REVIEW ARTICLE

Parasites Genomics

Ehsan Ahmadpour[1],
Abdolhasan Kazemi[2],
Ahmad Daryani[3],
Adel Spotin[4],
Ahad Bazmani[5]

[1] PhD Student in Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, Biotechnology Research Center, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3] Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] PhD Student in Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] MSc in Parasitology, Infectious and Tropical Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

(Received December 20, 2012 ; Accepted May 14, 2013)

Abstract

Genes carry instructions to make protein that affect body's cells and their physical activity. They also play an important role in the occurrence of various characteristics in the body. Recently, scientists in the new field of science known as genomics have studied the genetic instructions. Genomics deals with the discovery of all the sequences in the entire genome of organisms and is used to study the sequence, structure and function of the genome.

In the parasitic infections there is a real need to genomics due to necessity of developing vaccines and new drugs (as a result of drug resistance), diagnosing infections, pathogenesis, diagnosing cell signaling, studying the unknown immunology pathways, control and prevention, and the relationship between parasite and host. Also, genomics offers novel insights into the phylogeny, parasite and host relationship, physiology, biochemistry, biology, taxonomy, etc. Considering these points, parasitology and genomics are closely related and it is necessary to use molecular techniques to achieve the aforementioned objectives.

Keywords: Parasites, genomics, genome

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(101): 135-145 (Persian).

مجلـــــه دانـشـــگاه عـــلـــوم پـزشـکـــی مـــازنـــدران
دوره بیست و سوم شماره ۱۰۱ خرداد سال ۱۳۹۲ (۱۴۵-۱۳۵)

ژنومیکس انگل ها

احسان احمدپور [۱]
عبدالحسن کاظمی [۲]
احمد دریانی [۳]
عادل اسپوتین [۴]
احد بازمانی [۵]

چکیده

ژن‌ها حامل دستورالعمل برای ساختن پروتئین‌ها می‌باشند که فعالیت سلول‌ها و اعمال مختلف بدن را تحت تأثیر قرار می‌دهند و همچنین در بروز صفات گوناگون در بدن جانداران نقش ایفا می‌کنند. اخیراً دانشمندان در حوزه جدیدی از علم با عنوان ژنومیکس (Genomics) به مطالعه این دستورالعمل‌های ژنتیکی پرداخته‌اند. در حقیقت ژنومیکس علم جدیدی است که به مطالعه همه ژن‌های موجود در بدن یک ارگانیسم (ژنوم)، ساختار ژن‌ها و نیز تعامل این ژن‌ها با یکدیگر و با محیط اطراف ارگانیسم می‌پردازد و به عبارتی توالی، ساختار و عملکرد ژنوم را مورد مطالعه قرار می‌دهد.

نیازمندی به واکسن، ساخت داروهای جدید به دلیل بروز مقاومت‌های دارویی، کمک به تشخیص عفونت‌ها، شناسایی پاتوژنیسیته، شناسایی سیگنالینگ‌های سلولی، بررسی مسیرهای ناشناخته ایمونولوژیک، کنترل و پیشگیری بیماری ها، بررسی ارتباط و سازگاری متقابل انگل و میزبان و... در عفونت‌های انگلی نیاز مبرم به استفاده از ژنومیکس را نشان می‌دهد. همچنین به کمک ژنومیکس، تحقیقاتی روی نسب شناسی انگل‌ها، ارتباط انگل و میزبان، فیزیولوژی، بیوشیمی، بیولوژی، تاکسونومی و... انگل‌ها صورت گرفته است. لذا با توجه به نکات ذکر شده دو رشته انگل شناسی و ژنومیکس رابطه تنگاتنگی با همدیگر داشته و آشنایی با روش‌های بررسی ژنومی و ملکولی برای رسیدن به اهداف فوق ضروری به نظر می‌رسد.

واژه های کلیدی: انگل‌ها، ژنومیکس، ژنوم

مقدمه

یکی از شاخه‌های علم زیست شناسی، ژنتیک است که در واقع علم مطالعه توارث یا انتقال صفات از نسلی به نسل دیگر می‌باشد. ژن ها حامل دستورالعمل‌های لازم برای ساختن پروتئین ها هستند که به نوبه خود فعالیت‌های سلول و اعمال مختلف بدن را تعیین می کنند و به این ترتیب در بروز صفات گوناگون نقش دارند(۱).

به تازگی دانشمندان در قالب حوزه جدیدی از علم با عنوان ژنومیکس (Genomics) به مطالعه این دستورالعمل‌های ژنتیکی پرداخته‌اند. در حقیقت ژنومیکس واژه جدیدی است که به مطالعه کل محتویات ژنتیکی موجود در بدن یک ارگانیسم (ژنوم) و نیز تعامل این ژن ها با یکدیگر و با محیط اطراف او

مؤلف مسئول: عبدالحسن کاظمی- تبریز: دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی E-mail: kazemi1338@gmail.com
۱. دانشجوی دکترای انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۳. مرکز تحقیقات توکسوپلاسموزیس، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشجوی دکترای انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۵. کارشناس ارشد انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۱/۹/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۱/۱۲/۲۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۲/۲/۲۳

می‌پردازد و به عبارتی توالی، ساختار و عملکرد ژنوم را مطالعه می‌کند. تمرکز این شاخه علمی نوین بر مطالعه و تفسیر اطلاعات ژنتیکی یا همان ژنوم ارگانیسم است(۱، ۲). این اطلاعات شامل اعمال هر یک از ژن‌ها، شیوه تنظیم فعالیت آن‌ها و چگونگی تأثیرپذیری این ژن‌ها از ژن‌های دیگر و محیط اطرافشان می‌شود. ژنومیکس شناخت ما از ارگانیسم‌های زنده را از سطح ملکولی تا سلول و بالاخره جمعیت سلولی متحول می‌کند و ادراک ما را از تکامل و روابط بین گونه‌ها ارتقاء می‌دهد. مجموعه فعالیت دانشمندان در حوزه ژنومیکس با استفاده از نسل جدید ابزار علمی صورت می‌گیرد که به آن‌ها در تعیین ترادف یا توالی ژن‌ها، پیام‌های این ژن‌ها و محصولات پروتئینی آن‌ها و بالاخره تعبیر و تفسیر اطلاعات به دست آمده کمک می‌کند. یکی از مراحل بررسی‌های ژنومیکس به‌کارگیری روش‌های سریع برای توالی یابی ژن هاست که اکنون در بیش‌تر آزمایشگاه‌های پیشرفته بخش اعظم آن به کمک رایانه ها انجام می‌شود. مرحله بعد شامل به‌کارگیری اطلاعات است. یک ژنوم مشخص حاوی میلیونها قطعه کد ژنتیکی است. پس به طور خلاصه ژنومیکس به مجموعه‌ای از روش‌ها و ابزارهایی اطلاق می‌شود که جهت شناسایی و فهم نقشه ژنتیکی یک موجود و ارتباط آن با رفتار و ساختار موجود بکار می‌رود(۳-۱).

