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

A short report from the NGS 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

در سال‌های اخیر، بیشتر مطالعات زیست شناسی در حوزه ژنومیک مبتنی بر DNA و RNA بوده و اینکار با تجهیزات متنوع و پیشرفته و عموماً خدمات مبتنی بر توالی یابی کل ژنوم و یا RNA انجام می‌گردد. با این روش توالی یابی، می‌توان بیشتر اطلاعات ژنومی و همچنین داده‌های مربوط به سطح بیان ژن‌ها را استخراج نمود. این گزارش مربوط به دوره‌ای دو روزه است که تحت عنوان فوق بنده در انستیتو پاستور شرکت نمودم و خلاصه آن را در این مطلب عنوان نمودم.

روز اول دوره آموزشی توسط آقای دکتر بختیارزاده از بخش علوم دامی دانشگاه ابوریحان تهران در نوبت صبح ساعت ۹ ارائه گردید و در مورد پیشرفت‌های حاصله در موضوع توالی‌یابی ارائه گردید. عنوان شد که روش‌های توالی یابی بخش‌های گسترده‌ای داشته و در سطوح مختلف انجام می‌گیرد که هر کدام از این بخش‌ها چهارچوب کلی یکسانی دارند اما در سطوح عملیاتی و استخراج داده‌ها با یکدیگر متفاوت می‌باشند. هدف از شرکت در این کلاس آشنایی با چهارچوب فعالیت‌های حوزه نسل جدید توالی‌یابی یا به‌اصطلاح Next Generation Sequencing (NGS) بوده است. بخشی از تجزیه و تحلیل داده‌ها در توالی یابی ژنوم مربوط به miRNA می‌باشد. میکرو RNA ها توالی‌های کوچک اسید نوکلئیک هستند که ساز و کارهای مختلفی در ژنوم از جمله در موضوع خاموشی ژن‌های بیان‌شده دارند و کاربردهای آن در حوزه پزشکی و کشاورزی در حال گسترش است. شناسایی این قطعات کوچک اسید نوکلئیک در سطح ژنوم کار ساده‌ای نیست و شناسایی، کیفیت سنجی، تجزیه و تحلیل این داده‌ها نیاز به پروتکل‌ها و روش‌های مختلفی دارد که نیازمند یادگیری دانش برنامه‌نویسی و خدمات مبتنی بر داده‌های بانک‌های اطلاعاتی می‌باشد. در جلسه بعدازظهر و صبح روز بعد، با نحوه استفاده از تعدادی از این نرم افزارها و دستورها در محیط DOS توسط جناب آقای دکتر بختیارزاده آشنا شدیم. در بعدازظهر روز دوم، آقای دکتر شریعتی، به‌طور اختصاصی و با چند کد دستوری در محیط R studio تجزیه و تحلیل‌ها و رسم گراف‌های آماری کاربردی را تشریح نمودند.

ارائه برخی از مطالب کارگاه توسط آقای دکتر بختیارزاده در خصوص تکنولوژی توالی‌یابی

در سال ۱۹۷۵ به‌وسیله روش سنگر (از روش نوکلئوتیدهای برگشت ناپذیر) ، اولین باکتریوفاژ توالی یابی شد. به دنبال آن ماکسام گیلبرت در سال ۱۹۷۷ بر پایه تجزیه شیمیایی اینکار را انجام دادند. در روش سنگر کیفیت براساس طول و ارتفاع پیک است و از

این روش به دلیل سرعت انجام کار استقبال بیشتری می‌شود. روش سنگر ابتدا در الکتروفورز راه‌اندازی گردید و سپس دستگاه‌های مختلفی بر این اساس طراحی و روانه بازار شد مانند ABI270 سیستم ۱۹۸۷، بعد ABI 377 یا ABI 3730 که همگی بر پایه سنگر و الکتروفورز بودند. سپس دستگاه‌ها براساس کاپیلاری و سیستم لیزری ABI310 بنا نهاده شدند و نهایتاً پروژه ژنوم انسان در سال ۱۹۹۰ توسط پنج کشور و با مشارکت ۵۰ درصدی امریکا و سایر کشورها مثل استرالیا، کانادا، فرانسه و ژاپن رقم خورد. این پروژه ۱۳ سال با هزینه سه میلیارد دلاری به اتمام رسید. در سال ۲۰۰۴ حدود ۱۰ میلیون دلار هزینه توالی یابی برای هر فرد اعلام گردید و البته بعد از آن با سرمایه‌گذاری ۷۰ میلیون دلاری تصمیم گرفتند این هزینه را کاهش دهند که نهایتاً منجر به شروع مرحله جدیدی از خدمات NGS شد. اولین پلت فرم توسط Roch تحت عنوان نسل دوم سیستم‌های توالی یابی راه اندازی گردید. در همه پلت فرم‌های آن ابتدا DNA و cDNA را به قطعات کوچک‌تر تبدیل می‌کردند سپس با آنزیم لیگاز، آداپتورها را متصل و در مرحله بعد آن را در جایگاه‌های خود ثابت می‌نمودند و نهایتاً پس از تکثیر، توالی یابی شروع می‌گردید. بیشتر پلت فرم‌ها در نحوه تکثیر و توالی یابی با یکدیگر متفاوت هستند. برای توالی یابی دو نکته مهم است، چطور تکثیر کنیم و به چه طریق توالی یابی کنیم. در سیستم Roch 454 پس از fragment کردن DNA با تیمارهای شیمیایی یا صوتی، باندهای ۱۲۰۰ جفت باز (bp) می‌گرفتند و دو تا آداپتور متصل می‌کردند در حالی که در سیستم Roch از صفحه یا گویچه‌ها پر از الیگونوکلئوتید مکمل با آداپتور استفاده می‌شد.

