مقاله علمی

توالی یابی پروتئین و اسیدهای نوکلئیک با استفاده از تکنیک نانوپور تحولی در ژنتیک ملکولی

- عبدالله رضاقلی وند، دانشجویان کارشناسی ارشد رشته ی ژنتیک و اصلاح دام دانشگاه تهران
- اصغربزازپریخانی، دانشجویان کارشناسی ارشد رشته ی ژنتیک و اصلاح دام دانشگاه تهران
- عباس پاکدل، دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه تهران

اشاره

صنعت توالی یابی DNA یا RNA شامل تکنولوژی و روش هایی است که برای تعیین ترتیب بازهای نوکلوتیدی آدنین، سیتوزین، گوانین و تیمین یا یوراسیل موجود در مولکول DNA یا RNA استفاده می شوند. این صنعت به سرعت در حال پیشرفت است، بطوریکه باعث توسعه در تحقیقات بنیادی از قبیل کشاورزی، بیوتکنولوژی، علم پزشکی قانونی و بالینی شده است(۳).در حال حاضر روشهای متعددی برای توالی یابی موجود است که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارند. اکثر این روشها نیاز به مواد شیمیایی گران قیمت برای نشاندار کردن و آماده سازی نمونه داشته و از طرفی توالی یابی رشته های طولانی توسط آنها امکان پذیر نیست. از جمله این روش ها می توان روش ماگسام گیلبرت را نام بردکه بر پایه ایجاد شکاف در رشته اسید نوکلئیک با استفاده از مواد شیمیایی عمل می کند.ابداع روش ماگسام و گیلبرت باعث شد تا به دنبال آن فردریک سانگر تکنیک سریعتر و با بازدهی بالاتری را برای توالی یابی DNA ابداع کند که به همین منظور موفق به اخذ جایزه نوبل شیمی نیز شد. ویژگی کلیدی روش سانگر این است که دی دئوکسی نوکلوتید تری فسفات ها (ddNTPs) به مخلوط واکنش اضافه می شوند. ddNTPs فاقد گروه هیدروکسیل ۳' قنددزوکسی ریبوز هستند و لذا به علت نبود OH، پیوند فسفو دی استری بین یک نوکلوتید و نوکلوتید بعدی امکان پذیر نیست، لذا در هنگام تکثیر، زنجیره با رسیدن به ddNTPs مورد نظر خاتمه پیدا می کند(۲). تکنیک های توالی یابی خودکار بر پایه روش سانگر توسط شرکت هایی مانند Applied Biosystems که از رنگ های فلورسنت مختص به هر ddNTPs استفاده می کنند، توسعه داده شد. توالی یابی DNA با استفاده از تکنیک نانوپور روشی است که جدیدا مورد توجه محققین قرار گرفته است(۳). ایده ی اولیه استفاده از این تکنیک برای توالی یابی بیش از ۲۰ سال پیش پیشنهاد شده است. در این مقاله اصول تکنیک نانوپور و مکانیسم استفاده از آن در تعیین توالی پروتئین و اسیدهای نوکلئیک را به همراه معایب و مزایای آن مرور می کنیم.

مقدمه

نخستین آزمایشات توالی یابی اسیدهای نوکلئیک با دستگاه نانوپور(دارای ریزمنافذ آلفاهمولیزین) توسط Deamer و Akeson در سال ۱۹۹۶ دردانشگاه کالیفرنیا انجام شد(۵). شرکت «آکسفورد نانوپور» در سال ۲۰۰۵ توسط دانشگاه آکسفورد تاسیس شد. دستگاه نانوپوربه اندازه یک حافظه یو.اس.بی بوده که قادر به تعیین توالی DNA درکمتر ازچند ساعت است.این دستگاه به منظور تعیین توالی رشته دی‌ان‌ای، پروتئین، RNA و... ساخته شده است. یکی از این دستگاه‌ها موسوم به «GridION» به اندازه یک دستگاه دی‌وی‌دی پلیر است(شکل۱). دستگاه‌های یاد شده را می‌توان روی هم سوار و متصل کرده تا سرعت آنها افزایش یابد. دستگاه دیگر موسوم به « «MinION است که قیمت آن کمتر از ۹۰۰ دلار برآورد شده و به اندازه یک حافظه یواس‌بی است(۹).

