

NGS

توالی‌یابی نسل بعدی

(روش‌ها و پروتکل‌های کاربردی)

نویسنده: استیون آر. هد

مترجمین و ویراستاران:

علی زمان‌وزیری

(کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد علوم پزشکی تهران)

فرزانه فخاریان

(انجمن دکتری تخصصی میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشکده علوم پزشکی شهید بهشتی)

سایر مترجمین:

بهنام محمدخراسانی

(کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد علوم تحقیقات)

سمیه محمدی

(کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد)

احسان قدرتی‌شاتوری

(کارشناسی ارشد، دپارتمان ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علم و هنر یزد)

روناک حیدریان

(دانشجوی دکتری تکوین جانوری، دانشگاه خوارزمی)

زیرنظر و مترجم: دکتر آرزو صیاد

(دانشیار گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی شهید بهشتی)

لیسه سخن نویسنده:

تحول در فناوری توالی‌یابی با توان عملیاتی بالا^۱ - توالی‌یابی نسل جدید^۲ (NGS) - علم ژنتیک را در دهه‌ی اخیر تغییر داده‌است. پروتکل‌ها و راه‌های جدید برگرفته از این فناوری برای پاسخ‌گویی به پرسش‌های اساسی در زیست‌شناسی، استراتژی‌های بسیار موثری را برای حل مسائل مربوط به DNA، RNA و تعاملات آن‌ها با پروتئین‌ها فراهم کرده‌است. هر فصل این کتاب، وضعیت فعلی کاربرد NGS را شرح می‌دهد و برای محققان با هر سطح تجربه NGS که می‌خواهند دانش و مهارت‌های عملی خود را در توالی‌یابی highthroughput توسعه دهند منبع مناسبی است. علاوه بر این، نمونه‌هایی از چالش‌های کاربرد NGS در تجزیه و تحلیل داده‌های پروتکل‌های تحقیقات پایه‌ای و همچنین کاربردهای بالینی گنجانده شده‌است.

این کتاب طیف وسیعی از زمینه‌های مختلف تحقیق را در بر می‌گیرد که موضوع مشترک آن روش‌ها و برنامه‌های مربوط به NGS و همچنین تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌های به دست آمده‌است. دو فصل اول به فرایندهای بسیار پویای پروفایل ترجمه و رونویسی یک سلول می‌پردازد. در فصل اول، جداسازی پلی زوم و ریبوزوم توسط گرادیان ساکارز، برای بزرگ‌تر ترجمه استفاده می‌شود، هردو رویکرد شرح داده شده‌است و اطلاعات به دست آمده از هر کدام مورد بحث قرار می‌گیرد. در فصل دوم، جداسازی هسته سلول و رونوشت‌های RNA نوپا^۳ در آن اجازه می‌دهد تا نگاهی به رونوشت^۴ نوپای یک سلول داشته باشیم. فصل سوم به روشی برای شناسایی تغییرات تعداد نسخه‌های کروموزومی^۵ (CNAS) با استفاده از تکثیر کل ژنوم و توالی‌یابی پایین‌گذر کل ژنوم، می‌پردازد. فصل‌های ۴ و ۵ به برنامه‌های توالی‌یابی هدفمندتر^۶ اشاره دارد. در فصل ۴، استفاده از الیگونوکلوئیدهای کوچک طعمه^۷ به منظور «گیرانداختن»^۸ قطعات بلند DNA مرکب از خوانش‌های بلند (~۲ kb)، با استفاده از (Oxford Nanopore, Inc) MinION، امکان شناسایی نواحی ناشناخته‌ی کنار قطعه‌ی طعمه را فراهم می‌کند. فصل ۵ با روشی بسیار کارآمد و مقرون به صرفه به نام «هایپلکس»^۹ سروکار دارد که شناسایی لوکوس‌های پلی‌مریک شناخته‌شده را با رویکرد مبتنی بر «آمپلیکون بسیار تکثیر یافته»^{۱۰} برای جستجوی واریانت‌های ژنتیکی، فراهم می‌کند.

1. high-throughput
2. Next generation sequencing
3. Nascent RNA transcript
4. transcriptome
5. copy number alterations
6. more targeted sequencing applications
7. bait
8. fish out
9. Hi - Plex
10. highly multiplexed amplicon

فصل ۱۵ بر روی بازآرایی ساختاری DNA با استفاده از روشی به نام «Hi - C» تمرکز دارد که با استفاده از NGS، تعاملات کروماتین در هسته را نقشه برداری می‌کند. به منظور مطالعه بازآرایی ساختاری ناشی از فعال‌سازی کروماتین، کتابخانه‌های NGS برای سلول‌های در حال استراحت و فعال CD۴ انسان ایجاد شدند. فصل دیگر (فصل ۱۳) با تغییرات کروموزومی کتابخانه‌های ناک اوت بر پایه CRISPR در کل ژنوم، برای بررسی سیستماتیک عملکرد ژن در سیستم‌های بیولوژیکی سروکار دارد. در این فصل به‌طور خاص، از کتابخانه‌های ناک اوت بر پایه کریسپر کل ژنوم^۱ (GeCKO v۲) استفاده شده است و روش‌هایی برای ایجاد کتابخانه‌های NGS و توالی‌یابی و مورد بحث قرار گرفته است.