در سیستم Roch از یک ماده روغنی استفاده می‌کنند که در ترکیب با آب تشکیل حباب‌های را می‌دهد که حاوی تمامی مواد لازم برای تکثیر قطعات DNA است. هر گویچه وارد یک حباب شده و سپس وارد یک چاهک می‌شود و هر بار که می‌خواهیم باز را بخوانیم می‌بایست چهار باز را وارد کنیم. خطاهای هموپلیمری به دلیل نوع توالی یابی که نمی‌تواند پلیمرهای بیش از شش عددی را از یکدیگر تفکیک کند یکی از مشکلات این سیستم در کنار گران بودن و هزینه‌های مترتب آن بوده است.

در سال ۲۰۱۶ خدمات Roch محدود گردید و تکنولوژی دیگری که از سال ۲۰۰۶ فعالیت می‌کرد تحت عنوان Illumina توسعه یافت. در این سیستم هشت لاین وجود دارد که تایل بندی شده و در داخل هریک تا ۱۰۰ میلیون قطعه را می‌توان قرار داد. با تغییر دما، چون دو سر قطعه آداپتور متصل می‌شود با بالا رفتن دما دو قطعه از یکدیگر باز شده و بعد از ۲۰ سیکل تکثیر از هر قطعه، تعداد زیادی قطعه تولید می‌شود. یکی از مشکلات وارد بر این سیستم، مدت زمان زیاد برای تهیه کتابخانه توالی‌یابی بوده است. چون برخی قطعات ممکن است حالت استیکی (Sticky) پیدا کنند می‌بایست همه آن‌ها را با آنزیم بلانت (Blunt) هضم نمود.

در یکی از دستگاه‌های توسعه یافته از این سیستم مانند Hiseq 2000 قطعات ۷۰ تا ۱۰۰ جفت باز ایجاد می‌شود. در سال ۲۰۱۷ ایلومینا Novaseq را و در سال ۲۰۱۸ نیز Iseq100 را به بازار معرفی کرد که به صورت یک دستگاه Benchtop و بدون استفاده از چهار رنگ بود و تنها با استفاده از یک رنگ و با دو تصویر و دو فرآیند شیمیایی اطلاعات از آن قابل استخراج می‌باشد.

به‌عنوان مثال اگر باز G باشد در دو تصویر نور نمی‌دهد، اگر T باشد در هر دو تصویر نور می‌دهد اگر C باشد فقط در تصویر دوم نور می‌دهد و اگر A باشد فقط در تصویر اول نور می‌دهد. یک کلاستر شامل ۱۰ هزار نوکلئوتید است و همیشه انتهای '۳ کیفیت بازها کم می باشد.

در کنار این روش‌ها، سیستم توالی‌یابی دیگری تحت عنوان Ion Torrent معرفی‌شده بود که توالی‌یابی براساس میزان pH و تغییر شیمیایی انجام می‌گرفت اما باز خطای هموپلیمری داشت.

بعد از نسل دوم، نسل سوم NGS معرفی گردید که اصولاً فاقد PCR بوده و دارای قابلیت مانیتورینگ آنلاین داشته که یکی از آن‌ها PacBio است که دارای آداپتورهای حلقوی می‌باشند و لیبل آن را در دو فسفات آزاد شده گاما و بتا قرار داده‌اند و چاهک‌ها طوری تعبیه شده‌اند که با خارج شدن هر باز می‌توان آن‌ها را خوانش کنند.

یکی از مشکلات این سیستم خطای بالای آن است و ۱۵ درصد توالی‌ها در این سیستم خطا دارند یعنی از هر ۱۰۰ باز ۱۵ عدد آن می‌تواند خطا داشته باشد.

تکنولوژی بعدی Nanopore بوده که در سال ۲۰۱۴ معرفی و در این تکنولوژی DNA دو رشته‌ای، تک‌رشته‌ای شده و براساس شارش بار الکتریکی خوانش می‌شود و همچنین براساس حجم فضایی شناسایی می‌گردد. خطای این سیستم نیز بالا بوده و اولین پلت فرم این کمپانی تحت عنوان Minion و جدیدترین آن تحت عنوان SmidgION می‌باشد.

ادامه دارد ...