

محبوبه جمشیدی، کارشناس ارشد ژنتیک
دکتر امیر هوشنگ نژاده، دکتری علوم آزمایشگاهی



نسل سوم تعیین توالی ژنوم (Third Generation Sequencing)

ساختار و عملکرد نانوحفره‌ها

- ۱- نانوحفره‌ها (Nanopores):
 - نانوحفره‌ها معمولاً پروتئین‌های کانال مانند (مانند α -همولیزین) هستند که در یک غشای مصنوعی تعبیه شده‌اند.
 - قطر نانوحفره‌ها به گونه‌ای است که تنها یک رشته DNA یا RNA می‌تواند از آن عبور کند.

۲- پلیمرهای زیستی:

- پلیمرهای زیستی موادی هستند که از مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها یا اسیدهای نوکلئیک ساخته شده‌اند. این پلیمرها می‌توانند به عنوان نانوحفره‌ها عمل کنند و به مولکول‌های DNA یا RNA اجازه می‌دهند که به طور یکنواخت از طریق آنها عبور کنند.

۳. حسگرهای الکتریکی:

- جریان الکتریکی اعمال شده به غشاء پروتئینی (نانوحفره‌ها) تغییرات ولتاژی ایجاد می‌کند که به واسطه عبور نوکلئوتیدها تغییر می‌یابد.
- هر نوکلئوتید (A, T, C, G) یک الگوی جریان الکتریکی خاص ایجاد می‌کند که توسط حسگرها شناسایی و ثبت می‌شود.

مزایا و کاربردهای Nanopore Sequencing

مزایا:

۱. خوانش طولانی (Long Reads):
 - Nanopore Sequencing قادر است قطعات DNA یا RNA بسیار بلند (تا چند صد هزار جفت باز) را به صورت پیوسته تعیین توالی کند، که این قابلیت برای مطالعه ساختارهای ژنومی پیچیده و تکرارهای بزرگ بسیار مفید است.

تعیین توالی ژنوم به تکنیک‌ها و روش‌هایی اشاره دارد که برای تعیین ترتیب نوکلئوتیدها در DNA یا RNA استفاده می‌شود. پیشرفت‌های اخیر در این حوزه منجر به توسعه فناوری‌های جدید و پیشرفته‌تری شده است که می‌توانند با دقت بیشتر و هزینه کمتر، ژنوم‌ها را تعیین توالی کنند. این دسته از تکنولوژی‌ها توانایی خواندن مولکول‌های منفرد DNA را دارند و برخلاف روش‌های سنتی که نیاز به تکثیر DNA دارند، از خواندن مستقیم مولکول‌ها بهره می‌برند. دو تکنولوژی برجسته نسل سوم تعیین توالی ژنوم عبارتند از:

۱. تکنولوژی Oxford Nanopore (Nanopore Sequencing)

Technologies

تکنولوژی Nanopore Sequencing یکی از پیشرفته‌ترین و نوآورانه‌ترین روش‌های تعیین توالی ژنوم است که توسط شرکت Oxford Nanopore Technologies توسعه یافته است. این تکنولوژی به دلیل قابلیت‌های منحصر به فردش، مورد توجه بسیاری از محققان و آزمایشگاه‌های ژنتیک قرار گرفته است. در ادامه، توضیح تخصصی و کاملی از این تکنولوژی ارائه می‌شود.

اصول پایه Nanopore Sequencing

Nanopore Sequencing به طور مستقیم مولکول‌های DNA یا RNA را از نانوحفره‌ها (nanopores) عبور می‌دهد و تغییرات جریان الکتریکی را که هر نوکلئوتید ایجاد می‌کند، اندازه‌گیری می‌کند. این تغییرات در جریان الکتریکی الگوهای منحصر به فردی دارند که به تشخیص ترتیب نوکلئوتیدها کمک می‌کند.



چالش‌ها و محدودیت‌ها

۱. دقت:

• دقت تعیین توالی نانوپوری به اندازه روش‌های سنتی مانند Illumina نیست. با این حال، پیشرفت‌های اخیر در تحلیل داده‌ها و بهبود تکنولوژی این مشکل را تا حد زیادی کاهش داده است.

۲. هزینه:

• هزینه‌های اولیه برای خرید دستگاه‌های نانوپوری نسبتاً بالاست، هرچند که هزینه‌های عملیاتی و مواد مصرفی در مقایسه با روش‌های دیگر پایین‌تر است.

