تکنیک‌های تعیین نوع HLA بین آزمایشگاهی براساس قرارداد تایپینگ NMDP به‌طور گسترده که با استفاده از روش‌هایی چون SSP، SSOP و SBT در بسیاری از آزمایشگاه‌ها در حال انجام است.

روش بررسی	علامت اختصاری	مثالی از نحوه توالی‌یابی	مزایا و معایب
متد سرولوژی (شناسایی پروتئین HLA در سطح سلول با استفاده از آنتی‌ژن‌های اختصاصی سرم)			
توالی‌یابی گسترده آنتی‌ژن			مزایا: روش اولیه یا کمکی برای بررسی مولکولی، سریع و ارزان؛
توالی‌یابی بخشی از آنتی‌ژن	SERO	A24, A68	معایب: خطای بالا، نیازمند سلول زنده، اطلاعات تاییدکننده ناکافی، سخت، در حال حاضر روش استاندارد نیست.
روش های مبتنی بر ژنوم (شناسایی آلل‌های HLA در سطح ژنوم)			
شناسایی آلل در سطح خانوادگی (رزولوشن دو دیجیت)	DNA2	A*24:XX, A*68:XX	مزایا: روش اختصاصی؛ توالی‌سنجی با دقت بالا در مدت ۱۰ ساعت، سهولت انجام نمونه‌های متعدد در یک بار آزمایش؛
توالی‌یابی الیگونوکلوئید خاص (کدهای آللی)	SSO	A*24:AER, A*68:GM AER = 02/03/04/05 GM= 01/02/03/04/05	نیازمند کنترل در هر مرحله نیست؛ معایب: نیاز به دانستن توالی ال‌ها، دمای هیبریداسیون، احتمال نتیجه منفی کاذب در هیبریداسیون، فقدان دقت در توالی‌سنجی اللی
توالی‌یابی با روش تعیین سکانس	SBT	A*24:02,A*68:01 or A*24:03,A*68:01 or A*24:04,A*68:01	مزایا: دقت بالا؛ معایب: عدم توانایی در افتراق بین سیس و ترانس، محدود به آگزون‌های خاص
رزولوشن بالا (آلل‌های دقیق)	رزولوشن بالا	A*24:02,A*68:01 or A*24:03,A*68:01 or A*24:04,A*68:01 or A*24:05,A*68:01	مزایا: دقت بالا؛ معایب: پیچیدگی نحوه انجام و آنالیز، امکان هزینه‌بر بودن

جدول ۲) ویژگی داده‌های حاصل از شرکت‌ها و پلات‌فرم‌های مربوطه

تکنیک	Ion torrent	Roche 454	ایلومینا	Solid ABI
داده (مگاباز در هر ران)	۱۰۰	۱۰۰	۶۰۰	۷۰۰
زمان لازم برای هر ران (ساعت)	۵/۱	۷	۲۱۶	۲۱۶
طول خوانش (جفت باز)	۲۰۰	۴۰۰	۱۵۰	۷۵
هزینه (دلار به ازای هر مگاباز)	۵	۳۹/۸۴	۰۳/۰	۰۴/۰

درآمدی بر نسل جدید تعیین توالی

روش توالی‌یابی اتومات شده سانگر (همان روش تجزیه شیمیایی) را امروزه به‌عنوان تکنولوژی توالی‌یابی نسل اول می‌شناسند و روش‌های پیشرفته‌تر را توالی‌یابی نسل جدید می‌نامند که معمولاً به دو گروه نسل دوم و سوم تقسیم می‌شوند. روش‌های توالی‌یابی نسل چهارم هم که هنوز در اول راه هستند از تکنولوژی نانو و توالی‌یابی به کمک اگزونوکلازها بهره می‌برند و هنوز کارایی آنها مورد ارزیابی قرار نگرفته است. درواقع تکنولوژی‌های توالی‌یابی نسل جدید ترکیب متنوعی از انواع روش‌های آماده‌سازی اولیه نمونه، توالی‌یابی، تصویربرداری یا مرئی‌سازی، روش‌های قطعه‌قطعه کردن ژنوم مورد مطالعه، سرهم کردن قطعات توالی‌یابی شده و در نهایت آنالیز داده‌ها است.