ژنومیکس هم مانند انگل شناسی یک علم بین رشته‌ای است یعنی مرتبط با چند رشته علمی می‌باشد. در مطالعات انگل‌شناسی انجام شده به کمک ژنومیکس، تحقیقاتی روی فیلوژنتیک انگل‌ها (نسب شناسی انگل‌ها) در ارتباط با رابطه انگل و میزبان، فیزیولوژی، بیوشیمی، بیولوژی و تاکسونومی و... انگل‌ها صورت گرفته است. لذا با توجه به نکات ذکر شده، دو رشته انگل شناسی و ژنومیکس رابطه تنگاتنگی با همدیگر دارند(۸-۴). تحقیقات ژنتیکی در انگل شناسی را می‌توان به دو بخش مهم تقسیم نمود:

بخش اول شامل تولید منابع ژنتیکی از قبیل بانک‌های کلون، ساختار ژنوم و ژن ها، توالی نوکلئوتیدی ژن‌ها، عملکرد ژن‌های شناخته شده و زمینه‌های کاربردی ژنومیکس است. بخش دیگر شامل مطالعه فرضیه‌هایی در زمینه یافتن الگو و فرایند در ساختار، بیان و تکامل ژنوم‌هاست. این دو بخش ژنومیکس با هم همپوشانی دارند و حوزه‌ای علمی تحت عنوان متاژنومیکس بوجود می‌آورند که استنباط مفاهیم ژنتیکی مبنایی برای آزمون و تست فرضیات پیدایش و تکامل ژنوم ها و مقایسه عملکردهای ژنومی را ممکن می‌سازد. لذا با توجه به اهمیت و کاربرد ژنومیکس در مطالعات انگل‌شناسی و هم‌چنین آشنایی با پایه و اساس این علم جهت کمک به طراحی و فهم تحقیقات، این مطالعه مروری با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی بین‌المللی نظیر Pubmed، Elsevier، Springer و SID با جستجوی کلید واژه‌هایی مانند ژنومیکس، ژنوم و انگل ها انجام گرفت.

یافته‌ها

تاریخچه ژنومیکس

ژنومیکس و تعیین توالی ژنومی رشته نوپایی بوده و اولین ژنوم‌های تعیین توالی شده مربوط به ویروس‌های عفونی کننده باکتری‌ها (فاژ لامبدا و phix 174) می‌باشد. از اولین ژنوم‌های تعیین توالی شده در یک موجود مستقل، می‌توان ژنوم باکتری هموفیلوس آنفولانزا (Haemophilus influenzae) و هلیکوباکتر پیلوری (Helicobacter pylori)را نام برد(۹،۱).

در حال حاضر امکان تعیین توالی ژنوم‌های یوکاریوتی که اندازه آن‌ها بزرگ‌تر از ۲۰Mbp است نیز امکان پذیر می‌باشد مانند تعیین توالی ژنومی سنوروربدیتیس الگانس (Caenorhabditis elegans) و درزوفیلا ملانوگاستر (Drosophilamelanogaster) و حتی تعیین توالی ژنوم انسانی که اخیراً صورت گرفته است. همچنین چندین پروژه تعیین توالی

ژنومی نیـز در حـال اجراسـت کـه ایـن پـروژه‌هـا باعـث تحـول عمیقـی در تحقیقـات روی بیولـوژی انگـل‌هـا شده است(۹،۱).

اهمیت ژنومیکس

بـاکتری هـا (پروکـاریوت‌هـا) دارای ژنـوم نـسبتاً کـوچکی در حـدود ۱۵-۰/۶ Mbp هـستند ولـی ژنـوم یوکـاریوت‌هـا بـسیار بـزرگ‌تـر از آن (بیـشتر از Mbp ۱۰۰۰۰-۱۰) مـی‌باشـد. در ایـن میـان ژنـوم انگـل‌هـای یوکـاریوتی در محـدوده Mbp ۹ در تیلریـا آنولاتـا (Theileria annulata) با ۴ کروموزوم و تـا ۵۰۰۰Mbp در آسکاریس سئوم (Ascaris suum) با ۴۸ کروموزوم می‌باشد(۹،۱۰).

تعداد ژن‌های کدکننده ژنوم تا حدودی متناسب با اندازه ژنوم است اما این تعداد با حضور DNA اینترونی و DNA غیرکدکننده تکراری تغییر می‌یابد به طوری‌که بـرای مثـال ژنـوم Caenorhabditis elegance حـدود ۱۰۰Mbp است و ۲۰۰۰۰ ژن کدکننـده پـروتئین دارد و تراکم ژنـی آن حـدود یـک ژن بـه ازای ۵Kb اسـت در حالی‌که ژنوم انـسانی بـا طـول ۳۰۰۰Mbp فقـط ۲۵-۳۰ هزار ژن کدکننده دارد(۹، ۱۰).

تک یاخته‌ها ژنوم نسبتاً کـوچکی دارنـد کـه اغلـب غنی از توالی‌های غیرکدکننده تکراری هستند و معمـولاً بین ۱۵۰۰۰-۶۰۰۰ ژن کدکننده پروتئین دارند. به عنـوان مثـال آنتاموبـا هیـستولیتیکا (Entamoeba histolytica) عامل بیماری دیسانتری آمیبی در انسان، اندازه ژنومی در حـدود ۲۴ Mb دارد کـه در ۱۴ کروموزوم جمع شـده است. جالب توجه است که در آمیب‌های آزادزی اندازه ژنومی بسیار بزرگ می‌باشـند بـه طـوری‌کـه در آنتاموبـا پروتئوس (E. proteous) اندازه ژنـومی ۲۹۰ بیلیـون بـاز است که حدود ۱۰۰ برابر ژنوم انسانی می‌باشد(۱۲- ۱۰).