۳. نرخ خطای بالا در برخی موارد:

• خطاهای مربوط به خوانش و تشخیص نوکلئوتیدها می‌تواند به دلیل نویزهای الکتریکی و تغییرات ناخواسته در جریان الکتریکی رخ دهد.

۲. تکنولوژی Pacific Biosciences Single Molecule (PacBio)

Real-Time, SMRT Sequencing

تکنولوژی PacBio، یکی از تکنولوژی‌های پیشرفته در زمینه تعیین توالی نسل سوم است. این تکنولوژی به دلیل قابلیت‌های ویژه‌ای که دارد، مورد توجه محققان در حوزه ژنومیک و بیوانفورماتیک قرار گرفته است. این روش از پلیمرهای زنده و رنگ‌های فلورسنت برای مشاهده و ثبت نوکلئوتیدهای DNA در زمان واقعی استفاده می‌کند. مزایای این روش شامل خوانش طولانی‌تر، دقت بالا و توانایی کشف تغییرات پیچیده ساختاری در ژنوم است. در ادامه، به تشریح جزئیات تخصصی این تکنولوژی می‌پردازیم.

مبانی تکنولوژی PacBio

۱. روش Single Molecule Real-Time (SMRT) Sequencing:

• تکنولوژی PacBio مبتنی بر روش SMRT است که امکان مشاهده و تعیین توالی مولکول‌های DNA را در زمان واقعی فراهم می‌کند. این روش از یک پلیمرز DNA استفاده می‌کند

۲. تعیین توالی در زمان واقعی (Real-Time Sequencing):

• امکان مشاهده و تحلیل داده‌ها در زمان واقعی وجود دارد که این ویژگی برای کاربردهای تشخیصی و پایش اپیدمی‌ها بسیار ارزشمند است.

۳. قابلیت حمل و نقل بالا:

• دستگاه‌های تعیین توالی نانوپوری کوچک و قابل حمل هستند (مانند MinION)، که امکان استفاده در محیط‌های مختلف را فراهم می‌کنند.

۴. عدم نیاز به تکثیر PCR:

• این روش نیاز به تکثیر PCR ندارد، که باعث کاهش خطاهای تکثیر و حفظ توالی‌های حساس به تکثیر می‌شود.

کاربردها:

۱- ژنتیک پزشکی و تشخیص بیماری‌ها:

• تعیین توالی کامل ژنوم به منظور تشخیص جهش‌های ژنتیکی و بیماری‌های ارثی.
• استفاده در تست‌های تشخیصی سریع و دقیق برای بیماری‌های عفونی مانند کووید-۱۹، ابولا و زیکا.

۲. ژنتیک میکروبی:

• تحلیل تنوع ژنتیکی و مقاومت دارویی در جمعیت‌های میکروبی.
• استفاده در مطالعات متاژنومیک و شناسایی میکروارگانیسم‌های ناشناخته.

۳. تحقیقات زیست محیطی:

• پایش تنوع زیستی در محیط‌های مختلف.
• بررسی تأثیرات زیست محیطی بر تنوع ژنتیکی.

۴. تحقیقات پایه و ساختاری:

• مطالعه ساختارهای پیچیده ژنومی مانند تکرارهای ژنی و مناطق با تغییرات ساختاری زیاد.
• تحلیل اپی‌ژنتیک و بررسی تغییرات متیلاسیون DNA.

دقت بیشتری را فراهم می‌آورد. HiFi Reads قادر به دستیابی به دقت ۹۹/۹٪ است.

تکنولوژی PacBio عمدتاً توسط خود شرکت Pacific Biosciences توسعه داده شده است. این شرکت اولین بار تکنولوژی SMRT (Single Molecule Real-Time) Sequencing را معرفی کرد و دستگاه‌های مختلفی را بر اساس این تکنولوژی به بازار عرضه کرده است. در زیر به برخی از دستگاه‌ها و کمپانی‌های مرتبط با تکنولوژی PacBio اشاره می‌کنم:

دستگاه‌های تولید شده توسط Pacific Biosciences

۱. PacBio RS II:

- یکی از اولین دستگاه‌های مبتنی بر تکنولوژی SMRT که توسط Pacific Biosciences عرضه شد.
- این دستگاه قادر به تولید خوانش‌های بلند با دقت قابل قبول بود و در بسیاری از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی مورد استفاده قرار گرفت.