فصل‌های متعددی (فصل‌های ۷، ۸، ۱۰ و ۱۴) در رابطه با DNA NGS یا RNA سلول منفرد وجود دارد. فصل ۷ یک استراتژی برچسب‌گذاری post bisulfite آداپتر را برای تولید داده‌های سلول منفرد به منظور مشاهده‌ی وضعیت متیلاسیون سیتیدین در ژنوم توصیف می‌کند. فصل ۱۰ استفاده از آداپترهای اصلاح‌شده را برای آماده‌سازی کتابخانه‌های NGS در یک پروتکل کوچک RNA به نام «CleanTag» (TriLink Biotechnologies Inc) توضیح می‌دهد. استفاده از این آداپترها مانع تشکیل دی دایمر، محصول عمده خطا در آماده‌سازی یک کتابخانه‌ی کوچک استاندارد RNA می‌شود. مولفان نشان دادند که این تکنیک می‌تواند با ورودی‌های بسیار پایین تا سطح سلول واحد (۱۰ pg) کار کند. فصل ۱۴ روش آنالیز سلول واحد برای شناسایی و تشخیص نوع سلول‌های CD۴ نادر در گردش خون با استفاده از Biomark HD، پروفایل ۹۶ ژن مختلف با استفاده از PCR (qPCR) و ایجاد کتابخانه‌های NGS با استفاده از Biomark HD Access Array را توصیف می‌کند. فصل ۸ پروتکلی را برای جداسازی، استخراج و توالی‌یابی سلول‌های منفرد باکتریال و آرکئال با استفاده از FACS، MDA، rRNA ۱۶s و یک رویکرد محاسباتی را برای تضمین کیفیت شرح می‌دهد.

دو فصل دیگر (فصل‌های ۹ و ۱۲) بیش‌تر تمرکز محاسباتی دارند. فصل ۹ با استفاده از تعیین توالی low pass whole genome و اجتماع ارگانایسم‌های غیر مدل با راهنمایی مرجع برای اکتشاف SNP‌ها امکان تهیه ژنوتیپ جمعیت را فراهم می‌کند. فصل ۱۲ یک مسیر محاسباتی را برای آنالیز RNAseq از نمونه‌های بافت حاوی جمعیت ناهمگون و مرکب از چند سلول (به‌عنوان مثال نمونه خون) توصیف می‌کند. این سیر محاسباتی قادر به برآورد ترکیب نوع سلول و سایر اطلاعات آنالیز آماری تولیدشده از پروفایل‌های مجموع RNAseq است.

یکی دیگر از مؤلفه‌های مهم برای تقریباً تمام کارهای مربوط به NGS، به‌ویژه مطالعات مربوط به میکروبیوم، آلودگی است. برای این منظور فصل ۱۱ بر روی بهترین شیوه‌ها و روش‌های دستکاری نمونه، استخراج DNA و یا RNA و تهیه‌ی کتابخانه از نمونه‌های میکروبی و ویروسی برای ایجاد کتابخانه‌های

NGS متمرکز است. فصل ۶، درباره‌ی یک روش جدید برای تولید کتابخانه‌های تعیین توالی از RNA ویروسی است که «Clickseq» خوانده می‌شود؛ این روش از کلیک شیمی^۱ برای اتصال یک از آداپترهای NGS استفاده می‌کند که از خطاهای ناشی از ایجاد کایمر جلوگیری می‌کند و در نتیجه به شدت توانایی تشخیص رویدادهای نوترکیب نادر در RNA ویروسی را افزایش می‌دهد. فصل آخر کتاب (فصل ۱۶) یکی دیگر از روش‌های تهیه‌ی کتابخانه RNAseq برای پروفایل جایگاه‌های خاتمه رونویسی معکوس را شرح می‌دهد. این یک روش کارآمد است و کتابخانه‌های NGS خوبی را از ورودی‌های کم RNA تولیدشده از پروتکل‌هایی نظیر توالی‌یابی RNA نوپدید، رسوب ایمنی^۲ RNA (RIPseq) و پروب ساختاری RACE-^۵ ایجاد می‌کند.

فن‌آوری توالی‌یابی نسل جدید^۳ (NGS) مطالعات باکتریایی و ویروسی را به مطالعات مربوط به گیاهان و موجودات غیرمدل و البته بیماری‌های انسان پیوند زده است. این نیاز به همکاری بین کاربران داده‌های NGS و کسانی است که برای طراحی و انجام روش‌های آنزیمی برای آماده‌سازی کتابخانه‌های توالی‌یابی و اطمینان از این‌که توالی مورد نظر به‌درستی هدف‌گیری^۴، ضبط^۵ و تکثیرشده است مورد نیاز هستند. دیگر افراد مورد نیاز، مهندسان هستند که microfluidics و دستگاه‌های سخت‌افزاری توالی‌یابی را توسعه می‌دهند، یا نقش کارشناسان بیوانفورماتیک برای طیف‌نما از آنالیز صحیح داده‌های تولیدشده و تبدیل آن‌ها به آنالیزهای بامعنی ضروری است. امیدواریم از این کتاب لذت ببرید و آن را حاوی اطلاعات و مرجع مفید بیابید.

La Jolla, CA, USA

1. Click Chemistry
2. Immunoprecipitation
3. Next Generation Sequencing
4. target
5. Captur