بزرگی ژنوم و تعداد ژن‌های نماتودهای انگلی شبیه C. elegance مـی‌باشـد ولـی چنـدین گونـه از نماتودهـا دارای DNAهای بزرگتری در ژنوم هاپلوئیدشان هستند. در آسکاریس و گونـه‌هـای وابـسته بـه آن ژنـوم هـم بـه شدت تکراری بوده و هم بزرگ‌تر از ژنـوم C. elegance هستند(۹،۱۰). ژنوم کرم‌های پهن (سستودها و ترماتودها) کم‌تر شناخته شـده اسـت بـا ایـن حـال تحقیقـات انجـام گرفته در مورد گونه‌هـای شیـستوزوما (Schistosoma)، اندازه ژنوم آن‌ها را تقریباً ۲۷۰Mbp برآورد کرده‌اند که غنی از توالی‌های تکراری است و حاوی حـدود ۲۰۰۰۰ ژن می‌باشد. بندپایان در مقایسه با بندپای مدل یـا مگـس سـرکه (D. melanogaster) کـه حـاوی ۱۵۰۰۰ ژن در ژنوم ۱۶۰Mbp خود می‌باشد، ژنـوم بـزرگ‌تـری دارنـد. برای مثال اندازه ژنوم آنوفل ۲۸۰Mbp است ولـی تعـداد ژن‌های آن مشابه مگس سـرکه مـی‌باشـد(۹، ۱۰، ۱۵- ۱۳). متازوآها (کـرم‌هـای پهـن و نماتودهـا) و برخـی از تـک یاخته‌هـا (کینتوپلاسـتیدها) دارای دو نـوع ژنـوم هـستند: ژنوم میتوکندریایی دارای اندازه کوچک‌تری نـسبت بـه ژنوم هسته‌ای (معمولاً در انگـل‌هـا حـدود ۲۰۰۰۰ bp بـا وزن ۱۰۷ دالتون) است. ژنوم به شـکل گـرد و حلقـوی، دو رشته‌ای و در گونه‌های دو جنسی که نر و مـاده جـدا از هـم هـستند، هماننـد انـسان از جـنس مـاده بـه ارث می‌رسد. ایـن ژنـوم فاقـد هیـستون بـوده و تمایـل آن بـه موتاسیون بیش از ژنوم هسته‌ای است. رمز پایان در ژنـوم میتوکنـدریایی AGA وAGG (در هـسته کـدون رمـز کننده اسید آمینه آرژنـین) مـی‌باشـد. هـر سـلول حـاوی تعداد زیادی نسخه از ژنوم میتوکندریایی است که به‌دلیل راحتی آنالیز ملکولی این ژنوم، مطالعات بـیش‌تـری روی ژنوم میتوکندریایی صورت می‌گیرد. ژنـوم هـسته‌ای کـه اندازه آن بسیار بزرگ‌تر از ژنوم میتوکندیایی اسـت(۱۶- ۱۴).

اهداف مطالعات ژنومیکس

۱- تعیـین تـوالی کامـل کروموزومی و پلاسـتیدی ژنوم ارگانیسم

۲- مـشخص سـاختن ژن‌هـای کدکننـده تـوالی (پـروتئین و RNA) کـه بـه آن کـشف ژن هـم گفتـه می‌شود که توسط نرم افزارهای خاص انجام مـی‌گـردد (Gene discovery & Gene finding).

۳- پیش‌بینی عملکرد هر کدام از ژن‌ها و عملکرد نواحی اپراتور، پروموتور و نواحی کنترلی بر روی DNA غیر کدکننده (فاقد محصول) RNA و پروتئین.

۴- ادغام اطلاعات عملکردی، توالی‌ها و ساختارها در مدل‌های بیولوژیک و بررسی ساختار کروموزوم‌ها و واکنش بین قسمت‌های بیان شده ژنوم (Data mining).

۵- بررسی تغییرات طبیعی بر روی ژنوم میزبان، تعداد نسخه‌های ژنی، ساختار جمعیتی، تیمار دارویی و سایر موارد.

می‌توان علاوه بر موارد ذکر شده اهداف دیگری را نیز مانند تعیین توالی‌های کاندید، بررسی پلی مورفیسم‌ها در بین گونه‌ها، شناسایی قرابت فیلوژنیک، ژن‌ها یا محصولات ژنی از نظر تشخیص و مراقبت از بیماری، اهداف دارویی وتولید واکسن را دنبال نمود. اخیراً نیز بر اساس توالی ژنومیک هر موجود زنده‌ای، به آن موجود یک بارکد ژنتیکی داده می‌شود که اساس رده‌بندی نوین موجودات زنده و از جمله انگل‌ها را تشکیل می‌دهد(۱۰- ۸).

داده های ژنومیکس

در ژنومیکس از داده‌های منابع مختلف استفاده می‌کنند. برای این کار ابتدا نقشه‌های فیزیکی و ژنتیکی ژنوم‌های مورد نظر را ایجاد می‌کنند و سپس با جزئیات بیش‌تر نقشه‌های بیان ژن و توالی ژنومی را ترسیم نموده و در نهایت یک ژنوم تعیین هویت شده را به‌دست می‌آورند(۱۰- ۸، ۱۷). اکثر پروژه ها در حال حاضر در مرحله تولید داده‌ها هستند، به‌طوری‌که اطلاعات به‌دست آمده هر روز افزایش یافته و به مرور زمان کامل تر می‌شوند. در سطور آتی این نوشتار، برخی روش‌های مرسوم و همچنین پایگاه‌های اطلاعات ژنومیکی تعدادی از انگل‌های مهم پزشکی آورده شده است.

نقشه فیزیکی یا Physical map

این نقشه نشان دهنده موقعیت ژن‌ها نسبت به هم‌دیگر، محل پلی مورفیسم های ژنی، اندازه ژن‌ها، تعداد توالی‌های تکراری، محل توالی‌های تکراری، پراکندگی توالی‌های تکراری در ژنوم و... می‌باشد. به عبارتی نقشه ای از ترکیب ژن‌ها و نشان‌گرها در طول یک کروموزوم و فاصله آن‌ها از هم برحسب واحدهایی مانند نوارهای سیتوژنتیک و نقشه برداری‌های فیزیکی مانند نقشه‌برداری هیبرید پرتویی می‌باشد(۱۸).

نقشه های ژنتیکی یا Genetic map

نقشه‌های ژنتیکی برای بسیاری از ارگانیسم‌های انگلی در دسترس می‌باشد. نقشه ژنتیکی توسط ایجاد نسل و دودمان از والدینی که ژنوتیپ مشخصی دارند، ایجاد می‌گردد. این مشخصه‌ها می‌تواند شامل علایم فنوتیپی (نظیر رنگ چشم و یا مقاومت به عفونت نماتودهای فیلری) و یا برخی مارکرهای ژنتیکی نظیر میکروستلایت‌ها وRFLP [1] باشد. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که شباهت ژنتیکی و ارتباط معنی‌داری در نقشه ژنتیکی بین راسته‌ای وجود دارد. لذا نقشه ژنتیکی برای تقسیم‌بندی صحیح موجودات و قرار دادن آن‌ها در یک راسته و رده مربوط به همدیگر مورد نیاز است که علم انگل شناسی نیز از آن نمی‌تواند مستثنی باشد(۲۲-۱۹).