این تکنولوژی‌ها را براساس الگویی که برای توالی‌یابی به کار می‌برند به دو دسته تقسیم می‌کنند. الگوهای تکثیر شده به‌صورت یک مجموعه که معمولاً برای تکثیرشان از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در محیط مایع و یا روش‌های تکثیر بر روی سطوح جامد استفاده می‌شود، به دست می‌آیند. متداول‌ترین روش‌های توالی‌یابی برای یافتن الگوهایی تک مولکول شامل ماکسام گیلبرت، روش‌های شیمیایی، روش سانگر، انواع روش‌های

آنزیمی، پیروسکوئسنسینگ و توالی‌یابی تک مولکول به کمک اگزونوکلاز هستند. توسعه و پیشرفت روزافزون دانش پزشکی و همچنین استفاده از تکنولوژی‌های تشخیصی جدید این رشته در زمینه ژنتیک پزشکی به‌ویژه پس از تکمیل پروژه ژنوم انسانی پیشرفت سریع دانش ژنتیک در زمینه روش‌های جدید توالی‌یابی را به دنبال داشت که این امر منجر به ظهور نسل جدید توالی شد. نتایج حاصل از نسل جدید تعیین توالی به‌صورت داده‌های با توان بسیار بالا هستند. روش‌های جدید شرایط دستیابی به حجم بالایی از داده‌ها را نسبت به نتایج حاصل از تعیین توالی با روش سانگر امکان‌پذیر می‌کند. بدین ترتیب به‌راحتی می‌توان میلیون‌ها نسخه از توالی‌ها را به‌صورت پارالل تولید کرد و از طریق بررسی تعداد تکرار چرخه وارد شدن نوکلئوتیدها، خواندن فلورسانس و شکست رنگ، ترتیب توالی‌ها را باز به باز مورد خوانش قرار داد[44].

امروزه مطالعات گسترده ژنومی به این دلیل که امکان انجام تعیین توالی ژنوم ده‌ها هزار نفر فراهم نیست، مورد استفاده قرار می‌گیرد. به همین دلیل روش‌های جدیدتر تعیین توالی به‌سرعت جای‌گزین روش‌های قدیمی می‌شوند. این در حالی است که به نظر می‌رسد هنوز در ایران این تکنیک‌ها جایگزین نشده‌اند و روش‌های قدیمی‌تر همچنان مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این رو

در مطالعه حاضر به معرفی سیستم عامل‌های مختلف نسل جدید تعیین توالی برای تعیین توالی *HLA* که به صورت عمومی‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرد، پرداخته شد.

در این مطالعه مروری که در سال ۱۳۹۸ انجام شده است از مقالات نمایه‌شده در پایگاه‌های اطلاعاتی scholar Google، Scopus و Springer استفاده شد. مجموعه مقالات بررسی‌شده شامل ۵۵ مقاله بود که تحقیقات مربوط به ۳۵ سال گذشته (از سال ۱۹۸۳ تاکنون) را به زبان‌های فارسی و انگلیسی در برداشت. پژوهش‌هایی که متن کامل آنها در دسترس نبود حذف شدند.

روش تعیین توالی حرارتی (The Roche 454 system)

سیستم Roche 454 یکی از اولین فناوری‌ها در زمینه نسل جدید تعیین توالی به حساب می‌آید. امروزه دو دستگاه GS FLX و GS Junior با استفاده از روش تعیین توالی حرارتی، در این زمینه مورد استفاده قرار می‌گیرند. تشخیص بیماری‌ها با سنجش قوی و ارزیابی قابل اعتماد توسط نرم‌افزارهای با توانایی بازخوانی مجدد داده‌ها، منجر به استفاده از این روش در تست HIV شد [45]. این سیستم قدرت تشخیص مناطق پلی‌مورفیک و پلی‌ژنیک را دارد و شامل مجموعه تکنیک‌های نیمه‌رسانا، سیستم‌های نوری با وضوح بالا، طیف وسیعی از تکنیک‌های DNA مانند امولسیون واکنش زنجیره پلیمرز، شماره‌گذاری اختصاصی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و تعیین توالی با طول بلندتر است. این سیستم برای اولین بار توسط فدراسیون اروپایی برای بررسی‌های ایمونوزنتیک مورد استفاده قرار گرفت [50]. یکی از معایب استفاده از فناوری Roche 454 گران بودن این تکنیک در زمینه تعیین توالی *HLA* است. دو مسیر متفاوت برای سیستم ۴۵۴ قابل اجرا است. مسیر نخست، استفاده گسترده از مسیر توالی‌یابی آگزون بر پایه محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (تعیین توالی ژنومیک) حاصل و دیگری استفاده از پروتکل تعیین توالی به روش سانگر است. در حالی که مسیر ثانویه، استفاده از پروتکل DNA مکمل (تعیین توالی DNA مکمل) است اما این روش قدرت ارایه اطلاعات گسترده در مناطقی که ال‌های آن قبلاً تعیین توالی نشده است را ندارد. مزیت عمده این سیستم در هر دو روش، قابلیت تعیین توالی ۴۰۰ جفت باز و بیشتر است و بیشترین استفاده از نسل جدید تعیین توالی، توالی‌یابی ژنومی (توالی‌یابی آگرونی) است [36]. سیستم Roche 454 از ابتدا برای تعیین توالی شات‌گان استفاده شده و البته تا اندازه‌ای هم قادر به توالی‌یابی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز است، بنابراین نرم‌افزارهای قدیمی‌تر آن بر مبنای متدهای آنالیز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز طراحی نشده‌اند. نرم‌افزار conexio atf software مسیر استفاده از روش‌های مبتنی بر محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز را هموار کرده است. در این نرم‌افزار از یک پروتکل با یک مجموعه پرایمر اولیه استفاده می‌شود و در نهایت اطلاعات بسیار قابل اعتمادی را ارایه می‌دهد [51، 52]. در این روش تک‌رشته‌های DNA در داخل قطرات آب در یک محیط

