نسل جدید توالی یابی NGS برای توالی ژنوم ، DNA و RNA (cDNA): آشنایی با دستگاههای تعیین توالی نسل سوم

تفاوت نسل دوم توالی یابی NGS با نسل سوم تعیین توالی چیست

در تکنیکهای نسل دوم، قبل از تعیین توالی، برای بدست آوردن شدت سیگنال بیشتر، مرحله تکثیر بواسطه PCR انجام میشود اما در نسل سوم از دستگاههای توالییاب، این مرحله صورت نمی گیرد و بطور مستقیم یک قطعه DNA تک رشته در حین سنتز تعیین توالی می گردد. این امر می تواند منجر به حذف خطاها به هنگام همانندسازی شود. در نتیجه این تکنیکها بسیار ساده تر و ارزان تر از روشهای قبلی می باشند که شامل:

توالی یابی نسل آینده (NGS) : آموزش تکنیک Heliscope (Helicos Single molecule sequencing devic: برای تعیین توالی dna ، ژنوم و RNA (cDNA)

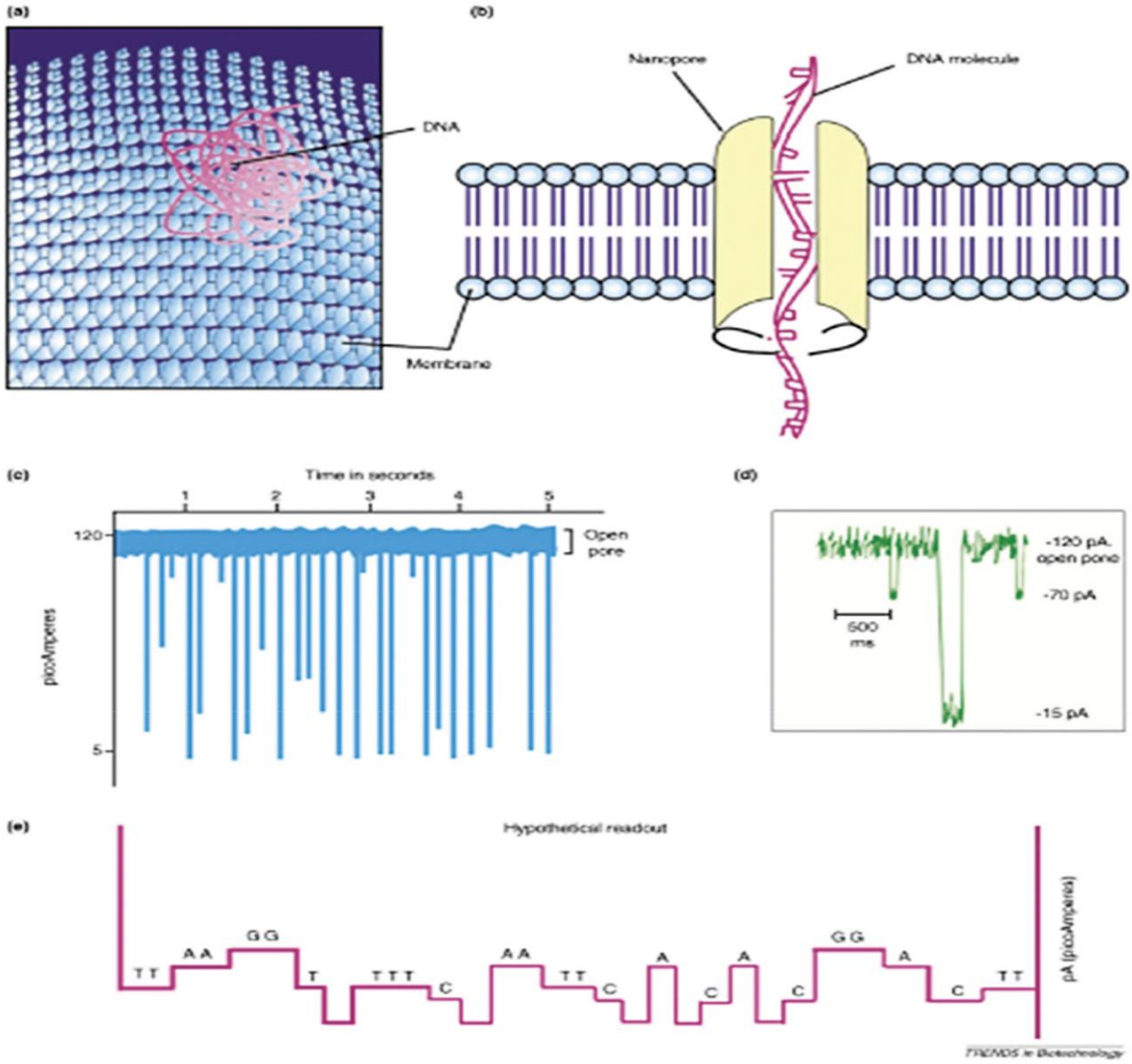
تکنیک Heliscope در سال ۲۰۰۸ توسط شرکت Helicos Bioscince ارائه شد. در این روش، ابتدا ژنوم مورد نظر به قطعاتی از DNA به طول ۳۰ الی ۳۵ جفت باز شکسته شده سپس در اثر ناتوراسیون، این قطعات به حالت تک رشته تبدیل میشوند. در مرحله بعد با استفاده از آنزیم ترمینال ترنسفراز به انتهای ۳ این قطعات تک رشته، دزوکسی آدنوزین تری فسفات را اضافه کرده تا یک دم پلی OA به طول بیش از ۵۰ نوکلئوتید ایجاد شود. سپس این قطعات از انتهای ۳ خود بصورت رندوم به توالیهای