HAPPY mapping:

نقشه ژنتیکی لزوماً محدود به موجوداتی که دارای تکثیر جنسی هستند می‌باشد. برای فائق آمدن به این مسئله (عدم وجود تکثیر جنسی) یک روش به‌نام HAPPY Mapping [2] توسعه یافته است. این روش برای اولین بار توسط Paul H. Dear و Peter R. Cook در سال ۱۹۸۹ مطرح گردید. توسط این روش که در آن آنالیز تقریبی DNA هاپلوئید ارگانیسم توسط تکنیک PCR صورت می‌گیرد، می‌توان ارتباط بین دو یا چند توالی ژنومی را بررسی نمود. این روش به شکل برون‌تنی/

1. Restriction Fragment Length Polymorphism
2. mapping based on the analysis of approximately Haploid DNA samples using the Polymerase chain reaction

In vitro انجام می‌گیرد و دارای سرعت و دقت بالایی می‌باشد. هم‌چنین برای شروع کار میزان DNA بسیار کمی مورد نیاز بوده و نکته مهم دیگر در مورد روش HAPPY mapping این است که نسبت بالای T و A در مناطق ژنی ارگانیسم بر کارآیی آن تأثیری ندارد. به عنوان مثال در انگل مالاریای انسانی پلاسمودیوم فالسی پاروم بیش از ۸۰ درصد محتوای ژنومی را نوکلئوتیدهای T و A تشکیل می دهد و T و A در مناطق ژنی مقداری بیش از مناطق بین ژنی و مناطق غیر کد کننده است(۹، ۲۳). مقدار کم نوکلئوتیدهای G و G در گونه فالسیپاروم سبب ناپایداری در ژنوم انگل مالاریا و در نتیجه تغییرات آنتی ژنیکی بالا می‌شود که این عامل از علل اصلی در ناکامی ساخت واکسن مالاریا می‌باشد.

کاریوتایپینگ

آرایش و مرتب کردن کروموزوم‌ها براساس شکل و اندازه به ترتیب از بزرگ به کوچک را کاریوتیپ (Karyotype) گویند. جهت به‌دست آوردن شکل فیزیکی ژن‌ها، ترسیم نقشه ژنتیکی و سایر مارکرهای ملکولی تعیین کاریوتیپ نیاز می‌باشد که این کار قدم اصلی و مهم برای شروع کارهای ژنومیکس می باشد. به‌طور عمده کروموزوم‌ها را می‌توان از طریق مورفولوژی و شکل ظاهری آن‌ها (به‌عنوان مثال کروموزوم جنسی در نماتودهای فیلری) و نیز از طریق باندهای تشکیل شده در رنگ آمیزی بازوهای کروموزومی آن‌ها را بطور نسبی از هم تفریق داد.

در تک یاخته ها کروموزوم‌ها به قدری کوچک هستند که نمی‌توان آن‌ها را از هم تفریق داد. لذا در این مواقع از ژل الکتروفورزیس استفاده می‌شود. کاریوتایپینگ توسط ژل الکتروفورزیس در اغلب گونه‌های انگلی تک یاخته‌ای قابل استفاده است و کاریوتایپینگ مقایسه‌ای با ارزش و قابل قبولی را در حد جنس و گونه ارایه می‌نماید(۲۷-۲۴).

انگشت نگاری DNA

ساختمان شیمیایی همه DNA ها شبیه هم بوده و تنها اختلاف بین موجودات، در ترتیب جفت بازها هست. بیش از میلیون‌ها جفت باز در DNA هر موجودی وجود دارد. هر ارگانیسم دارای توالی مختلفی است که با استفاده از تعیین توالی جفت بازهای آن‌ها، هر موجود می‌تواند شناخته شود (دقیقاً مثل اثر انگشت در انسان). در هر صورت، چون بیش از میلیون‌ها جفت باز وجود دارد تعیین توالی بسیار وقت‌گیر می‌باشد. انگشت نگاری DNA بر اساس وجود چند شکلی‌های توالی (Sequence polymorphisms) است. این چند شکلی‌ها، حاصل تفاوت‌های کوچک (معمولاً تغییرات تک جفت بازی) در توالی‌ها هستند. در این روش همانند روش ساترن بلاتینگ ژنوم را در معرض آنزیم‌های اگزونوکلئازی محدودالاثر قرار می‌دهند ولی قطعات حاصله را روی ژل آگارز برده و پس از رنگ‌آمیزی، از ژل عکسبرداری می‌نمایند. بالاخره سایزهای مختلف قطعات DNA و تفاوت مابین قطعات، مورد بررسی قرار می‌گیرد(۳۰- ۲۸).

شناسایی توالی‌های رونویسی شده یا EST[1]

EST به توالی‌های کوتاه ۵۰۰- ۲۰۰ نوکلئوتیدی از cDNA اطلاق می‌گردد و یکی از بهترین و قابل اعتمادترین راه‌های شناسایی واحدهای رونویسی می‌باشد. ولی باید توجه کرد که EST ها طول کامل ژن‌ها و جهت آن‌را مشخص نمی‌کنند. بلکه این توالی‌ها کوتاه بوده و از یک یا دو انتهای هر رشته کلون شده با یک‌بار توالی یابی مشخص می‌گردند.

برای شناسایی ژن‌های بیان شده ابتدا توالی مورد نظر به صورت کاملاً تصادفی با پرایمر بریده و به شکل mRNA استخراج و جدا می‌کنیم. سپس آن را به کمک آنزیم ترانس کریپتاز معکوس به cDNA تبدیل کرده و در نهایت مکمل cDNA حاصل را به دست می‌آوریم.

1. Expressed Sequence Tags

حال می‌توان با تعیین توالی cDNA به دست آمده، توالی ژن بیان شده مورد نظر را مشخص نمود. توالی‌های منتخب حداقل باید ۱۰۰bp باشند و همان‌طور که گفته شد در طی پروژه‌های EST چند صدهزار نمونه‌برداری تصادفی صورت می‌گیرد. بنابراین وجود تکرارهای پی در پی یک EST به عنوان نماینده ژن مورد بررسی، با تعداد رونویسی آن ژن ارتباط مستقیم خواهد داشت. در نهایت می‌توان این توالی ها را سرهم بندی کرده و توالی ژن و ژنوم را به دست آورد(۳۳-۳۱).