روغنی تکثیر می‌شوند (امولسیون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز). بر اثر تکثیر DNA الگوی متصل به آغازگر، کلنی فشرده‌ای تشکیل می‌شود. اتصال قطعات متفاوت DNA در قطرات آب و یا قطرات آب خالی منجر به کاهش راندمان سیستم می‌شود، بنابراین جداسازی قطرات آب دارای DNA از قطرات خالی آب توسط ریات خودکار (Roche 454 LifeSciences؛ ایالات متحده) انجام می‌شود. در یک روش ساده‌تر PicoTiterPlates™ (Roche 454 LifeSciences؛ ایالات متحده) را با استفاده از صفحه نمایش به چند بخش تقسیم می‌کند. شناسایی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط تجزیه و تحلیل پرایمرها امکان‌پذیر است. همچنین بارکدکردن ۴ نوکلئوتید برای هر نمونه بیماران (MIDs) امکان‌پذیر است [53]. پروتکل‌های مختلف، قدرت تعیین توالی ۱۲۸ تا ۴۳۹ باز را ذکر کرده‌اند. البته تعیین توالی بیش از ۴۰۰ امکان ایجاد خطا در توالی‌یابی را دارد [50]. مونسامی و همکاران روشی ارایه کردند که از PCR Arrey استفاده می‌کند و با استفاده از ترکیب تمام عوامل مورد نیاز به تولید محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز می‌پردازد [54]. اولویت طراحی و تنظیم اولیه مسیر توالی‌یابی آگرونی، اجتناب از بهره‌برداری مجموعه متنوع از محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و توسعه مجموعه الیگونوکلئوتید با قدرت تقویت نتایج در محیط جامد است. پس از تقویت، بیدها توسط PicoTiterPlates™ مورد توالی‌یابی قرار می‌گیرند. از آنجایی که چگالی بیدها متفاوت است، منجر به بازده متفاوت تعیین توالی می‌شود. هر نوکلئوتید با تبادل فسفات به رشته DNA تازه تشکیل‌شده افزوده و تولید نور می‌کند. امواج نور ساطع‌شده توسط دوربین CCD با حساسیت بالا ثبت می‌شود. این نور با مقدار نوکلئوتیدها در ارتباط است. مشکل اصلی پایروسکانس، همپلی‌مرها هستند، چراکه تفکیک انتشار طول موج‌های بالا توسط سیستم ۴۵۴ غیر قابل انجام است. هر چقدر میزان همپلی‌مرها بیشتر باشد، کیفیت توالی‌یابی دستگاه کمتر است. همان‌گونه که ذکر شد تعیین توالی DNA مکمل توسط سیستم ۴۵۴ نیز انجام می‌گیرد. نتایج توالی‌یابی *HLA* ذکرشده در مقالات اخیر بر پایه محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، تقریباً کل طول ال را در بر می‌گیرد [51]. پروتکل بر مبنای محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به دو محصول این واکنش که در ال‌های *HLA* کلاس I با هم تداخل دارند و یک محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز منفرد *HLA* کلاس I، نیاز دارد [17]. فایده اصلی توالی‌یابی DNA مکمل، شناسایی ال‌های جدید است. تعیین توالی ژنوتایپ‌های جدید با استفاده از نسل جدید تعیین توالی به تعیین توالی‌های بیش از دو تا سه آگزون مربوط می‌شود. پیشرفت‌های بیشتر در زمینه کیت‌های FLX plus Titanium منجر به استفاده از پروتکل تعیین توالی محصول منفرد واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، با طول ۹۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز شده است. استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی در تکنیک Roche 454 کاربرد فراوان دارد. نزدیک به ۵۰٪ اشتباهات در خارج از یک منطقه همپلیمر