مکمل دم پلی dA (توالیهای الیگو ۲۷ بطول ۵۰ نوکلئوتید) که بر روی اسلایدهای شیشهای تعبیه شده اند، متصل شده و در سطح این صفحات از انتهای ۳ خود ثابت می گردند. جهت تعیین توالی، نوکلئوتیدهای ختم دهنده برگشت پذیر که همگی توسط یک رنگ فلورسانس یکسان لیبل شده اند به همراه آنزیم پلیمراز به این صفحات افزوده میشود تا پروسه تعیین توالی بر پایه تکثیر آغاز گردد. در این پروسه از توالی های الیگو آن تعبیه شده بر روی اسلایدهای شیشهای بعنوان پرایمر استفاده می شود . در این تکنیک از نوکلئوتیدهای ختم دهنده برگشت پذیری که انتهای ۳ آنها بواسطه یک گروه ترمیناتور بلوکه نشده است، استفاده میشود. در این نوکلئوتیدها گروه ترمیناتور به تنهایی و یا بصورت متصل به واحد رنگی، به باز آلی متصل می گردد. پس از قرارگیری این دسته از نوکلئوتیدها در زنجیره در حال ساخت، بدلیل تداخلی که بواسطه گروه رنگی و ترمیناتور ایجاد میشود، از عملکرد آنزیم پلیمر از ممانعت می گردد. در نتیجه سنتز رشته جدید بطور موقت، متوقف میشود. در هر مرحله نوکلئوتیدهای ختم دهنده برگشت پذیر مشابهی وارد واکنش می شوند. سپس یک شستشو انجام میشود تا نوکلئوتیدهایی که به زنجیرههای در حال ساخت وارد نشدهاند از محیط حذف گردند. در نهایت جدا شدن رنگ فلورسانس به همراه گروه ترمیناتور آن دسته از نوکلئوتیدهایی که به زنجیره در حال