تعیین توالی ژنوم

بررسی تعیین توالی یک ژنوم نشان می‌دهد که آیا یک توالی به دست آمده برای یک DNA، در برگیرنده یک ژن هست یا خیر؟ اگر وجود دارد در کجای زنجیره DNA قرار دارد و آنزیمی که کد می‌کند چه نقشی در سلول یا فرآیندهای حیاتی ایفا می‌کند؟ برای تعیین توالی ژنوم انگل‌ها همانند سایر موجودات، از چند روش که تقریباً مشابه هستند استفاده می‌شود. انتخاب روش تعیین توالی به منابع و تسهیلات موجود، بیولوژی ژنی ارگانیسم و نیازهای پژوهشگر بستگی دارد(۱،۵،۶،۱۰). پیشرفت در فن آوری و تکنیک‌هایی که برای تعیین توالی DNA استفاده می‌شود، دست یابی به تعیین توالی تعداد فزاینده‌ای از ژنوم‌های پیچیده انگلی را توسط شیوه‌هایی مقرون به صرفه‌تر، سریع‌تر و دقیق‌تر امکان‌پذیر ساخته است. ژنوم انگل‌ها دارای اندازه‌های متفاوت، میزان متغیر نوکلئوتید و نیز سطح پلی مورفیسم بالایی می‌باشند. لذا با توجه به ویژگی‌های ذکر شده، از بین روش‌های متعدد تعیین توالی، تعداد معدودی از آن‌ها در توالی یابی ژنوم انگل‌ها بیش‌ترین کاربرد را دارند(۹).

روش های مختلف تعیین توالی DNA

روش ماکسام گیلبرت: این روش یک روش شیمیایی است که برای تعیین توالی قطعه مورد نظر، با آنزیم فسفاتاز فسفات‌های انتهایی '5 رشته DNA را برداشته و با استفاده از ATP کیناز، فسفات نشاندار را به انتهای '5 متصل می‌نمایند. سپس با حرارت دو رشته DNA را از هم جدا کرده و آن را به صورت تک رشته‌ای در می‌آوریم(۱،۱۰).

روش سانجر: این روش یک روش آنزیمی می‌باشد که در آن به جای دزاکسی ریبوز رشته DNA، دی دزاکسی ریبوز جایگزین می‌شود. در این روش از قطعه کلینو DNA پلیمراز ۱ که خاصیت پلیمرازی دارد، استفاده می‌شود. برای تعیین توالی قطعه مورد نظر ابتدا آن را به‌صورت تک رشته‌ای در آورده و در چهار لوله جدا (هر کدام حاوی یک نوع نوکلئوتید جایگزین) ریخته و در ادامه با پرایمرهای از قبل طراحی شده مجاور می‌کنیم(۱، ۱۰). امروزه تعیین توالی DNA به صورت اتومات انجام می‌شود که از ۴ نوع پرایمر مختلف که هرکدام توسط مواد فلورسانت متفاوت نشاندار شده است استفاده می‌شود و در نهایت اطلاعات به دست آمده با کامپیوتر آنالیز می‌گردد(۱،۱۰). در گذشته نه چندان دور (حدود ۱۰ سال قبل)، دستگاه‌های DNA Sequencer برای توالی یابی مورد استفاده قرار گرفتند. این دستگاه‌ها در هر بار آزمایش می‌توانستند حداکثر ۸۰۰ تا ۱۰۰۰ نوکلئوتید را شناسایی نمایند که به عنوان دستگاه‌های DNA Sequencer نسل اول شناخته می‌شوند. امروزه نسل دوم و سوم از این دستگاه‌ها، قادرند در مدت زمان کم‌تری تا چند میلیون نوکلئوتید را شناسایی کنند.

علاوه بر موارد فوق، در سال‌های اخیر پیشرفت‌های چشم‌گیری در روش‌های تعیین توالی انجام شده است که برخی از آن‌ها در جدول شماره ۱ به‌طور خلاصه ذکر شده است(۳۷-۳۴).

توالی کل ژنوم، عمدتاً با استفاده از دو استراتژی یا روش، و با استفاده از تکنیک تعیین توالی انجام می‌گردد که عبارتند از:

روش Clone-by-Clone

یکی از رایج‌ترین روش‌ها برای تعیین توالی کل ژنوم می‌باشد که دارای انواع گوناگونی می‌باشد. از این روش برای تعیین توالی انسان، سایر موجودات و از جمله پروژه‌های تعیین توالی ژنومی انگل‌های

جدول شماره ۱: برخی از روش‌های جدید که برای تعیین توالی

روش (Method)	طول قطعه‌های مورد بررسی	دقت روش(درصد)	طول قطعه تعیین توالی شده در هر رانش	زمان مورد نیاز برای هر رانش	مزایا	معایب
Single-molecule real-time sequencing	۲۹۰۰ نوکلئوتید	٪۸۷-۹۹	۳۷-۳۵ هزار نوکلئوتید	۳۰ دقیقه تا ۲ساعت	- طولانی ترین قطعه‌های مورد بررسی - سرعت بالا	- بازده پایین - نیاز به تجهیزات گران قیمت
Ion Torrent sequencing	۲۰۰ نوکلئوتید	٪۹۸	بیش از ۵ میلیون نوکلئوتید	۲ ساعت	- نیاز به تجهیزات ارزان قیمت - سرعت بالا	- احتمال تشکیل هموپلیمر
Pyrosequencing	۷۰۰ نوکلئوتید	٪۹۹/۹	۱ میلیون نوکلئوتید	۲۴ ساعت	- طول بلند قطعه تعیین توالی شده - سرعت بالا	- گران - احتمال تشکیل هموپلیمر
Sequencing by synthesis	۲۵۰-۵۰ نوکلئوتید	٪۹۸	بیش از۳ میلیارد نوکلئوتید	۱۰-۱ روز	قدرت عملکردی بالا	- نیاز به تجهیزات گران قیمت
SOLiD sequencing	۵۰ نوکلئوتید	٪۹۹/۹	۱/۴-۱/۲ میلیارد نوکلئوتید	۲-۱ هفته	قیمت مناسب	- سرعت پایین نسبت سایر روشها
Chain termination	۹۰۰-۴۰۰ نوکلئوتید	٪۹۹/۹	نا محدود	۲۰ دقیقه تا ۳ساعت	مفید برای بسیاری از طرح‌های کاربردی	- بسیار گران

تریپانوزوما بروسئی و همچنین لیشمانیا ماژور استفاده شده است(۳۸، ۳۹). اولین کار برای انجام این روش، نقشه برداری کروموزومی و سپس بریدن DNA به قطعه‌های بزرگ ۴۰ تا ۳۰۰ کیلو باز (kb) می‌باشد. پس از شناسایی قطعه‌های مشترک، این قطعات دوباره به قطعه‌های ژنی کوچک‌تر (۳kb-۱) تقسیم و کلون شده و در نهایت تعیین توالی هریک از قطعات جداگانه انجام می‌گیرد که با گردآوری این اطلاعات، توالی کل ژنوم موجود مشخص می‌گردد. قابل ذکر است به طور عمده سه نوع وکتور در این روش استفاده می‌شوند که عبارتند از کروموزوم‌های صناعی مخمری (YAC)، کروموزوم‌های صناعی باکتریایی (BAC) و کاسمیدها(۱، ۳، ۹).