پیشنهاد می‌شود. در سال ۲۰۱۱ ایلومینا مدل *Miseq* با به‌کاربردن تکنیک سولکسا توسط دانشگاه کمبریج ساخته شد. توالی‌یابی *Miseq* در حالت اصلی قابلیت حداقل 2×10^5 جفت باز را دارد که امروزه آخرین ورژن آن (۳) قابلیت تعیین توالی 2×300 جفت باز را دارد. براساس تعیین توالی نسل جدید *HLA* بر پایه محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، تعیین توالی قطعات طولانی منجر به پوشش یک اگزون در تعیین توالی است. اصل علمی ایلومینا-سولکسا، که با نام *sbs* نیز معرفی می‌شود، در بسیاری از پلت‌فرم‌ها توسط ایلومینا (*Illumina*; ایالات متحده) در ساینزهای متفاوت از *Miseq* تا ساینز بزرگ *HiSeq-system* با نتایج عالی عرضه می‌شود^[30]. بعد از انجام کلیات آزمایشگاهی مولکول‌های *DNA* در فاز جامد از طریق الیگونوکلوئوتیدهای آداپتوری رفت و برگشت احاطه می‌شوند. آداپتورها از طریق سرهای ۵' و ۳' به توالی ویژه مکمل خود به اسلاید متصل می‌شوند و اجازه اتصال *DNA* را به سلول‌های روی سطح نمی‌دهند. پیوند الیگونوکلوئوتیدهای آداپتور به سلول‌های روی سطح، نه تنها به‌صورت مولکول‌های ثبت‌کننده توالی‌یابی از روی اسلاید عمل می‌کنند بلکه بر روی پل‌های حاصل برای ایجاد محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به‌عنوان پرایمری ایفای نقش می‌کنند. به علاوه پس از انجام تکثیر و توالی‌یابی به شکل‌گیری استفاده از ترمیناتور معکوس شیمیایی نیز کمک می‌نمایند. هر چهار الیگونوکلوئوتید واجد برچسب‌های فلورسنتی هستند. این برچسب در انتهای پلیمریزاسیون قرار می‌گیرد و در هر چرخه پلیمریزاسیونی تنها یک نوکلئوتید اضافه می‌شود. نوکلئوتیدهایی که محاصره نشده‌اند در حین عمل شست‌وشو از بین می‌روند. به کمک دوربین *CCD* و برداشتن برچسب و ترمیناتور طویل‌شدن رشته در چرخه تعیین توالی جدید ادامه می‌یابد. توالی‌یابی آداپتور از توالی‌یابی *Index* پیروی می‌شود (بارکد کردن *DNA*)^[31]. برای سهولت در تولید سیگنال در فاز جامد، خوشه‌های مولکول‌های *DNA* تک‌رشته که از روی پل به‌صورت محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ایجاد شده‌اند، به‌صورت کپی‌هایی با تراکم هزارتایی بر روی هر کدام از سلول‌ها ایجاد می‌شوند.

بحث

تعیین نوع *HLA* از نظر بالینی و آزمایشگاهی دارای اهمیت بسیاری است^[5]، به‌طوری که علاوه بر کاربرد آن برای ارزیابی ریسک ابتلا به بیماری‌های مختلف، نقشی بسیار حیاتی نیز در پیوند اعضا دارد. تعیین *HLA* در بیماران نیازمند پیوند علاوه بر دقت و صحت نیاز به سرعت عمل بالا نیز دارد^[21]. به‌طوری که هر گونه تاخیر و خطا در این کار می‌تواند حیات بیمار را به خطر اندازد. از این رو توسعه روش‌های تعیین *HLA* همواره دغدغه محققین بوده است^[40]. امروزه با معرفی نسل جدید تعیین توالی انقلابی در ارزیابی‌های ژنتیکی صورت گرفته است. تعیین *HLA* نیز از این تکنیک بهره گرفته و روش‌های متنوعی برای بررسی