دستگاههای رمزگشای DNA موجود در بازار، ساخت شرکت‌های ایلومینا و لایف تک بسیار بزرگتر بوده و زمان پاسخگویی آنها نیز بسیار طولانی‌تر است. شرکت سازنده دستگاه نانوپور، محصولش را در تاریخ هفدهم فوریه سال۲۰۱۲در کنفرانس پیشرفت در فناوری زیست‌شناسی ژنتیکی که در جزیره مارکو ایالت فلوریدا برگزار شد، در معرض نمایش قرارداد(۲).

مواد بیولوژیکی که توسط نانوپورها شناسایی می شوند شامل مواردی از قبیل: بافت، میکروارگانیسم، گیرنده های سلولی، آنتی بادیها، اسیدهاینوکلئیک، پروتئین ها، باز های تغییریافته، آنزیم ها وغیره هستند. از این فناوری در آزمایشات مربوط به تعیین سریع توالی ژنی بیماری‌های عفونی با سرعت جهش بالا مانند ایدز و مالاریا و لذا تشخیص چگونگی درمان آنها، غربالگری DNA پیش از تولد برای نقایص ژنتیکی، نظارت بر جهش‌های ژنتیکی گیاهان، برای تشخیص سرطان (با استفاده از نمونه‌های برداشته شده) ومشخص کردن هویت تکه‌های استخوانی کشف شده در باستان‌شناسی کاربرد خواهد داشت(۹).

تکنیک نانوپورها بر اساس منافذشان به سه دسته تقسیم می شوند:

۱-نانوپورهای بیولوژیکی:معمولاً منافذ این نوع نانوپور ها از پروتئینی پوشانده شده است که دریک غشای دولایه لیپیدی قرار گرفته و این منافذ شبیه کانال های پروتئینی موجود در غشای سلولی هستند.

۲-نانوپورهای حالت جامد: این نانوپورها منافذی به اندازه نانومترداشته و در یک غشای سنتتیک قرارگرفته اند (معمولاً SiO_2). این منافذ معمولاًازمواد سنتتیک از قبیل سیلیکون نیتریت یا گرافن تشکیل شده اند.

۳-منافذ های هیبرید: منافذ پروتئینی در داخل یک غشای جامد به جای غشای دو لایه لیپیدی قرار می گیرد(۹).

نانوپورهای حالت جامد پیشرفته تر ازنانوپورهای بیولوژیکی هستند.مزیت نانوپورهای بیولوژیکی نسبت به حالت جامد این است که با هزینه کمتری قابل تولید بوده و به وسیله تغییر ژنتیکی به راحتی قابل تغییر هستند(۲).

مواد بیولوژیکی که توسط نانوپورها شناسایی می شوند شامل مواردی از قبیل: بافت، میکروارگانیسم، گیرنده های سلولی، آنتی بادیها، اسیدهاینوکلئیک، پروتئین ها، باز های تغییریافته، آنزیم ها وغیره هستند. از این فناوری در آزمایشات مربوط به تعیین سریع توالی ژنی بیماری‌های عفونی با سرعت جهش بالا مانند ایدز و مالاریا و لذا تشخیص چگونگی درمان آنها، غربالگری DNA پیش از تولد برای نقایص ژنتیکی، نظارت بر جهش‌های ژنتیکی گیاهان، برای تشخیص سرطان (با استفاده از نمونه‌های برداشته شده) ومشخص کردن هویت تکه‌های استخوانی کشف شده در باستان‌شناسی کاربرد خواهد داشت(۹).

توالی یابیDNA:

تولی یابی DNA توسط نانوپورها به دو صورت انجام می شود: حالت اول عبوریک رشته کامل DNA از میان ریز منافذ پروتئینی نانوپور است، که دراین روش تک تک بازهای رشته ی DNA هنگام عبور ازمیان منافذ پروتئینی قابل تشخیص هستند. هنگام عبور یک پلیمر DNA از میان ریز منافذ درهرزمان یک بازانفرادی DNA روزنه منافذ را اشغال می کند.برای عبور رشته DNA از میان منافذ یک روش کنترل شده مورد نیاز است که در این روش از آنزیم های بسیار اختصاصی مانند phi29-DNApolymerase استفاده می شود.