روش Shotgun

روش دیگر که جایگزینی برای روش Clone-by-Clone است، روش تعیین توالی کل ژنوم Shotgun (Whole Genome Shotgun= WGS) می‌باشد که توسط سانجر در سال ۱۹۸۲ معرفی شد. برای انجام این روش ابتدا کل ژنوم موجود را به قطعاتی شکسته و کتابخانه ژنومی موجود را که حاوی قطعات ۲۰۰۰-۱۰۰۰۰ جفت بازی است، ایجاد می‌کنند (کتابخانه ژنومی یعنی مجموعه‌ای از یک وکتور یا ناقل که هر یک حاوی یک قطعه از ژنوم موجود مورد نظر باشد). سپس این قطعات به طور تصادفی تعیین توالی و با توجه به همپوشانی آن‌ها، گردآوری می‌شوند. از جمله مزایای این روش نسبت به Clone-by-Clone عدم نیاز آن به نقشه فیزیکی موجود است. از معایب این روش نیز می‌توان به نیاز آن به دستگاه‌ها و نرم افزارهای پیشرفته برای جمع کردن و تفسیر اطلاعات به دست آمده اشاره نمود. همچنین برخلاف روش Clone-by-Clone، در این روش برای به دست آوردن نتیجه و تعیین توالی، جمع شدن کل اطلاعات ژنومی ابتدا مورد نیاز است(۳، ۹). برخی از پروژه‌های توالی یابی انگلی که با این روش انجام شده اند عبارتند از:

- Trypanosoma cruzi (http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tca1/)
- Toxoplasma gondii (http://www.sanger.ac.uk/Projects/T_gondii/)
- Plasmodium vivax (http://www.tigr.org/tdb/e2k1/pva1/)
- Cryptosporidium parvum (http://www.parvum.mic.vcu.edu/)
- Giardia lamblia (http://jbpc.mbl.edu/Giardia-HTML/index2.html)
- Entamoeba histolytica (http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_histolytica/)
- Schistosoma mansoni (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_mansoni)

کاربردهای تعیین توالی ژنوم

ژنومیکس برای یافتن داروهای جدید، ژن‌های جدید، دستیابی به ترانس کریپتومیکس، پروتئومیکس، اینتراکتومیکس، متابولومیکس، سیستومیکس و سیستم بیولوژی، یافتن نقش DNA غیرکدکننده، انجام پروژه‌های ژنی، شناسایی توالی‌های تکراری و موتاسیون‌ها، شناسایی ارتباطات تکاملی بین موجودات و غیره کاربرد دارد(۱۰-۵).

آشنایی با چند نرم افزار در رابطه با ژنومیکس

clustal w

همان نسل سوم از سری برنامه‌های clustal است که در سال ۱۹۹۴ انتشار یافت. سرور اصلی این نرم‌افزار در سایت ebi واقع است و می‌توان از سایت http://www.ebi.ac.uk/Tools/sequence.html مورد استفاده قرار داد. این برنامه به طور وسیعی برای هم‌ردیفی چند گانه توالی‌های اسید نوکلئیک و پروتئین برای رسم درخت فیلوژنیکی استفاده می‌شود و دارای صحت نتایج، قابلیت انتقال برنامه به جای دیگر و راحتی استفاده توسط کاربر است. از مشخصات ورژن‌های جدید و مزایای آن می‌توان به خروجی با فرمت fasta و nexus، قابلیت پرینت نتایج و رسم سریع‌تر درخت فیلوژنی اشاره نمود. این نرم افزار عمل هم‌ردیفی چند گانه را به صورت جهانی/ Global انجام می‌دهد(۴۰،۴۱).

BLAST

BLAST از حروف اول عبارت Basic Local Alignment Search Tool به معنی ابزار جستجوی هم‌ردیفی گرفته شده است. اساس آن مقایسه یک توالی جدید با توالی‌های موجود در پایگاه‌های داده به وسیله ردیف کردن توالی جدید با ژن‌های تعیین هویت شده قبلی است. هدف اصلی آن پیدا کردن نواحی دارای شباهت مابین توالی‌ها است که از نتایج به‌دست آمده می‌توان سر نخ‌هایی در مورد ساختمان و عملکرد توالی‌های جدید و تاریخچه تکاملی و شباهت آن با سایر توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ها به‌دست آورد. این نرم‌افزار نیز در سایت http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi قرار دارد.

BLAT

BLAT نیز که از حروف ابتدایی عبارت Blast Like Alignment Tool تشکیل شده، نرم افزاری است که همانند BLAST برای مقایسه توالی ژنومی و پروتئینی به‌کار می‌رود و توسط جیم کنت معرفی گردیده است. این نرم افزار نسبت به نرم افزارهای قدیمی مانند BLAST بسیار سریع‌تر بوده و قدرت مقایسه توالی‌های ژنومی هم به‌صورت DNA و هم RNA را دارد. همچنین به‌کارگیری این نرم افزار نیازمند کامپیوترهای پیشرفته و گران‌قیمت نبوده و به سهولت قابل انجام است(۴۲).

سایت مرکزی برای دسترسی به ژنوم انگل‌ها در کشور انگلیس با کمک WHO-TDR با نشانی http://www.ebi.ac.uk/parasites/parasite-genome.html ایجاد شده است. هم‌چنین برخی سایت‌های اختصاصی در مورد انگل‌ها در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که علی‌رغم پیشرفت‌های گسترده در شاخه های علم پزشکی، هنوز بیماری‌های عفونی و بیماری‌های انگلی به عنوان بخشی از این عفونت‌ها، تعداد زیادی از افراد جوامع مختلف را مبتلا می‌سازند و باعث بروز علایم بالینی خفیف تا شدید و حتی در برخی مواقع باعث مرگ مبتلایان می‌شوند(۸). نیازمندی به واکسن، ساخت داروهای جدید به دلیل بروز مقاومت‌های دارویی، کمک به تشخیص عفونت‌ها، شناسایی پاتوژنیسیته، کنترل و پیشگیری، بررسی ارتباط و چگونگی سازگاری انگل و میزبان با هم و... در عفونت‌های انگلی نیاز مبرم به استفاده از ژنومیکس را پیش می‌آورد(۲۱،۴۳،۴۴). به عنوان مثال با تعیین توالی ژنوم لیشمانیا ماژور که هم نقشه فیزیکی و هم نقشه ژنی آن به دست آمد محققان توانستند ژن‌های عامل در بیماری و شدت آن را شناسایی نموده و شروع به تحقیقات گسترده‌ای جهت ساختن واکسن علیه بیماری لیشمانیازیس نمایند(۱۸).