روی می‌دهد و تقریباً ۱۲٪ آنها مربوط به محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز است. در کل می‌توان گفت ۶۵ تا ۷۰٪ خوانش توالی بدون ایراد است. تحقیقات نشان می‌دهد که خوانش نادرست در کمتر از سه نوکلئوتید و در ۳۸/۱۵٪ مواقع در همان محل توالی‌یابی‌شده، تکرار می‌شود^[27]. ترتیب قرارگیری نوکلئوتیدها و یا ساختار سوم ترادف‌ها خود عاملی برای خطا در خوانش به حساب می‌آید. بیش از ۱۰٪ خوانش توالی *HLA*، اطلاعات اگزون را به‌درستی نشان نمی‌دهند. سیستم 454 Junior بین ۶۰۰۰ تا ۷۰۰۰۰ خوانش را انجام می‌دهد. در ژنوتایپ‌کردن برای ۱۷ اگزون با ۶ لوکوس از هر نمونه حدود ۳۵۰ مرتبه از هر اگزون خوانده می‌شود که این مقدار، عددی قابل اطمینان است. کمترین پوشش خوانش باید بیش از ۲۰ جفت باز در هر محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز باشد و این محدودیت ضعف عمده توالی‌یابی بر پایه محصول این واکنش است. سیستم ۴۵۴ با شروع توالی‌یابی به‌طور متوسط ۱۲۰ جفت باز (در پلات‌فرم GS20) از سایر سیستم‌های موجود در بازار فراتر است. طول خوانش قطعه ۴۵۰ جفت بازی در GS FLX Titanium است و می‌تواند تا ۱۰۰۰ جفت باز را هم سکانس کند و بهترین تعیین توالی اگزونی و حتی فواصل بین اگزونی را فراهم می‌آورد (جدول ۳).

جدول ۳) حداقل و حداکثر طول خوانش در پلات‌فرم‌های مختلف

پلات‌فرم	حداقل طول خوانش (جفت باز)	حداکثر طول خوانش (جفت باز)
Roche 454	۷۰	۴۰۰
ایلومینا GA	۳۰	۸۱
ایلومینا GA II	۲۶	۱۶۰
ایلومینا HiSeq	۵۰	۱۰۲
سیستم جامد ABI3.0	۵۰	۵۰

چندین نمونه را طی سه روز می‌توان در یک دوره سکانس و تعیین توالی کرد. مهم‌ترین هدف استفاده از نسل جدید ۴۵۴ تعیین توالی نتایج با وضوح بالا است. بنابراین دقت عمل در اجرای آن امری ضروری است. همچنین در مقایسه با روش سانگر، تعیین توالی را با وضوح بالاتری انجام می‌دهد (۹۲/۷ و ۱۰۰٪ به ترتیب برای *HLA-B* و *HLA-DQB1*)^[5]. روش ۴۵۴ یک روش پیچیده و گران‌قیمت است. همچنین بیشترین کاربرد این روش استفاده از آن برای تعیین توالی در زمینه پیوند سلول‌های بنیادی است^[29].

روش ایلومینا *Miseq*

ماشین‌های نسل جدید تعیین توالی برای آزمایشگاه‌های کوچک و حتی متوسط که تخصص اصلی در تعیین توالی کل ژنوم و یا کل اگزون‌ها ندارند، کاربرد دارد. بسیاری از پلت‌فرم‌های NGS benchtop به‌راحتی با برنامه بودجه تجهیزات هماهنگ می‌شوند و برای توالی‌یابی محصولات مشخص واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

سهم نویسندگان: نسیم غفاری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۵٪)؛ مرضیه رئیسی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۲۵٪)؛ کامران گیتی (نویسنده سوم)، پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵٪)؛ مریم‌السادات دانشپور (نویسنده چهارم)، تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۵٪)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.