سنتز وارد شدهاند، نتنها منجر به ساطع شدن نور و ثبت سیگنال مربوطه توسط دستگاه میشود بلکه منجر به از بین رفتن اثر مهاری آنها و در نتیجه ادامه پروسه سنتز نیز می گردد. بدین ترتیب دور بعدی با استفاده از یکسری نوکلئوتیدهای مشابه دیگر آغاز میشود. این روند تا کامل شدن زنجیره در حال ساخت ادامه مییابد و از آنجاکه در هر مرحله نوع نوکلئوتیدهای وارد شده به پروسه مشخص میباشد، می توان به توالی DNA رشته مورد نظر بطور مستقیم و بدون نیاز به تکثیر قطعه دست یافت. این تکنیک قادر به آنالیز میلیونها قطعه DNA تک رشته بطور همزمان میباشد. در این روش بر خلاف روش Solexa، تمامی نوکلئوتیدهای ختم دهنده برگشت پذیر، تنها با یک رنگ فلورسانس لیبل می شوند. استفاده از یک رنگ اجازه می دهد که اندازه گیری در وضوح بالاتری صورت گیرد چراکه در این روش بر خلاف روش Solexa پروسه تکثیر جهت تقویت سیگنال مربوطه صورت نمیگیرد.

توالی یابی نسل جدید : آموزش تکنیک SMRT (Single Molecule Real Time) یا Pac Bio sequencing RS برای تعیین توالی dna ، ژنوم و RNA (cDNA)

این تکنیک توسط شرکت Pacific Biosciences در سال ۲۰۱۰ ارائه شد. در این تکنیک از چیپهایی استفاده می شود که دارای یک فیلم فلزی بسیار باریک می باشند. این فیلم فلزی حاوی هزاران حفره بوده که ZMW (Zero-Mode Waveguid نامیده می شوند. حجم هر ZMW در حدود ۲۰ زپتو لیتر میباشد که یک آنزیم DNA پلیمراز به کف هر یک از این چاهکها متصل شده است. این چاهکها توسط دوربینهای CCD رصد میشوند. این امر امکان تعیین توالی همزمان با سنتز در زمان واقعی را فراهم آورده است. در این روش، در ابتدا ژنوم به قطعاتی بطول ۱۵۰۰ جفت باز شکسته شده و قبل از تک رشته ای شدن، به ۲ سمت این قطعات، آداپتور متصل می گردد. برخلاف سایر تکنیکها، در این روش از آداپتورهای خاصی موسوم به آداپتورهای سنجاق سری استفاده می شود که از لحاظ ساختاری بصورت یک قطعه تک رشته حلقوی میباشند. لذا ساختار ویژه این آداپتورها باعث میشود که قطعه مورد نظر پس از دناتوراسیون به حالت حلقوی تبدیل گردد. نکته جالب توجه در این تکنیک این است که قبل از انتقال این قطعات به چاهکهای مورد نظر، یک پرایمر جهت تکثیر، به هر کدام از آداپتورها متصل میگردد. در نهایت، پس از اتصال آنزیم پلیمراز به توالی پرایمر، مخلوطی از نوکلئوتیدها که هر کدام با رنگ خاصی لیبل شده اند به همراه سایر عوامل مورد نیاز برای پلیمریزاسیون جهت تعیین توالی به داخل هر یک از این چاهکها افزوده می شود. در طی پلیمریزاسیون، بواسطه اتصال هر نوکلئوتید، گروه رنگی مخصوص آن نیز آزاد شده و رنگ خاصی را ساطع میکند که توسط دوربینهای CCD تبت می گردد. در این حالت هر ۲ رشته DNA تعیین توالی می گردد که این امر می تواند منجر به افزایش صحت در تعیین توالی شود. نمایی از آداپتورهای سنجاق سری در شکل ۹ نشان داده شده است. در این تکنیک، هر کدام از نوکلئوتیدها با یکی از چهارنگ فلورسانس (قرمز، آبی،

نارنجی و سبز) لیبل می شوند اما بجای اینکه فلوروفرم به باز آلی متصل شود به گروه فسفات نوکلئوتید متصل می گردد. این امر منجر به کاهش ممانعت فضایی ناشی از رنگ فلورسانس و در نتیجه افزایش راندمان پلیمریزیشن می شود. نکته قابل توجه در این تکنیک این است که بر خلاف سایر روشهای تعیین توالی، نیازی نیست که پس از هر مرحله که نوکلئوتیدها به مخلوط واکنش افزوده می شوند، یک مرحله شستشو صورت گیرد. این مسئله، در کاهش زمان انجام این پروسه نقش دارد. این روش قادر به توالییابی بیش از ۳۰۰۰ نمونه بطور همزمان می باشد