حالت دوم عبور نوکلئوتید ها ازمنافذپروتئینی است که توسط آنزیم اگزونوکلئاز رشته DNA جدا شده است. در این روش آنزیم اگزونوکلئاز به ریزمنافذ پروتئینی متصل شده وبه دنبال آن این آنزیم، بازها را به ترتیب از رشته DNA جدا می کنند.

این بازها قبل از عبور از ریزمنافذ با آن یک اتصال برقرارکرده واین اتصال باعث کاهش جریان یون از ریزمنافذ شده واین افت جریان در شناسایی بازهای توالی DNA حائز اهمیت است(۳).

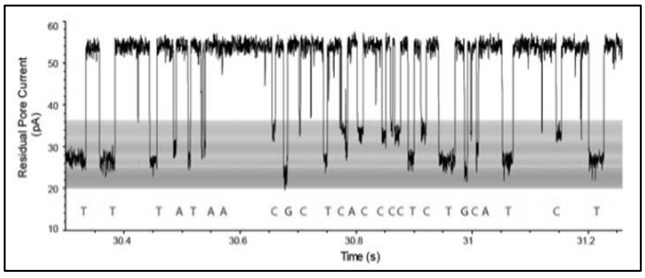
نوع طبیعی ریزمنافذ آلفا همولیزین به علت محدودیت دراندازه، تنوع و ثبات به تنهایی توانایی تشخیص بازهای DNA را ندارد، اما تکنیک جدید با استفاده از روش های مهندسی پروتئین، توانایی تشخیص بازهای DNA را دارد(۳).تغییرات شیمیایی درنانوپور از قبیل اتصال کوالانسی سیکلودکسترین به سطح داخلی روزنه در نانوپور است که این عمل باعث شناسایی دقیق تر بازهای انفرادی DNA حین عبورازریزمنفذ ها می شود.

علاوه بر این باعث شناسایی بازهای تغییریافته مثل متیلاسیون سیتوزین می شود.در اوایل سال ۱۹۹۶برای توالی یابی DNA تک رشته ای توسط منافذ پروتئینی آلفا همولیزین ازپتانسیل عمل استفاده می شد ولی امروزه ازعبورجریان الکتریکی از میان منافذ استفاده می شود(۳).

در روش منافذ پروتئینی آلفا همولیزین نرخ جا بجا شدگی رشته DNA در طی ایجاد پتانسیل عمل افزایش می یابد لذا برای کاهش جابجا شدگی DNA از آنزیم ها استفاده می شود. بنابراین برای شناسایی اسیدهای نوکلئیک در تکنیک جدید لازم است که رشته ها به حالت سکون در آورده شوند(۳).

شکل ۱- تصویر دستگاه GridION

شکل ۲ ردیابی الکترونیکی بازهای DNA در محلول داخل نانوپورآکسفوردرا نشان می دهد. بازها به طور انفرادی با اتصال به آداپتور سیکلودکسترین از ریز منافذ می گذرند. در هر بار عبور بازها از میان ریز منافذ جریان یونی قطع می شود. در این دیاگرام براساس مقدار قطع بازهای مختلف آدنین، تیمین، گوانین و سیتوزین قابل شناسایی هستند.(۶و۸)



شکل۲:ردیابی الکترونیکی بازهای DNAدر محلول داخل نانوپور آکسفورد

توالی یابی :RNA

سیستم GridION علاوه بر توالی یابی DNA برای آنالیز مستقیم RNA نیز طراحی شده است.

توالی یابی پروتئین ها:

در حال حاضر روش های قابل اطمینان برای آنالیز پروتئین ها به کندی در حال پیشرفت است. مزیتی که نانوپور های پروتئینی دارند این است که سنسورهای قابل تغییر برای مولکول های کوچک تا مولکول های بزرگ مثل پروتئین را دارا می باشند.یک روش الکترونیکی خاص آنالیز پروتئین مثل نانوپورها می تواند برای محققانی که به دنبال کشف پروتئین جدید هستند مفید باشد.