منابع

- 1- Samaranyake N, Fernando SD, Neththikumara NF, Rodrigo C, Karunaweera ND, Dissanayake VH. Association of HLA class I and II genes with cutaneous leishmaniasis: A case control study from Sri Lanka and a systematic review. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):292.
- 2- Trowsdale J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity*. 2001;15(3):363-74.
- 3- Corvin A, Morris DW. Genome-wide association studies: findings at the major histocompatibility complex locus in psychosis. *Biol Psychiatry*. 2014;75(4):276-83.
- 4- Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet*. 2009;54(1):15-39.
- 5- Zheng X, Shen J, Cox C, Wakefield JC, Ehm MG, Nelson MR, et al. HIBAG-HLA genotype imputation with attribute bagging. *Pharmacogenom J*. 2014;14(2):192-200.
- 6- Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system. *Hum Immunol*. 2005;66(5):571-636.
- 7- Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SG. IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D1222-7.
- 8- Thomson G, Valdes AM, Noble JA, Kockum I, Grote MN, Najman J, et al. Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: A meta-analysis. *Tissue Antigens*. 2007;70(2):110-27.
- 9- Brown MA, Kenna T, Wordsworth BP. Genetics of ankylosing spondylitis-insights into pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(2):81-91.
- 10- Weeks CL, Batra A, Tighe MP. QUESTION 2: Is HLA typing for coeliac disease helpful in children with type 1 diabetes mellitus?. *Arch Dis Child*. 2016;101(6):590-1.
- 11- Hachiya Y, Kawasaki A, Oka Sh, Kondo Y, Ito S, Matsumoto I, et al. Association of HLA-G 3'Untranslated region polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: A case-control association study. *PLoS One*. 2016;11(6):e0158065.
- 12- Saruhan-Direskeneli G, Hughes T, Yilmaz V, Durmus H, Adler A, Alahgholi-Hajibehzad M, et al. Genetic heterogeneity within the HLA region in three distinct clinical subgroups of myasthenia gravis. *Clin Immunol*. 2016;166-167:81-8.
- 13- Huang R, Yin J, Chen Y, Deng F, Chen J, Gao X, et al. The amino acid variation within the binding pocket 7 and 9 of HLA-DRB1 molecules are associated with primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*. 2015;57:53-9.
- 14- Tafti M, Lammers GJ, Dauvilliers Y, Overeem S, Mayer G, Nowak J, et al. Narcolepsy-associated HLA class I alleles implicate cell-mediated cytotoxicity. *Sleep*. 2016;39(3):581-7.
- 15- Liu J, Ye Z, Mayer JG, Hoch BA, Green C, Rolak L, et al.

ژنتیکی HLA به کمک نسل جدید تعیین توالی معرفی شده‌اند^[39]. در این مطالعه دو مورد از پرکاربردترین تکنیک‌ها براساس نسل جدید تعیین توالی تحت عنوان روش تعیین توالی حرارتی و روش ایلومینا Miseq مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند.

در کنار افزایش توانمندی از دیگر مزیت‌های استفاده از تکنولوژی نسل جدید تعیین توالی، سرعت، کاهش قابل توجه مقدار کمی DNA، کاهش تعداد ران‌ها و درنتیجه ارزان‌تر تمام‌شدن کار نسبت به روش‌های PCR-SSO و PCR-SBT است^[43]. در روش سنکر هر خوانش نیازمند مقدار زیادی از DNA الگو است. به‌عنوان مثال برای یک توالی ۱۰۰ جفت بازی به صدها کپی و برای یک توالی ۱۰۰۰ جفت بازی هزاران کپی نیاز است. بنابراین چندین رشته از DNA الگو برای هر بازی که قرار است تعیین توالی شود لازم است^[36].

امروزه مطالعات گسترده ژنومی به این دلیل که امکان انجام تعیین توالی ژنوم ده‌ها هزار نفر فراهم نیست، مورد استفاده قرار می‌گیرند. به همین دلیل روش‌های قدیمی‌تر تعیین توالی به‌سرعت با روش‌های جدید جایگزین می‌شوند^[37]. از طرف دیگر فرآیندهای همانندسازی، رونویسی، ترجمه، متیلاسیون و فولدینگ DNA اگرچه فرآیندهایی کاملاً متفاوت از یکدیگر هستند اما به کمک نسل جدید تعیین توالی می‌توان به مطالعه آنها پرداخت^[51]. نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که روش‌های جدید نسبت به روش‌های گذشته همچون روش‌های سرولوژیک و روش‌های براساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز دارای مزیت‌های فراوانی هستند. این در حالی است که به نظر می‌رسد هنوز در ایران این تکنیک‌ها جایگزین نشده‌اند و روش‌های قدیمی‌تر همچنان مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر این با وجود پیشرفت‌های حاصله در تکمیل بانک سلول‌های بنیادی در ایران، به نظر می‌رسد استفاده از این روش‌ها می‌تواند سبب بالا بردن صحت پایگاه داده HLA این بانک شود. از آنجایی که در زمان آزادسازی نمونه سلول بنیادی به‌منظور پیوند، تعیین دوباره HLA الزامی است، بنابراین استفاده از تکنیک‌ها با اساس نسل جدید تعیین توالی انجام این روند را سرعت می‌بخشد. مساله دیگر حائز اهمیت در پیوند مچ‌بودن کامل یا به اصطلاح ۱۰/۱۰ است، که به‌شدت موفقیت پیوند را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این در حالی است که انجام این کار نیازمند تکنیک‌های دشوار و زمان‌بر است و در صورت استفاده از روش‌های با اساس نسل جدید تعیین توالی انجام آن به‌سهولت انجام می‌شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان بدین وسیله از حمایت‌های همکاران محترم پژوهشکده غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در انجام این مطالعه، کمال تشکر و قدردانی دارند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.

DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*. 1986;324(6093):163-6.

33- Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*. 1992;39(5):225-35.

34- Nunes E, Heslop H, Fernandez-Vina M, Taves C, Wagenknecht DR, Eisenbrey AB, et al. Definitions of histocompatibility typing terms. *Blood*. 2011;118(23):e180-3.

35- Santamaria P, Lindstrom AL, Boyce-Jacino MT, Myster SH, Barbosa JJ, Faras AJ, et al. HLA class I sequence-based typing. *Hum Immunol*. 1993;37(1):39-50.

36- Gabriel C, Fürst D, Faé I, Wenda S, Zollikofer C, Mytilineos J, et al. HLA typing by next-generation sequencing-getting closer to reality. *Tissue Antigens*. 2014;83(2):65-75.

37- Nielsen R, Paul JS, Albrechtsen A, Song YS. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nat Rev Genet*. 2011;12(6):443-51.

38- Weimer ET. Clinical validation of NGS technology for HLA: An early adopter's perspective. *Hum Immunol*. 2016;77(10):820-3.

39- Dunn PP. Human leucocyte antigen typing: Techniques and technology, a critical appraisal. *Int J Immunogenet*. 2011;38(6):463-73.

40- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *BioMed Res Int*. 2012;2012:251364.

41- De Santis D, Dinanuer D, Duke J, Erlich HA, Holcomb CL, Lind C, et al. 16th IHIW: Review of HLA typing by NGS. *Int J Immunogenet*. 2013;40(1):72-6.

42- Boyd SD, Gaëta BA, Jackson KJ, Fire AZ, Marshall EL, Merker JD, et al. Individual variation in the germline Ig gene repertoire inferred from variable region gene rearrangements. *J Immunol*. 2010;184(12):6986-92.

43- Robins HS, Campregher PV, Srivastava SK, Wachter A, Turtle CJ, Kahsai O, et al. Comprehensive assessment of T-cell receptor β -chain diversity in $\alpha\beta$ T cells. *Blood*. 2009;114(19):4099-107.

44- Daneshpour M, Masjoodi S, Ghafari N, Raesi M, Fallah M. Performance of Illumina Next Generation Sequencing. *Pathobiol Res*. 2018;21(3):153-61. [Persian]

45- Simen BB, Simons JF, Hullsiek KH, Novak RM, MacArthur RD, Baxter JD, et al. Low-abundance drug-resistant viral variants in chronically HIV-infected, antiretroviral treatment-naïve patients significantly impact treatment outcomes. *J Infect Dis*. 2009;199(5):693-701.

46- Lataillade M, Chiarella J, Yang R, Schnittman S, Wirtz V, Uy J, et al. Prevalence and clinical significance of HIV drug resistance mutations by ultra-deep sequencing in antiretroviral-naïve subjects in the CASTLE study. *PloS One*. 2010;5(6):e10952.

47- Kohlmann A, Grossmann V, Haferlach C, Kazak B, Schindela S, Klein HU, et al. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 75% of Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) by detecting frequent alterations in TET2, RUNX1, CBL, and RAS. *Blood*. 2009;114(22):417.

48- Bentley G, Higuchi R, Hoglund B, Goodridge D, Sayer D, Trachtenberg EA, et al. High-resolution, high-throughput HLA genotyping by next-generation sequencing. *Tissue Antigens*. 2009;74(5):393-403.

Phenome-wide association study maps new diseases to the human major histocompatibility complex region. *J Med Genet*. 2016;53(10):681-9.

16- Daneshpour MS, Faam B, Mansournia MA, Hedayati M, Halalkhor S, Mesbah-Namin SA, et al. Haplotype analysis of Apo AI-CIII-AIV gene cluster and lipids level: Tehran lipid and glucose study. *Endocrine*. 2012;41(1):103-10.

