گزارشی کوتاه از شرکت در دوره آموزشی NGS در تاریخ ۴ و ۵ بهمن‌ماه ۱۳۹۶ در انستیتو پاستور ایران

short report from the NGS A training course on January 2018 at the Pasteur Institute of Iran

علی زمان میرآبادی

Zaman.a@arc-ordc.ir

رئیس مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر، شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

پیرو مطالب قبلی ارائه شده در خصوص دوره آموزشی miRNA و بعد از مطالب عنوان شده توسط آقای دکتر عبدالله زاده در مابین صحبتهای ایشان آقای دکتر سلامی مدیر تخصصی امیکس مطالبی را در خصوص میکرو ار ان ای عنوان نمودند که بنده در اینجا خلاصه ایی از مطالب ایشان را آورده ام.

Small RNA کمتر از ۲۰۰ نوکلئوتید بوده، به صورت غیربیانی Non coding و یکی از نقش های آنها را در خاموشی بیان ژن Silencing می دانند. در واقع نقش آنها را به‌عنوان Negative regulatory system نیز میدانند. در ادامه ایشان به انواع و مراحل پیشرفت توالی‌یابی ژنوم اشاره نمودند و ۳ مرحله را برای این اقدامات انجام‌شده در نظر گرفتند. اولین گم در مسیر توالی‌یابی روش سنگر بودکه به نام زنجیره انتهایی یا Chain termination نیز معروف است مرحله دوم از پیشرفتهای انجام شده که تحت‌عنوان Next Generation مربوط به reversible termination، pyrosequencing و ligation بود که به ترتیب توسط تکنولوژیهای Illumina/Solexa Hi-Seq، Genome analyzer و Technologies SOLiD انجام گردید. مرحله سوم از توسعه این تکنولوژی که تحت‌عنوان Next-Next Generation نامیده می‌شود در سه رده از تکنولوژیهای Fluorescence، Electonic و Atomic می‌باشد.

NGS کابردهای زیادی دارد که می‌تواند در مطالعاتی همچون Genome resequencing، Metagenomics، Chip-seq، Methyl-seq epigenetics، Gene expression، mRNA sequencing، mRNA map، Rare mutation detection و نهایتا Small RNA sequencing که موضوع این سرفصل دوره می‌باشد.

چارت کاری NGS را می‌توان در ۳ بخش آماده سازی نمونه ها و تهیه کتابخانه، توالی‌یابی و نهایتا تجزیه و تحلیل داده‌ها خلاصه نمود. برای تهیه نمونه ابتدا کل RNA استخراج و توسط کیت‌های مخصوص mRNA جداسازی می‌گردد بسته به روش استفاده‌شده به ۵ تا ۱۰ میکروگرم RNA با یک غلظت ۲۰۰ نانوگرم در میکرو مول نیاز می‌باشد. برای توالی‌یابی میزان RNA integrity number (RIN) بهتر است بیشتر از ۷ باشد و برای مقادیر کمتر از ۵ می‌بایست دوباره چک گردد. در مطالعات miRNA ما چالش‌هایی داریم به عنوان مثال دم پلی A نداریم، مقدار mRNA کم بوده و در حدود ۰.۱ درصد کل RNA می‌باشد و معمولا به صورت Cluster می‌باشد. در میزان GC انها تفاوتهایی وجود دارد و دارای انواع مختلفی تحت عنوان isomiR هستند. miRNA می‌توانند یا به صورت منفرد نقش خود را ایفا کنند یا به صورت چندتایی مثل حالت Co-expressed . برای استفاده و باز خوانی اطلاعات پس از استخراج miRNA و تعیین میزان کمیت و کیفیت نمونه ها برای تعیین پروفایل نمونه ها از سه روش می‌توان استفاده نمود. RNA seq، Microarray، qRT-PCR. برای افزایش دقت آزمایشات نیاز است بعضا تکرارهای بیولوژیکی Biological replication داشته باشیم که دو مرتبه نمونه برداری می

بایست انجام گیرد و گاهی نیازمند تکرار تکنیکی Technical replication هستیم بدینصورت که نمونه ها در داخل دستگاه دوبار خوانش یا Run می شوند. تفکیک و تعیین این دو روش در آزمایشات بسیار مهم است. زمانیکه ما به دنبال قطعات جدید Novel باشیم ضروری است که خوانش ها عمیق تر انجام گیرند. مگر آنکه به دنبال پروفایلینگ باشیم که در این صورت عمق خیلی مهم نیست. برای توالی‌یابی و ساخت کتابخانه ژنی Library construction چند مرحله وجود دارد که به ترتیب شامل استخراج کل RNA و تفکیک و جداسازی size fractionation قطعات ۱۷ تا ۲۵ نوکلئوتیدی اتصال آداپتور ها Adaptor ligation به هر دو انتهای فسفات ۵ و هیدورکسل ۳، رونویسی معکوس pcr و نهایتا توالی‌یابی قطعات CDNA.

ادامه دارد...