هم‌چنین در مطالعات انگل شناسی انجام شده به کمک ژنومیکس، تحقیقاتی روی نسب‌شناسی انگل‌ها، بررسی ارتباط انگل و میزبان، فیزیولوژی، بیوشیمی، بیولوژی، تاکسونومی و... انگل‌ها صورت گرفته است که بررسی این موارد در مقیاسی کلان تر، خود

جدول شماره ۲: برخی سایت های اختصاصی در مورد تحقیقات ژنومی در انگل ها

Parasite genome central resources	
Parasite-Genome WWW site	http://www.ebi.ac.uk/parasites/parasite-genome.htm
Parasite-Genome BLAST server	http://www.ebi.ac.uk/blast2/parasites.html
Parasite-Genome Proteome Analyses	http://www.ebi.ac.uk/parasites/proteomes.html
Parasite Genome email network	parasite-genome@jiscmail.ac.uk
Parasite Genome contact	Martin Aslett aslett@ebi.ac.uk
Structural Genomics of Pathogenic Protozoa	http://www.sgpp.org
The Molecular Parasitology Network	http://www.rna.ucla.edu/par/molpar/index.html
Malaria (*Plasmodium*) genome project	
PlasmoDB	http://PlasmoDB.org
Malaria gene identification program	http://parasite.vetmed.ufl.edu/
Malaria genome sequencing at the Sanger Institute	http://www.sanger.ac.uk/Projects/P_falciparum
Malaria genome sequencing at TIGR	http://www.tigr.org/tdb/edb/pfdb/pfdb.html
Malaria genome sequencing at Stanford	http://sequence-www.stanford.edu/group/malaria/index.html
NCBI Malaria Genetics and Genomics	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Malaria/
Toxoplasma gondii genome project	
ToxoDB and *T. gondii* genome project WWW site	http://www.ebi.ac.uk/parasites/toxo/toxpage.html
Toxoplasma EST program	http://genome.wustl.edu/est/toxo_esthmpg.html
Cryptosporidium parvum genome project	
C. parvum genome sequencing project	http://www.parvum.mic.vcu.edu/
C. parvum EST project	http://medsfgh.ucsf.edu/id/CpTags/home.html
Entamoeba histolytica genome project	
TIGR *E. histolytica* genome sequencing	http://www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1/
African trypanosome (*T. brucei*) genome project	
T. brucei genome project WWW site	http://parsun1.path.cam.ac.uk
Sanger Institute *T. brucei* genome sequencing	http://www.sanger.ac.uk/Projects/T_brucei/
TIGR *T. brucei* genome sequencing	http://www.tigr.org/tdb/mdb/tbdb/index.html
Trypanosoma cruzi genome project	
TIGR *T. cruzi* genome sequencing	http://www.tigr.org/tdb/mdb/tcdb/
Swedish *T. cruzi* genome sequencing	http://cruzi.genpat.uu.se/
Swedish *T. cruzi* EST sequencing	http://www.genpat.uu.se/tryp/tryp.html
Leishmania genome project	
Leishmania genome project WWW site	http://www.ebi.ac.uk/parasites/leish.html
Sanger Institute *L. major* genome sequencing	http://www.sanger.ac.uk/Projects/L_major/
Brugia malayi genome project	
Genome project WWW site	http://nema.cap.ed.ac.uk/fgn/filgen.html
Onchocerciasis WWW site	http://math.smith.edu/OnchoNet/OnchoNet.html
EST projects on parasitic nematodes	
Edinburgh parasitic nematodes EST project	http://www.nematodes.org/
GSC-WUSTL parasitic nematode EST Project	http://www.nematode.net
Schistosoma genome project	
Schistosome genome project WWW site	http://www.nhm.ac.uk/hosted_sites/schisto/

بـه حـوزه علمـی گـسترده‌تـری بـه نـام متـاژنومیکس (Metagenomics) نیـاز دارد(۴۵). ژنومیکـس شنـاخت مـا از ارگانیـسم‌هـای زنـده را از سـطح ملکـولی تـا سـلول، همـه ارگانیـسم و بـالاخره در سـطح جمعیـت متحول می‌کنـد و ادراک مـا را از تکامـل و روابـط بـین گونه‌ها ارتقاء می‌دهد. لذا با توجه بـه نکـات ذکـر شـده دو رشـته انگـل‌شناسـی و ژنـومیکس رابطـه تنگـاتنگی با هم‌دیگر داشته و آشنایی با روش‌هـای بررسـی ژنـومی و ملکولی برای رسیدن به اهداف فوق ضـروری بـه نظـر می‌رسد.

References

1. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, et al. Molecular Cell Biology. 6th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2008.
2. Teixeira SM, Vieira LQ, Gazzinelli RT. Genomics, pathogenesis and control of infection with protozoan parasites. Trends Parasitol 2002; 18(2): 52-54.
3. Johnston DA, Blaxter ML, Degrave WM, Foster J, Ivens AC, Melville SE. Genomics and the biology of parasites. Bioessays 1999; 21(2): 131-147.
4. Kazemi A, Nahaei MR, Akhi M, Sorosh MH, Sadegi J. Drawing of Phylogenetic Tree for Bacteria Using Bioinformatic Software. The 7th Iranian Congress of Microbiology; 2005 Feb 1–3, Semnan, Iran.
5. Tarleton RL, Kissinger J. Parasite genomics: current status and future prospects. Curr Opin Immunol 2001; 13(4): 395-402.