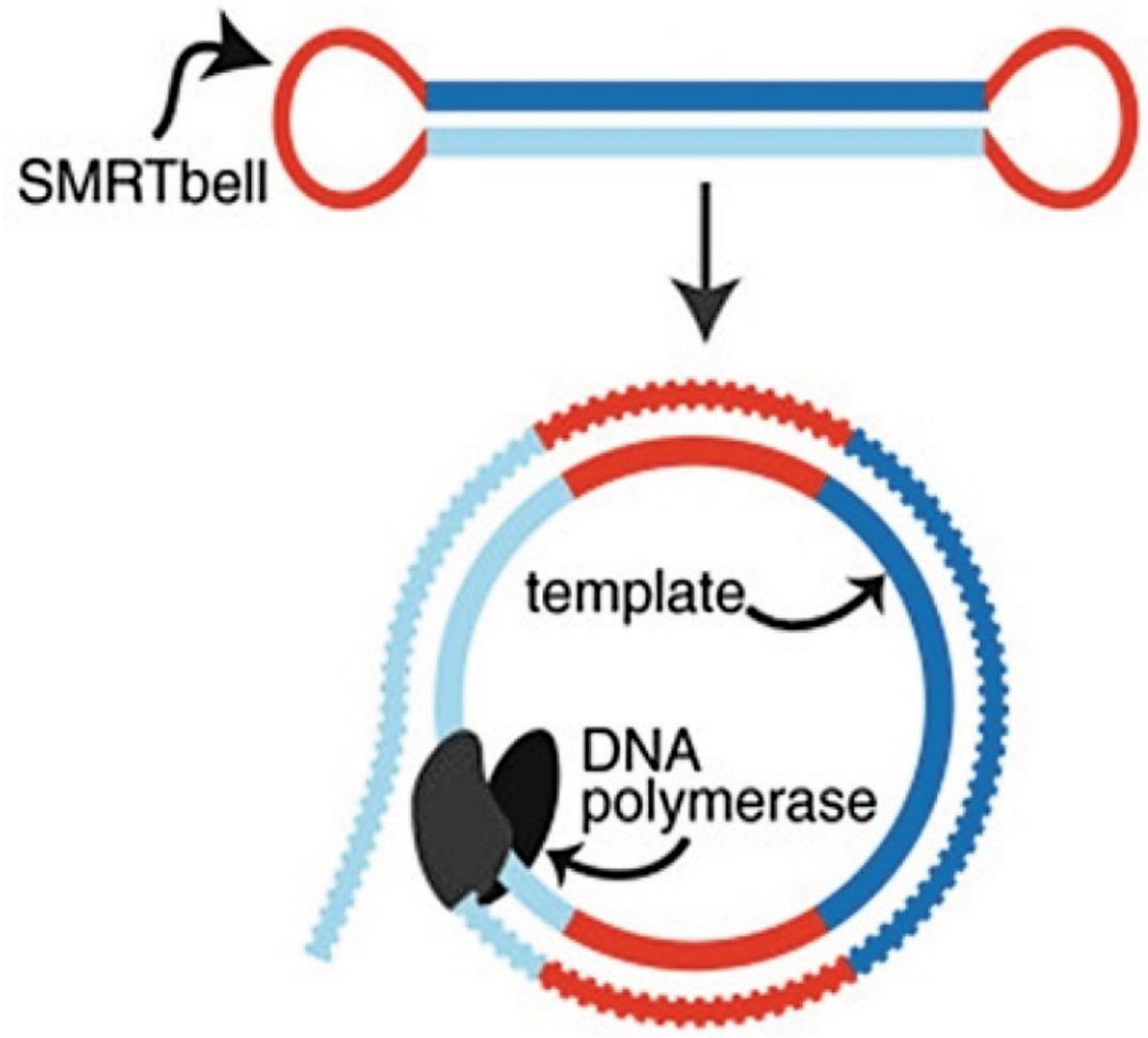


شکل -۱- نمایی از آداپتورهای سنجاق سریSMRTbell))