تکنیک نانوپور روش هایی رابرای آنالیز الکترونیکی مستقیم پروتئین ها بوسیله ترکیب نانوپورها با آپتامرها فراهم می کند.آپتامر یک الیگونوکلئیک اسید است که می تواند به طور اختصاصی به یک جایگاه روی پروتئین هدف متصل شودکه این کمپلکس آپتامر-پروتئین هنگام گذراز ریز منافذ باعث قطع جریان شده و در نتیجه سیگنالهای آن ثبت می شود و این کمپلکس آپتامر-پروتئین برگشت پذیر است.

طول مدت ترکیب آپتامر-پروتئین، فرصت بیشتری را برای شناسایی پروتئین توسط دستگاه ایجاد می کند. همچنین فرکانس ایجاد شده توسط این ترکیب، اطلاعاتی درباره غلظت پروتئین نیزدر اختیار می گذارد(۷و۹).

آنالیز مولکول های کوچک:

تکنولوژی نانوپور همچنین می تواند مولکول های کوچک را نیز آنالیز کند. مولکول های کوچکی که توسط نانوپورها قابل شناسایی است شامل موارد ذیل می باشد:

۱- ریزمولکول های فعال زیستی: توکسین ها، ویتامین ها، کافئین، کوکائین، هروئین و غیره.

۲- ترکیبات سنتتیک: توکسین ها، ایبوپروفن.

۳- مولکول های غیر فعال از نظر زیستی: مواد منفجره، رنگ ها،آلاینده های شیمیایی(۹).

مشکلی که در توالی یابی DNA توسط نانوپورها وجود دارد این است که سرعت عبور رشته ی DNA ازنانوپورخیلی سریع می باشد. برای حل این مشکل راه حل هایی مانند اتصال پروتئین به انتهایDNA، تجهیز شدن آلفا همولیزین با سیکلو دکسترین، استفاده ازDNA پلی مرازی که توسط Akeson وهمکاران از فاژ۲۹گرفته شده است ارائه گردیدکه هر سه روش سرعت حرکت رشته ی DNA را کند می کند. ویژگی DNAپلی مراز phi29 این است که به DNA تک رشته ای متصل شده، حتی درمقابل نیروی ولتاژ ایجاد شده که برای عبوررشته ی DNA به داخل منافذ لازم است؛ مقاومت ایجاد می کند(۵).

برتری روش نانوپور:

۱- پیش گویی‌های ژنتیکی در خصوص بروز شرایط خاص و بیماری‌هایی مانند سرطان، دیابت یا اعتیاد

۲- صرفه جویی در زمان و هزینه

۳-استفاده از توالی کل ژنوم به جای استفاده از چیپ های K3000، K 750، K 250، K 56، K 60، K 55 و K 6000 به ترتیب در انسان، گاو، سگ، گوسفند، خوک، اسب و جوجه اسنپی در تحقیقات.

۴-نکته جالب این است که در این روش توالی یابی نیازی به مرحله زمان‌بر تقویت DNA نیست و علاوه بر این، با این شیوه بدون نیاز به تکه تکه کردن DNA می‌توان رشته‌هایی با طول حدود ده ها هزار باز را توالی یابی کرد.

منابع:

۱.امتیازی، گیتی. ۱۳۸۹.مبانی زیست مولکولی و مهندسی ژنتیک (تألیف). انتشارات مانی

2. Eisenstein M. 2012.Oxford nanopore announcement sets sequencing sector abuzz. NatBiotechnol. 30(4),295-296

3. Schneider G.F, Dekker C.2012.DNA sequencing with nanopores.NatBiotechnol. 30(4):326-8

4. Stoddart D , Heron A.J, Mikhailova E, Maglia G and Bayley H .2009.Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore. PNAS: 7702–7707.

5. Deamer D .W. and Akeson M.2000.Nanopores and nucleic acids: prospects forultrarapid sequencing. Elsevier Science Ltd:147-151

6. Kowalczyk S W, BlosserT R and Dekker C.2011. Biomimetic nanopores: learning from and about nature , Elsevier Science Ltd:18

7.Branton.H .et al.2007 . Single-molecule analysis of DNA-protein complexes using nanopores.Nature Publishing Group: Nature Methods:315 - 317

8. C James .et al. 2009. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. Nature Nanotechnology :265 - 270

9. www.nanopretech.com