۲. Sequel System:

- پس از RS II، دستگاه Sequel معرفی شد که دارای ظرفیت و کارایی بالاتری بود.
- این دستگاه بهبودهای زیادی در سرعت، هزینه و دقت نسبت به مدل قبلی داشت و توانایی تولید خوانش‌های طولانی‌تر و با دقت بیشتر را داشت.

۳. Sequel II and Sequel IIe Systems:

- این دستگاه‌ها نسخه‌های بهبود یافته سیستم Sequel هستند.
- Sequel II و Sequel IIe از SMRT Cells جدیدی استفاده می‌کنند که توانایی تولید داده‌های بیشتر و دقیق‌تری را دارند.
- دستگاه Sequel IIe دارای قابلیت‌های بهبود یافته نرم‌افزاری است که تحلیل داده‌ها را ساده‌تر و سریع‌تر می‌کند.
- تکنولوژی HiFi Reads در این دستگاه‌ها ارایه شده است که ترکیبی از خوانش‌های بلند و دقت بالا را فراهم می‌آورد.

کمپانی‌های دیگر در حوزه تکنولوژی تعیین توالی

نسل سوم

در حالی که Pacific Biosciences به عنوان پیشرو در تکنولوژی SMRT شناخته می‌شود، کمپانی‌های دیگری نیز در حوزه تکنولوژی‌های تعیین توالی نسل سوم فعالیت دارند. در زیر به برخی از این کمپانی‌ها اشاره می‌کنم:

که بر روی یک مولکول DNA منفرد کار می‌کند.

- **Zero-Mode Waveguides (ZMWs):** ژنومد ویوگایدها، نانو ساختارهایی هستند که اجازه می‌دهند یک مولکول DNA در هر زمان تحت مشاهده قرار گیرد. ZMW ها نواحی بسیار کوچکی از سطح فلزی هستند که امکان رصد تک مولکول‌ها را در زمان واقعی می‌دهند.

۲. مزایای تعیین توالی PacBio:

- **خوانش‌های بلند:** PacBio توانایی تولید خوانش‌های بلند (Long Reads) تا ۱۰-۱۵ کیلوباز و حتی بیشتر را دارد که برای تعیین توالی مناطق پیچیده ژنوم و تجزیه و تحلیل ساختارهای تکراری مفید است.
- **خطای تصادفی:** خطاهای تکنولوژی PacBio عمدتاً تصادفی هستند و با افزایش عمق پوشش می‌توان آن‌ها را کاهش داد. این ویژگی در تمایز این تکنولوژی از تکنولوژی‌های نسل قبل (مثل Illumina) که خطاهای سیستمی دارند، مؤثر است.
- **زمان واقعی (Real-Time):** تکنولوژی SMRT امکان مشاهده فرآیند سنتز DNA در زمان واقعی را فراهم می‌کند که به بهبود دقت و کارایی کمک می‌کند.

کاربردها و پیشرفت‌های اخیر

۱. کاربردها:

- **ژنومیک ساختاری:** به دلیل توانایی تولید خوانش‌های بلند، PacBio برای مطالعات ژنوم‌های پیچیده و ساختارهای تکراری بسیار مفید است.
- **ترانسکریپتومیک:** این تکنولوژی به دلیل توانایی خوانش‌های بلند، برای تعیین توالی کامل مولکول‌های mRNA و تحلیل ایزوفرم‌های مختلف RNA ایده‌آل است.
- **مطالعات اپی‌ژنتیک:** با استفاده از تکنیک‌های PacBio می‌توان تغییرات اپی‌ژنتیکی نظیر متیلاسیون DNA را نیز مورد مطالعه قرار داد.

۲. پیشرفت‌های اخیر:

- **دقت بالاتر:** نسل جدید سیستم‌های PacBio (مثل Sequel II) دقت بالاتری نسبت به مدل‌های قدیمی‌تر (RS II) دارند. Sequel II با استفاده از SMRT Cells جدید، توانایی تولید داده‌های بیشتر و دقیق‌تر را داراست.
- **تکنولوژی HiFi Reads:** این تکنولوژی ترکیبی از خوانش‌های بلند و دقت بالاست که در خوانش‌های طولانی (Long Reads)

۱. Oxford Nanopore Technologies:

محدودیت‌های واردات تجهیزات علمی پیشرفته می‌شود. با این حال، مراکز تحقیقاتی و دانشگاه‌های برجسته ایران تلاش کرده‌اند تا به جدیدترین تکنولوژی‌های علمی دسترسی پیدا کنند و از آن‌ها در تحقیقات خود استفاده کنند.