امروزه تکنیکی موسوم به Pac Bio sequencing RSII بر پایه SMRT ابداع شده است که قادر به تعیین توالی قطعاتی بطول بیش از ۱۰ کیلو باز میباشد. با این شیوه می توان یک ژنوم کامل انسان را در کمتر از ۴ ساعت توالییابی کرد. یکی از محدودیتهای بزرگ این تکنیک این است که بدلیل طول خوانش بالا، میزان خطا نیز افزایش مییابد. اما امکان توالییابی قطعات بزرگتر نیز مزیتی بزرگ به حساب می آید که بویژه در مطالعات متاژنومیکس می تواند بسیار سودمند باشد.

توالی یابی نسل جدید (NGS) آموزش **تکنیک Nanopore Sequencing برای توالی یابی DNA ، ژنوم و RNA (cDNA)**

این روش در سال ۲۰۱۱ توسط شرکت Oxford Nanopore Technologies ارائه شد. در این تکنیک از یک غشاء بسیار نازک که حاوی کانالهایی به قطر ۱ الی ۵/۲ نانو متر میباشد، استفاده می گردد. این کانالها بطور عمده از جنس آلفاهمولایزین می باشند. در حقیقت در این سیستم از آلفا- همولایزین که بواسطه استافیلوکوکوس اورئوس ترشح میگردد، جهت ایجاد کانال استفاده می شود. آلفا- همولایزین یک پروتئین هپتامر بوده که بطور نرمال یک منفذ را در غشاءهای بیولوژیک ایجاد می نماید. قطر داخلی این کانال به گونهای میباشد که تنها DNA به حالت تک رشته می تواند از داخل آن عبور نماید. در دو سمت این کانالها، ۲ الکترود تعبیه شده است. این امر منجر به ایجاد یک جریان یونی در داخل این کانالها میشود. زمانیکه DNA بصورت تک رشتهای (به طول ۵ کیلو باز) از درون این سوراخهای بسیار ریز عبور می نماید بر اساس میزان مقاومت هر یک از نوکلئوتیدها، جریان یونی تغییر مییابد. این تغییرات توسط دستگاهی ثبت میگردد. از آنجاکه این تغییرات برای هر نوکلئوتید متفاوت بوده و مختص به همان نوکلئوتید میباشد، می توان ضمن عبور قطعه تک رشته، به ترتیب توالی نوکلئوتیدی آن نیز پی برد. ورود DNA تک رشته به داخل منفذ نیز بواسطه ولتاژ مثبتی می باشد که در آن سوی منفذ ایجاد می گردد چراکه DNA دارای بار منفی بوده و بواسطه این ولتاژ مثبت به داخل منفذ هدایت می شود. نکته قابل توجه در این تکنیک این است که بر خلاف سایر روشهای تعیین توالی، از پلی مریزیشن جهت تعیین توالی استفاده نمیگردد، این امر دانشمندان را قادر ساخته تا در عرض چند ساعت و با هزینه کمتر از ۱۰۰۰ دلار آمریکایی به کل ژنوم انسان دست یابند. در شکل ۱۰ مراحل این تکنیک نشان داده شده است.