6. Gutierrez JA. Genomics: from novel genes to new therapeutics in parasitology. Int J Parasitol 2000; 30(3): 247-52.
7. Fan E, Baker D, Fields S, Gelb MH, Buckner FS, Van Voorhis WC, et al. Structural genomics of pathogenic protozoa: an overview. Methods Mol Biol 2008; 426: 497-513.
8. Sakata T, Winzeler EA. Genomics, systems biology and drug development for infectious diseases. Mol Biosyst 2007; 3(12): 841-848.
9. Melville SE. Parasite Genomics Protocols (Methods in Molecular Biology). Totowa, NJ: Humana Press; 2004.
10. Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki R. Molecular Medical Parasitology. California: Academic Press; 2002.
11. Winstead ER. Sizing up genomes: Amoeba isking. Available from. http://www.genom-enewsnetwork.org/articles/02_01/Sizing_genomes.shtml. Accessed February 12, 2001.
12. Weedall GD, Hall N. Evolutionary genomics of Entamoeba. Res Microbiol 2011; 162(6): 637-645.
13. Brindley PJ, Mitreva M, Ghedin E, Lustigman S. Helminth genomics: The implications for human health. PLoS Negl Trop Dis 2009; 3(10): e538.
14. Han ZG, Brindley PJ, Wang SY, Chen Z. Schistosoma genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. Annu Rev Genomics Hum Genet 2009; 10: 211-240.
15. Martin J, Abubucker S, Wylie T, Yin Y, Wang Z, Mitreva M. Nematode.net update 2008: improvements enabling more efficient data mining and comparative nematode genomics. Nucleic Acids Research 2009; 37: 571-578.
16. Gull K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. Int J Parasitol 2001; 31(5-6): 443-452.
17. Kazemi A. Bioinformatically processing of molecular data. The First Congress of Molecular Microbiology. 2005; 25, Shahryar, Iran.
18. Ivens AC, Lewis SM, Bagherzadeh A, Zhang L, Chan HM, Smith DF. A physical map of the Leishmania major Friedlin genome. Genome Res 1998; 8(2): 135-145.
19. Blake DP, Billington KJ, Copestake SL, Oakes RD, Quail MA, Wan KL, et al. Genetic mapping identifies novel highly protective antigens for an apicomplexan parasite. PLoS Pathog 2011; 7(2): e1001279.
20. Tait A. Genetics and genomics converge on the human blood fluke. Genome Biol 2009; 10(6): 225.
21. Sonstegard TS, Gasbarre LC. Genomic tools to improve parasite resistance. Vet Parasitol 2001; 101(3-4): 387-403.
22. Nemetschke L, Eberhardt AG, Viney ME, Streit A. A genetic map of the animal-parasitic nematode Strongyloides ratti. Mol Biochem Parasitol 2010; 169(2): 124-127.
23. Piper MB, Bankier AT, Dear PH. A HAPPY map of Cryptosporidium parvum. Genome Res 1998; 8(12): 1299-1307.
24. Bastien P, Blaineau C, Pagès M. Molecular karyotype analysis in Leishmania. Subcell Biochem 1992; 18: 131-187.
25. Foote SJ, Kemp DJ. Chromosomes of malaria parasites. Trends Genet 1989; 5(10): 337-342.
26. Souza RT, Lima FM, Barros RM, Cortez DR, Santos MF, Cordero EM, et al. Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in Trypanosoma cruzi. PLoS One 2011; 6(8): e23042.
27. Contreras-Dominguez M, Moraes CB, Dorval T, Genovesio A, Dossin Fde M,

Freitas-Junior LH. A modified fluorescence in situ hybridization protocol for Plasmodium falciparum greatly improves nuclear architecture conservation. Mol Biochem Parasitol 2010; 173(1): 48-52.

28. Tydén E, Morrison DA, Engström A, Nielsen MK, Eydal M, Höglund J. Population genetics of Parascaris equorum based on DNA fingerprinting. Infect Genet Evol 2013; 13: 236-241.
29. Xiao JC, Xie LF, Zhao L, Fang SL, Lun ZR. The presence of Mycoplasma hominis in isolates of Trichomonas vaginalis impacts significantly on DNA fingerprinting results. Parasitol Res 2008; 102(4): 613-619.
30. Upcroft P. DNA fingerprinting of the human intestinal parasite Giardia intestinalis with hypervariable minisatellite sequences. EXS 1991; 58: 70-84.
31. Abernathy JW, Xu P, Li P, Xu DH, Kucuktas H, Klesius P, et al. Generation and analysis of expressed sequence tags from the ciliate protozoan parasite Ichthyophthirius multifiliis. BMC Genomics 2007; 8: 176.
32. Wang X, Gobert GN, Feng X, Fu Z, Jin Y, Peng J, et al. Analysis of early hepatic stage schistosomula gene expression by subtractive expressed sequence tags library. Mol Biochem Parasitol 2009; 166(1): 62-69.
33. Blaxter M, Aslett M, Guiliano D, Daub J. Parasitic helminth genomics. Filarial Genome Project. Parasitology 1999; 118: S39-51.
34. Boyd SD. Diagnostic applications of high-throughput DNA sequencing. Annu Rev Pathol 2013; 8: 381-410.
35. Thompson JF, Oliver JS. Mapping and sequencing DNA using nanopores and nanodetectors. Electrophoresis 2012; 33(23): 3429-3436.
36. Stranneheim H, Lundeberg J. Stepping stones in DNA sequencing. Biotechnol J 2012; 7(9): 1063-1073.
37. Shendure J, Lieberman Aiden E. The expanding scope of DNA sequencing. Nat Biotechnol 2012; 30(11): 1084-1094.
38. El-Sayed NM, Hegde P, Quackenbush J, Melville SE, Donelson JE. The African trypanosome genome. Int J Parasitol 2000; 30(4): 329-345.
39. Myler PJ, Audleman L, deVos T, Hixson G, Kiser P, Lemley C. Leishmania major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(6): 2902-2906.
40. Kazemi A. Processing of Scientific Data Using Bioinformatic Softwares. 6th Conventional of Iranian Veterinary Clinicians. Tabriz Islamic Azad University, Iran, 2009 July 28-30.
41. Kazemi A. Pourhassan M. An Interactive Bioinformatics Tool of Annotated Bacterial genome. 11th Iranian Pharmaceutical Sciences Conferences. 2008 Aug 18-21, Kerman, Iran.
42. Kent WJ. BLAT the BLAST-like alignment tool. Genome Res 2002; 12(4): 656-664.
43. Rinaudo CD, Telford JL, Rappuoli R, Seib KL. Vaccinology in the genome era. J Clin Invest 2009; 119(9): 2515-2525.
44. Carlton JM, Escalante AA. Comparative evolutionary genomics of human malaria parasites. Trends Parasitol 2008; 24(12): 545-550.
45. Sharma VK, Kumar N, Prakash T, Taylor TD. Fast and accurate taxonomic assignments of metagenomic sequences using MetaBin. PLoS One 2012; 7(4): e34030.