- این کمپانی تکنولوژی Nanopore Sequencing را توسعه داده است که مانند PacBio به تولید خوانش‌های بلند شهرت دارد.
- دستگاه‌های معروف این شرکت شامل MinION، GridION و PromethION هستند.

۲. Illumina (با همکاری Pacific Biosciences):

• اگرچه تکنولوژی‌های نسل سوم تعیین توالی ژنوم به طور خاص ممکن است در ایران به طور گسترده در دسترس نباشند، تکنولوژی‌های تعیین توالی نسل دوم مانند دستگاه‌های Ion Torrent (Life Technologies) و Illumina به طور گسترده‌تری در آزمایشگاه‌های ژنتیکی و بیوانفورماتیکی ایران مورد استفاده قرار می‌گیرند.

- Illumina به عنوان یک پیشرو در تکنولوژی‌های نسل دوم (Next-Generation Sequencing) شناخته می‌شود، اما این شرکت در گذشته تلاش‌هایی برای همکاری با Pacific Biosciences جهت توسعه تکنولوژی‌های پیشرفته‌تر انجام داده است.

- در سال‌های اخیر، Illumina و Pacific Biosciences به دلیل مسائل رقابتی و حقوقی، همکاری‌های خود را محدودتر کرده‌اند.

چالش‌ها و محدودیت‌ها:

- **تحریم‌های بین‌المللی:** این تحریم‌ها می‌تواند واردات تجهیزات علمی پیشرفته را محدود کند و یا هزینه‌های آن‌ها را افزایش دهند.
- **هزینه‌های بالا:** دستگاه‌های PacBio بسیار گران‌قیمت هستند و نگهداری و تامین مواد مصرفی آن‌ها نیز هزینه‌بر است، که ممکن است برای بسیاری از مراکز تحقیقاتی ایران چالش‌برانگیز باشد.
- **نیاز به تخصص فنی:** استفاده از این تکنولوژی‌ها نیاز به تخصص فنی بالا و دسترسی به نرم‌افزارهای پیشرفته تحلیل داده دارد که می‌تواند محدودیت‌های اضافی ایجاد کند.
- **تعرفه پایین خدمات آزمایشگاهی و ژنتیکی در ایران.**
- **وضعیت اقتصادی مردم و نیاز به پوشش وسیع‌تر بیمه‌های تکمیلی.**

استفاده در آزمایشگاه‌ها

- دستگاه‌های PacBio به دلیل توانایی تولید خوانش‌های بلند و دقیق، در بسیاری از آزمایشگاه‌های ژنتیکی و بیوانفورماتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این دستگاه‌ها برای کاربردهای مختلفی مانند تعیین توالی ژنوم‌های کامل، مطالعات اپی‌ژنتیک و تحلیل ایزوفرم‌های مختلف RNA بسیار مفید هستند.
- **دانشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی:** بسیاری از دانشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی پیشرو از دستگاه‌های PacBio برای پروژه‌های تحقیقاتی بزرگ استفاده می‌کنند.
- **مراکز پزشکی و تشخیصی:** در برخی موارد، این تکنولوژی برای تشخیص‌های ژنتیکی دقیق و تحلیل‌های پیشرفته پزشکی نیز به کار گرفته می‌شود.

تکنولوژی PacBio همچنان در حال توسعه و بهبود است و با توجه به پیشرفت‌های اخیر، انتظار می‌رود که کاربردهای آن در آینده بیشتر گسترش یابد.

وضعیت تکنولوژی‌های تعیین توالی در ایران

در ایران، دستیابی به تکنولوژی‌های پیشرفته مانند دستگاه‌های تعیین توالی PacBio ممکن است با چالش‌هایی مواجه باشد. این چالش‌ها شامل مسائل مربوط به تحریم‌های بین‌المللی، هزینه‌های بالا، تعرفه پایین خدمات آزمایشگاهی و

منابع

1. nanoporetech.com
2. Quick et al., Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature*. 2016 Feb 11;530(7589):228-232. doi: 10.1038/nature16996. Epub 2016 Feb 3.
3. Jain et al., Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nature Biotechnology* 2018 Vol. 36 Issue 4 Pages 338-345
4. Wang et al., Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nature Biotechnology* 2021 Vol. 39 Issue 11 Pages 1348-1365
5. Rhoads A, Au K. F., PacBio Sequencing and its Applications. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 2015 Vol. 13 Issue 5 Pages 278-289
6. Lee H et al., Third-generation sequencing and the future of genomics. *bioRxiv* 2016 Pages 048603