17- Daneshpour MS, Hosseinzadeh N, Zarkesh M, Azizi F. Haplotype frequency distribution for 7 microsatellites in chromosome 8 and 11 in relation to the metabolic syndrome in four ethnic groups: Tehran lipid and glucose study. *Gene*. 2012;495(1):62-4.

18- Daneshpour MS, Alfadhli S, Houshmand M, Zeinali S, Hedayati M, Zarkesh M, et al. Allele frequency distribution data for D8S1132, D8S1779, D8S514, and D8S1743 in four ethnic groups in relation to metabolic syndrome: Tehran lipid and glucose study. *Biochem Genet*. 2009;47(9-10):680-7.

19- Hebbbring SJ. The challenges, advantages and future of phenome-wide association studies. *Immunology*. 2014;141(2):157-65.

20- Bacigalupo A, Sica S. HLA haplotype mismatch transplants and posttransplant cyclophosphamide. *Adv Hematol*. 2016;2016:7802967.

21- Reisner Y, Kapoor N, Kirkpatrick D, Pollack MS, Cunningham-Rundles S, Dupont B, et al. Transplantation for severe combined immunodeficiency with HLA-A, B, D, DR incompatible parental marrow cells fractionated by soybean agglutinin and sheep red blood cells. *Blood*. 1983;61(2):341-8.

22- Daneshpour MA, Fallah MS, Eshraghi P. Revolution of DNA sequencing method from the past until today. *Pathobiol Res*. 2014;16(4):1-13. [Persian]

23- Daneshpour MS, Rebai A, Houshmand M, Alfadhli S, Zeinali S, Hedayati M, et al. 8q24. 3 and 11q25 chromosomal loci association with low HDL-C in metabolic syndrome. *Eur J Clin Investig*. 2011;41(10):1105-12.

24- Tiercy JM. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells?. *Haematologica*. 2016;101(6):680-7.

25- Cereb N, Kim HR, Ryu J, Yang SY. Advances in DNA sequencing technologies for high resolution HLA typing. *Hum Immunol*. 2015;76(12):923-7.

26- Valluei V, Mustafa M, Santhosh A, Middleton D, Alvales M, El Haj E, et al. Frequencies of HLA-A, HLA-B, HLA-DR, and HLA-DQ phenotypes in the United Arab Emirates population. *Tissue Antigens*. 2005;66(2):107-13.

27- Farjadian S, Naruse T, Kawata H, Ghaderi A, Bahram S, Inoko H. Molecular analysis of HLA allele frequencies and haplotypes in Baloch of Iran compared with related populations of Pakistan. *Tissue Antigens*. 2004;64(5):581-7.

28- Shankarkumar U, Prasanavar D, Ghosh K, Mohanty D. HLA A* 02 allele frequencies and B haplotype associations in Western Indians. *Hum Immunol*. 2003;64(5):562-6.

29- Jung HL. Shedding a new light on the HLA matching. *Korean J Hematol*. 2011;46(1):1-2.

30- Erlich H. HLA DNA typing: Past, present, and future. *Tissue Antigens*. 2012;80(1):1-11.

31- Parham P. Histocompatibility typing-Mac is back in town. *Immunol Today*. 1988;9(5):127-30.

32- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-

- 52- Parameswaran P, Jalili R, Tao L, Shokralla S, Gharizadeh B, Ronaghi M, et al. A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(19):e130.
- 53- Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Bäckhed F, Nyrén P, Engstrand L. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One.* 2008;3(7):e2836.
- 54- Moonsamy PV, Williams T, Bonella P, Holcomb CL, Höglund BN, Hillman G, et al. High throughput HLA genotyping using 454 sequencing and the Fluidigm Access Array™ system for simplified amplicon library preparation. *Tissue Antigens.* 2013;81(3):141-9.
- 49- Gabriel Ch, Danzer M, Hackl Ch, Kopal G, Hufnagl P, Hofer K, et al. Rapid high-throughput human leukocyte antigen typing by massively parallel pyrosequencing for high-resolution allele identification. *Hum Immunol.* 2009;70(11):960-4.
- 50- Danzer M, Niklas N, Stabentheiner S, Hofer K, Pröll J, Stückler Ch, et al. Rapid, scalable and highly automated HLA genotyping using next-generation sequencing: A transition from research to diagnostics. *BMC Genom.* 2013;14(1):221.
- 51- Holcomb CL, Höglund B, Anderson MW, Blake LA, Böhme I, Egholm M, et al. A multi-site study using high-resolution HLA genotyping by next generation sequencing. *Tissue Antigens.* 2011;77(3):206-17.