شکل-۲- تعیین توالی به شیوهNanopore Sequencing

البته این روش مشکلاتی را نیز به همراه دارد. یکی از بزرگترین مشکلات این تکنیک این است که در این روش ممکن است DNA سریع تر از حد انتظار از این کانالها عبور نماید. لذا این امر می تواند منجر به بروز خطا در تعیین توالی شود. امروزه تکنیکهای جدیدتری بر پایه Nanopore Sequencing روانه بازار شده است. در این تکنیکها سعی شده است که این محدودیتها بر طرف گردد. بعنوان مثال یک جزء اگزونوکلئازی بر روی این منفذ قرار داده شده است که نوکلئوتیدهای موجود در رشته الگو را یکی یکی میشکند. بدین ترتیب، نوکلئوتیدها بصورت مجزا به داخل منفذ انتقال مییابند. از طرفی در داخل کانالها نیز یک مولکول سیکلو دکسترین جهت اتصال به نوکلئوتیدهای آزاد تعبیه شده است. این امر باعث میشود که این نوکلئوتیدها در اثر واکنش با این مولکول، مدت

زمان طولانی تری در منفذ باقی بمانند. بدین ترتیب تمایز بین نوکلئوتیدها بهتر صورت می گیرد و میزان خطا در تعیین توالی کاهش مییابد. با اینکه می توان از یک تنظیم کننده سرعت ورود DNA بداخل منفذ استفاده کرد تا قطعه مورد نظر با سرعت مناسب به داخل منفذ هدایت گردد. برای این منظور از DNA پلیمر از باکتریوفاژ فی ۲۹ استفاده می شود. در این روش، DNA تک رشته الگو که یک پرایمر به آن متصل شده است، بکار گرفته میشود. آنزیم پلیمراز به پرایمر متصل شده و شروع به سنتز رشته مکمل می نماید. در این حین، این آنزیم همانند یک موتور عمل کرده و منجر به ورود رشته الگو به داخل منفذ می شود. بدین ترتیب که یک توالی الیگونوکلئوتیدی ویژه موسوم به الیگومر بلاکه کننده به انتهای پرایمر متصل می شود. سپس بار مثبت در طرف مخالف منفذ ایجاد می گردد تا DNA به داخل منفذ هدایت شود. نیروی حاصل از این ولتاژ باعث میشود که ۲ رشته DNA از محل این توالی ویژه بصورت مکانیکی از یکدیگر جدا شوند و در نهایت رشته الگو از انتهای ۳ به داخل منفذ وارد میشود. مزیت DNA پلیمر از باکتریوفاژ فی ۲۹ این است که به هنگام ایجاد این ولتاژ از DNA جدا نمی گردد و همچنان به فعالیت خود ادامه می دهد. این پروسه می تواند منجر به کاهش سرعت ورود DNA تک رشته به داخل منفذ و در نتیجه شناسایی بهتر نوکلئوتیدها جهت تعیین توالی گردد.

تاریخچه تکنیک های توالی یابی DNA (نسل اول، نسل دوم و نسل سوم)

تکنیکهای تعیین توالی، انقلاب بزرگی را در عرصه زیست شناسی مولکولی ایجاد کردهاند. از زمان معرفی تعیین توالی بر پایه سنگر ، بسیاری از تکنیکها در جهت افزایش بازدهی تعیین توالی و بطبع کاهش هزینه این پروسه، توسط شرکتهای مختلف ارائه شده است. شرکتهایی از قبیل Pacific Biosciences و ۴۵۴Life Sciences ، خود را بواسطه طول خوانشهای بیشتر از سایر شرکتها متمایز کرده اند. در مقابل شرکتهایی از قبیل Illumina و lonTorrent بواسطه هزینههای پایین تر تعیین توالی، نظر بسیاری از مشتریان را به سوی خود جلب کردهاند. تکنیکهایی از قبیل Solid با وجود طول خوانش های کوچکتر، بدلیل بازدهی بیشتر مطرح شدهاند و یا ابزارهای جدیدی از قبیل نانو پورها که بواسطه شرکت Oxford Nanopore Technologies ارائه شده است، با هزینه بسیار اندک ولی با میزان خطای بیشتر عمل تعیین توالی را انجام میدهند. از این رو، اولین و مهم ترین امر در تکنیکهای تعیین توالی این است که محققین بر اساس ویژگیهای طرح پژوهشی خود، مناسب ترین روش توالی یابی را از نظر کارایی انتخاب نمایند.